ARTVİN ERZİNCAN ERZURUM IĞDIR İLLERİNDE BAZI MEYVE VE SEBZELERDE YUMUŞAK ÇÜRÜKLÜĞE SEBEP OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE KARAKTERİZASYONU

Fatih DADAŞOĞLU

Doktora Tezi
Bitki Koruma Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Recep KOTAN
2013
Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ARTVİN ERZİNCAN ERZURUM IĞDIR İLLERİNDE BAZI MEYVE VE SEBZELERDE YUMUŞAK ÇÜRÜKLÜĞE SEBEP OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE KARAKTERİZASYONU

Fatih DADAŞOĞLU

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

ERZURUM
2013

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

Artvin, Erzincan, Erzurum, Iğdır İllerinde Bazı Meyve ve Sebzelerde Yumuşak Çürüklüğe Sebep Olan Bakterilerin İzolasyonu, Klasik ve Moleküler Yöntemler İle Karakterizasyonu

Doç. Dr. Recep KOTAN danışmanlığında, **Fatih DADAŞOĞLU** tarafından hazırlanan bu çalışma 11/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Bitki Koruma** Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği/~~oy çokluğu~~** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR	*İmza* :
Üye	: Prof. Dr. Erol YILDIRIM	*İmza* :
Üye	: Prof. Dr. Soner SOYLU	*İmza* :
Üye	: Prof. Dr. Hidayet BOSTAN	*İmza* :
Üye	: Doç. Dr. Recep KOTAN	*İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2012/ 262

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

ÖZET

Doktora Tezi

ARTVİN ERZİNCAN ERZURUM IĞDIR İLLERİNDE BAZI MEYVE VE SEBZELERDE YUMUŞAK ÇÜRÜKLÜĞE SEBEP OLAN BAKTERİLERİN İZOLASYONU KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE KARAKTERİZASYONU

Fatih DADAŞOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Recep KOTAN

Bu çalışmada; Artvin, Erzincan, Erzurum ve Iğdır il ve ilçelerinde bazı meyve ve sebzelerde yumuşak çürüklük oluşturan bakteriyel etmenlerin izolasyonu, klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanılanması amaçlanmıştır. Bu amaçla yumuşak çürüklük belirtisi gösteren meyve ve sebzelerin gövde, yaprak, meyve ve yumrularından izolasyonlar yapılmış ve elde edilen bakteriler saflaştırılarak kültüre alınmıştır. Kültüre alınan izolatlardan aşırı duyarlılık testi (HR), patojenite testi ve pektolitik aktivite testi pozitif olanlar klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanılanmıştır.

Araştırma sonucunda elde edilen toplam 882 bakteri izolatının 868 tanesi mikrobiyal tanı sistemi (MIS) kullanılarak tanılanırken 14 tanesi tanılananamamıştır. Bu izolatlar arasında MIS tanı sonucuna göre; 18 *Bacillus pumilus*, 17 *Enterobacter cloacae*, 15 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 8 *Chryseobacterium indologenes*, 7 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, 9 *Pseudomonas viridiflava* ve 5 *Dickeya chrysanthemi* olmak üzere toplam 79 yumuşak çürüklük etmeni olduğu belirlenmiştir. Patojen olduğu belirlenen bu izolatlar ayrıca BIOLOG sistemi kullanılarak da tanılanmıştır. MIS ve BIOLOG testleri sonucunda bütün izolatlar arasında tam bir uyum olmamakla birlikte, 40 izolat arasında cins ve/veya tür seviyesinde benzerlik tespit edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testlerinden 16S rDNA testleri sonucunda izolatların cins düzeyinde tanısı yapılmıştır. Rep, ERIC ve BOX testleri sonucunda izolatların genomik parmak izi belirlenerek izolatlar arasındaki filogenetik ilişki belirlenmiştir. MIS tanı sonucuna göre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olarak tanılanan 15 izolat, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* olarak tanılanan 7 izolat ve *Dickeya chrysanthemi* olarak tanılanan 5 izolat sırası ile Y1-Y2, ECA1f-ECA2r ve ADE1-ADE2 primerleri kullanılarak spesifik PCR testlerine tabi tutulmuştur. Spesifik PCR testleri sonucunda; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatlarının 4'ünün 434 bp uzunluğunda bant verdiği, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* izolatlarının bant vermediği ve *Dickeya chrysanthemi* izolatlarının ise 50-150 bp arasında tek bant verdiği görülmüştür.

2013, 130 sayfa

Anahtar Kelimeler: Yumuşak çürüklük, Pektolitik bakteriler, MIS, PCR

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

ISOLATION AND CLASSICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BACTERIA WHICH CAUSE SOFT ROT IN SOME FRUITS AND VEGETABLES IN ARTVIN ERZINCAN ERZURUM AND IGDIR PROVINCES

Fatih DADASOGLU

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Recep KOTAN

In this study isolation, classical and molecular characterization of bacterial disease agents, which cause soft rot in some fruits and vegetables in Artvin, Erzincan, Erzurum and Iğdır provinces, was aimed. For this purpose, isolations were made from stems, leaves, fruits, and tubers of plants, which show soft rot symptoms, and the obtained bacteria were purified and cultivated. Among the cultivated bacteria, isolates having hyper reaction (HR), pathogenity and pectolytic activity positives were identified by using classical and molecular methods.

In our study, a total of 882 bacterial isolates were obtained and of these 868 were identified by MIS, while 14 could not be identified. According to MIS identification results a total of 79 soft rot bacteria were determined, of which 18 were *Bacillus pumilus*, 17 were *Enterobacter cloacae*, 15 were *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 8 were *Chryseobacterium indologenes*, 7 were *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, 9 were *Pseudomonas viridiflava*, 5 and were *Dickeya chrysanthemi*. These isolates, which were determined as pathogens, were also identified using BIOLOG system. Although there is no complete match between results of MIS and BIOLOG tests, 40 isolates were found to match at genus and/or species level. Of the PCR tests, 16S rDNA tests were used to identify isolates at genus level. Using Rep, ERIC and BOX tests, genomic fingerprints of isolates and phylogenetic relationship between isolates were determined. Fifteen isolates identified as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 7 isolates identified as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* and 5 isolates identified as *Dickeya chrysanthemi* according to MIS identification results, were spesific PCR tested using Y1-Y2, ECA1f-ECA2r, and ADE1-ADE2 primers, respectively. Spesific PCR results indicate that 4 of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates give a band of 434 bp long, while *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* isolates give no band and *Dickeya chrysanthemi* isolates give single band of 50-150 bp long.

2013, 130 pages

Keywords: Soft rot, pectolytic bacteria, MIS, PCR.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen fikir ve tecrübeleri ile daima bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Recep KOTAN'a, tez izleme komitesinde yer alan ve fikirleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ömer FARUK ALGUR ve Sayın Prof. Dr. Erol YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Fikirleri ve becerileri ile hep yanımda olan değerli dostum ve mesai arkadaşım Sayın Arş. Gör. Kenan KARAGÖZ'e, daima ilgisini ve desteğini gördüğüm değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Yalçın KARAGÖZ'e, burada isimlerini sayamadığım, birlikte çalışmaktan büyük zevk duyduğum, aynı zamanda çok şey öğrendiğim değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma, hayatımın her döneminde bana destek olan sevgili eşime ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Fatih DADAŞOĞLU
Mayıs 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 8
3. MATERYAL ve YÖNTEM 28
3.1. Materyal 28
3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar 28
3.1.2. Kullanılan besi yerleri ve çözeltilerin hazırlanışı 29
3.2. Yöntem 34
3.2.1. Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması ve laboratuvara getirilmesi 34
3.2.2. Bakterilerin izolasyonu ve stoklanması 35
3.2.3. İzolatların MIS sistemi ile yağ asiti profillerinin belirlenmesi ve tanılanması 35
3.2.4. Tütünde aşırı duyarlılık (Hypersensitivity (HR)) testi 37
3.2.5. Patojenite testi 37
3.2.6. Pektolitik aktivite testi 38
3.2.7. Klasik yöntemler 38
3.2.8. Bakterilerin BIOLOG sistemi ile metabolik enzim profillerinin belirlenmesi ve tanılanması 42
3.2.9. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 49
4.1. Genel Bakteri İzolatlarının MIS Tanı Sonucu, Lokasyon ve Konukçu Dağılımları 49
4.2. Patojenite ve Pektolitik Aktivite Test Sonuçları Pozitif Olan İzolatların MIS ve BIOLOG Sonuçları ile HR Testi Sonuçları 58

4.3. Patojen İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları 69
4.4. Patojen İzolatların Yağ Asidi Metil Ester Grupları 78
4.5. Patojen İzolatların Metabolik Enzim Profillerinin Belirlenmesi 83
4.6. PCR Sonuçları 88
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 102
KAYNAKLAR 118
ÖZGEÇMİŞ 131

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Cm	Santimetre
dH_2O	Distil su
Dk	Dakika
G	Gram
HCl	Hidroklorik asit
Kg	Kilogram
L	Litre
Mg	Miligram
Ml	Mililitre
mol	Mol
NA	Nutrient agar
NaClO	Sodyum hipoklorit
Sa	Saat
sdH_2O	Steril ve distil su
sH_2O	Steril su
Sn	Saniye
TSA	Tyripticase Soy Agar
TSB	Tyripticase Soy Broth
$CaCO_3$	Kalsiyum karbonat
bp	Baz çifti
mM	Milimolar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
MIS	Mikrobiyal tanı sistemi
rpm	Santriüj dönüş hızı
ng	Nanogram
V	Volt
µg	Mikrogram
HR	Tütünde aşırı duyarlılık testi
MIS	Mikrobiyal tanı sistemi
FAME	Fatty acid methyl ester

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Farklı konukçularda yumuşak çürüklük simptomları 49
Şekil 4.2. HR testi 63
Şekil 4.3. Çilekte patojenite testi 63
Şekil 4.4. Dutda patojenite testi 64
Şekil 4.5. Hıyarda patojenite testi 64
Şekil 4.6. Kabakta patojenite testi 65
Şekil 4.7. Domateste patojenite testi 65
Şekil 4.8. Patlıcanda patojenite testi 66
Şekil 4.9. Turpta patojenite testi 66
Şekil 4.10. Patateste patojenite testi 67
Şekil 4.11. Soğanda patojenite testi 67
Şekil 4.12. Domatesde patojenite testi 68
Şekil 4.13. Patates dilimlerinde pektolitik aktivite testi 68
Şekil 4.14. Eritromisine duyarlılık test sonuçları; 71
Şekil 4.15. %5 NaCl'ye tolerans sonuçları 71
Şekil 4.16. Fosfataz aktivitesi test sonucu 72
Şekil 4.17. İndol üretimi test sonucu 72
Şekil 4.18. Karbonhidratlardan asit üretimi test sonucu 73
Şekil 4.19. Pcc: *P.c.* ssp. *carotovorum,* Pca: *P.c.* ssp. *atrosepticum,* Dc: *D. chrysanthemi* ve Ec: *E. cloacae* 16S rDNA bant görüntüleri 89
Şekil 4.20. Ec: *E. cloacae,* Ci: *C. indologenes,* Bp: *B. pumilus* ve Pv: *P. viridiflava* 16S rDNA bant görüntüleri 89
Şekil 4.21. Pcc: *P.c.* ssp. *carotovorum,* **Pca:** *P.c.* ssp. *atrosepticum* ve **Dc:** *D. chrysanthemi* izolatları Rep PCR görüntüleri 92
Şekil 4.22. *E. cloacae* izolatları Rep PCR görüntüleri 92
Şekil 4.23. *B. pumilus* izolatları Rep PCR görüntüleri 92
Şekil 4.24. *P. viridiflava* izolatları Rep PCR görüntüleri 92
Şekil 4.25. *C. indologenes* izolatları Rep PCR görüntüleri 92
Şekil 4.26. Pcc: *P.c.* ssp. *carotovorum,* **Pca:** *P.c.*ssp. *carotovorum* ve görüntüleri 95

Şekil. 4.27. *Enterobacter cloacae* izolatları ERIC PCR **Dc:** *D. chrysanthemi* izolatları ERIC PCR görüntüleri 95
Şekil 4.28. *Bacillus pumilus* izolatları ERIC PCR görüntüleri 95
Şekil 4.29. *P. viridiflava* izolatları ERIC 95
PCR görüntüleri 95
Şekil 4.30. *Chryseobacterium indologenes* izolatları ERIC PCR görüntüleri 95
Şekil 4.31. Pcc: *P.c.* ssp. *carotovorum*, **Pca:** *P.c.*ssp. *carotovorum* ve **Dc:** *D. chrysanthemi* izolatları BOX PCR görüntüleri 98
Şekil 4.32. *Enterobacter cloacae* izolatları BOX PCR görüntüleri 98
Şekil 4.33. *Bacillus pumilus* izolatları BOX PCR görüntüleri 98
Şekil 4.34. *P. viridiflava* izolatları BOX PCR görüntüleri 98
Şekil 4.35. *Chryseobacterium indologenes* izolatları BOX PCR görüntüleri 98
Şekil 4.36. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*'a spesifik Y1 ve Y2 primerlerinde pozitif sonuç veren izolatlar 101
Şekil 4.37. *D. chrysanthemi*'ye spesifik ADE1 ve ADE2 primerlerinde pozitif sonuç veren izolatlar 101
Şekil 4.38. *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*'a spesifik ECA1f ve ECA2r primerleri ile yapılan spesifik PCR test sonucu 101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya yaş sebze üretimi ilk 10 ürün (ton).....1
Çizelge 1.2. Yaş sebze üreticisi ülkeler (ton) 2
Çizelge 1.3. Dünya yaş meyve üretiminde ilk 10 ürün (ton).....3
Çizelge 1.4. Yaş meyve üreticisi ülkeler (ton).....3
Çizelge 3.1. İzolatların tanısında kullanılan PCR metotları 47
Çizelge 4.1. MIS tanı sonucuna göre belirlenen türlerin konukçu ve lokasyon bilgileri 53
Çizege 4.2. Patojen bakterilerin MIS ve BIOLOG tanı sonucu, izolasyon bilgileri ile HR, patojenite ve pektolitik aktivite test sonuçları 60
Çizelge 4.3. Morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları 74
Çizelge 4.4. Patojen izolatların içerdikleri yağ asidi metil esterlerinin maksimum, minimum ve ortalama değerleri 80
Çizelge 4.5 MIS sonucunda elde edilen dendogram.....82
Çizelge 4.6. Gram pozitif bakterilerin biyolog dendogramı 84
Çizelge 4.7. Gram negatif bakterilerin biyolog dendogramı 85
Çizelge 4.8. İzolatların GP2 kitinde kullandığı karbon kaynaklarının yüzde oranları ...87
Çizelge 4.9. İzolatların GN2 kitinde kullandığı karbon kaynaklarının yüzde oranları...88

1. GİRİŞ

Beslenme açısından çok önemli bir yer tutan meyve ve sebzeler; vitaminler ve mineral maddelerce zengin olup sağladıkları kaloriler, kalsiyum, demir ve fosfor bakımından büyük önem arz etmektedir. Özellikle vücut direncinin artmasına, sindirim sisteminin çalışmasına kadar insan sağlığı açısından da önemli bir yere sahip olan meyve ve sebzelerin kanser, kalp hastalıkları ve felç riskini azalttığı, fazla meyve ve sebze tüketimi sonucunda bağırsak kanserinde %18 ve mide kanserinde %28 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir (Akbay vd 2005). Sağlık ve beslenme açısından bu kadar büyük öneme sahip olan meyve ve sebzeler aynı zamanda tüm dünya ülkeleri açısından tarımsal ekonominin en büyük payını oluşturmaktadır.

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nün en güncel verileri olan 2010 yılı verilerine göre; dünyada 52,7 milyon hektar alanda yaş sebze üretimi yapılmaktadır. Söz konusu alanda yetiştirilen toplam yaş sebze 965 milyon ton olup, domates yaklaşık 145,6 milyon tonluk üretimi ile dünyada en çok yetiştirilen yaş sebze ürünüdür. Domates ürününü, sırasıyla karpuz (89,1 milyon ton), kuru soğan (74,2 milyon ton), lahana (58,0 milyon ton), hıyar ve kornişon (57,6 milyon ton) ürünleri takip etmektedir. 2010 yılı itibarıyla toplam yaş sebze üretiminde 2009 yılına kıyasla %4,7 oranında azalma meydana gelmiş olup Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Dünya yaş sebze üretimi ilk 10 ürün (ton)

Sıra	Ürün adı	2009	2010	Değişim (%)
1	Domates	153.884.368	145.652.579	-3,16
2	Karpuz	98.265.472	89.153.514	-9,27
3	Kuru soğan	72.033.629	74.220.950	3,04
4	Lahana	65.344.052	58.023.731	-11,20
5	Hıyar ve kornişon	60.693.007	57.556.880	-5,17
6	Patlıcan	43.064.343	41.829.973	-2,87
7	Havuç ve şalgam	33.296.898	33.663.365	1,10
8	Biber	28.464.329	27.518.904	-3,32
9	Marul ve hindiba	23.939.770	23.612.763	-1,37
10	Kabak	22.548.166	22.396.399	-0,67
Genel toplam		1.013.014.041	965.751.346	-4,67

FAO'nun 2010 yılı verilerine göre; 473 milyon tonluk üretimi ile Çin Halk Cumhuriyeti dünyada en fazla yaş sebze yetiştiren ülke konumundadır. Bunu sırasıyla Hindistan (99,7 milyon ton) ve ABD (35,3 milyon ton) takip etmektedir. Ülkemiz 25,8 milyon tonluk yaş sebze üretimi ile dünya sıralamasında 4 üncü sırada yer almakta ve küresel yaş sebze üretiminden %2,7 oranında pay almaktadır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Yaş sebze üreticisi ülkeler (ton)

Sıra	Ülke adı	2009	2010	Değişim (%)
1	Çin Halk Cumhuriyeti	522.650.882	473.094.711	-9,5
2	Hindistan	90.791.030	99.680.370	9,8
3	A.B.D	37.289.727	35.293.556	-5,4
4	**Türkiye**	**26.701.543**	**25.831.193**	**-3,3**
5	Mısır	21.397.574	19.516.402	-8,8
6	İran	18.120.929	18.678.490	3,1
7	İtalya	14.466.672	13.499.277	-6,7
8	Rusya Federasyonu	14.827.060	13.233.450	-10,7
9	İspanya	11.327.474	12.125.391	7,0
10	Meksika	11.327.474	12.125.391	7,0
11	Nijerya	8.703.608	11.055.900	27,0
12	Japonya	11.504.073	11.034.200	-4,1
13	Brezilya	11.073.981	10.032.406	-9,4
14	Endonezya	9.532.972	9.586.496	0,6
15	Güney Kore	11.276.846	9.401.222	-16,6
Genel toplam		1.013.014.040	965.751.348	-4,7

Yine FAO'nun en güncel verileri olan 2010 yılı verilerine göre; dünyada toplam 55,7 milyon hektarlık arazide yaş meyve üretimi yapılmıştır. Söz konusu alanda yetiştirilen toplam yaş meyve 609 milyon ton olup, yaklaşık 102 milyon tonluk üretim miktarı ile muz, dünyada en çok yetiştirilen yaş meyve ürünüdür. Muz ürününü, sırasıyla elma (69,6 milyon ton), portakal (69,5 milyon ton), üzüm (68,3 milyon ton) ve mango (38,7 milyon ton) ürünleri takip etmektedir. Dünya yaş meyve üretimi 2010 yılında 2009 yılına kıyasla %3,8 oranında artış kaydetmiş olup, Dünya yaş meyve üretiminde ilk on ürün Çizelge 1.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Dünya yaş meyve üretiminde ilk 10 ürün (ton)

Sıra	Ürün adı	2009	2010	Değişim (%)
1	Muz	95.816.627	102.114.819	6,57
2	Elma	70.516.242	69.567.526	-1,35
3	Portakal	67.594.523	69.507.617	2,83
4	Üzüm	67.901.744	68.350.535	0,66
5	Mango	35.617.696	38.673.116	8,58
6	Plantaın	36.719.005	36.561.851	-0,43
7	Armut	22.480.320	22.638.098	0,70
8	Mandarin	21.967.158	21.317.592	-2,96
9	Şeftali	20.389.575	20.278.439	-0,55
10	Ananas	19.099.017	19.418.306	1,67
Genel toplam		595.555.679	609.369.083	2,32

FAO'nun 2010 yılı verilerine göre; 122 milyon tonluk üretimi ile Çin Halk Cumhuriyeti dünyada en fazla yaş meyve yetiştiren ülke konumundadır. Bu ülkeyi sırasıyla Hindistan (84,7 milyon ton) ve Brezilya (39,2 milyon ton) takip etmektedir. Ülkemiz 13,9 milyon tonluk üretimi ile dünya sıralamasında 10 uncu sırada yer almakta ve küresel yaş meyve üretiminden %2,3 oranında pay almakta olup sonuçlar Çizelge 1.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. Yaş meyve üreticisi ülkeler (ton)

Sıra	Ülke adı	2009	2010	Pay (%)
1	Çin	115.876.234	122.178.415	20,0
2	Hindistan	70.362.613	84.791.100	13,9
3	Brezilya	37.123.864	39.286.781	6,4
4	ABD	27.403.517	25.383.917	4,2
5	İtalya	18.362.902	16.907.895	2,8
6	Filipinler	15.980.190	16.181.731	2,7
7	Meksika	15.732.178	15.255.598	2,5
8	İspanya	14.454.635	15.184.420	2,5
9	Endonezya	17.287.652	14.867.762	2,4
10	**Türkiye**	**14.222.927**	**13.945.604**	**2,3**
11	İran	12.538.299	12.126.041	2,0
12	Uganda	10.156.750	10.203.750	1,7
13	Nijerya	10.255.624	9.979.700	1,6
14	Mısır	10.298.581	9.581.146	1,6
15	Ekvador	8.975.740	9.292.075	1,5
Genel toplam		595.555.679	609.369.080	100,0

Dünyada ve ülkemizde işlenebilir alanların sınırlı olması, yanlış tarım uygulamaları, vb. nedenlerle hızla artan nüfus yeterli ve dengeli beslenme açısından çok büyük bir problemle karşı karşıya kalmıştır. Tüm bu olumsuzluklara ilave olarak zaten yetersiz olan tarım alanlarının sanayileşme ile giderek azalması da eklendiğinde artan gıda açığını karşılamanın en akıllıca yolunun hiç şüphesizki birim alandan elde edilecek ürün miktarının artırılması olduğu açıkça görülmektedir. Bu amaçla birim alanda başta meyve ve sebze olmak üzere mevcut tarımsal ürünlerin verim ve kalitesini büyük oranda artırmak gerekmektedir. Bilindiği gibi tarımsal ürünlerin verim ve kalitesini etkileyen birçok faktör var olup bunları başlıca canlı ve cansız etkenler olmak üzere iki gruba ayırabiliriz. Cansız etkenler arasında besin maddesi, ışık, nem, sıcaklık azlığı veya çokluğu, toprakta veya havada toksik kimyasalların bulunması gibi çevresel faktörler bulunmaktadır. Kültür bitkilerinin verim ve kalitesini azaltan canlı organizmalar arasında ise; hastalık etmeni olarak bilinen patojenler (fungus, bakteri ve virüs), zararlılar olarak bilinen hayvansal organizmalar (böcekler, akarlar, nematodlar, salyangozlar, sümüklü böcekler, kemirgenler, memeliler ve kuşlar) ve yabancı otlar sayılabilir. Bu organizmalar kültür bitkilerinde verim ve kaliteyi düşürmek suretiyle ekonomik kayıplara sebep olmaktadırlar. Dünyada tarımsal üretimde meydana gelen ürün kayıplarının %9,1'ini hastalıklar, %11,2'sini zararlılar ve %14,7'sini ise yabancı otlar oluşturmaktadır. Bu miktar dünya tarımsal üretim potansiyelinin üçte birine denk olup, bunlara %6-12 kadar hasat sonrası kayıplar da ilave edilecek olursa toplam ürün kaybı yaklasık %40-48'e ulaşmaktadır. Bu kayıpların yıllık parasal degeri 550 milyar dolar olup, ürünü korumak için yapılan masraflar da yaklasık yıllık 455 milyar dolardır (Agrios 2005). Hastalık etmenlerinden bakteriler; hem dünyada hem de ülkemizde çok geniş bir konukçu potansiyeline sahiptirler. Bunlar içerisinde yumuşak çürüklüğe sebep olan bakteriler; bütün dünyaya yayılmış olup, patates, (Ngadze *et al.* 2012), domates (Alippi *et al*. 1997), biber (Fiori and Schiaffino 2004), patlıcan (Catara *et al*. 2001), kabak (Costa *et al*. 2006) süs bitkilerinden zambak (Perombelon and Kelman 1980; Krejzar *et al*. 2008), begonya (Saaltink and Kamerman 1971), kaktüs (Kim *et al*. 2007) gibi ekonomik öneme sahip çok sayıda konukçuda zarara neden olmaktadırlar. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda da bu bakterilerin başta patates (Benlioğlu 1991; Anonim 2008) olmak üzere domates (Aysan *et al*. 2005; Anonim 2010) enginar

(Türkmenoğlu vd 1975) kala ve difenbahya (Öden 1991) gibi bazı süs bitkilerinde yumuşak çürüklük ve gövde çürüklüğü gibi zararlara sebep olduğu tespit edilmiştir.

Yumuşak çürüklük hastalıklarına *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Chryseobacterium* ve *Bacillus* cinslerine ait farklı sayıda bakteri neden olmaktadır. Bu cinsler içerisinde özellikle *Erwinia* cinsi içerisinde yer alan *Erwinia carotovora* (alt türleri; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *betavusculorum*, *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*, *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*) ve *Erwinia chrysanthemi*'ye ait birçok tür ve alt tür ile *Pseudomonas* cinsi içerisinde yer alan *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas marginalis*, *Pseudomonas viridiflava* ve *Pseudomonas cichorii* gibi çok sayıda patojen bütün dünyaya yayılmış olup çok sayıda konukçuda zarara neden olmaktadır. Bu türlerden *E. c.* subsp. *carotovora* ilk kez 1901 yılında Jones tarafından tanılanmış ve *Bacillus caratovorus* adını almıştır (Bradbury 1977a). *E. c.* subsp. *atroseptica* ise 1902'de van Hall tarafından *Bacillus atrosepticus* olarak isimlendirilmiştir (Bradbury 1977b). Her iki bakteride 1980 yılında basılan ve uluslararasında kabul edilmiş olan bakteri isimlerinin yer aldığı listede *E. c.* subsp. *carotovora*, *E. c.* subsp. *atroseptica* olarak isimlendirilmiştir (Skerman *et al*. 1980). Ancak son zamanlarda moleküler taksonomiye dayanılarak yapılan sınıflandırmada bu iki bakteri *Pectobacterium* cinsi içine dahil edilmiştir. Bir diğer tür olan *E. chrysanthemi* ise yine genetik özellikleri dikkate alınarak moleküler taksonomiye göre yapılan sınıflandırmada *Dickeya* cinsi içerisine dahil edilmiştir (Saygılı vd 2008). Bu sınıflandırmaya göre *Pectobacterium* spp. içeresinde *Pectobacterium caratovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium brasiliensis*, *Pectobacterium betavasculorum* ve *Pectobacterium wasabiae* gibi türler bulunurken, *Dickeya* spp. içerisinde *Dickeya chrysanthemi*, *Dickeya solani*, *Dickeya dadantii*, *Dickeya dieffenbachiae*, *Dickeya zeae*, *Dickeya paradisiaca* ve *Dickeya dianthicola* gibi türler yer almaktadır (Samson *et al.* 2005). *Enterobacter cloacae*, *Chryseobacterium indologenes* ve *Bacillus pumilus* gibi patojenlerin ise özellikle son yıllarda yumuşak çürüklüğe neden olduğu belirlenmiştir (Masyahit *et al*. 2009; Bathily *et al*. 2010; Mikicinski *et al*. 2010; Santana *et al*. 2012).

Bu patojenler kışı enfekteli bitkilerin depo organlarında veya hastalıklı bitkilerde depoda, tohum üzerinde, toprakta ve bazı böceklerin pupaları üzerinde geçirebilir. Ancak hastalıklı dokular ile ilişki içinde değilse toprakta birkaç aydan fazla canlı kalamazlar. Genelde birincil inokulum kaynağı bulaşık üretim materyali veya kontamine topraktır. Ayrıca bakteri ile bulaşık işleme aletleri ile de bulaşma olabilir. Bitkiler üzerindeki yaralar, don zararı ve hasat yaraları enfeksiyon olasılığını artırır. Ayrıca enfeksiyonun oluşabilmesi için yara yüzeyi oldukça nemli olmalıdır. Bakteriler bitkiye hücum ettikten sonra hızla çoğalarak ürettikleri pektolitik enzimlerle bitkinin hücre duvarını parçalar ve muhtevası dışarı akan hücre yıkıma uğrayarak ölür. Bu aşamadan sonra saprofitik mikroorganizmaların saldırısı da başlar ve bitki birkaç gün içinde çürür. Uygun şartların devam etmesi halinde meydana gelen epidemiler ekonomik açıdan büyük kayıplara yol açabilir (Saygılı vd 2008; Anonim 2010). Bu nedenle çok sayıda konukçu dizisine sahip olan bu patojenlerin tanı ve karakterizasyonu yapılarak gerekli mücadele yöntemleri belirlenmelidir. Böylece tanısı yapılan bu hastalıklarla zamanında ve etkili mücadele yapma olasılığı çok yüksek olacağı için epidemilerin neden olacağı büyük kayıpların önlenmesi tarımsal açıdan çok büyük önem arz etmektedir.

Mikroorganizmaların sınıflandırılarak taksonomideki yerinin belirlenmesi tanı, tanısı yapılan organizmaların sahip oldukları özelliklerinin belirlenerek diğerleri arasındaki farklılıkların ortaya konulmasına ise karakteriasyon adı verilmektedir. Genel olarak tanı yöntemleri klasik ve moleküler yöntemler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Mikroorganizmaların daha çok fenotipik karakterleri hakkında bilgi veren morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik özelliklerinin belirlenmesi klasik yöntemler olarak adlandırılır. Bu yöntemlerin daima alternatif sistemlere ihtiyaç duyması, daha çok cins düzeyinde bir tanı yapılabilmesi, yani tür ve tür altı kategorilerin bu sistemlerle belirlenememesi, uzun zaman alması, fazla işgücüne gereksinim duyulması ve sonuçların kontaminasyon ve el becerisine bağlı olarak değişebilmesi gibi birçok dezavantajları vardır (Miller and Joaqium 1993). Bazı mikroorganizmalar için çok spesifik klasik yöntemlere başvurulsa dahi, bu yöntemler tek başlarına mikroorganizmaların tanısı ve teşhisinde yeterli olmamakta, mutlaka moleküler

metotlarla desteklenmesine gerek duyulmaktadır. Bu nedenle günümüzde sadece klasik yöntemler ile yapılan tanı ve teşhislere pek fazla itibar edilmemektedir.

Moleküler yöntemler; karbonhidratları, lipitleri, proteinleri ve genetik materyalleri (DNA ve RNA) çalışma materyali olarak kabul etmekte ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımı ile mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonunun yapılmasını sağlamaktadır (Manceau and Horvais 1997). Yağ asit analizleri (Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIS)), metabolik enzim profillerinin belirlenmesi (BIOLOG), protein profillerinin belirlenmesi (SDS-PAGE), serolojik reaksiyonlar (Immunofloresans, Radioimmunoassay, Immuno Blot, Dot İmmunobinding Assay ve Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve genetik profillere (r DNA-PCR, Rep-PCR, Eric-PCR, Box-PCR ve Spesifik PCR) göre mikroorganizmaları tanılayan sistemlerin tamamı moleküler sistemler olarak kabul edilir (Jackman 1985, Kersters 1985, Miller and Berger 1985, Miller and Martin 1988, Guillorit-Rondeau *et al.* 1996, Scortichini *et al.* 1996, Zhang and Geider 1997).

Moleküler yöntemler; içerisinde MIS, BIOLOG, ELISA ve PCR yöntemleri mikroorganizmaların tanısında en fazla kullanılan yöntemler olmaktadır. Günümüzde moleküler yöntemler daha güvenilir ve daha hızlı sonuçlar verdiği için klasik yöntemlere göre daha fazla tercih edilmektedir. Ancak, her ne kadar moleküler yöntemler çok yaygın kullanılsa da hiçbir zaman tek başlarına yeterli sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle moleküler yöntemlerin her zaman klasik yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada; Artvin, Erzincan, Erzurum ve Iğdır il ve ilçelerinde yumuşak çürüklük simptomu görülen bazı sebze (patates, domates, hıyar, patlıcan, maydanoz, biber vs.) ve meyvelerde (kavun, karpuz, çilek, dut vs.) hastalık oluşturan bakteriyel yaş çürüklük etmenlerinin klasik (mrfolojik, sitolojik ve biyokimyasal testler) ve moleküler yöntemler (MIS, BIOLOG, 16S rDNA PCR, REP, ERIC, BOX PCR ve spesifik PCR) kullanılarak tanısı ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kültür bitkileri ve yabani bitkileri etkileyen çok sayıda hastalık ve bu hastalıkların oluşmasında rol oynayan sayısız hastalık etmeni bulunmaktadır. Bu hastalık etmenleri içerisinde mikroorganizmalar en büyük rolü oynamakta, uygun koşullar da epidemilere yol açarak tüm dünyada ekonomik açıdan çok büyük kayıplara neden olmaktadırlar (Dolar vd 2011).

Hastalık etmenleri içerisinde bütün dünyaya yayılmış olan bakteriler; çok sayıda konukçuda başlıca kloroz, nekroz, çürüklük, solgunluk, bitki organlarının atılması, bakteriyel akıntı, doku anormallikleri ve uyuz gibi hastalıklar yaparak ekonomik açıdan çok büyük kayıplara neden olmaktadırlar (Saygılı vd 2008).

Farklı cinslere ait bakteriler içerisinde patojen olan türler belirli konukçularda hastalığa neden olduğu gibi aynı anda çok sayıda konukçuda da hastalık oluşturabilirler. Bu duruma en iyi örnek çok fazla konukçuda farklı cins ve türden bakterilerin oluşturmuş olduğu yumuşak çürüklük hastalıklarına neden olan bakteriyel etmenler verilebilir. Yumuşak çürüklük hastalıklarına başlıca *Pectobacterium, Dickeya* ve *Pseudomonas* cinslerine ait çok sayıda farklı tür neden olduğu gibi son yıllarda *Enterobacter, Chryseobacterium* ve *Bacillus* cinslerine ait farklı sayıda bakteri türünün de bu hastalığa sebep olduğu belirlenmiştir (Aysan *et al*. 2005; Masyahit *et al*. 2009; Bathily *et al*. 2010; Mikicinski *et al*. 2010; Santana *et al*. 2012).

Bitki patojeni olan *Erwinia* cinsi bakterilerini sebep oldukları hastalıkların simptomlarına göre üç ana grup altında toplamak mümkündür. *Amylovora* grubu; elma ve armut gibi yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ateş yanıklığı hastalığına sebep olurken bilinen en önemli türü *Erwinia amylovora'*dır. *Carotovora* grubu ise; yumuşak çürüklük ve karabacak hastalığına sebep olan türleri içerir. Bu bakteriler hem tarlada hem de depoda birçok üründe çok önemli kayıplar oluşturmakta olup; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum, Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* ve

Dickeya chrysanthemi tüm dünyada en çok bilinen patojenleridir. *Herbicola* grubu iki ana türü içermektedir. *Erwinia herbicola*, genellikle bitkilerin üzerinde bulunan bir epifit iken; diğer tür olan *Erwinia stewartii* ise mısırlarda Stewart'ın solgunluğu diye bilinen hastalığa sebep olmaktadır (Leliott and Dickey 1984; Suparyono and Pataky 1989).

Enterobacteriaceae familyasından olan *Erwinia* cinsi içerisinde yumuşak çürüklük oluşturan patojen bakteriler gram negatif, fakültatif anaerob olup yaklaşık 0,5-3,0 µm boyutunda ve peritrik kamçıya sahiptirler (Agrios 1997; Charkowski 2006). Fimbria veya pili birçok *P. c.* subsp. *carotovorum* ve *D. chrysanthemi* türlerinde bulunurken *P. c.* subsp. *atrosepticum*'da bulunmamaktadır (Perombelon and Kelman 1980). *P. c.* subsp. *carotovorum* ve *D. chrysanthemi* türlerinin çoğu bakteriyosin üretirken *P. c.* subsp. *atrosepticum* türleri bakteriyosin üretememektedir. Her üç bakteri grubundaki bütün türlerde katalaz pozitif, oksidaz negatiftir. Bu üç bakteri türü üretmiş oldukları pektolitik enzimler ve kristal viyolet pectate besi yerinde meydana getirdikleri koloni şekilleri ile diğer bitki patojeni enterobakterlerden ayırt edilmektedirler (Dickey and Kelman 1988; Charkowski 2006; Toth *et al.* 2011).

Dünyada yumuşak çürüklüğe neden olan *Pectobacter*'lerin farklı yöntemler kullanılarak tanısının yapıldığı birçok çalışma mevcuttur (Perombelon 2002; Duarte *et al.* 2004; Van der Merwe *et al.* 2010; Marquez-Villavicencio *et al.* 2011).

Seo *et al*. (2003); fenotipik ve genotipik testler kullanarak dutdan (*Morus* spp.) izole etmiş oldukları 9 bakteri izolatını tanılamaya çalışmışlardır. Yapılan çalışmaya göre; izolatlar biyokimyasal testler sonucu iki farklı gruba ayrılmıştır: 1. gruptaki iki izolat *P. c.* subsp. *carotovorum* ile benzerlik gösterirken; 2. gruptaki 7 izolat farklılık göstermiştir. Aynı zamanda yapılan serolojik ve spesifik PCR deneylerinde 2. gruptaki izolatlerin *P. c.* subsp. *atrosepticum*'dan farklı olduğu tespit edilmiştir. RFLP analizi sonucunda ise 2. gruptaki izolatların tamamı aynı tip olarak belirlenmiştir. Yapılan RAPD analizi sonucunda ise 2. gruptaki izolatlar içerisinde yüksek oranda benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Portekizde 31 bakteri izolatının klasik yöntemler, yağ asidi metil esterleri (FAME) ve moleküler metodlar (MSP PCR ve BOX PCR) kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada; klasik metodlara göre 10 izolat *P. c.* subsp. *carotovorum*, 10 izolat *P. c.* subsp. *atrosepticum* ve 11 izolatda *D. chrysanthemi* olarak tanılanmıştır. *P. c.* subsp. *carotovorum* ve *D. chrysanthemi* izolatlarının fenotipik, kemotaksonomik ve genetik açıdan yüksek bir değişkenliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. *P. c.* subsp. *atrosepticum* izolatlarının ise moleküler olarak düşük bir değişkenliğe sahip olduğu ancak FAME analizlerine göre fenotipik olarak yüksek oranda değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir (Costa *et al*. 2006).

Avrupa'da patateslerde yumuşak çürüklük oluşturan etmenlerin hangi cins içerisinde ve hangi ülkelerde olduğunu tespit etmek için yapılan bir araştırmada; *Dickeya* sp.'ye ait 65 izolat ve sümbülden izole edilmiş olan 2 izolat biyokimyasal testler, REP PCR, 16S rDNA ve *dnaX* sekans analizleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu izolatlar daha önceden tanısı yapılmış 6 *Dickeya* cinsini temsil eden 19 izolatle bu metodlar kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca 2005-2007 yılları arasında Hollanda, Polonya, Finlandiya ve İsrailde patatesten izole edilmiş olan 22 izolatlı bir grubun biovar 3 izolatları içerisinde olduğu tespit edilmişti. Bu izolatların REP PCR, *dnaX* ve 16S rDNA sekans analizleri sonucunda %100 aynı olduğu belirlenmiştir. 1979 ve 1994 yılları arasında Avrupa'da patatesten izole edilmiş olan diğer bütün izolatlara karşı yapılan *dnaX* sekans ve biyokimyasal testlere göre sırasıyla *Dickeya dianthicola* (biovar 1 ve 7), iki Alman izolatı hariç *Dickeya dieffenbachiae* (biovar 2) ve *Dickeya dadantii* (biovar 3) olarak tanılanmıştır. Ayrıca Peru'da *D. dadantii*, Avustralya'da *D. zeae* ve Tayvan'da *D. chrysanthemi* bv. *parthenii* olarak sınıflandırılan izolatlar, patateste *Dickeya* cinsine ait farklı türlerin var olduğunu bir göstergesidir (Slawiak *et al.* 2009).

Benzer bir çalışmaya göre; *Dickeya* sp. muhtemelen *D. dianthicola* Avrupa'da ilk olarak 1970'li yıllarda Hollanda'da rapor edilmiş ve o tarihten itibaren birçok Avrupa ülkesinde saptanmıştır. Ancak; 2004-2005 yıllarında yeni bir patojen olarak adlandırılan *Dickeya solani* bulaşık patates tohumları ile Avrupaya yayılmış ve ekonomik kayıplara neden olmuştur. *Dickeya* sp. çok düşük inokulum seviyelerinde bile hastalık yapma

yeteneğine sahip olup iklim koşullarının uygun olması durumunda şiddetli ve hızlı yayılma gösterebilmektedirler. Hastalığın kontrolünde, modern tarım tekniklerinin kullanılması özellikle bulaşık olmayan yumru ve tohum kullanılması büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalar ile sertifikalı üretim materyallerinin belirlenmesi için Avrupa'da PCR temelli modern tanı tekniklerinin kullanılarak hastalıkların bu materyallerle yayılmasının önüne geçilmesi amaçlanmıştır (Toth *et al.* 2011).

Lin *et al*. (2010)'nın yapmış oldukları çalışmalarda; çeşitli biyokimyasal ve moleküler testler sonucunda *D. chrysanthemi*'nin Çin'de muzda yumuşak çürüklüğe neden olduğu ilk kez rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada; Biolog sistemine göre yapılan tanılamada referans kültürle 3 bakteri izolatın 0,803 oranında yüksek bir benzerlik gösterdiği, yine bu 3 bakterinin 16S rDNA ile yapılan tanılarında da *D. chrysanthemi* olduğu tespit edilmiştir.

İspanya'da 2003-2005 yılları arasında yapılan bir çalışmada; patates, soğan ve sulama sularından izole edilen bakteriler biyokimyasal, serolojik, moleküler ve patojenite testleri kullanılarak tanılanmıştır. Yapılan serolojik ve biyokimyasal testler sonucunda izolatlar arasında farklılıklar gözlenmiş ve bu nedenle izolatlar 3 ve 6 biovar içinde sınıflandırılmıştır. Daha önce moleküler testler ile tanılanmış *Dickeya* cinsine ait türler ile izole edilmiş olan bu izolatlar arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Ayrıca İspanya izolatlarından bir tanesi *D. dieffenbachiae* olarak tanılanmış olup, diğerleri önceden tanılanmış olan 6 *Dickeya* türü ile uyuşmadığı tespit edilmiştir (Palacio-Bielsa *et al*. 2010).

Yumuşak çürüklük etmenlerinden biri olan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae* sınırlı bir konukçu dizisine sahip olup önceleri sadece Japon yabanturpunda patojen olarak bilinmekteydi. Yeni Zelanda'da patateslerde yumuşak çürüklük belirtisi gösteren bitkilerden izole edilen bakteriler acnA (GCCTCGCCGCCGCTGGTGGT, CCGCGCATCATCACTTCATG) ve mdh (GCGCGTAAGCCGGGTATGGA, CGCGGCAGCCTGGCCCATAG) primerleri kullanılarak DNA sekansları ve

fluorescent amplified fragment length polymorphisms (fAFLP) metodları kullanılarak tanılanmıştır. Her iki metoda göre bu izolatların *P. c.* subsp. *wasabiae* ile benzerlik gösterdiği ancak diğer bitki patojeni *Enterobacter*'lerden farklı olduğu tespit edilmiştir (Pitman *et al.* 2010).

Malezya'da 2011 ağustos ayında tarla ve seralarda yapılan sürveylerde patates, domates ve patlıcanlarda; sırasıyla %80, %70 ve %65 oranlarında hastalık olduğu gözlemlenmiştir. Hastalığın simptomları her üç konukçuda da siyah, küçük sulu lezyonlar veya yumuşak çürüklük olarak belirlenmiştir. Yapılan izolasyonlar sonucunda patatesten 12 izolat, domatesten 6 izolat ve patlıcanda 4 izolat olmak üzere toplamda 22 izolat elde edilmiştir. Patojenlerin tanısı için kullanılan biyokimyasal ve morfolojik testler bu izolatların *P. c.* subsp. *wasabiae* olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca 16SF1 ve 16SR1 primerleri kullanılarak yapılan 16 sRNA PCR metodu ile bu bakterilerin *P. wasabiae*'ya ait referans kültür ile %99 oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmanın Malezya'da *P. c.* subsp. *wasabiae* patojeninin patates, domates ve patlıcanda yumuşak çürüklük hastalığına neden olduğunu ortaya koyan il kayıt olduğu rapor edilmiştir (Golkhandan *et al.* 2012).

Finlandiya'da nehir suyu ve patatesten izole edilen bakterilerin biyokimyasal testler sonucunda *Dickeya* cinsine ait biovar 3 izolatları ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda bu izolatların daha önce Hollanda, Polonya ve İsrail'de patateslerden izole edilen *Dickeya* cinsleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Finlandiya'dan izole edilen izolatlerin yaklaşık yarısı daha önceden izole edilmiş ve yeni sınıflandırma içerisinde yer alan virulent izolatlar tarafından oluşturulan simptomlar (kök ve gövdede çürümeler, solgunluk ve nekrotik lezyonlar) ile benzerlik gösterdiği kaydedilmiştir. Aynı zamanda birkaç nehirden ve patatesten izole edilen *D. dianthicola* izolatlarınında benzer simptomlara neden olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan geleneksel PCR ve real-time PCR metodları da tarladaki bitkilerde *Dickeya*'nın varlığını kanıtlamıştır. Çalışmanın sonucuna göre; virulent *Dickeya* izolatlarının depoda ve tarlada yumrularda çürüklüğe neden olduğu ve yaklaşık %50 oranında ürün kaybına yol açtığı tespit edilmiştir (Laurila *et al.* 2010).

2005-2006 yıllarında yapılan bir çalışmada; İran'da enfekteli patates yumruları, havuç, şeker pancarı ve şalgam kökleri ile marul ve lahana yapraklarından 42 bakteri izolatı elde edilmiştir. Elde edilen izolatların çubuk şeklinde, gram negatif, fakültatif anaerop, oksidaz ve üreaz negatif olduğu ve patates yumrularında yapılan patojenite testlerinde yumuşak çürüklük oluşturduğu belirlenmiştir. 42 izolatın 20'si *P. c.* subsp. *carotovorum*, 6 sı *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, 4'ü *Pectobacterium betavasculorum* ve 12 izolat ise *D. dadantii* olarak tanılanmıştır. REP, ERIC ve BOX PCR metodları kullanılarak yumuşak çürüklük oluşturan bu bakteriler; tür ve alttür düzeyinde incelenmiş ve *P. c.* subsp. *carotovorum* ve *D. dadantii* izolatlarının fenotipik ve genotipik olarak yüksek oranda değişken olduğu; ancak *P. betavasculorum* ve *P. c.* subsp. *odoriferum* izolatları arasında ise düşük değişkenlik olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan metodlardan REP-PCR yönteminin yumuşak çürüklük bakterilerini karakterize etme ve sınıflandırmada daha hızlı ve güvenilir olduğu gözlemlenmiştir (Rezaei and Taghavi 2010).

Kore'de 2011 yılında meyvelerde çürüklük oluşturmak suretiyle, biber üretiminde aşırı derecede ekonomik kayıplara sebep olan bir hastalığın varlığı tespit edilmiş ve bu hastalığın son zamanlarda Brezilya, ABD, İsrail ve Güney Afrika'da *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* olarak tanılanmış olan patojen ile aynı simptomlara sahip olduğu belirlenmiştir. Hastalıklı meyvelerden PCB01 ve PCB02 olmak üzere iki izolat izole edilmiş ve izole edilen bu izolatlar yapılan fizyolojik, biyokimyasal, patojenite ve moleküler testler (16S rDNA ve 16S-23S rDNA) sonucunda *P. c.* subsp. *brasiliense* olarak tanılanmıştır. Bu çalışma; *P. c.* subsp. *brasiliense* patojeninin Kore'de biber üretiminde önemli bir ekonomik kayba neden olduğunu ortaya çıkaran ilk çalışma olarak kaydedilmiştir (Choi and Kim 2013).

Benzer şekilde Türkiye'de de yumuşak çürüklüğe neden olan bakteriyel etmenler farklı konukçulardan izole edilip tanılanmıştır. Ülkemizde 1975 yılında İzmir ve çevresinde enginar bahçelerinde, enginar çiçek tomurcuklarında siyah çürüklük hastalığına sebep olan etmenleri belirlemek amacı yapılan bir çalışmada; hastalıklı örneklerden yapılan izolasyonlarda buyyon agar ortamında kirli beyaz renkte floresans görünüşte ve

yuvarlak koloniler oluşturan bakteriler elde edilmiştir. Elde edilen bakteriler ilk yıllar saflaştırılarak hastalığın teşhisi amacı ile farklı ülkelere gönderilmiş ancak kesin bir sonuç alınamamıştır. Bu nedenle daha sonraki yıllarda bakterinin kültürel özellikleri ve bazı biyokimyasal testler ile tanısı yapılmış ve bu bakterinin *Erwinia carotovora* olduğu tespit edilmiştir (Türkmenoğlu vd 1975).

Yine Akdeniz Bölgesi'nde seralarda domateslerde gövde çürüklüğü oluşturan bakteriyel izolatlar izole edilmiş olup; yapılan fizyolojik, biyokimyasal ve FAME analizleri sonucunda bu bakterilerin yumuşak çürüklük etmeni olan *P. c.* subsp. *carotovorum* ve *D. chrysanthemi* olduğu tespit edilmiştir (Aysan *et al*. 2005). Benzer şekilde Mersin ve Antakyada seralarda domateslerde yapılan surveyler sonucunda; %20-25 ile %80-90 arasında hastalık şiddeti görülmüş olup; izolasyonlar sonucunda farklı bakteriyel izolatlar elde edilmiştir. Bu izolatlara karşı uygulanan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve FAME testleri sonucunda *E. c*. subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* ve *P. viridiflava* olduğu tespit edilmiştir (Saygili *et al*. 2005; Aysan *et al*. 2005).

Yapılan bazı çalışmalarda ise; yumuşak çürüklük etmenlerinden biri olan *D. chrysanthemi*'nin Türkiye'de patateslerde var olduğu fakat Ege ve Doğu Akdeniz bölgesinde seralarda domates gövde çürüklüğüne de neden olduğu ifade edilmiştir (Benlioğlu 1991; Öden 1991; Aysan *et al*. 2005; Anonim 2008; Anonim 2010).

Konya'da yapılan bir diğer çalışmada; ayçiçeğinden 24 bakteri izole edilmiş; fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler sonucunda Türkiye'de ayçiçeğinde ilk defa *P. c.* subsp. *atrosepticum*'un hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Bastas *et al*. 2009).

Yine ülkemizde Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın yapmış olduğu çalışmalarda da patates, domates ve havuçta *P. c.* ssp. *carotovorum*, *P. c.* subsp. *atrosepticum* ve *D. chrysanthemi* türlerine ait yumuşak çürüklük oluşturan patojenlerin varlığı tespit edilmiştir (Anonim 2008, 2010).

Yumuşak çürüklük etmenleri bilindiği gibi süs bitkilerinde de hastalık oluşturmaktadır. Ülkemizde 8 farklı süs bitkisinden toplam 14 adet *Erwinia* izolatı elde edilmiş, PCR çalışmaları ile bu türlerin hepsinin *E. c.* subsp. *carotovora* olduğu tespit edilmiştir (Kılıç 2011). Boyraz ve arkadaşları (2006) tarafından lalelerde yumuşak çürüklük oluşturan bakteriler izole edilmiş olup yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda bu bakterilerin *P. c.* subsp. *caratovurum* olduğu tespit edilmiştir.

Son yıllarda bu patojenlerin farklı ülkelerde ve farklı konukçularda ilk kez yumuşak çürüklük hastalığına neden olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır. Tunus'ta domateslerde *P. c.* subsp. *carotovorum* (Hibar *et al.* 2007), Çin'de muzlarda *P. chrysanthemi* (Lin. *et al.* 2010), Kore'de kaktüslerde *P. c.* subsp. *carotovorum* (Kim *et al.* 2007), Türkiye'de ayçiçeğinde *P. c.* subsp. *atrosepticum* (Bastas 2009) ve Malezya'da bamyada *P. caratovurum* (Nazerian *et al.* 2011) etmenlerinin yumuşak çürüklük hastalığına neden olduklarını gösteren ilk kayıtlardır.

Bakterilerde hücre dışı salgı sistemlerince salgılanan bazı maddeler virulanslık faktörü olarak rol oynarken; bakteriyel taksonomide de kullanılmaktadırlar. Bakteri hücresi; kendini koruma (toksinler /enzimler ve virülens faktörleri salgılaması yoluyla), hücresel taşıma faaliyetleri (moleküllerin hücre yüzeyinden, hücre duvarından ve hücre zarından taşınması) ve iletişim amacıyla salgı salgılar. Bitki patojeni gram negatif ve pozitif bakteriler bitkilerde hastalığa neden olan efektör proteinlere sahiptir. Bu proteinleri özel bakteriyel salgı sistemleri aracılığıyla bitki hücresi içerisine aktarırlar. Bitki patojeni bakteriler, hücre dışı protein salgılamasını kendi türüne özgü protein taşıma sistemi ile gerçekleştirir. Baz dizisi analizine göre bitki ve hayvan patojeni bakterilerin sahip oldukları hücre dışı salgı sistemleri büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Bu benzerliklere göre bakterilerdeki salgı sistemlerini Gram negatif bakterilerde; Tip I, Tip II, Tip III, Tip IV ve Tip V olmak üzere 5 grupta, Gram pozitif bakterilerde; Tip I, Tip II ve Tip V olmak üzere 3 grupta toplamak mümkündür. Gram negatif bitki patojeni bakterilerin çoğu Tip III salgı sistemine sahiptir. Bu salgı sistemi hrp (aşırı duyarlılık ve hastalık oluşturma) genleri tarafından kodlanır ve bu genler, hassas bitkilerde hastalık oluşturma, dayanıklı bitkilerde ise aşırı duyarlılık için gereklidir (Aksoy ve Kara 2012).

Tip I sistemine sahip olan bitki patojeni bakterilere *D. chrysanthemi* örnek verilebilir. Sistemin salgıladığı en iyi bilinen molekülleri; RTX toksinleri, protease ve lipase enzimleridir (Ghigo and Wveersmann, 1992). Tip II salgı sistemine sahip olan bakterilere *P. c.* subsp. *carotovorum, D. chrysanthemi* ve *Pseudomonas aeruginosa* örnek verilebilir. *Pectobacterium* sp., bu sistemi pektinaz aktivesi için kullanır. Sistemin salgıladığı diğer virulens faktörleri ise; AB toksinleri ve proteaz enzimleridir (Lindeberg *et al.* 1996; Possot *et al.* 1999; Bouley *et al.* 2001). Bitki ve hayvanlarda patojen olan Gram negatif bakterilerin konukçu bitkilerle ilişkisinde Tip III salgı sistemi çok önemli bir yer tutar. Tip III salgı sisteminin bulunduğu hayvan patojenlerinden *Yersinia, Shigella, Salmonella*'da ve bitki patojenlerinden *Erwinia, Pseudomonas, Xanthomonas, Ralstonia,* ve *Pantoea* cinslerine ait bakteri türlerinde çok sayıda model çalışmaları yapılmaktadır (He *et al.* 2004).

Yumuşak çürüklük *Erwinia* türlerinin ürettikleri selülaz (Cel), proteaz (Prt) ve pektinaz [pektat liyaz (Pel), pektin metilesteraz (Pme), pektin liyaz (Pnl) ve poligalakturonaz (Peh)] enzimleri patojenitenin başlıca nedeni olup; orta lamel ve hücre duvarını hidrolize etmek suretiyle doku yumuşamasına neden olurlar (Barras *et al.* 1994). Bu enzimleri üretmeyen veya salgılayamayan mutantların patojenitelerinin azaldığı belirtilmiştir (Boccara *et al.* 1988).

Pel ve Cel enzimlerinin çoğu Tip II yoluyla (iki basamaklı salgılama) salgılanırlar iken (Salmond 1994); Prt enzimleri, Tip I yoluyla (tek basamaklı salgılama) salgılanırlar (Letoffe *et al.* 1990). Bu enzimler arasında, pektinazlar doku yumuşamasında önemli bir rol oynarlar. Yumuşak çürüklük etmeni olan *Erwinia*'larda başlıca pektinolitik enzimler; Pel A, Pel B, Pel C, Pe1 D ve Pel E ve pektin metil esterazlardır (Barras *et al.* 1994). Selülutik enzimler de patojenite için önemli olup, hücre duvarında yumuşamaya ve kısmi bozulmalara sebep olurlar. *E. c.* subsp. *carotovora* ve *E. chr*ysanthemi'nin başlıca Cel. leri, Cel Z (Boyer *et al.* 1987) ve Cel V (Cooper and Salmond 1993) dir. Proteaz enzimlerinin patojenitedeki rolü çok iyi anlaşılamamış olmakla birlikte *E. c.* subsp. *carotovora'*da *prt W* geninin inaktivasyonunun patojenitede azalmaya neden olduğu belirtilmektedir (Marits *et al.* 1999).

Pseudomonaceae familyası içinde bulunan ve ilk kez 1882 yılında Gessard tarafından tanılanmış olan *Pseudomonas* cinsleri 0.5-1.0×1,5-4.0 µm boyutlarında, düz ya da eğik çubuk şekilli, tek veya birkaç polar kamçılı, beyaz veya sarı renkli koloni oluşturan gram (-) bakterilerdir. Birkaç istisna dışında aerobik bakteriler olup; ortamda arginine olması durumunda anaerobik olarak da yaşayabilirler. Katalaz pozitif, nitratı indirgeyen, bazı türler hariç hepsi King B gibi demir içermeyen besi yerinde floresan pigment üretebilirler. *Pseudomonas corrugata* hariç 41°C'de gelişemez ve karbon kaynaklarından D-arabinose'u kullanamazlar (Saygılı vd 2006). Geleneksel açıdan fitopatojenik oksidaz negatif floresan *Pseudomonad*'lar *Pseudomonas syringae* ve *P. viridiflava* olmak üzere iki tür içerisinde gruplandırılmaktadırlar (Palleroni 1984).

Pseudomonas cinsi içerisinde 14 adet bitki patojeni tür bulunmakta ve bu türlerden *P. syringae, P. viridiflava, P. marginalis ve Pseudomonas savastanoi* ekonomik açıdan en önemli grupları oluşturmaktadırlar. Fitopatojenik *Pseudomonas*'lar; yanıklık, geriye doğru ölüm, çiçek, sürgün, yaprak ve çekirdek yanıklıkları, yaprak lekeleri (*Pseudomonas syringae* pathovarları), çürüklük veya kahverengi çürüklükler (*Pseudomonas viridiflava* ve *Pseudomonas marginalis* pathovarları), ur, tümör veya gal oluşumları (*Pseudomonas savastanoi* pathovarları) gibi çok çeşitli hastalıklara neden olmaktadırlar (Saygılı vd 2008).

Pektolitik *Pseudomonas* türleri; çok geniş konukçu dizisine sahip olup gövde ve kök çürüklüğü, gövdede lezyonlar ve yaprak yanıklıkları gibi simptomlara neden olmaktadırlar (Burkholder 1930; Dowson 1939). Goumans ve Chatzaki 1998 yılında yaptıkları çalışmalarda *P. viridiflava*'nın domates, kavun, *Amaranthus blitum* ve patlıcanda yaprak yanıklığına; krizantem bitkilerinde ise gövdede öz çürüklüğüne neden olduğunu tespit etmişlerdir. Alimi *et al.* (2011) yaptıkları çalışmada *P. viridiflava*'nın elmada çiçek yanıklığına neden olduğunu ilk kez rapor etmişlerdir. Ayrıca *P. viridiflava*'nın önemli yem bitkilerinden biri olan yoncada da kök çürüklüğüne neden olduğu İran'da yapılan bir çalışmada belirlenmiştir (Heydari *et al.* 2012).

1999 yılında Yeni Zelanda'da hasat sonrası havuçlarda yumuşak çürüklük oluşturmak suretiyle ortaya çıkan şiddetli enfeksiyonların, özellikle ihracat ve çiftçiler açısından önemli ekonomik kayıplara yol açtığı belirlenmiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada bu hastalığa neden olan etmenleri tanılamak için çeşitli biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan BIOLOG ve 16S rRNA filogenetik analiz testleri sonucunda *P. viridiflava* ve *P. marginalis* olmak üzere iki bakteri izolatı tanılanmıştır. Ayrıca hastalığın epidemiyolojisi araştırılmış ve yaklaşık 0°C gibi çok düşük sıcaklıklarda bile bitki dokularında çürüme ve yıkımın olduğu gözlemlenmiştir (Godfrey and Marshall 2002).

Japonya'dan Avustralya'ya bakteriyolojik bitki sağlığı sertifikası için ithal edilen havuç tohumları örnekleri ile yapılan bir çalışmada ise; dairesel, konveks ve krem renkli kolonili izolatlar elde edilmiştir. Bu izolatların King's B besi ortamında floresan yeşil pigment ürettikleri, tütün bitkisinde yapılan aşırı duyarlılık testlerinde pozitif sonuç verdiği gözlemlenmiştir. İzolatların oksidaz ve arginine test sonuçları negatif, levan koloni üretmeyen ve patates dilimlerinde yumuşak çürüklük oluşturduğu belirlenmiştir. Yapılan bu morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları dikkate alınarak elde edilen izolatlar *P. viridiflava* olarak tanılanmıştır. Elde edilen izolatlar ile aynı konukçuya yapay inokulasyonlar yapılarak beş gün sonra yeniden izolasyon yapılmış ve aynı bakteriler elde edilmiştir. Sonuçta araştırıcılar fırsatçı patojen olarak bilinen bu bakterilerin simptomsuz örneklerden de izole edilebildiğini, tarlada ve hasat sonrası ürünlerde kayıplara neden olabileceklerini ifade etmişlerdir (Almeida *et al.* 2012).

P. viridiflava türlerinin moleküler evrimi hakkında çok az bilgi mevcuttur. Bu amaçla yapılan bir çalışmada hem Yunanistan'da bulunan yerel *P. viridiflava* türleri hem de patojenin uluslar arası izolatları arasındaki genetik çeşitlilik araştırılmıştır. Çalışmada biyokimyasal ve patojenite testleri (LOPAT testleri: Levan testi, Oksidaz testi, pektolitik aktivite testi, arginine dihidrolaz testi ve tütünde aşırı duyarlılık testi) ve moleküler yöntemlerden [Rep-PCR ve temel gen sekansı (gyrB, rpoD ve rpoB)] yararlanılmıştır. Yapılan biyokimyasal ve patojenite testleri sonucunda izolatlar arasında herhangi bir çeşitlilik belirlenememiştir. Ancak kullanılan Rep PCR ve temel

gen sekansı ile izolatlar arasındaki farklılıklar açık ve net bir şekilde tespit edilmiştir. Gen bankasındaki temel genlerle yapılan karşılaştırmada aynı konukçulardan elde edilen izolatlar arasında olduğu gibi farklı konukçulardan alınan izolatlar arasında da genetik çeşitliliğin önemli olduğu belirlenmiştir (Panagiotis *et al.* 2012).

1985 yılında Kore'de Taejon bölgesinde yetiştiriciliği yapılan muz meyvelerinden yeni bir bakteriyel hastalık tespit edilmiş ve yapılan izolasyonlar sonucunda 7 farklı bakteri izolatı elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda; bu izolatlardan 3 tanesi *E. c.* subsp. *carotovora* geri kalan 4 izolat ise *P. cichorii* olarak tanılanmıştır. Bu bakteriler Kore'de muzlarda yumuşak çürüklük oluşturan ilk izolatlar olarak rapor edilmiştir (Choi *et al.* 1988).

Bazı Gram negatif fitopatojenik bakterilerde *hrp* genleri dirençli bitkiler üzerinde aşırı duyarlılığı ortaya çıkarmasında ve uygun konukçular üzerinde hastalığın gelişiminden sorumlu asıl belirleyicilerdir. Konukçu hücreler içerisine virulens proteini direkt transfer ettiği düşünülen *hrp* genleri tip III (TTSS) salgı sisteminde proteinleri kodlar. Bu proteinler konukçu savunma sistemine baskı yapar ve enfekteli dokularda hücre dışı boşluklar içerisine bitki besin maddelerinin sızmasına neden olur (Bogdanove *et al.* 1996). Son zamanlarda *P. cichorii* izolat 83-1'in genomik DNA'sında *hrp* genlerinin var olduğu tespit edilmiş ancak bu genlerin *P. cichorii*'nin patojenisitesindeki rolü açıklanamamıştır (Araki *et al.* 2006).

P. cichorii'nin Kaliforniya ve Japonya'da marul yapraklarında bakteriyel çürüklük oluşturduğu ve hastalığın tarlada ilk inokulum kaynaklarının; enfekteli tohumlar, enfekteli bitki artıkları, yabancı otlar ve toprak olduğu belirtilmiştir (Grogan *et al.* 1977; Bazzi *et al.* 1984; Hikichi *et al.* 1996a,b). Aynı patojenin Belçika'da seralarda yapraklarda da çürüklük oluşturmak suretiyle marul üretiminde ciddi boyutlarda kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Pauwelyn *et al.* 2011).

Bitki dokuları mikroorganizmaların gelişimi için gerekli olan gıda maddelerini içermekte olup herhangi bir bakteriyel bitki patojeninin gelişimi için gerekli olan bütün

besin maddeleri uygun konukçuda var olan organik maddeler ile karşılanabilmektedir (Starr 1959). Özellikle soğan; çözünür şekerlerden 6600 kg^{-1}, amino asitlerden 19 kg^{-1}, 530 kg^{-1} lipid ve %91 su içermekte ve bu bitkide patojen olan türlerden biri olan *P. fluorescens*'in yaptığı hastalık süreci esnasında konukçudaki mevcut şeker oranında kayda değer bir azalma meydana getirdiği belirtilmektedir (Aboaba and Ekundayo 2000). Aynı patojenin ve *Pseudomonas* cinsine ait farklı türlerin soğanlarda yumuşak çürüklük hastalığının etmeni olduğuna dair kayıtlar eskiden beri binmektedir (Cother *et al.* 1976; Oguntuyo 1981).

2000 yılının başında Kore'de düşük sıcaklıklar altında (5°C) depolanmış soğan yumrularında aşırı derecede yumuşak çürüklük meydana gelmiştir. Başlangıçta yumruların dış kısmında sulu, yeşilimsi kahverengi renkte çürümeler ile başlayan hastalık; daha sonra kademeli olarak iç kısımlara doğru yayılma göstermiş ve büyük kayıplara neden olmuştur. Kore'de soğan önemli bir sebze ürünü olup çok geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılmakta ve en önemlisi mayıs ayının ortalarında başlayıp haziran ayının sonuna kadar 2-5°C gibi çok düşük sıcaklıklarda bile ürün elde edilebilmektedir. Hastalıklı yumrulardan yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen K-2 izolatının bu hastalıktan sorumlu olduğu, patojenin 0-36°C aralıklarında gelişme gösterebildiği ve optimum gelişme sıcaklığının 30-33°C olduğu tespit edilmiştir. Ancak yapılan patojenite testlerinde patojenin 25°C'de 3 günde soğan yumrularında güçlü bir çürüme meydana getirdiği gözlemlenirken, 5°C'de yapılan uygulamalarda 2 ay sonra çürüme olduğu tespit edilmiştir. Bakterinin aynı zamanda patateste de yumuşak çürüklük oluşturduğu, patates ve tütünde yapılan aşırı duyarlılık testlerinde pozitif sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçlarına göre patojenin *P.marginalis* olduğu belirlenmiş ve bu patojenin soğanlarda bu kadar düşük sıcaklıklarda bile yumuşak çürüklük oluşturabildiği ilk kez rapor edilmiştir (Yong-Ki *et al.* 2002). Benzer şekilde Mısır'da yapılan bir çalışmada ise; depolanmış soğan yumrularında yumuşak çürüklük oluşturan bakteriyel bir patojen elde edilmiş ve bu patojenin de 4-43°C arasındaki sıcaklıklarda gelişme gösterebildiği ve optimum gelişme sıcaklığının 37°C olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan biyokimyasal ve moleküler testler sonucunda bu bakteri *P. aeruginosa* olarak

tanılanmıştır. Çalışmanın sonucuna göre *P. aeruginosa*'nın Mısır'da soğanlarda yumuşak çürüklük hastalığına sebep olduğu ilk kez rapor edilmiştir (Abd-Alla *et al.* 2011).

Brokolide bakteriyel yumuşak çürüklük aynı zamanda baş çürüklüğü olarak da bilinmekte uzun süreli nemli şartlarda özellikle çiçeklenme ve olgunlaşma dönemlerinde hastalık çok tahripkâr olabilmektedir. Brokolide bakteriyel yumuşak çürüklük problemi Avustralya, Kanada, İrlanda, İngiltere ve Amerika'da daha önce rapor edilmiştir (Wimalajeeva *et al.* 1987; Hildebrand 1989; Hill 1989). Yine ABD'de yapılan bir çalışmada *P. marginalis*'in brokolide neden olduğu yumuşak çürüklük nedeniyle brokoli üretiminde azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Canaday *et al.* 1991).

Patates Çin'in Gansu bölgesinde buğday ve mısırdan sonra üçüncü en önemli tarımsal ürün olup; ülkenin yıllık toplam patates üretiminin üçte birlik kısmı bu bölgeden karşılanmaktadır. Bölgede yapılan bir çalışmada patateslerde yumuşak çürüklük oluşturan patojenin varlığı gözlemlenmiş ve fizyolojik ve moleküler metotlar (16 S rDNA) kullanılarak tanısı yapılmıştır. Elde edilen tanı sonuçlarına göre; etmen *P. m.* pv. *marginalis* olarak tanılanmış ve bunun ilk kez Çin'de patateslerde yumuşak çürüklüğe neden olduğunu ifade etmişlerdir (Jinhua *et al.* 2007).

Pseudomonas cinsine ait bakterilerden bazıları aynı zamanda süs bitkilerinde de yumuşak çürüklük oluşturmaktadırlar. Kore'de yapılan bir çalışmada zambak soğanlarında yumuşak çürüklük yapan iki bakteri izole edilmiş ve bu bakteriler *P. c.* subsp. *carotovorum* ve *P. marginalis* olarak tanılanmıştır (Hahm *et al.* 2003). Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada ise; *Zantedeschia* türlerinin yumrularından 30 bakteri izole edilmiştir. Elde edilen bakteriyel izolatlar Biolog tanılama sistemi kullanılarak tanılanmış ve bu bakterilerin çoğunun *P. marginalis* olduğu tespit edilmiştir. Patates yumruları kullanılarak yapılan pektolitik aktivite testlerinde *P. marginalis* türleri pozitif sonuç vermiştir (Krejzar *et al.* 2008).

Türkiye'de *Pseudomonas* cinsi içerisinde yer alan yumuşak çürüklük etmenlerinden özellikle *P. viridiflava* ve *P. cichorii* ile ilgili çalışmalar yapılmış olup; bu türlerin konukçu bitkilerde genellikle gövde nekrozu hastalığına neden olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalara göre; *P. viridiflava*'nın ülkemizde domateslerde gövde nekrozuna neden olduğu Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Aysan vd (2004), Ege Bölgesi'nde Üstün ve Saygılı (2001) tarafından bildirilmiştir. Doğu Akdeniz bölgesinde domateslerde gövde nekrozuna neden olan *Pseudomonas* türlerinin %12's i *P. viridiflava* olarak tanılanmıştır (Aysan ve Çınar 2001).

2002 yılının kış aylarında Akdeniz Bölgesi Mersin ilinde ticari üretim yapılan dört farklı marul tarlasında, marul yaprakları üzerinde bakteriyel çürüklük olduğu tespit edilmiştir (Aysan *et al.* 2003). Hastalığın tarladaki yayılma oranı %25-30 olarak değerlendirilmiş olup; başlangıçta özellikle ikinci ve üçüncü yaprakların alt kısmında damarlar boyunca, yaprak sapı ve yapraklar üzerinde dağınık halde küçük, parlak, kahverengi-siyahımsı lekeler şeklinde simptomların olduğu gözlemlenmiştir. Hastalığın ileri aşamasında konukçu bitkiler üzerinde çok sayıda genişlemiş ve birleşmiş yeşilimsi siyah renkli alanlar görülmüş ancak yumuşak çürüklük gözlenmemiştir. Enfekteli bitkilerden sekiz izolat izole edilmiş bu izolatların tamamı tütünde aşırı duyarlılık testlerinde ve pektolitik aktivite testlerinde pozitif sonuç vermiştir. İzolatlar FAME analiz sistemi kullanılarak *P. cichorii* olarak tanılanmıştır. Yapılan patojenite testleri sonucunda bitkilerden reizolasyonlar yapılmış ve tekrar aynı bakteri türü elde edilmiştir.

Araştırıcılar yapılan bu çalışma ile; *P. cichorii'*nin Türkiye'de marullarda bakteriyel çürüklüğe neden olduğunu gösteren ilk kayıt olduğunu ifade etmişlerdir (Aysan *et al.* 2003). Benzer bir çalışmada Adana'da kavunlarda fidelerde bakteriyel yaprak lekesi ve nekrozu oluşturan izolatlar izole edilmiş ve yine FAME analizi ve bazı biyokimyasal testler kullanılarak yapılan tanılamada patojenin *P. viridiflava* olduğu tespit edilmiştir (Aysan *et al.* 2003).

Son yıllarda; *E. cloacae*, *B. pumilus* ve *C. indologenes* türlerinin farklı konukçularda özelliklede süs bitkilerinde yumuşak çürüklük oluşturduğunu belirten çalışmalar

yapılmıştır. *E. cloacae, Enterobacteriacae* familyasına ait bir bakteri olup; doğada yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu bakteri genellikle insanlardan, böceklerden, bitkilerden, toprak ve sudan kolaylıkla izole edilebilmektedir. *E. cloacae*'nın karaağaç (Caster 1945; Murdoch and Campana 1983), mısır (Rosen 1922), elma (Rossiter *et al.* 1983), papaya (Nishijima *et al.* 1987), hindistan cevizi (George *et al.* 1976), dut (Wang *et al.* 2010) ve manyok (Santana *et al.* 2012) gibi birçok bitkide patojen olduğu bilinmektedir.

2009 yılında Malezya'da yapılan bir çalışmada; ejder meyvesi olarak bilinen bir kaktüs türünün enfekteli meyvelerinin üzerinde olduğu gibi gövde üzerinde de yeşilimsi kahverengi, yumuşak ve sulu simptomlar olduğu gözlemlenmiştir. Bu hastalıklı gövde ve meyvelerden yapılan izolasyonlardan farklı koloni renklerinde ve farklı ölçülerde (1.9–6.3×0.5–2.8 μm) *Enterobacteriacae* familyasına ait patojen bakteriler elde edilmiştir. Biolog sistemi kullanılarak yapılan tanılamada bu bakterilerin sırasıyla; *E. cloacae, E. aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea dispersa* and *Rahnella aquatilis* olduğu belirlenmiştir. Yapılan patojenite testleri sonucunda *E. cloacae*'nın hem meyve hem de gövde de yumuşak çürüklük oluşturduğu ve bu patojenin Malezya'da ejder meyvesi türünde ilk kez yumuşak çürüklüğe neden olduğu rapor edilmiştir (Mashayit *et al.* 2009).

2010 yılı yaz aylarında Çin'de yapılan bir çalışmada ise; bölgede yetiştiriciliği yapılan *Amorphophallus konjac* bitkisinin gövde ve soğan kısmında yumuşak çürüklük oluşturan bakteriler izole edilmiş ve bu bakterilerin yapılan morfolojik, patolojik ve 16S rDNA sekans analizleri sonucunda *Enterobacter* sp. oldukları tespit edilmiştir (Jinping *et al.* 2011).

Bacillacae familyası içerisinde yer alan *Bacillus* cinsi bakteriler bitki patojeni, saprofit, biyolojik kontrol ajanı ya da biyogübre özelliğinde olabilirler. Bitki patojenleri içerisinde *B. pumilus, Bacillus megaterium* patovar *cerealis, Bacillus circulans* ve *Bacillus polymxa, B. subtilis,* ve *B. coagulans* türleri yer almaktadır (Chiu *et al.* 1964; Hosford 1982; Leary and Chun 1989; Saleh, 1995; Saleh *et al.* 1997; Saleh and Stead

2003; Galal *et al.* 2006). *Bacillus* spp. çubuk şeklinde, katalaz pozitif, endospor forma sahip, aerobik veya fakültatif anaerobik ve genelde Gram pozitif olup Gram reaksiyonu izolata, ortama ve kültürün yaşına göre değişiklik gösterebilir (Saygılı vd 2006).

Mali'de Sikasso Bölgesi'nde geleneksel yöntemler kullanılarak evlerde depolanmış patates yumrularında aşırı derecede yumuşak çürüklük oluştuğu gözlenmiştir. Hastalıklı patates yumrularından yapılan izolasyonlarda 17 bakteri izolatı elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar içerisinde Od23 izolatının patojenik olduğu, çubuk şekilli, gram pozitif, endospor formunda ve sarı pigment ürettiği tespit edilmiş. Bu izolatın Sikasso'da depolanmış patates yumrularında yumuşak çürüklük hastalığından sorumlu olduğu, 5-45°C arasında gelişme gösterdiği ve optimum gelişme sıcaklığının 30-35°C olduğu belirlenmiştir. Yapılan morfolojik, biyokimyasal ve 16S rDNA sonuçlarına göre Od23 izolatı *B. pumilus* olarak tanılanmıştır. Araştırıcılar tarafından yapılan literatür araştırmasına göre; Mali'nin Sikasso Bölgesi'nde depolanmış patateslerde *B. pumilus*'un neden olduğu yumuşak çürüklüğün ilk kez rapor edildiği bildirilmiştir (Bathily *et al.* 2010). Başka bir çalışmada ise; *B. pumilus*'un difenbahyada yumuşak çürüklük oluşturduğu belirtilmiştir (Mikicinski *et al.* 2010).

Chryseobacterium cinsi *Flavobacteriacae* familyası içerisinde yer almakta olup, eskiden *Flavobacterium* olarak adlandırılmaktaydı. Bu bakteriler çubuk formunda, gram negatif, aerobik ve oksidaz pozitif bakterilerdir (Ferreira *et al.* 2010). *Chryseobacterium* cinsine ait bazı türlerin yumuşak çürüklük oluşturduğuna dair çok az çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalardan birinde; *Zantedeschia* spp. bitkisinde 41 adet bakteriyel izolat izole edilmiş ve bu izolatlardan sadece 10 tanesi patates dilimlerinde pektolitik aktivite göstermiştir. 10 bakterinin tamamının çubuk şekilli ve Gram negatif olduğu enfekteli bitkilerde tipik yumuşak çürüklük simptomu gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan fenotipik ve moleküler (16S rRNA) testler sonucunda yumuşak çürklüğe neden olan türlerin sırasıyla; *P. c.* subsp. *carotovorum*, *P. c.* subsp. *atrosepticum*, *P. marginalis*, *P. veronii* and *C. indologenes* olduğu tespit edilmiştir (Mikicinski *et al.* 2010). Yapılan bir başka çalışmada ise; *Chryseobacterium vrystaatense*,

Flavobacterium defluvii veya *F. johnsoniae*'nin difenbahyada yumuşak çürüklük oluşturduklarını bildirmişlerdir (Mikicinski *et al.* 2010).

Yapılan literatür araştırmasına göre; *E. cloacae, B. pumilus* ve *C. indologenes* türlerinin Türkiye'de yumuşak çürüklük hastalığına neden olduğunu gösteren herhangi bir kayda rastlanamamıştır.

Sürdürülebilir bir kalkınma sağlanması için çevreye duyarlı tarımsal tekniklerin benimsenmesi ve uygulanması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, son yıllarda organik tarıma olan talebin giderek artıyor olması, bitkisel üretimde kimyasal mücadele ilaçlarıyla kimyasal gübrelere alternatif çözümlerin oluşturulmasını zorunlu kılmaktadır. Ancak, gerek bitki hastalık ve zararlılarıyla mücadele için kullanılan kimyasalların gerekse yüksek verim için kullanılan inorganik gübrelerin genelde çevre, özelde biyoçeşitlilik üzerindeki olumsuz etkileri gittikçe artmaktadır. Ayrıca karantina sistemindeki boşluklar nedeniyle, ülkeler arası birçok hastalık etmeni ve zararlıların çok geniş alanlara yayılması da engellenememiştir. Tüm bu nedenler dikkate alındığında, çok sayıdaki hastalık etmeni ve zararlıların tanılanarak uygun mücadele tekniklerinin belirlenmesi için modern biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması ve dünya çapında yaygınlaştırılması öncelikle ele alınmalıdır (Anonim 2004).

Günümüzde kullanılan moleküler tanı yöntemleri tıp ve hayvancılıkta olduğu kadar, tarım sektöründe de geniş uygulama alanları bulmaktadır. Bu moleküler tekniklerden biri olan ve son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılan MIS sistemi; ilk defa 1985 yılında, ABD'de MIDI, inc. firması tarafından geliştirilmiş olup, mikroorganizmaları yağ asitlerine göre tanılayan bir sistemdir. Bu sistem aynı tür mikroorganizmaların hücrelerindeki yağ asitlerinin sayısı, çeşitliliği ve % olarak miktarlarının (yağ asitleri profili) aynı olup çevre koşulları aynı olduğu sürece değişmemesini esas alır (Şahin 1999). Yağ asitleri (CH_3-$(CH_2)_n$-COOH); mikroorganizmaların hücrelerinde sitoplazma ve diğer hücresel organellerin çift tabakalı membranlarında; phospholipid, glycolipid veya lipopolysaccharide formunda bulunan hidrokarbon yapısındaki makro moleküller olup; içerdikleri karbon (C) atomlarının sayısına, karbon atomları arasındaki çift bağ

sayısına, hangi karbon atomları arasında çift bağ olduğuna ve karbonların hidrojen (H) atomları tarafından doyurulmuş olup olmamalarına göre farklı isimler almaktadırlar (Miller and Berger 1985). Yağ asitleri profillerindeki farklılıklar, mikroorganizmalar arasındaki genetiksel akrabalıkların dolaylı bir göstergesidir (Sasser 1990).

Mikroorganizmaların çoğu heterotrof olduklarından yaşamlarını sürdürmek için çeşitli karbon ve azot kaynaklarına ihtiyaç duymaktadırlar. Bünyelerinde bulunan çeşitli enzimlerin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak karbon kaynaklarını ya kullanır ya da kullanamazlar. Bu esasa dayanarak ilk önce durham tüplerinde daha sonra API ismiyle geliştirilen sınırlı sayıda karbon kaynaklı kit sistemi ile yapılan tanı yöntemi yerini son yıllarda Biyolog olarak isimlendirilen 95 farklı karbon kaynağına göre tanı yapan mikroplate sistemine bırakmıştır (Bochner 1989; Michael *et al.* 1993; Verniere *et al.* 1993; Holmes *et al.* 1994; Alexandra *et al.* 1995; Konopka *et al.* 1998).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılan moleküler metodların en önemlilerinden birisi de hiç şüphesizki polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemidir. Bu yöntemde üzerinde çalışma yapılan genetik materyal, çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA moleküllerinin arasında olsa bile çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve böylelikle kolayca tanımlanabilir (Arda 1995; Schochetman ve Jones 1988). Seçilen DNA dizisi çoğaltılırken istenmeyen diziler baskılanabilir ve böylece DNA dizisinin tanımlanması kolaylaşır (Saiki vd 1988, Walker ve Dounan 1989). PCR yöntemi hızlı ve güvenilir olması, eskimiş, kurumuş, az miktarda DNA içeren örneklerle bile uyganabilmesi, popülasyon genetiği ve epidemiyolojik çalışmalara varıncaya kadar geniş kullanım alanı bulması gibi birçok avantajlara sahip olmakla birlikte, deneyimli elemanlara ihtiyaç duyulması ve pahalı olması gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Ayrıca tür ve/veya tür içi seviyede yüksek ayrım gücü tercih edildiğinde PCR temelli moleküler tekniklerin daha yüksek potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir (Kıran ve Osmanağoğlu 2011).

Bu avantajlar PCR metodunun tarım, endüstri ve tıp başta olmak üzüere birçok alanda kolaylıkla ve güvenilir bir şekilde uygulanabilir olmasını sağlamış ve araştırmacıların

yoğun ilgisini çekmiştir. Aynı zamanda günümüzde bu amaçla hem Dünya'da hem de Türkiye'de bitkilerde patojen olan mikroorganizmaların tanısı için de bu alanlarda çalışan bilim adamlarının çoğu farklı PCR metodlarını kullanmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (Ristaino *et al.* 1998; Kotan 2002; Göçmen vd 2003; Jamir *et al.* 2004; Mirik *et al.* 2011; Sahin *et al.* 2003). Benzer şekilde yumuşak çürüklük bakterilerinin tanısında da 16S rDNA, REP (tekrarlanan ekstrajenik palindromik), RFLP (restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi), RAPD (rastgele çoğalmış polimorfik DNA) ve ERIC (Enterobakteriyel tekrarlanan interjenik palindromik konsensus) gibi çok sayıda PCR metodu etkin ve güvenilir bir şekilde kullanılmıştır (Maki-Valkama and Karjalainen, 1994; Darrasse *et al.* 1994; Nassar *et al.* 1996; Van der Wolf *et al.* 1996; Hélias *et al.* 1998; Toth *et al.* 1999; Sledz *et al.* 2000; Yahiaoui *et al.* 2003; Maisuria and Nerurkar 2012). Yapılmış olan bu çalışmada da patojen bakterilerin tanısı için MIS ve BIOLOG metodlarının yanısıra, 16S rDNA-PCR, Rep-PCR, Eric-PCR, Box-PCR ve spesifik PCR yöntemleri de kullanılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

Biolog mikroplate okuyucusu (Biolog, U.S.A., SN E11175)
Biolog turbudity (Biolog, U.S.A., SN 02071102)
Bitki büyütme kabini
Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)
Çalkalayıcı (Thermoshake, Gerhard, GERMANY, SN 4002319)
Derin dondurucu (Nuaire, U. S. A, -86 Ultralow Freezer, SN P07K–476316-PK)
Elektroforez akım sağlayıcı (Biogen)
Elektroforez tankı (Max Fıll)
Hassas terazi (Scaltec, GERMANY, SPB42, SN SPB42–90908239)
Hematoloji çalkalayıcısı (GERMANY, GEL–3025, SN 10365703 F)
İnkübatör (Nüve, TÜRKİYE, ES 500, SN 03–0591)
Jel görüntüleme sistemi (Biolab)
Magnetik karıştırıcı (Nüve, TÜRKİYE, MK–418, SN 05–1083)
Mikrobiyal identifikasyon sistemi (MIDI, Inc., Newark, DE)
Mikroskop (Olympus, JAPAN, B x 50, ODO4368)
Mini karıştırıcı (IKA, U.S.A., M51, SN 03017581)
Otoklav (Hırayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)
Otomatik pipetler (Eppendorf, GERMANY)
PCR thermocycle (Eppendorf)
pH metre (Hana, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202)
Saf su cihazı (Ateks, 7x35, Eu)
Steril kabin (LABCAIRE)
Sterilizatör (Nüve, TÜRKİYE, FN 500, SN 303–3051)
Su banyosu (Nüve, TÜRKİYE, ST–402, SN 02–0138

3.1.2. Kullanılan besi yerleri ve çözeltilerin hazırlanışı

Araştırma süresince kullanılmış besi yerlerinin ve çözeltilerin hazırlanışı ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

Lauryl broth (LB): Bir litre sdH_2O'ya 10 g NaCl, 10 g pepton ve 5 g yeast extract katılarak elde edilen sıvı besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir (Klement *et al.* 1990). Bakterilerden stok kültür hazırlarken kullanılmıştır.

%70'lik etil alkol: Etil alkolden 70 ml alınarak üzerine 30 ml sdH_2O ilave edilip hacmi 100 ml'ye tamamlanmış ve hazırlanan çözelti -20°C'de muhafaza edilmiştir. Sterilizasyon amaçlı kullanılmıştır.

%30 'luk gliserol: Ölçü silindirinde 30 ml gliserol 70 ml sdH_2O'ya ilave edilerek hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. Bakterilerden stok kültür hazırlarken kullanılmıştır.

Lugol solüsyonu: Hassas terazide 1 g iyot ve 2 g KCl tartılarak önceden hazırlanmış olan sdH_2O içerisine aktarılmıştır (Klement *et al.* 1990). Amilaz testinde kullanılmıştır.

Nutrient agar: Hassas terazide 28 g nutrient agar karışımı (Oxoıd) tartılarak 1 L dH_2O içerisine aktarılarak hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilip soğumaya bırakılmıştır. Besiyeri 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987). Genel besi yeri olup bakterilerin izolasyonu yapıldıktan sonra çizgi veya yayma ekim yapımında kullanılmıştır.

Nutrient broth: Hassas terazide 13 g nutrient broth besiyeri tartılarak (Oxoid) 1 L dH_2O içerisine ilave edilip hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril

edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987). Genel besi yeri olup saflaştırılan bakterilerin sıvı ortamda geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Trypticase soy broth agar (TSBA) besi yeri: Hassas terazide 15 g granüle agar (BBL#11849), 30 g Trypticase soy broth (BBL# 11768) tartılarak 2 L'lik bir erlenmayer içerisindeki 1 L dH_2O içerisine ilave edilip hazırlanan karışım, ısıtmalı magnetik karıştırıcı üzerinde agar çözülünceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilerek steril edilen besi yeri 60°C'ye kadar soğumaya bırakılmıştır. Sonra steril kabinde petrilere dökülerek oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır (Klement *et al.* 1990). Genel besi yeri olup yağ asidi metil esterleri saflaştırılırken bakterilerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Trypticase soy broth (TSB) besi yeri: Hassas terazide 30 g trypticase Soy Broth besi yeri tartılarak (Oxoid) 1 L dH_2O içerisine ilave edilip hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır (Klement *et al.* 1990). Genel besi yeri olup saflaştırılan bakterilerin sıvı ortamda geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Yeast dexrose carbonate agar (YDC): 1 L saf su içerisine 10 g yeast extract, 20 g dextrose, 20 g $CaCO_3$ ilave edilmiştir. Karışım otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilerek besiyeri 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülmüş ve katılaşmaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987). Bakteri kültürlerinin izolasyonu ve saflaştırılması amacıyla kullanılmıştır.

Stok besi yeri: 0,65 g nutrient broth karışımına 36 ml gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavda steril edildikten sonra aseptik şartlarda 2 ml'lik eppendorf tüplerine 1,2'şer ml olarak dağıtılmıştır. Bakterilerden stok kültür hazırlarken kullanılmıştır.

King B besi yeri: 1 L saf su içerisine 20 g protease peptone (Difco No: 3), 1,5 g $K_2HPO_4.3H_2O$, 1,5 g $MgSO_4.7H_2O$, 15 g agar ve 10 ml gliserol ilave edilmiştir.

Karışımın pH'sı 7.2'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası, besiyeri 45°C'ye kadar soğutulup petrilere dökülerek katılaşması sağlanmıştır (King *et al*. 1954). Floresan pigment oluşturan bakterilerin tespiti amacıyla kullanılmıştır.

CVP besi yeri: 4,5 ml 1 N NaOH, 3 ml %10'luk $CaCl_2.2H_2O$, 1 g $NaNO_3$, 1,5 g agar, 10 g sodyum polipektat, 0,5ml SDS, 1 ml %0.075'lik kristal violet, 500 ml saf su. Ön ısıtma yapılmış laboratuar blanderi içine 300 ml kaynamış su koyularak NaOH, $CaCl_2.2H_2O$, $NaNO_3$ ve agar eklenmiştir. Blender yüksek hızda 15 saniye çalışırken sodyum polipektat ilave edilip kalan 200 ml kaynamış su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu solüsyon 2 litrelik erlenmayere konularak SDS ile kristal violet eklenmiş, otoklavda 121°C'de 25 dk sterilize edildikten sonra ortam sıcakken petrilere dökülmüştür (Saygılı vd 2006). Pektolitik bakteriler için seçici besi yeri olarak kullanılmıştır.

Benedict ayıracı: 160 ml sdH_2O içinde 35 g sodium citrate ve 20 g $Na_2CO_3.H_2O$ ısıtılarak çözülmüştür. Farklı bir yerde 40 ml sdH_2O içinde 3,5 g $CuSO_4X5H_2O$ çözülerek iki solüsyon karıştırılmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Saygılı vd 2006). Sukroz indirgenmesi testi için kullanılmıştır.

%7'lik H_2O_2 çözeltisi: sdH_2O'dan 93 ml, H_2O_2'den 7 ml alınarak hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Katatlaz testi için kulanılmıştır.

%3'lük KOH çözeltisi: 100 ml steril distile su içerisinde 3 g KOH çözülerek çözelti hazırlanmıştır (Fahy and Hayward 1983). Bakterilerin Gram negatif mi yoksa Gram pozitif mi olduğunu belirlemek için kullanılmıştır.

İndol besi yeri: 1L dH_2O içerisine 10 gr tryptone ve 1 g L-tryptophan eklenerek hazırlanan karışım çözününceye kadar karıştırılmış ve pH 7,4 olarak ayarlanmıştır. Elde edilen karışımdan 5 ml tüplere aktarılarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir (Prombelon and Van Der Wolf 2002). İndol üretimi testinde kullanılmıştır.

Kovac's ayıracı: 100 ml %10' luk HCL içerisine 1gr *p*-dimethylaminobenzalaldehyde eklenerek solüsyon hazırlanmıştır (Saygılı vd 2006). İndol üretimi testinde kullanılmıştır.

Hücre parçalama (Saponification) çözeltisi: 150 ml sdH_2O ve 150 ml metil alkol (HPLC Grade) 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarıldıktan sonra katı formdaki sodyum hidroksit (ACS Grade)'den hassas terazide 45 g tartılarak çözeltiye ilave edilmiştir. Çözelti iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır (Şahin 1999). Bakterilerin MIS sisteminde tanılanması için yağ asit metil esterlerin saflaştırılması amacıyla kullanılmıştır.

Metilleştirme (Methylation) çözeltisi: 275 ml metil alkol (HPLC Grade) ve 325 ml hidroklorik asit (6 N) 1 L'lik renkli çözelti şişesi içerisine ilave edilerek çözelti iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır (Şahin 1997). Bakterilerin MIS sisteminde tanılanması için yağ asit metil esterlerin saflaştırılması amacıyla kullanılmıştır.

Saflaştırma (Exraction) çözeltisi: 200 ml metil-tert-butil-eter (HPLC Grade) 200 ml hexan (HPLC Grade) üzerine ilave edilerek 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarılmıştır. Hazırlanan çözelti iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır (Şahin 1999). Bakterilerin MIS sisteminde tanılanması için yağ asit metil esterlerin saflaştırılması amacıyla kullanılmıştır.

Bazik yıkama (Base Wash) çözeltisi: Hassas terazide katı formdaki sodyum hidroksitden (ACS Grade) 10,8 g tartılarak 900 ml sdH_2O içerisinde iyice çözülünceye kadar karıştırılmıştır. Karışım 1 L'lik renkli çözelti şişesine aktarılmıştır (Şahin 1999). Bakterilerin MIS sisteminde tanılanması için yağ asit metil esterlerin saflaştırılması amacıyla kullanılacaktır.

Biolog universal growth agar + %0.025 Maltoz (BUG+M): Hassas terazide BUG+M besiyerinden 13 g tartılarak 1 L dH_2O içerisine ilave edilip hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 45°C'ye kadar

soğutulan besiyeri steril kabinde petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Miller and Joaquim 1993). Gram pozitif bakterilerin biolog sisteminde tanılanabilmesi için önce bu besi yerinde geliştirilmesi gerekmektedir.

TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) Tamponu: 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözülerek pH'sı 8'e ayarlanmıştır. Son hacim 250 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edilmiştir (Wilson 1997). PCR yöntemleri için genomik DNA izolasyonu amacı ile kullanılmıştır.

%10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS'nin 100 ml steril saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. Şişenin ağzı kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Wilson 1997). PCR yöntemleri için genomik DNA izolasyonu amacı ile kullanılmıştır.

Proteinaz K: 1 ml steril saf su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlanmıştır. -20°C'de muhafaza edilmiştir (Wilson 1997). PCR yöntemleri için izole edilen genomik DNA'daki proteinlerin parçalanması amacı ile kullanılmıştır.

5 M NaCl çözeltisi: 29,22 g NaCl'ün 100 ml saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlanıp otoklavda steril edilmiştir (Wilson 1997). PCR yöntemleri için genomik DNA izolasyonu amacı ile kullanılmıştır.

CTAB/NaCl: 4,1 g NaCl 80 ml su içinde çözülmüş ve yavaş bir şekilde 10 g CTAB (hexadecylytrimethyl ammonium bromide) eklenmiştir. Çözünme için yaklaşık olarak 65°C sıcaklık gerekmektedir. Üzeri 100 ml su ile tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. PCR yöntemleri için genomik DNA izolasyonu amacı ile kullanılmıştır.

Kloroform-izoamilalkol (24:1) çözeltisi: 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak elde edilen karışım –20°C'de muhafaza edilmiştir. DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak elde edilen karışım –20°C'de muhafaza edilmiştir. DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Ethidium bromür çözeltisi: 500 ml 0.5xTBE tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmıştır. Karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. PCR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılmıştır.

Bromfenol blue çözeltisi: 0.25 g bromfenol blue, 0.25 g xylene cyanol FF ve 30 ml gliserol'ün toplam hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir. PCR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılmıştır.

10xTBE tamponu (pH: 8): 108 g Tris, 55 g borik asit, 40 ml 0.5 M EDTA 500 ml steril distile su içerisinde çözüldükten sonra karışımın pH'sı 8'e ayarlanmıştır. Toplam hacim steril distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 16S rDNA PCR çalışmaları için master mix hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması ve laboratuvara getirilmesi

Araştırma için Artvin, Erzincan, Erzurum ve Iğdır illeri ve ilçelerindeki bahçe ve tarlalardan 2010-2011 yılları haziran-ekim ayları arasında başta patates olmak üzere, domates, havuç, soğan, biber, çilek, erik, kavun, karpuz ve elmada yaş çürüklük belirtisi görülen bitki materyalleri (yaprak, gövde, meyve, yumru ve soğan) toplanarak her biri ayrı ayrı etiketlenmiş ve polietilen torbalar içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

3.2.2. Bakterilerin izolasyonu ve stoklanması

İzolasyonlar için standart Trypticase Soy Broth Agar (TSBA), Nutrient Agar (NA), Yeast Dextrose Carbonate Agar (YDC) besi yerleri kullanılmıştır. Hastalıklı bitki materyalleri, sebze ve meyveler musluk suyunda yıkandıktan sonra içerisinde %70'lik etil alkol bulunan bir kapta 5 dk bekletilerek yüzeysel olarak steril edilmiş ve ardından sdH_2O'dan geçirilmiştir. Hem hastalıklı hem de sağlıklı dokuyu içeren bölgelerden, küçük parçalar kesilerek içerisinde 2 ml sdH_2O bulunan steril tüpler içerisinde 1 saat bekletildikten sonra, 5 kat seyreltilerek dilüsyonlar hazırlanmıştır. Pipetle her bir dilüsyondan 100 µl alınarak, standart besi yerlerine transfer edilmiş ve cam bagetle yüzeye yayılmıştır. Kültürler 25°C'de inkübasyona konulmuş, gelişen her bir koloniden yeniden ekim yapılarak saf kültürler elde edilmiştir.

Saf olarak elde edilen her bir izolata ayrı bir kod numarası verilerek, izolasyonla ilgili bilgiler (izole edildiği bitki, lokasyon, tarih vs.) kaydedilmiş; tanı ve karakterizasyon işlemlerine kadar 1:1 oranında karıştırılan %30 gliserol ve Lauryl Broth (LB) içeren stok besiyerlerinde -86°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. İzolatların MIS sistemi ile yağ asiti profillerinin belirlenmesi ve tanılanması

Saflaştırılarak muhafaza edilen bakteri izolatlarının yağ asiti metil esterleri elde edilmiş, Mikrobial Identification Sistemi=MIS (MIDI, Inc., Newark, DE) kullanılarak tanılanmıştır.

Bakteri izolatlarının trypticase soy broth agar (TSBA) besiyerinde geliştirilmesi

Test edilen bakteriyel izolatlar steril öze ile stok kültürden alınarak, TSBA katı besi yerine 3 fazlı çizgi ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler, 24-48 saat süreyle 30^oC'ye ayarlı bir inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

Yağ asidi metil esterlerinin saflaştırılması

İzolatların yağ asitlerini saf olarak izole edebilmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır. Bu çözeltiler sıra ile Hücre Parçalama (Saponification) çözeltisi (çözelti1), Metilleştirme (Methylation) çözeltisi (çözelti 2), Saflaştırma (Exraction) çözeltisi (çözelti 3) ve Bazik yıkama (Base Wash) çözeltisi (çözelti 4)'tür. Yağ asidi metil esterlerinin saflaştırılmasında yukarıda bahsedilen çözeltiler kullanılarak aşağıdaki prosedür uygulanmıştır (Şahin 1999).

a) TSA besi ortamına 4 fazlı çizgi ekimi yapılarak geliştirilen 24 saatlik bakteri izolatlarının 3. ve 4. fazlarından canlı bakteri hücreleri steril öze ile toplanarak (40 mg), ağızları teflon kapaklı steril cam test tüplerine (5 ml) aktarılmış, test tüpleri etiketlenerek ağızları kapatılmıştır.

b) Test tüplerine 1 ml çözelti 1 ilave edilip, 5–10 sn çalkalanarak 5 dk süreyle 100°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Çıkarılan tüpler tekrar 5–10 sn çalkalanarak 25 dk süreyle 100°C'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Bu muamele ile canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.

c) Test tüplerine 2 ml çözelti 2 eklenerek 5–10 sn'lik bir çalkalamadan sonra 80°C'de 10 dk süreyle su banyosunda bekletilmiş ve hemen takiben 2 dk süreyle buz veya soğuk su içerisinde soğutulmuştur. Bu uygulama ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenerek, yağ asitlerinden yağ asit metil esterler elde edilmiştir.

d) Soğutulan tüplere 1,25 ml çözelti 3 eklenerek 10 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısı ile çalkalamaya bırakılmıştır. Alt kısmında inorganik, üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz gözlemlenmiştir. Pasteur pipeti kullanarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılarak organik faz muhafaza edilmiştir.

e) En son aşamada ise her tüpe 3 ml çözelti 4 ilave edilerek, 5 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısı ile çalkalandıktan sonra 10 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüp içerisinde yine 2 ayrı faz oluşmuştur. Üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml' lik gaz kromatografi tüplerine transfer edilerek ağızları teflon kapakla sıkıca kapatılmıştır.

Örneklerin mikrobiyal tanılama sistemi ile (MIS) analiz edilmesi

Yukarıdaki protokole göre hazırlanan örnekler MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirildikten sonra, cihazın kılavuzunda belirtilen programa izolatlar tanılanmıştır. Bütün örnekler için bu test 3 kez tekrar edilmiş ve en yüksek tanı oranını veren sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır. Patojen oldukları belirlenen izolatlar SPSS programı kullanılarak istatiksel analizi yapılmış ve dendogramlar elde edilmiştir.

3.2.4. Tütünde aşırı duyarlılık (Hypersensitivity (HR)) testi

Saflaştırılan bakteriyel izolatlar NA besiyerine çizilerek inkübasyona bırakılmıştır. 24 sa'lik kültürlerden öze ile alınarak sdH_2O içerisine aktarılan bakteriler vorteks cihazında karıştırılıp hazırlanan karışımın konsantrasyonu 10^8 CFU/ml'ye ayarlanmıştır. Elde edilen solüsyondan steril şırınga ile 2 cc'lik alınarak tütün (*Nicotina tabacum* L. var. Samsun) yapraklarının damarları arasına enjekte edilmiştir. Uygulama yapılan bitkiler bitki büyütme kabinlerinde %90 nemde ve 24-48 sa süreyle bekletilerek, inokulasyonun yapıldığı bölgelerde ölü doku (nekroz) oluşup oluşmadığı takip edilmiştir. Ölü doku oluşturan izolatlar HR pozitif (+), oluşturmayanlar ise HR negatif (–) olarak değerlendirilmiştir. Kontrol bitkilerinde sdH_2O kullanılmıştır.

3.2.5. Patojenite testi

Yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen verilere göre patojenite testleri için bakteri kültürlerinden alınarak TSA besi yerine ekim yapılmıştır. 24 h süreyle etüvde gelişmeye bırakılan bakterilerden 10^8 CFU/ml konsantrasyonda solüsyonlar hazırlanmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar nemlendirilmiş kağıtlar içeren polietilen torbalar içerisine konulan konukçu bitkilerin meyvelerine (patates, domates, biber, havuç, turp, kavun, karpuz, hıyar, kabak, çilek, elma, dut, patlıcan) şırınga ile enjekte edilerek bir hafta boyunca 27-30°C sıcaklıkta takip edilmiştir.

Sera denemeleri patojenite testlerinde ise; patojenler için izole edildiği konukçu bitkiler yetiştirilerek kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda bitkilerin toprak üstü aksamına sıvı besi yerinde 10^8 CFU/ml konsantrasyonda hazırlanan patojen solüsyonlarından şırınga ile enjekte edilerek polietilen torbalarda nemli koşullarda 2 gün süre ile bekletilmiştir. Bu süre sonunda torbalar çıkarılarak 15 gün boyunca bitkiler takip edilmiş yumuşak çürüklük oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir. Kontrol olarak ise sdH_2O kullanılmıştır.

3.2.6. Pektolitik aktivite testi

Taze ve hastalıksız olan patates yumruları %5'lik sodyum hipokloritde 10 dk bekletilerek steril edilmiştir. Steril edilen yumrular yaklaşık 5 mm dilimlenerek içerisinde steril nemli kağıtlar içeren petri kaplarına yerleştirilmiştir. 24 sa'lik bakteri kültürlerinden alınarak patates dilimlerine 1 ml enjekte edilmiş ve 26±2°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24-72 sa sonra yumuşama olup olmadığı kontrol edilerek yumuşama olması pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak sdH_2O kullanılmıştır.

3.2.7. Klasik yöntemler

Morfolojik özellikler

Bakterilerin kültürel özelliklerini incelemede, bunların sıvı ortamlardaki saf kültürleri kullanılmıştır. İzolatlar katı besiyerlerine çizgi ekim şeklinde ekilip, koloni meydana getirmeleri beklenmiş, koloni morfolojisi mikroskopla incelenerek görünüşleri ve rengi tespit edilmiştir (Saygılı vd 2006).

Sitolojik özellikler

Potasyum hidroksit testi (KOH)

Lam üzerine damlatılan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonu üzerine NA'da geliştirilen 24-48 sa'lik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak karıştırılmıştır. Bu testde Gram negatif bakteriler %3 KOH ile muamele edildiğinde hücre duvarı parçalanmakta böylece sitoplazma ve nüklear materyalin açığa çıkması sonucu bir viskoz yapı oluşmaktadır. Bu nedenle öze karışıma dokundurulup sonra yukarı kaldırıldığında sakız gibi bir uzama meydana gelmekte veya herhangi bir uzama oluşmamaktadır. Uzamanın olması KOH pozitif, olmaması ise KOH negatif olarak değerlendirilmiştir. KOH pozitif bakteriler Gram negatif, KOH negatif bakteriler ise Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fahy and Hayward 1983).

Hareket testi

Saflaştırılan mikroorganizmalar NA besi yerine 3 fazlı olarak çizilip inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik bakteri kültürlerinden, öze ile bir miktar alınarak içerisinde sd H_2O bulunan cam tüplere aktarılmıştır. Hazırlanan solüsyondan öze ile alınan bir damla sıvı lamelin ortasına konulmuş, lamelin lama temas edecek noktalarına vazelin sürülerek, çukur lamın çukur kısmı lamel üzerindeki damlayı kapatacak şekilde çukur lam lamel üzerine kapatılmıştır. Preparat dikkatli bir şekilde ters çevrilerek mikroskopta incelenmiş ve mikroorganizmanın hareketli olup olmadığına bakılarak belirlenmiştir (Saygılı vd 2006).

Biyokimyasal özellikler

Katalaz testi

Elde edilen izolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıkları bu testle belirlenmiştir.

Test için 24-48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp, üzerine 1 damla %5'lik H_2O_2 ilave edilmiş kabarcık oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Oksidaz testi

Bu test için %1'lik tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren diskler kullanılmıştır. Diskler 1 damla steril saf su ile doyurularak, üzerine 24-48 saatlik bakteri kültüründen ilave edilmiştir. Mavi-mor rengin görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002).

Floresan pigment üretimi

King B besi yerinde 24-48 sa süreyle 26±2°C'de geliştirilen izolatların ultraviyole ışıkta floresan pigment üretip üretmedikleri belirlenmiştir.

37°C'de gelişme

NA besi yeri içeren petrilere çizgi şeklinde bakteri ekimi yapılarak 3 gün 37°C'de inkübe edilmiş bakteri gelişimi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Amilaz testi

İzolatlar nişastalı katı besiyerlerine ekilerek, 3-7 gün süreyle 26±2°C'de inkübasyona bırakılmış ve lugol ilavesiyle amilaz enzimini üretip üretmedikleri test edilmiştir (Harley and Prescott 2002).

İndol üretimi

İndol üretim testi için 26±2°C'de 2 gün süreyle tüplerde sıvı besi yerinde geliştirilmiş olan izolatlara pipetle 1 ml kovacs ayıracı damlatılmış ve tüpün üst kısmında halka

şeklinde oluşan kırmızı-pembe renk pozitif olarak, sarı-kahverengi renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Prombelon and Van Der Wolf 2002).

Eritromisine duyarlılık

Otoklavda steril edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutulmuş 3 ml NA içeren tüplere 100 µl bakteri solüsyonundan ilave edilmiştir. NA besi yeri içeren petriler üzerine bu karışım dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Ticari olarak satılan eritromycin içeren diskler petrinin yüzeyine yerleştirilerek 26±2°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. Diskler etrafında oluşan zonlara göre eritromicine olan duyarlılık tespit edilmiştir.

NaCl'e tolerans

TSA besi yeri içerisine %5'lik NaCL ilave edilerek hazırlanan petrilere bakteriler swap ile çizilmiştir. 26±2°C'de inkübasyona bırakılan petrilerde bakteri gelişimine göre değerlendirme yapılmıştır.

Sukrozun indirgenmesi

800 ml distile su içerisine 10 g bacto pepton ve 17 gr agar eklenerek otoklavda sterilize edilmiştir. 200 ml distile su içerisine 40 g sucroz eklenip filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve hazırlanan iki solüsyon karıştırılarak petrilere dökülmüştür. Çizgi ekim yaparak bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmiş petriler 26±2°C'de 2 gün inkübe edildikten sonra her petriye 10 ml Benedict ayıracından dökülerek 60°C'de 30-45 dk inkübe edilmiştir. Mavi zeminde koloniler etrafında turuncu-mor bir zonun oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Saygılı vd 2006).

Fosfataz aktivitesi

Nutrient broth besi yeri içerisine son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde hazırlanmış

phenolphthalein diphosphate sodium tuzu eklenmiştir. Hazırlanan solüsyondan 5 ml alınarak tüplere dağıtılmış ve 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Saf haldeki 24-48 sa'lik bakteri kültürlerinden bir öze alınarak tüp içerisine konulmuş ve 26±2°C'de 2 gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra her tüpe %40'lık NaOH çözeltisinden damlatılmış ve tüplerde parlak pembe rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Karbonhidratlardan asit üretimi

%1'lik pepton solüsyonu hazırlanarak içerisine 10-30 mg/litre bromcresol purpule ilave edilerek pH'sı 7'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Testlenecek karbonhidratlardan her biri son konsantrasyonu %1 olacak şekilde filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve hazırlanmış solüsyon içerisine ilave edilmiştir. 24-48 sa'lik bakteri kolonilerinden alınarak tüplere inokule edilmiş ve 26±2°C'de 2 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Asit üretimi sonucu oluşan sarı renk pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.8. Bakterilerin BIOLOG sistemi ile metabolik enzim profillerinin belirlenmesi ve tanılanması

Bakteri izolatlarının BIOLOG sistemi yardımı ile metabolik enzim profillerinin belirlenmesi hem alternatif bir tanı hem de izolatların karakterizasyonunda kullanılmıştır. Aynı zamanda metabolik enzim profillerine bağlı olarak izolatların kullandıkları karbon kaynakları belirlenmiştir. Bu çalışmada sadece patojen oldukları belirlenen izolatlara BIOLOG yapılmış olup test edilen bakteriler Gram reaksiyonu özelliklerine göre gruplara ayrılmıştır. Gram Pozitifler BUG+M (Biolog Universal Growth Agar +%0,25 Maltoz) besiyerine, Gram Negatifler ise TSA besiyerine çizgi usulü ile ekilmiştir. Kültürler 30°C'de 16-24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak oluşan koloniler eküvyon çubukları ile Salina Tampon Çözeltisine (%0,5'lik NaCl) aktarılmıştır. Vortex cihazında karıştırılarak standart turbidity tüpüne göre konsantrasyonları 10^8 CFU/ml'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlardan pipet ile

150 mikrolitre alınarak mikroplate üzerindeki her bir çukurcuğa ilave edilmiştir. Mikroplateler 4-6 veya 16-24 saat süreyle 27-30°C'de inkübe edilmiş ve oluşan renklenme BIOLOG kinetik okuyucuda okutularak tanı sonuçları elde edilmiştir.

3.2.9. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Bakteri hücresinden DNA ekstraksiyonu

Araştırmada kullanılan bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu, Lazo *et al*.(1987), Ausubel *et al*. (1994), Khoodoo and Jaufeerally-Fakim (2004) tarafından kullanılan izolasyon metodunun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

1. LB besi yeri üzerine DNA'sı izole edilecek izolatlar 3 fazlı ekilerek, petriler 26°C'ye ayarlı inkübatörde 24-48 h inkübasyona bırakılmıştır.

2. Steril, ağzı kapaklı ependorflara 1000 µl STE tamponu (hücre duvarını parçalayarak hücre içeriğinin serbest hale gelmesini sağlar) konularak içerisine 2-3 öze dolusu bakteri ilave edilmiş ve tüpler 2500 rpm'de vortekslenerek homojenizasyon sağlanmıştır.

3. Vortekslenen tüpler 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak pelet üzerine tekrar 1000 µl STE tamponu eklenip 10 dk 10000 rpm'de santrifüj yapılmış ve bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrarlanmıştır.

4. Santrifüj sonrası oluşan üst faz atılıp pelet üzerine 500 µl STE tamponu ilave edilerek tamponun peletle tamamen karışması sağlanmıştır.

5. Tüpler 75°C'ye ayarlı su banyosunda 30 dk inkübe edilmiş ve su banyosundan çıkartılarak 50 µl %10'luk SDS ve 5 µl proteinaz K eklenen tüpler 40°C'ye ayarlı su banyosunda 1 sa bekletilmiştir.

6. İnkübasyon sonrası ortamdaki tuz konsantrasyonu %0,75-0,8 olacak şekilde 5 M NaCl ve 100 µl %10 CTAB/0.7 M NaCl (DNA'yı polisakkaritlerden ve ortamdaki diğer bileşiklerden arındırır) eklenerek tüpler 65°C'ye ayarlı su banyosunda 10 dk inkübe edilmiştir.

7. 25:24:1 oranlarında fenol:kloroform: izoamilalkol ilave edilen tüpler 15 dk oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda karıştırılmış ve böylece DNA'nın bu sıvıya bağlanarak üste çıkması sağlanmıştır. Oluşan üst faz pastör pipeti ile alınarak yeni steril ependorf tüplere aktarılmıştır.

8. Hematoloji çalkalayıcıda tüpler 10 dk karıştırılacak ve üst faz tekrar yeni steril bir ependorf tüpüne aktarılarak 0.6 hacim isopropanol (–20°C) ilave edilerek tüpler –20°C'de bir gece bekletilmiştir.

9. Cam pastör pipetlerin uç kısmı ateşte bükülerek bir gecelik inkübasyon sonrası çökmüş olan DNA, pastör pipetin ucuna sarılarak toplanmıştır.

10. Her bir izolat için steril ependorf tüplerine %70'lik etil alkolden 100 µl konulmuş ve pastör pipetin ucunda toplanan DNA bu tüplerde yıkanmıştır.

11. Etil alkolün uçması ve DNA'nın kuruması için DNA'lar şeffaf bir görünüm alana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen DNA miktarına göre steril ependorf tüplerine 30 -100 µl TE çözeltisi konularak kuruyan DNA, pastör pipetle birlikte TE çözeltisi bulunan tüpler içerisine alınarak DNA serbest kalana kadar bekletilmiştir.

260 ve 280 nm'de ultraviyole ışık absorbsiyon yöntemiyle DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin temizliği 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edilmiştir. Kuvarts

küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbansı ölçülmüş elde edilen değer kör olarak kaydedilmiştir. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlanıldıktan sonra 260 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulunmuştur. Yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlanarak A_{260} ve A_{280} değerlerine bakılmış ve A_{260} / A_{280}=1-2 olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır.

DNA örneğinin konsantrasyonu (µg / ml)

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)= A_{260}**x**Seyrelme Faktörü (500)**x**50 (Nükleik Asit Katsayısı) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlenmiştir.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu (ng / µl)

İstenen konsantrasyon (50 ng/µl) **x** İstenen hacim (100 µl) / Stok DNA konsantrasyonu (µg/ml) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve böylece hesaplama sonucu elde edilen değer, stok DNA çözeltisinden alınarak miktarı belirlenmiştir. Bu miktar TE çözeltisi ile 100 µl'ye tamamlanarak 50 ng/µl konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve DNA tüpleri –20°C'de muhafaza edilmiştir.

Primer çalışma konsantrasyonu (µM/ml)

Primer konsantrasyonu (nmol) x 2 = Gerekli TE tamponu formülü kullanılarak 500 µM/ml konsantrasyonda stok primer çözeltisi hazırlanılarak 2 eşit hacme ayrılmıştır. C_1 x V_1 = C_2 x V_2 formülü ile önce 100 µM/ml, sonra 5 µM/ml konsantrasyonda primer çalışma solüsyonu hazırlanmış, 5 µM/ml'lik primer çözeltisi PCR çalışmasında kullanılmak üzere –20°C'de muhafaza edilmiştir.

Bakteriyel izolatların 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA'dan, intergenic bölge genleri uygun forward ve reverse primerler kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltılmıştır. Master miksin hazırlanması, kullanılan primerler ve PCR programı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

REP, ERIC ve BOX PCR yöntemiyle bakterilerin gen profillerinin belirlenmesi

Her bir izolat için uygun forward ve reverse primerler kullanılarak Rep, ERIC ve BOX PCR yöntemleri ile bakterilerin gen profilleri belirlenmiştir. Master miksin hazırlanması, kullanılan primerler ve PCR programı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Spesifik PCR metoduna göre genetik profillerin belirlenmesi

Spesifik PCR *P. carotovorum* ssp. *carotovorum, P. carotovorum* ssp. *atrosepticum* ve *D. chrysanthemi* türlerine ait patojenler için yapılmış olup bu amaçla kullanılan primerler, master miksin hazırlanışı ve PCR programı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

PCR ürünlerinin elektroforezi

16S rDNA ve spesifik PCR metodlarında 1g agaroz, REP, ERIC ve BOX PCR metodlarında 1,5 g agaroz üzerine 100 ml 0,5XTBE tamponu ilave edilerek elde edilen solüsyon mikrodalga fırında 4 dk bekletilerek iyice kaynaması sağlanmıştır. 50-60 dereceye kadar soğutulan agaroz jele 0,6 µg/ml oranında ethidium bromür ilave edilmiş ve uygun taraklar yerleştirilerek jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jel donuncaya kadar bekletilmiş ve tarak dikkatlice çıkarılarak içerisinde 0,5XTBE bufer bulunan tanka yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı içerisindeki jelin ilk kuyucuğuna marker sonraki kuyucuklara ise örnekler yüklenerek 70 voltta 2,5-3,0 saat yürütülmüştür. Elde edilen DNA bantları jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

Çizelge 3.1. İzolatların tanısında kullanılan PCR metotları

PCR metotları	Primerlerin baz dizilimleri	Master miks (1 örnek için)		PCR programı	
16S rDNA PCR: (*Pectobacter* sp., *Dickeya* sp. *ve Enterobacter* sp.)	**fD1:** AGAGTTTGATCCTGGCTCAG **rP2:** ACGGCTACCTTGTTACGACTT	10 x PCR tamponu	5 µl	**1.** Denatürasyon a	94°C'de 4 dk
		dNTP	1 µl	**2.** Denatürasyon b	94C'de 1 dk
		Primerler	0.3'er µl	**3.** Bağlanma	58°C'de 1 dk
		Taq DNA polimeraz (5U)	0.5 µl	**4.** Uzama	72°C'de 3 dk
		sdH_2O	39.9 µl	**5.** Döngü (2, 3, 4)	35 tekrar
		Template DNA (50 ng/µl)	3 µl	**6.** Uzama	72°C'de 10 dk
16S rDNA PCR: *Chryseobacterium* sp.	**fD1:** AGAGTTTGATCCTGGCTCAG **rP2:** ACGGCTACCTTGTTACGACTT	10 x PCR tamponu	5 µl	**1.** Denatürasyon a	94°C'de 2 dk
		25 mM $MgCl_2$	4 µl	**2.** Denatürasyon b	94°C'de 45 sn
		dNTP	1 µl	**3.** Bağlanma	55°C'de 45 sn
		Primerler	0.3'er µl	**4.** Uzama	72°C'de 2 dk
		Taq DNA polimeraz (5U)	0.5 µl	**5.** Döngü (2, 3, 4)	35 tekrar
		sdH_2O	35.9 µl	**6.** Uzama	72°C'de 10 dk
		Template DNA (50 ng/µl)	3 µl		
16S rDNA PCR: *Pseudomonas* sp.	**PsvF:** GTAGGTGGTTTGTTAAGTTGAA **PsvR:** ACCTCAGTGTCAGTATGAGC	10 x PCR tamponu	5 µl	**1.** Denatürasyon a	94°C'de 4 dk
		25 mM $MgCl_2$	6 µl	**2.** Denatürasyon b	95°C'de 1 dk
		dNTP	1 µl	**3.** Bağlanma	52°C'de 1 dk
		Primerler	0.3'er µl	**4.** Uzama	72°C'de 1,5 dk
		Taq DNA polimeraz (5U)	0.5 µl	**5.** Döngü (2, 3, 4)	35 tekrar
		sdH_2O	33.9 µl	**6.** Uzama	72°C'de 10 dk
		Template DNA (50 ng/µl)			
16S rDNA PCR: *Bacillus* sp.	**EUB-F:** GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG **EUB-R:** GCCCGGGAACGTATTC-ACCG	10 x PCR tamponu	5 µl	**1.** Denatürasyon a	95 °C 'de 7 dk
		dNTP	1 µl	**2.** Denatürasyon b	94 °C'de 1 dk
		Primerler	0.3'er µl	**3.** Bağlanma	56 °C'de 1 dk
		Taq DNA polimeraz (5U)	0.5 µl	**4.** Uzama	72 °C'de 3 dk
		sdH_2O	39.9 µl	**5.** Döngü (2, 3, 4)	20 tekrar
		Template DNA (50 ng/µl)	3 µl	**6.** Uzama	72°C'de 10 dk

Çizelge 3.1 (devam)

PCR metotları	Primerlerin baz dizilimleri	Master miks (1 örnek için)		PCR programı	
REP PCR	REP 1R: IIICGI CGI CAT CIG GGC REP 2I: ICG ICT TAT CIG GCC TAC	10 x PCR tamponu	5 µl	**1.** Denatürasyon a	95 ^{o}C ‘de 7 dk
		25 mM $MgCl_2$	4 µl	**2.** Denatürasyon b	94 ^{o}C’de 1 dk
		dNTP	1,25 µl	**3.** Bağlanma	40 ^{o}C’de 1 dk
		Primerler	0.3’er µl	**4.** Uzama	65 ^{o}C’de 8 dk
		Taq DNA polimeraz (5U)	0.5 µl	**5.** Döngü (2, 3, 4)	30 tekrar
		sdH_2O	35,65 µl	**6.** Uzama	65°C’de 16 dk
		Template DNA (50 ng/µl)	3 µl		
ERIC PCR	ERIC1R: CAC TTA GGG GTC CTC GAA TGT A ERIC 2: AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	10 x PCR tamponu	5 µl	**1.** Denatürasyon a **2.** Denatürasyon b **3.** Bağlanma **4.** Uzama **5.** Döngü (2, 3, 4) **6.** Denatürasyon a **7.** Denatürasyon b **8.** Bağlanma **9.** Döngü (6, 7, 8) **10.** Uzama	95 ^{o}C ‘de 7 dk 95 ^{o}C’de 1 dk 40 ^{o}C’de 5 dk 72 ^{o}C’de 5 dk 4 tekrar 94°C 1 dk 55 ^{o}C ‘de 1 dk 72 ^{o}C’de 2 dk 30 tekrar 72°C’de 10 dk
		25 mM $MgCl_2$	12 µl		
		dNTP	4 µl		
		Primerler	0.4’er µl		
		Taq DNA polimeraz (5U)	1.5 µl		
		sdH_2O	23,7 µl		
		Template DNA (50 ng/µl)	3 µl		
BOX PCR	BOX A1R: CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	10 x PCR tamponu	5 µl		
		25 mM $MgCl_2$	8 µl		
		dNTP	3 µl		
		Primer	0.6 µl		
		Taq DNA polimeraz (5U)	1 µl		
		sdH_2O	29,4 µl		
		Template DNA (50 ng/µl)	3 µl		
spesifik PCR: *P.*c.*carotovorum*	Y1: TTA CCG GAC GCC GAG CTG TGG CGT Y2: 5CAG GAA GAT GTC GTT ATC GCG AGT	10 x PCR tamponu	5 µl	**1.** Denatürasyon a **2.** Denatürasyon b **3.** Bağlanma **4.** Uzama **5.** Döngü (2, 3, 4) **6.** Uzama	94 ^{o}C ‘de 5 dk 94 ^{o}C’de 30 sn 55 ^{o}C’de 45 sn 72 ^{o}C’de 45 sn 34 tekrar 72°C’de 7 dk
		25 mM $MgCl_2$	3 µl		
spesifik PCR: *P.*c.*atrosepticum*	ECA1f: CGG CAT CAT AAA AAC ACG ECA2r: GCA CAC TTC ATC CAG CGA	dNTP	0,5 µl		
		Primerler	0.3’er µl		
spesifik PCR: *D. chrysanthemi*	ADE1: GATCAGAAAGCC-CGCAGCCAGAT ADE2: CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC	Taq DNA polimeraz (5U)	0.25 µl		
		sdH_2O	37,65 µl		
		Template DNA (50 ng/µl)	3 µl		

***10 x PCR tamponu:** 100 mM Tris – HCl, 500 mM KCI, 15 mM $MgCl_2$, %0.01 jelatin pH: 8.3); **dNTP:** (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM)

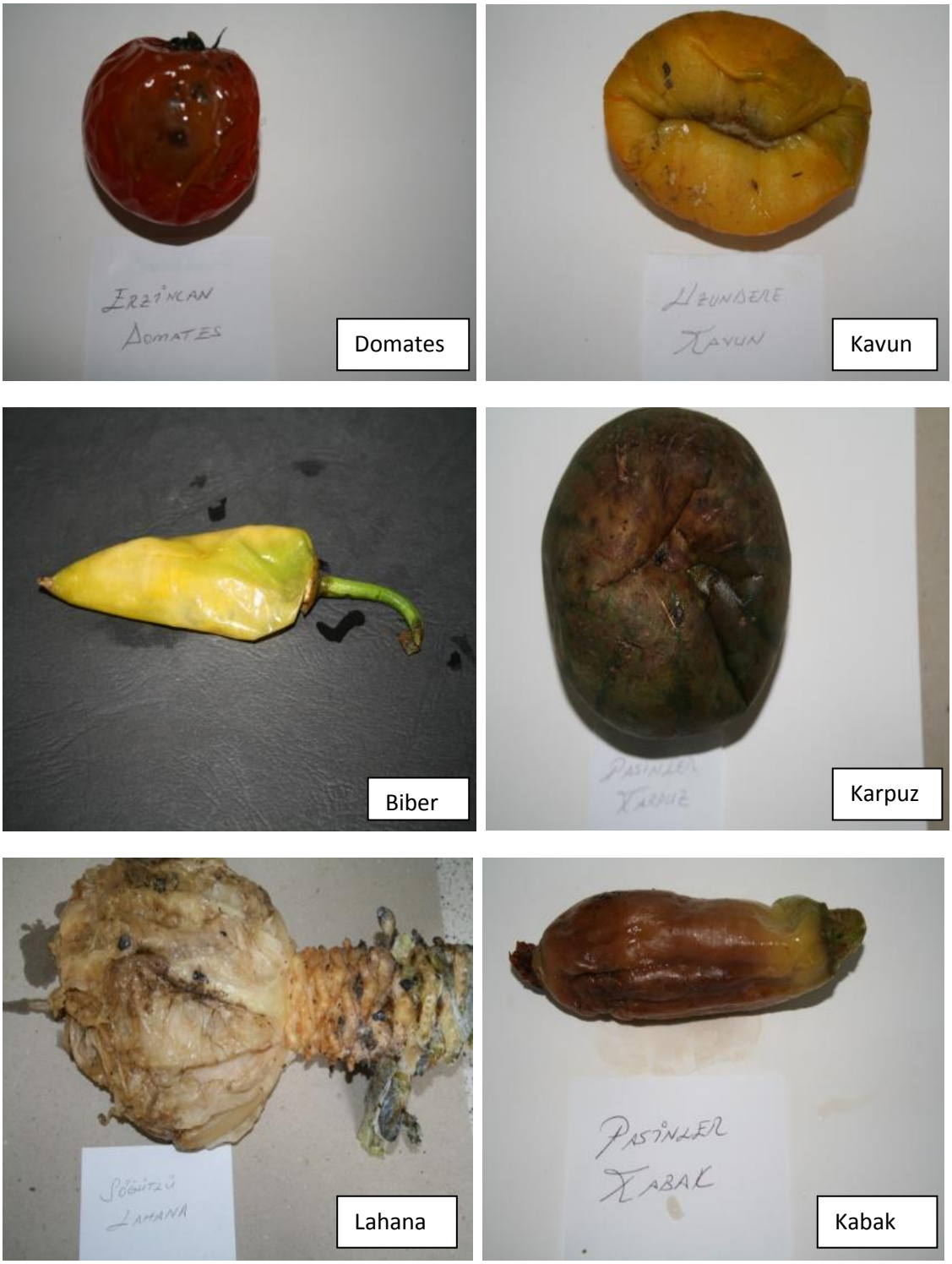
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Genel Bakteri İzolatlarının MIS Tanı Sonucu, Lokasyon ve Konukçu Dağılımları

Artvin, Erzincan, Erzurum ve Iğdır illeri merkez ve bazı ilçelerde yapılan survey çalışmalarında meyve (çilek, dut, hurma, nar, üzüm, kayısı, böğürtlen, elma, erik, kiraz, kavun ve karpuz) ve sebzelerde (patates, domates, kabak hıyar, patlıcan, marul, biber, havuç, turp, maydanoz, bamya, lahana ve soğan) çok sayıda yumuşak çürüklük belirtisi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Farklı konukçularda yumuşak çürüklük simptomları



Şekil 4.1 (Devam)

Belirtilen alanlardan alınarak laboratuara getirilen hastalıklı bitki materyallerinden toplam 882 bakteri izolatı izole edilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatlardan 868 tanesi MIS sistemi kullanılarak tanılanmış olup 14 tanesi tanılananmamıştır. Tanılanan izolatların 525 tanesi Erzurum'dan, 140 tanesi Erzincan'dan, 118 tanesi Artvin'den ve 99 tanesi de Iğdır'dan alınan örneklerden elde edilmiştir. MIS tanı sonucuna göre tanılanan toplam 868 bakteri izolatının tür düzeyindeki dağılımını gösteren sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; toplam 169 tür ya da alt tür belirlenmiş olup; toplam bakteri izolatı içerisinde yoğunluk açısından ilk üç sırayı sırasıyla 59 *Bacillus pumilus*, 53 *Pantoea agglomerans* ve 41 *Enterobacter cloacae* izolatları oluşturmaktadır.

Meyvelerde yapılan izolasyonlardan toplam 123 bakteri izole edilmiş olup; bunların 28'i elmadan, 19'u kavundan, 18'i karpuzdan, 17'si dutdan, 11'i kirazdan, 8'i çilekten, 7'si hurmadan, 5'i böğürtlenden, 5'i erikden, 2'si kayısıdan, 2'si üzümden ve 1'i nardan elde edilmiştir. Sebzelerde yapılan izolasyonlarda ise toplam 759 bakteri izole edilmiş olup; bunların 201'i patatesten, 109'u domatesden, 98'i biberden, 74'ü hıyardan, 72'si soğandan, 61'i kabakdan, 59'u lahanadan, 26'sı patlıcandan, 23'ü maruldan, 18'i maydanozdan, 12'si turptan, 4'ü havuçtan ve 2'si bamyadan elde edilmiştir.

P. c. subsp. *carotovorum* izolatlarının; 6'sı patates, 5'i biber, 1'i domates, 1'i kabak, 4'ü soğan ve 2'si patlıcandan, *P. c.* subsp. *atrosepticum* izolatlarının; 4'ü domates, 2'si hıyar, 1'i çilek, 1'i dut, 1'i biber, 1'i patlıcan, 1'i lahana, ve 1'i maydanozdan, *D. chrysanthemi* izolatlarının; 3'ü biber, 2'si soğan, 1'i patates, 1'i domates, 1'i kabak, 1'i bamya ve 1'i maydanozdan *P. viridiflava* izolatlarının; 1'i patates, 1'i karpuz, 1'i biber, 1'i domates, 1'i kabak, 1'i patlıcan, ve 1'i maydanozdan, 1'i karpuz, 1'i domates ve 1'i soğandan, *B. pumilus* izolatlarının; 1'i çilek, 4'ü dut, 3'ü böğürtlen, 7'si elma, 3'ü erik, 1'i kiraz, 1'i kavun, 2'si karpuz, 3'ü patates, 7'si domates, 2'si kabak, 2'si hıyar, 5'i marul, 3'ü biber, 1'i turp, 6'sı lahana ve 8'i soğandan, *E. cloacae* izolatlarının; 16'sı patates, 5'i domates, 4'ü biber, 4'ü kavun, 2'si karpuz, 2'si hıyar, 2'si soğan, 2'si patlıcan, lahana ve 2'si turpdan *C. indologenes* izolatlarının; 4'ü hıyardan, 2'si domatesden, 1'i biberden ve 1'i kabaktan alınan örneklerden elde edilmiş ve sonuçlar

Çizelge 4.1'de verilmiştir. Benzer şekilde bu etmenler dışında farklı türlere ait çok sayıda izolat elde edilmiş olup bu izolatların elde edildiği konukçulara ait bilgiler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Yine MIS tanı sonucuna göre yumuşak çürüklük etmeni olarak belirlenen 159 izolattan *P. c.* subsp. *carotovorum* izolatlarının 10'u Erzurum, 2'si Artvin ve 7'si Iğdır'dan, *P. c.* subsp. *atrosepticum* izolatlarının 8'i Erzurum, 2'si Erzincan ve 2'si de Iğdır'dan, *D. chrysanthemi* izolatlarının 9'u Erzurum, 1' Erzincan'dan, *P. viridiflava* izolatlarının 8'i Erzurum, 1'i Erzincan ve 1'i Iğdır'dan, *B. pumilus* izolatlarının 16'sı Erzurum, 16'sı Erzincan ve 27'si Artvin'den, *E. cloacae* izolatlarının 14'ü Erzurum, 18'i Erzincan ve 9'u Iğdır'dan, *C. indologenes* izolatlarının 4'ü Erzurum, 1'i Artvin ve 3'ü Iğdır'dan alınan örneklerden elde edilmiştir. Benzer şekilde bu etmenler dışında farklı türlere ait çok sayıda izolat elde edilmiş olup bu izolatlara ait lokasyon bilgileri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. MIS tanı sonucuna göre belirlenen türlerin konukçu ve lokasyon bilgileri

MIS tanı sonucuna göre bakteri türü	Lokasyon				Meyvelerden												Sebzeler den												
	Erzurum	Erzincan	Artvin	Iğdır	Kiraz	Hurma	Dut	Nar	Üzüm	Elma	Kayısı	Çilek	Kavun	Karpuz	Böğürtlen	Erik	Patates	Biber	Domates	Kabak	Hıyar	Soğan	Patlıcan	Bamya	Lahana	Maydanoz	Marul	Turp	Havuç
Pectobacterium caratovorum carotovorum	10		2	7													6	5	1	1		4	2						
Pectobacterium caratovorum atrosepticum	8	2		2			1					1						1	4		2		1		1	1			
Erwinia chrysanthemi biotype IV	3	1															1	2		1									
Erwinia chrysanthemi biotype V	6																	1	1			2		1		1			
Pseudomonas viridiflava	8	1		1										2			1	1	2	1		1	1			1			
Bacillus pumilus GC subgroup A	13	8	7		1					2			1	1		1	2	1	3	2	1	5			5		3		
Bacillus pumilus GC subgroup B	3	8	20				4			5		1		1	3	2	1	2	4		1	3			1		2	1	
Enterobacter cloacae	14	18		9									4	2			16	4	5		2	2	2		2			2	
Chryseobacterium indologenes	4		1	3														1	2	1	4								
Achromobacter xylosoxydans denitrificans		1																							1				
Acidovorax konjaci	1																			1									
Acinetobacter baumannii		3		1									3					1											
Acinetobacter calcoaceticus	7			1										1			4	1				1					1		
Acinetobacter genospecies 3	1																			1									
Acinetobacter haemolyticus	2												1							1									
Acinetobacter johnsonii	4		1														4	1											
Acinetobacter lwoffii	3	1															4												
Acinetobacter radioresistens	1																1												
Actinomadura yumaensis	1				1																								
Aeromonas hydrophila	4	1					1										3				1								
Aeromonas salmonicida salmonicida	1			1																			1		1				
Aeromonas schubertii	1		1														1	1											
Agrobacterium radiobacter				2														2											
Agrobacterium rubi	2			1													2		1										
Alcaligenes piechaudii	3	2																2		1		1				1			
Alcaligenes xylosoxydans xylosoxydans	9	1	2		1												3	1	2			1			2	2			
Aquaspirillum autotrophicum	2	1								1							1								1				
Arthrobacter atrocyaneus	1																				1								
Arthrobacter ilicis	3		1														1				3								
Bacillus cereus GC subgroup B	1																				1								
Bacillus circulans			1									1																	
Bacillus coagulans			1							1																			
Bacillus flexus	4	2															2				2		1		1				
Bacillus GC group 22		2															2												
Bacillus globisporus	2																1	1											
Bacillus lentimorbus			2									1				1													
Bacillus licheniformis	1		5																	1		1			1		3		
Bacillus marinus	1	10		1										3			2	2	2	1	2								

Çizelge 4.1 (devam)

MIS tanı sonucuna göre bakteri türü	Lokasyon				Meyvelerden												Sebzeler den												
	Erzurum	Erzincan	Artvin	Iğdır	Kiraz	Hurma	Dut	Nar	Üzüm	Elma	Kayısı	Çilek	Kavun	Karpuz	Böğürtlen	Erik	Patates	Biber	Domates	Kabak	Hıyar	Soğan	Patlıcan	Bamya	Lahana	Maydanoz	Marul	Turp	Havuç
Bacillus megaterium GC subgroup A	2	1	2										1								1		1		1		1		
Bacillus megaterium GC subgroup B	7		1							1							2		1		2	2							
Bacillus oleronius			2							1																	1		
Bacillus pychrophilus	1																								1				
Bacillus simplex	2		1							1											1						1		
Bacillus sphaericus GC subgroup III	1																			1									
Bacillus sphaericus GC subgroup IV	1																			1									
Bacillus subtilis	2	3	10		1		1			2		2			1	1	1	2			1	2			1				
Bacillus thuringiensis canadensis	1																				1								
Bergeyella zoohelcum	3		1																		4								
Bordetella avium	3																3												
Bordetella parapertussis	1																1												
Brevibacillus agri	13		1		1										1		2		3	1	4	1					1		
Brevibacillus brevis	2																				1					1			
Brevibacillus centrosporus			1							1																			
Brevibacterium casei				1															1										
Brevibacterium epidermidis	1																				1								
Brevibacterium mcbrellneri	1																		1										
Brevindimonas vesicularis			1																			1							
Brevindominas diminuta				1																			1						
Brevundimonas vesicularis		5												1			3						1						
Burkholderia cepacia GC subgroup C	3				1		1										1												
Burkholderia pyrrocinia	1																								1				
Cedecea davisae	1																				1								
Cellulomonas fimi	2	1	1	1						1				1			1		1	1									
Cellulomonas flavigena			2																	1	1								
Chromobacterium violaceum	8	1	4	2						2				1			4	2	2	2		1			1				
Chryseomonas luteola				3														1	2										
Citrobacter freundii	8	4	2	3		1											8		4		2	2							
Comamonas acidovorans	1																			1									
Corynebacterium pseudotuberculosis	1																								1				
Curtobacterium citreum	1																1												
Curtobacterium flaccumfaciens oortii				1															1										
Deinococcus erythromxa			1							1																			
Empedobacter brevis	3		1	2	1												2	1	2										
Enterobacter agglomerans GC subgroup II	4	1															1	1	2			1							
Enterobacter agglomerans GC subgroup III	5			2							1						1				1	1			1		1	1	
Enterobacter amnigenus	1	4															5												

Çizelge 4.1 (devam)

MIS tanı sonucuna göre bakteri türü	Lokasyon				Meyvelerden												Sebzelerden												
	Erzurum	Erzincan	Artvin	Iğdır	Kiraz	Hurma	Dut	Nar	Üzüm	Elma	Kayısı	Çilek	Kavun	Karpuz	Böğürtlen	Erik	Patates	Biber	Domates	Kabak	Hıyar	Soğan	Patlıcan	Bamya	Lahana	Maydanoz	Marul	Turp	Havuç
Enterobacter intermedius	5	2	1														5		1			1				1			
Enterobacter sakazakii		2		1														2					1						
Enterococcus casseliflavus		2															2												
Enterococcus durans	1																									1			
Enterococcus faecalis GC subgroup A	1	1		1									1						1						1				
Erwinia amylovora			1			1																							
Erwinia rhapontici	2											1														1			
Escherichia coli GC subgroup C	4	3	2	3									1				1	3	1			6							
Escherichia coli GC subgroup E	1																						1						
Escherichia vulneris	1		1																1		1								
Exiquobacterium acetylicum GC subgroup B	19	1		1									1				4	2	2	1	1		2		8				
Flavimonas oryzihabitans				2															2										
Janthinobacterium lividum	1																								1				
Klebsiella planticola	2	1		1									1				2	1											
Klebsiella pneumoniae pneumoniae			1	2						1									2										
Klebsiella pneumoniae ozaenae	3	2	1				1							1			2		1						1				
Kluyvera ascorbata	1	1											1				1												
Kocuria kristinae			1				1																						
Kocuria rosea	1																	1											
Kocuria varians	4		1		1													2		2									
Kurthia gibsonii		5		1									1				3		2										
Lactobacillus paracasei paracasei		1																1											
Leclercia adecarboxylata		1		1														1	1										
Lysobacter enzymogenes enzymogenes	1																			1									
Microbacterium esteraromaticum	4																1		2	1									
Microbacterium lacticum GC subgroup B	1																		1										
Microbacterium liquefaciens	1			1														1							1				
Micrococcus luteus GC subgroup C			2														1				1								
Moraxella nonliquefaciens				1														1											
Morganella morganii	2																		1			1							
Myroides odoratus	12			2													9	1					1		1	2			
Neisseria flavescens GC subgroup A	1		1			1														1									
Neisseria mucosa	5		2	1													2	1			4	1							
Neisseria subflava	9	1		3			2							1			3	2	2		1		1		1				
Nesterenkonia halobia	3																3												
Orchrobactrum anthropi	1																								1				
Paenibacillus gordonae	1																1												
Paenibacillus macerans GC subgroup B			1																	1									

Çizelge 4.1 (devam)

MIS tanı sonucuna göre bakteri türü	Lokasyon				Meyvelerden												Sebzelerden												
	Erzurum	Erzincan	Artvin	Iğdır	Kiraz	Hurma	Dut	Nar	Üzüm	Elma	Kayısı	Çilek	Kavun	Karpuz	Böğürtlen	Erik	Patates	Biber	Domates	Kabak	Hıyar	Soğan	Patlıcan	Bamya	Lahana	Maydanoz	Marul	Turp	Havuç
Paenibacillus polymyxa	2																1					1							
Pantoea agglomerans	36	13	4			1	2			1			1				1	9	9	12	2	5			6	2		2	
Pantoea ananas	3																			1	1	1							
Photobacterium damsela	1			1							1						1												
Photobacterium leiognathi	6		1	2						1							4	1	2								1		
Proteus myxofaciens				1														1											
Proteus vulgaris GC subgroup A	1		1	1															1		1			1					
Providencia rustigianii	1																1												
Pseudomonas aeruginosa		1																							1				
Pseudomonas alcaligenes	5			1													2	1			1	2							
Pseudomonas balearica	1																			1									
Pseudomonas chlororaphis	8	1								2							1	2		1		1			1				
Pseudomonas coronafaciens	1																												1
Pseudomonas doudoroffii	11		3			1											9	2	1			1							
Pseudomonas fluorescens biotype B		1																	1										
Pseudomonas fluorescens biotype C	3																2			1									
Pseudomonas fluorescens biotype F	1																			1									
Pseudomonas fluorescens biotype G	1		1																		1				1				
Pseudomonas huttiensis	5																2						1		1	1			
Pseudomonas mendocina	4		1														1			3	1								
Pseudomonas pseudoalcaligenes	6			1													4		1		1						1		
Pseudomonas putida biotype A	11			2										1			2	2	3		4							1	
Pseudomonas putida biotype B	33	6	3	1			1							1			8	2	5	6	3	4	1		5	2	1	4	
Pseudomonas stutzeri				1														1											
Pseudomonas syringae pv. *papulans*	1																			1									
Pseudomonas syringae pv. *pisi*	2																			2									
Pseudomonas syringae pv. *syringae*	12	1		3													1	7	1	1	3	1			1				1
Pseudomonas syringae pv. *tomato*	1																				1								
Rahnella aquatilis	1		2		1	1						1																	
Rathayibacter rathayi	1																			1									
Salmonella typhimurium GC subgroup A				2															2										
Salmonella typhimurium GC subgroup B	2																	1							1				
Serratia fonticola	2	1								1												1							
Serratia grimesii	13		3	2		1	1			2							1		4	1	1	5	1						1
Serratia liquefaciens	7	1		2	1													2		2		3	1					1	
Serratia marcescens GC subgroup A			1																1										
Serratia odorifera	1																1												

Çizelge 4.1 (devam)

MIS tanı sonucuna göre bakteri türü	Lokasyon				Meyvelerden												Sebzelerden													
	Erzurum	Erzincan	Artvin	Iğdır	Kiraz	Hurma	Dut	Nar	Üzüm	Elma	Kayısı	Çilek	Kavun	Karpuz	Böğürtlen	Erik	Patates	Biber	Domates	Kabak	Hıyar	Soğan	Patlıcan	Bamya	Lahana	Maydanoz	Marul	Turp	Havuç
Serratia plymuthica	1	1											1									1							
Sphingobacterium spiritivorum	2			1													1					1	1						
Staphylococcus kloosii			1					1																					
Stenotrophomonas maltophilia	17	1	3	10	1								1				10	8	3		3	1	1		2				1
Streptococcus sanquis	2																					2							
Vibrio aestuarianus	1																1												
Vibrio alginolyticus GC subgroup B	2													1					1										
Vibrio furnissii	2	2															3	1											
Vibrio harveyi	1																1												
Vibrio hollisae	2	1															2	1											
Vibrio mediterranei	1																1												
Vibrio parahaemolyticus	2																2												
Xanthobacter agilis			1	1																		1	1						
Xanthomonas arboricola pv. *corylina*	1																		1										
Xanthomonas axonopodis pv. *dieffenbachiae*	1																						1						
Yersinia fredericksenii	4			1													3	1			1								
Yersinia pseudotuberculosis	4	1																	3						2				
Tanılanmadı	7	4	3				1		2	1							3		3		1		1			1	1		
Toplam	525	140	118	99	11	7	17	1	2	28	2	8	19	18	5	5	201	98	109	61	74	72	26	2	59	18	23	12	4

4.2. Patojenite ve Pektolitik Aktivite Test Sonuçları Pozitif Olan İzolatların MIS ve BIOLOG Sonuçları ile HR Testi Sonuçları

MIS ve BIOLOG tanı sonuçları, HR, patojenite ve pektolitik aktivite testlerinden elde edilen sonuçlara göre yumuşak çürüklük etmeni olduğu tespit edilen izolatlara ait bilgiler Çizelge 4.2'de verilmiştir. MIS sistemi kullanılarak tanısı yapılan bütün bakterilere tütün (*Nicotina tabacum* L. var. Samsun) bitkisinde HR testi yapılmış olup; bu bakterilerden toplam 115 izolat pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.2). Yapılan HR testleri sonucunda yumuşak çürüklük etmeni olarak bilinen bakterilerden; 28 *Bacillus pumilus*, 9 *Pseudomonas viridiflava*, 4 *Pectobacterium carotovorum carotovorum*, 4 *Chryseobacterium indologenes*, 3 *Enterobacter cloacae*, 1 *Pectobacterium carotovorum atrosepticum* ve 1 *Dickeya chrysanthemi* izolatı pozitif sonuç vermiştir. Bu türlere ait geri kalan toplam 65 izolat ise negatif sonu vermiştir.

Ancak, HR sonucu negatif çıkmış olsa bile MIS tanı sonucuna göre yumuşak çürüklük etmeni olabileceği düşünülen izolatlar ile HR pozitif olan izolatların tamamına patojenite testi yapılmış olup; bu bakterilerden elde edilen sonuçlara göre 79 izolatın patojen olduğu tespit edilmiştir. Patojenite testleri sonucunda yumuşak çürüklük hastalığı etmenlerinden; 18 *Bacillus pumilus*, 17 *Enterobacter cloacae*, 15 *Pectobacterium carotovorum carotovorum*, 8 *Chryseobacterium indologenes*, 7 *Pectobacterium carotovorum atrosepticum*, 9 *Pseudomonas viridiflava*, ve 5 *Erwinia chrysanthemi* türüne ait izolatlar pozitif sonuç vermiştir. Bu izolatların farklı konukçularda yapılan patojenite testleri ile ilgil görseller Şekil 4.3, 4,4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13'de verilmiştir. HR ve patojenite testleri sonucunda pozitif sonuç veren 79 izolata yapılan patates dilimlerinde pektolitik aktivite testleri sonucunda da tüm izolatların pozitif sonuç verdiği görülmüştür (Şekil 4.14, 4.15 ve 4.16).

MIS sistemi kullanılarak tanılanmış olan izolatlardan yumuşak çürüklük etmeni olarak bilinen 19 *Pectobacterium carotovorum carotovorum*, 12 *Pectobacterium carotovorum atrosepticum*, 10 *Erwinia chrysanthemi*, ve 10 *Pseudomonas viridiflava* türü tespit

edilmiştir. Ayrıca son zamanlarada yumuşak çürüklük etmeni olduğu tespit edilen 59 adet *Bacillus pumilus*, 41 adet *Enterobacter cloacae*, 8 *Chryseobacterium indologenes* türü olduğu belirlenmiştir. Ancak tanılanan bu izolatlar içerisinde yapılan HR, patojenite ve pektolitik aktivite testleri sonucunda yumuşak çürüklük etmeni olduğu belirlenen; 18 *Bacillus pumilus*, 17 *Enterobacter cloacae*, 15 *Pectobacterium carotovorum carotovorum*, 8 *Chryseobacterium indologenes*, 9 *Pectobacterium carotovorum atrosepticum*, 7 *Pseudomonas viridiflava*, ve 5 *Erwinia chrysanthemi* türlerine ait izolatların MIS tanı sonucuna göre benzerlik oranları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

BIOLOG tanı sonuçları ve benzerlik oranları Çizelge 4.2'de verilmiştir. BIOLOG tanı sonuçları incelendiğinde *Chryseobacterium indologenes* türleri içerisinde sadece bir türün *Chryseobacterium scopthalmum* (F-544) olarak tanılandığı diğer 7 türün ise MIS tanı sonucu ile aynı sonucu verdiği belirlenmiştir. MIS tanı sonucuna göre; *Bacillus pumilus* olarak belirlenen 18 izolatdan F-313, F-323 ve F-546 izolatları BIOLOG ile yapılan tanıda aynı sonucu vermişken; geri kalan 15 izolatdan ise cins düzeyinde aynı sonuçlar elde edilmiştir. Benzer şekilde MIS sisteminde *Pseudomonas viridiflava* olarak tanılanan 9 izolatdan 8'i BIOLOG sisteminde cins düzeyinde *Pseudomonas* olarak belirlenmişken; 1 izolat *Brevundimonas vesicularis* olarak tanılanmıştır. MIS sistemine göre *Pectobacterium carotovorum carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum atrosepticum*, *Erwinia chrysanthemi* ve *Enterobacter cloacae* olarak tanılanan izolatlardan ise BIOLOG sisteminde cins ve tür düzeyinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. MIS, BIOLOG, HR, patojenite ve pektolitik aktivite testleri sonucu patojen olduğu belirlenen 79 izolat esas alınmış olup; morfolojik ve biyokimyasal testler ile PCR çalışmaları bu izolatlar üzerinden yürütülmüştür.

Çizege 4.2. Patojen bakterilerin MIS ve BIOLOG tanı sonucu, izolasyon bilgileri ile HR, patojenite ve pektolitik aktivite test sonuçları

İN	MIS tanı sonucu	MBİ	BIOLOG tanı sonucu	BBİ	K	BM	L	HR	P	PA
F-11	*Enterobacter cloacae*	0.59	*Klebsiella pneumoniae pneumoniae*	0.29	Patates	Yumru	Pasinler	+	+	+
F-18	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.79	*Salmonella typhimurium*	0.47	Biber	Meyve	Artvin	+	+	+
F-37	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.76	*Enterobacter cloacae*	0.40	Patates	Yumru	Şenkaya	+	+	+
F-41	*Enterobacter cloacae*	0.70	*Raoultella terrigena*	0.24	Patates	Yumru	Şenkaya	-	+	+
F-108	*Pseudomonas viridiflava*	0.46	*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*	0.61	Soğan	Gövde	Pasinler	+	+	+
F-121	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *atrosepticum*	0.61	*Pantoea agglomerans*	0.62	Çilek	Meyve	Pazaryolu	-	+	+
F-123	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *atrosepticum*	0.65	*Vibrio vulnificus*	0.46	Dut	Meyve	Pazaryolu	-	+	+
F-128	*Pseudomonas viridiflava*	0.51	*Pseudomonas fluorescens biotype* F	0.70	Patlıcan	Yaprak	Pazaryolu	+	+	+
F-137	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *atrosepticum*	0.51	*Vibrio vulnificus*	0.52	Lahana	Gövde	Pazaryolu	-	+	+
F-138	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *atrosepticum*	0.86	*Vibrio vulnificus*	0.26	Maydanoz	Gövde	Pazaryolu	-	+	+
F-139	*Pseudomonas viridiflava*	0.76	*Pseudomonas viridiflava*	0.84	Maydanoz	Gövde	Pazaryolu	+	+	+
F-140	*Erwinia chrysanthemi* biotype V	0.83	*Pantoea agglomerans*	0.25	Maydanoz	Gövde	Pazaryolu	-	+	+
F-161	*Erwinia chrysanthemi* biotype V	0.81	*Raoultella terrigena*	0.22	Soğan	Gövde	İspir	-	+	+
F-172	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *atrosepticum*	0.71	*Salmonella typhimurium*	0.36	Patates	Gövde	Uzundere	-	+	+
F-173	*Pseudomonas viridiflava*	0.92	*Pseudomonas viridiflava*	0.45	Patates	Gövde	Uzundere	+	+	+
F-176	*Pseudomonas viridiflava*	0.82	*Pseudomonas viridiflava*	0.68	Karpuz	Meyve	Uzundere	+	+	+
F-215	*Erwinia chrysanthemi* biotype V	0.75	*Vibrio vulnificus*	0.50	Soğan	Gövde	Uzundere	-	+	+
F-243	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.76	*Bacillus licheniformis*	0.35	Patates	Gövde	Tortum	+	+	+
F-281	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.64	*Bacillus licheniformis*	0.11	Çilek	Meyve	Erzurum	+	+	+
F-296	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.61	*Bacillus amyloliquefaciens*	0.05	Elma	Meyve	Şavşat	+	+	+
F-311	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.60	*Bacillus licheniformis*	0.08	Soğan	Gövde	Şavşat	+	+	+
F-313	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.51	*Bacillus pumilus*	0.15	Soğan	Gövde	Şavşat	+	+	+
F-323	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.41	*Bacillus pumilus*	0.24	Erik	Meyve	Şavşat	+	+	+
F-331	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.71	*Salmonella typhimurium*	0.40	Patates	Gövde	Şavşat	-	+	+
F-379	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.56	*Serratia odorifera*	0.40	Soğan	Gövde	Hınıs	-	+	+
F-389	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.44	*Shigella flexneri*	0.38	Soğan	Gövde	Hınıs	-	+	+
F-391	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.79	*P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*	0.44	Soğan	Gövde	Hınıs	+	+	+

***İN:** İzolat no, **MBİ:** MIS benzerlik indeksi, **BBİ:** Biyolog benzerlik indeksi, **K:** Konukçu, **BM:** Bitki materyali, **L:** Lokasyon, **HR:** Aşırı duyarlık testi, **P:** Patojenite, **PA:** Pektolitik aktivite, **+ :** Pozitif sonuç, **-:** Negatif sonuç

Çizege 4.2 (devam)

İN	MIS tanı sonucu	MBİ	BIOLOG tanı sonucu	BBİ	K	BM	L	HR	P	PA
F-408	*Chryseobacterium indologenes*	0.84	*Chryseobacterium indologenes*	0.33	Hıyar	Meyve	Hınıs	-	+	+
F-417	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.74	*Vibrio vulnificus*	0.28	Patlıcan	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-418	*Enterobacter cloacae*	0.84	*Enterobacter cloacae*	0.37	Patlıcan	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-421	*Pseudomonas viridiflava*	0.66	*Pseudomonas cichorii*	0.85	Biber	Meyve	Iğdır	+	+	+
F-432	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.65	*Vibrio vulnificus*	0.40	Biber	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-441	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.48	*Vibrio vulnificus*	0.35	Biber	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-453	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *atrosepticum*	0.72	*Salmonella typhimurium*	0.09	Biber	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-460	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.77	*Vibrio vulnificus*	0.20	Domates	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-469	*Enterobacter cloacae*	0.77	*Vibrio vulnificus*	0.29	Domates	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-476	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.39	*Citrobacter freundii*	0.33	Biber	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-487	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.64	*Brevundimonas vesicularis*	0.31	Biber	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-491	*Chryseobacterium indologenes*	0.78	*Chryseobacterium indologenes*	0.42	Hıyar	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-492	*Chryseobacterium indologenes*	0.82	*Chryseobacterium indologenes*	0.40	Hıyar	Meyve	Iğdır	+	+	+
F-502	*Chryseobacterium indologenes*	0.35	*Chryseobacterium indologenes*	0.39	Domates	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-503	*Enterobacter cloacae*	0.78	*Citrobacter freundii*	0.09	Domates	Meyve	Iğdır	-	+	+
F-544	*Chryseobacterium indologenes*	0.89	*Chryseobacterium scopthalmum*	0.31	Hıyar	Meyve	Yusufeli	-	+	+
F-546	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.62	*Bacillus pumilus*	0.01	Turp	Meyve	Karaçoban	+	+	+
F-547	*Enterobacter cloacae*	0.85	*Bacillus licheniformis*	0.25	Turp	Meyve	Karaçoban	-	+	+
F-548	*Enterobacter cloacae*	0.67	*Citrobacter freundii*	0.14	Turp	Meyve	Karaçoban	-	+	+
F-554	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.68	*Bacillus subtilis*	0.39	Biber	Meyve	Uluköy	+	+	+
F-562	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.45	*Bacillus maroccanus*	0.21	Domates	Gövde	Uluköy	+	+	+
F-570	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.72	*Bacillus subtilis*	0.61	Domates	Gövde	Uluköy	+	+	+
F-575	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.63	*Bacillus subtilis*	0.44	Karpuz	Meyve	Uluköy	+	+	+
F-578	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.41	*Bacillus amyloliquefaciens*	0.16	Karpuz	Meyve	Uluköy	+	+	+
F-581	*Enterobacter cloacae*	0.07	*Pseudomonas bathycetes*	0.29	Karpuz	Meyve	Uluköy	+	+	+

***İN:** İzolat no, **MBİ:** MIS benzerlik indeksi, **BBİ:** Biyolog benzerlik indeksi, **K:** Konukçu, **BM:** Bitki materyali, **L:** Lokasyon, **HR:** Aşırı duyarlık testi, **P:** Patojenite, **PA:** Pektolitik aktivite, **+ :** Pozitif sonuç, **-:** Negatif sonuç

Çizege 4.2 (devam)

İN	MIS tanı sonucu	MBİ	BIOLOG tanı sonucu	BBİ	K	BM	L	HR	P	PA
F-588	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.69	*Bacillus subtilis*	0.35	Kavun	Meyve	Uluköy	+	+	+
F-591	*Enterobacter cloacae*	0.66	*Enterobacter cloacae*	0.39	Kavun	Meyve	Uluköy	-	+	+
F-593	*Enterobacter cloacae*	0.63	*Enterobacter cloacae*	0.15	Kavun	Meyve	Uluköy	-	+	+
F-594	*Enterobacter cloacae*	0.73	*Brevundimonas vesicularis*	0.26	Kavun	Meyve	Uluköy	-	+	+
F-608	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.60	*Bacillus licheniformis*	0.34	Kabak	Meyve	Erzincan	+	+	+
F-610	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *atrosepticum*	0.69	*Salmonella typhimurium*	0.50	Patlıcan	Meyve	Erzincan	-	+	+
F-614	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.45	*Bacillus subtilis*	0.26	Dut	Meyve	Erzincan	+	+	+
F-641	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.51	*Bacillus subtilis*	0.32	Patates	Gövde	Erzincan	+	+	+
F-658	*Bacillus pumilus* GC subgroup B	0.48	*Bacillus subtilis*	0.25	Biber	Meyve	Erzincan	+	+	+
F-663	*Erwinia chrysanthemi* biotype IV	0.55	*Enterobacter nimipressuralis*	0.54	Biber	Meyve	Erzincan	-	+	+
F-680	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.64	*Escherichia coli*	0.15	Patates	Gövde	Pasinler	+	+	+
F-709	*Chryseobacterium indologenes*	0.86	*Chryseobacterium indologenes*	0.55	Domates	Meyve	Uzundere	+	+	+
F-713	*Chryseobacterium indologenes*	0.60	*Chryseobacterium indologenes*	0.74	Biber	Meyve	Uzundere	+	+	+
F-714	*Erwinia chrysanthemi* biotype IV	0.54	*Vibrio vulnificus*	0.53	Biber	Meyve	Uzundere	-	+	+
F-718	*Enterobacter cloacae*	0.84	*Chryseobacterium indologenes*	0.36	Karpuz	Meyve	Uzundere	-	+	+
F-723	*Chryseobacterium indologenes*	0.79	*Chryseobacterium indologenes*	0.60	Kabak	Meyve	Uzundere	+	+	+
F-732	*Pseudomonas viridiflava*	0.36	*Pseudomonas syringae* pv. *persicae*	0.20	Karpuz	Meyve	Pasinler	-	+	+
F-741	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.67	*Vibrio vulnificus*	0.34	Patates	Yumru	Pasinler	-	+	+
F-742	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *carotovorum*	0.54	*Brevundimonas vesicularis*	0.38	Patates	Yumru	Pasinler	-	+	+
F-764	*Pseudomonas viridiflava*	0.76	*Brevundimonas vesicularis*	0.35	Kabak	Meyve	Söğütlü	+	+	+
F-778	*Bacillus pumilus* GC subgroup A	0.78	*Bacillus amyloliquefaciens*	0.13	Lahana	Gövde	Söğütlü	+	+	+
F-786	*Pseudomonas viridiflava*	0.75	*Pseudomonas syringae* pv. *primulae*	0.62	Domates	Meyve	Erzincan	+	+	+
F-795	*Enterobacter cloacae*	0.71	*Enterobacter cloacae*	0.18	Patates	Yumru	Çayırlı	-	+	+
F-796	*Enterobacter cloacae*	0.81	*Citrobacter freundii*	0.37	Patates	Yumru	Çayırlı	-	+	+
F-797	*Enterobacter cloacae*	0.83	*Enterobacter cloacae*	0.54	Patates	Yumru	Çayırlı	-	+	+
F-799	*Enterobacter cloacae*	0.80	*Citrobacter freundii*	0.39	Patates	Yumru	Çayırlı	-	+	+
F-865	*Enterobacter cloacae*	0.52	*Acinetobacter calcoaceticus*	0.21	Patates	Yumru	Oltu	-	+	+

***İN:** İzolat no, **MBİ:** MIS benzerlik indeksi, **BBİ:** Biyolog benzerlik indeksi, **K:** Konukçu, **BM:** Bitki materyali, **L:** Lokasyon, **HR:** Aşırı duyarlık testi, **P:** Patojenite, **PA:** Pektolitik aktivite, **+ :** Pozitif sonuç, **-:** Negatif sonuç



Şekil 4.2. HR testi
*Pozitif sonuç; *C. indologenes* F-709, negatif sonuç; *P. putida* (F-705)



Şekil 4.3. Çilekte patojenite testi
*Soldaki örnek: *B. pumilus* (F-281), sağdaki örnek: Kontrol sdH_2O



Şekil 4.4. Dutda patojenite testi
*soldaki örnek: *B. pumilus* (F-614), sağdaki örnek: Kontrol sdH_2O



Şekil 4.5. Hıyarda patojenite testi
*Soldaki örnek: *C. indologenes* (F-492), sağdaki örnek: Kontrol sdH_2O



Şekil 4.6. Kabakta patojenite testi
*Soldaki örnek: *P. viridiflava* (F-176), sağdaki örnek: Kontrol sdH_2O



Şekil 4.7. Domateste patojenite testi
*Soldaki örnek: *C. indologenes* (F-709), sağdaki örnek: Kontrol sdH_2O



Şekil 4.8. Patlıcanda patojenite testi
*Soldaki örnek: *P.c.* subsp. *atrosepticum* (F-610), sağdaki örnek: Kontrol sdH_2O



Şekil 4.9. Turpta patojenite testi
*Soldaki örnek: *B. pumilus* (F-546), sağdaki örnek: Kontrol sdH_2O



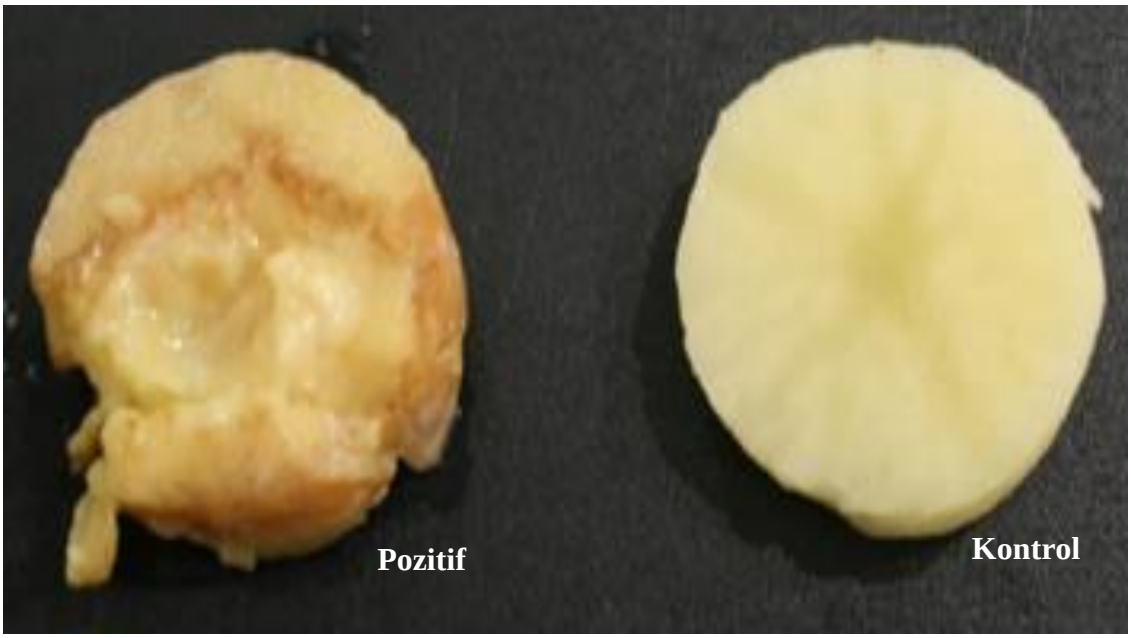
Şekil 4.10. Patateste patojenite testi
*Soldaki örnek: Kontrol sdH_2O, sağdaki örnek: *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-172)



Şekil 4.11. Soğanda patojenite testi
*Soldaki örnek: Kontrol sdH_2O, sağdaki örnek: *P. viridiflava* (F-108)



Şekil 4.12. Domatesde patojenite testi
*Soldaki örnek: Kontrol sdH_2O, sağdaki örnek: *B. pumilus* (F-570)



Şekil 4.13. Patates dilimlerinde pektolitik aktivite testi
*Soldaki örnek: *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-680), sağdaki örnek: Kontrol sdH_2O

4.3. Patojen İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları

Morfolojik ve biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. HR, pektolitik aktivite ve izole edildiği konukçusunda patojenite testi sonucu pozitif olan izolatların katı ve sıvı ortamlarda geliştirilmiş saf kültürlerinden alınan kolonilerin mikroskopta incelenmesi sonucu tüm bakterilerin çubuk şeklinde olduğu, ancak izolatların farklı renklerde koloni oluşturduğu tespit edilmiştir.

Patojen izolatların çukur lamda hazırlanmış preparatlarının mikroskobik incelemeleri sonucu *C. indologenes* türlerinin hareketsiz, diğer bütün patojenlerin ise hareketli olduğu belirlenmiştir.

Nutrient agar besi yerinde 37°C'de inkübasyona bırakılan patojen bakterilerin tamamı gelişmiş olup bu sıcaklıkta bakterilerin gelişimi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Potasyum hidroksit testleri sonucuna göre; *B. pumilus* türleri pozitif diğer bütün patojenlerin ise negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Patojen bakterilerin katalaz testleri sonucunda tamamının pozitif olduğu, oksidaz testleri sonucunda *C. indologenes* (F-408, F-491, F-492, F-502, F-544, F-709, F-713 ve F-723) türlerinin hepsinin, 2 *B. pumilus* (F-296, F-554) ve 2 *P. viridiflava* (F-128, F-421) türünün de pozitif sonuç verdiği, geri kalan bütün izolatların ise negatif olduğu tespit edilmiştir.

King B besi yerinde geliştirilen patojen izolatlardan *Pseudomonas* cinsine ait türler floresan pigment üretmiş olup diğer türlerin hiç biri floresan pigment üretememiştir.

Eritromisine karşı duyarlılık test sonuçlarına göre bütün türlere ait izolatlar arasında farklı sonuçlar elde edilmiş olup bu antibiyotiğin etkili olduğu türlerde hem bakterisidal hem de bakteriyostatik özellikte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

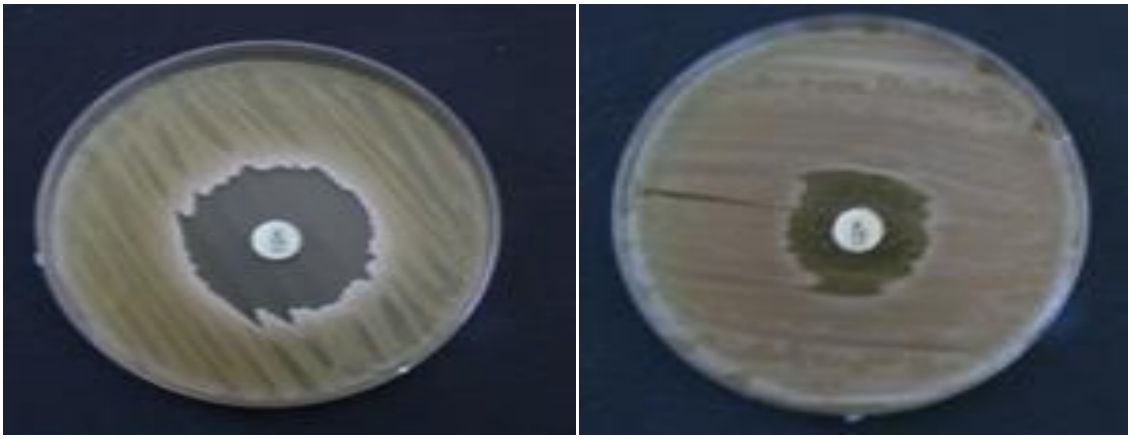
%5'lik NaCl besi ortamında patojen bakterilerin gelişip gelişememesi açısından yapılan test sonuçlarına göre; *C. indologenes* türlerinin tamamının tolerans gösteremeyerek bu ortamda gelişemediği diğer bütün izolatların ise geliştiği belirlenmiştir (Şekil 4.15).

Yapılan amilaz testleri sonucunda tüm patojenler negatif sonuç vermişken, fosfataz testleri sonucunda ise bütün izolatlar pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.16).

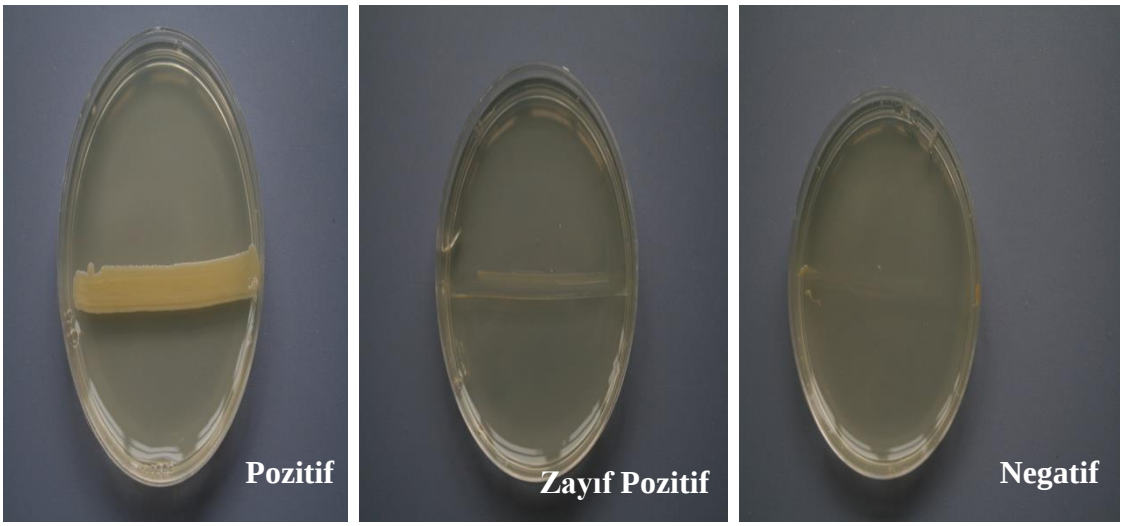
Patojen bakterilerin indol üretimi testleri sonucunda *C. indologenes* türlerinin tamamı ve 3 *E. cloacae* izolatı (F-11, F-581, F-795) pozitif sonuç vermişken diğer bütün izolatlar negatif sonuç vermiştir (Şekil 4.17).

Sukrozun indirgenmesi test sonuçlarına göre *P. viridiflava* ve *C. indologenes* türlerine ait izolatların tamamı negatif sonuç vermiştir. Geride kalan diğer bakteriyel izolatlar arasında ise değişkenlik gözlenmiş olup hem negatif hem de pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Karbonhidratlardan asit üretimi testlerinde glukoz, fruktoz, laktoz ve mannitol olmak üzere dört farklı karbonhidrat kullanılmıştır. *C. indologenes* türüne ait bütün izolatlar denemede kullanılan karbanhidratların hepsinde negatif sonuç vermiştir. *B. pumilus* türüne ait izolatlar ile *Pseudomonas* cinsine ait izolatların hepsi fruktozdan asit üretiminde pozitif sonuç vermişken geri kalan üç karbanhidrat testinde negatif sonuç vermiştir. Aynı şekilde *Pseudomonas* cinsine ait izolatların da fruktozdan asit üretiminde pozitif sonuç verdiği, diğer karbonhidratlardan ise farklı sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir. *E. cloacae*, *D. chrysanthemi*, *P. c.* subsp. *carotovorum* ve *P. c.* subsp. *atrosepticum* türlerine ait izolatların hepsi fruktoz ve mannitolde pozitif sonuç vermişken, diğer karbonhidratlarda değişken sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.18).



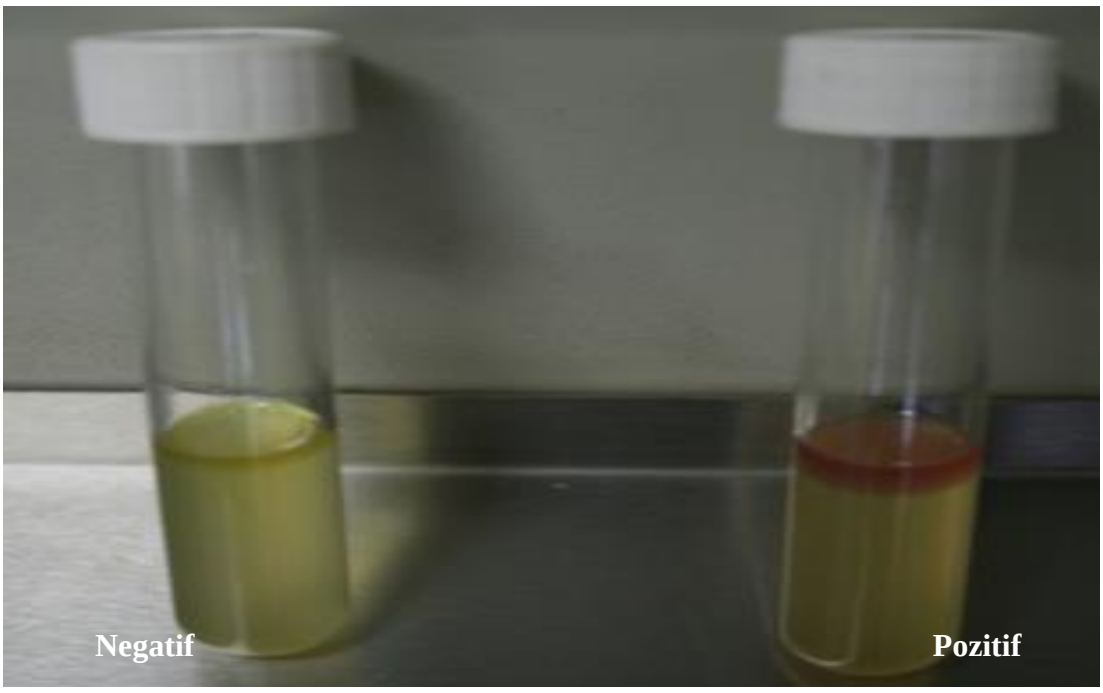
Şekil 4.14. Eritromisine duyarlılık test sonuçları;
*soldaki örnek: Eritromisinin *D. chrysanthemi* (F-663)'ye bakterisidal etkisi, sağdaki örnek: Eritromisinin *B. pumilus* (F-658)'a bakteriyosidatik etkisi



Şekil 4.15. %5 NaCl'ye tolerans sonuçları
*soldan sağa doğru sırasıyla: Pozitif sonuç *B. pumilus* (F-323), zayıf pozitif sonuç *P.viridiflava* (F-176), negatif sonuç *C.indologenes* (F-709)



Şekil 4.16. Fosfataz aktivitesi test sonucu



Şekil 4.17. İndol üretimi test sonucu



Şekil 4.18. Karbonhidratlardan asit üretimi test sonucu

Çizelge 4.3. Morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları

İzolat no	MIS tanı sonucu	BIOLOG tanı sonucu	Hareketlilik	Hücre Şekli	Koloni rengi	37°C'de gelişim	Katalaz	Oksidaz	KOH	Eritromisine duyarlılık	%5 NaCl'ye tolerans	Fosfataz aktivitesi	Amilaz testi	Floresan pigment üretimi	İndol üretimi	Sukrozun indirgenmesi	Karbonhidratlardan asit üretimi			
																	Glukoz	Fruktoz	Laktoz	Mannitol
F-11	*E. cloacae*	*K. p. pneumoniae*	+	Ç	AK	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
F-18	*P. c.* subsp.*carotovorum*	*S. typhimurium*	+	Ç	AK	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
F-37	*P.c.* subsp. *carotovorum*	*E. cloacae*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
F-41	*E. cloacae*	*R. terrigena*	+	Ç	AK	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
F-108	*P. viridiflava*	*P. s.* pv. *syringae*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
F-121	*P. c.* subsp. *atrosepticum*	*P. agglomerans*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-123	*P. c.* subsp. *atrosepticum*	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-128	*P. viridiflava*	*P. fluorescens* biotype F	+	Ç	AS	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
F-137	*P. c.* subsp. *atrosepticum*	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-138	*P. c.* subsp. *atrosepticum*	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-139	*P. viridiflava*	*P. viridiflava*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
F-140	*E. chrysanthemi* biotype V	*P. agglomerans*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-161	*E. chrysanthemi* biotype V	*R. terrigena*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-172	*P. c.* subsp. *atrosepticum*	*S. typhimurium*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-173	*P. viridiflava*	*P. viridiflava*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	Z^+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
F-176	*P. viridiflava*	*P. viridiflava*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	Z^+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
F-215	*E. chrysanthemi* biotype V	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-243	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. licheniformis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-281	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. licheniformis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-296	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. amyloliquefaciens*	+	Ç	BK	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-

***Z^+:** Zayıf pozitif sonuç, **+:** Pozitif sonuç, **-:** Negatif sonuç, **AK:** Açık krem, **AS:** Açık sarı, **BK:** Beyazımsı krem, **T:** Turuncu, **Ç:** Çubuk

Çizelge 4.3 (devam)

İzolat no	MIS tanı sonucu	BIOLOG tanı sonucu	Hareketlilik	Hücre Şekli	Koloni rengi	37°C'de gelişim	Katalaz	Oksidaz	KOH	Eritromisine duyarlılık	%5 NaCl'ye tolerans	Fosfataz aktivitesi	Amilaz testi	Floresan pigment üretimi	İndol üretimi	Sukrozun indirgenmesi	Karbonhidratlardan asit üretimi			
																	Glukoz	Früktoz	Laktoz	Mannitol
F-311	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. licheniformis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-313	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. pumilus*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-323	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. pumilus*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-331	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*S. typhimurium*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-379	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*S. odorifera*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-389	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*S. flexneri*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-391	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*P. c.* subsp. *atrosepticum*	+	Ç	AK	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
F-408	*C. indologenes*	*C. indologenes*	-	Ç	T	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
F-417	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-418	*E. cloacae*	*E. cloacae*	+	Ç	AK	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
F-421	*P. viridiflava*	*P. cichorii*	+	Ç	AS	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
F-432	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-441	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-453	*P.c.* subsp. *atrosepticum*	*S. typhimurium*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-460	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-469	*E. cloacae*	*V. vulnificus*	+	Ç	AK	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
F-476	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*C. freundii*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-487	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*B. vesicularis*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-491	*C. indologenes*	*C. indologenes*	-	Ç	T	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
F-492	*C. indologenes*	*C. indologenes*	-	Ç	T	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

***Z^{+}:** Zayıf pozitif sonuç, **+:** Pozitif sonuç, **-:** Negatif sonuç, **AK:** Açık krem, **AS:** Açık sarı, **BK:** Beyazımsı krem, **T:** Turuncu, **Ç:** Çubuk

Çizelge 4.3 (devam)

İzolat no	MIS tanı sonucu	BIOLOG tanı sonucu	Hareketlilik	Hücre Şekli	Koloni rengi	37°C'de gelişim	Katalaz	Oksidaz	KOH	Eritromisine duyarlılık	%5 NaCl'ye tolerans	Fosfataz aktivitesi	Amilaz testi	Floresan pigment üretimi	İndol üretimi	Sukrozun indirgenmesi	Karbonhidratlardan asit üretimi			
																	Glukoz	Früktoz	Laktoz	Mannitol
F-502	*C. indologenes*	*C. indologenes*	-	Ç	T	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
F-503	*E. cloacae*	*C. freundii*	+	Ç	AK	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
F-544	*C. indologenes*	*C. scopthalmum*	-	Ç	T	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
F-546	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. pumilus*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-547	*E. cloacae*	*B. licheniformis*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
F-548	*E. cloacae*	*C. freundii*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
F-554	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. subtilis*	+	Ç	BK	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-562	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. maroccanus*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
F-570	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. subtilis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-575	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. subtilis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-578	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. amyloliquefaciens*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-581	*E. cloacae*	*P. bathycetes*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
F-588	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. subtilis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-591	*E. cloacae*	*E. cloacae*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-593	*E. cloacae*	*E. cloacae*	+	Ç	AK	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-594	*E. cloacae*	*B. vesicularis*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-608	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. licheniformis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-610	*P. c.* subsp. *atrosepticum*	*S. typhimurium*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-614	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. subtilis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-641	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. subtilis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-

***Z⁺:** Zayıf pozitif sonuç, **+:** Pozitif sonuç, **-:** Negatif sonuç, **AK:** Açık krem, **AS:** Açık sarı, **BK:** Beyazımsı krem, **T:** Turuncu, **Ç:** Çubuk

Çizelge 4.3 (devam)

İzolat no	MIS tanı sonucu	BIOLOG tanı sonucu	Hareketlilik	Hücre Şekli	Koloni rengi	37°C'de gelişim	Katalaz	Oksidaz	KOH	Eritromisine duyarlılık	%5 NaCl'ye tolerans	Fosfataz aktivitesi	Amilaz testi	Floresan pigment üretimi	İndol üretimi	Sukrozun indirgenmesi	Karbonhidratlardan asit üretimi			
																	Glukoz	Früktoz	Laktoz	Mannitol
F-658	*B. pumilus* GC subgroup B	*B. subtilis*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
F-663	*E. chrysanthemi* biotypeIV	*E. nimipressuralis*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-680	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*E. coli*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
F-709	*C. indologenes*	*C. indologenes*	-	Ç	T	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
F-713	*C. indologenes*	*C. indologenes*	-	Ç	T	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
F-714	*E. chrysanthemi* biotype IV	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-718	*E. cloacae*	*C. indologenes*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-723	*C. indologenes*	*C. indologenes*	-	Ç	T	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
F-732	*P. viridiflava*	*P. s.* pv. *persicae*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
F-741	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*V. vulnificus*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-742	*P. c.* subsp. *carotovorum*	*B. vesicularis*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-764	*P. viridiflava*	*B. vesicularis*	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
F-778	*B. pumilus* GC subgroup A	*B. amyloliquefaciens*	+	Ç	BK	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
F-786	*P. viridiflava*	*P. s.* pv. *primulae*	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
F-795	*E. cloacae*	*E. cloacae*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
F-796	*E. cloacae*	*C. freundii*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-797	*E. cloacae*	*E. cloacae*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-799	*E. cloacae*	*C. freundii*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-865	*E. cloacae*	*A. calcoaceticus*	+	Ç	AK	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+

***Z⁺:** Zayıf pozitif sonuç, **+:** Pozitif sonuç, **-:** Negatif sonuç, **AK:** Açık krem, **AS:** Açık sarı, **BK:** Beyazımsı krem, **T:** Turuncu, **Ç:** Çubuk

4.4. Patojen İzolatların Yağ Asidi Metil Ester Grupları

Patojen olduğu belirlenen izolatların MIS sistemi kullanılarak; ihtiva etmiş oldukları yağ asidi çeşidi ve bulunma oranları ile yapılan istatistik analiz sonuçlarına göre elde edilen dendogramda 2 temel grup belirlenmiştir. Bu gruplardan birinci temel grub da kendi arasında iki alt gruba ayrılmıştır. MIS tanısına göre; *B. pumilus* türüne ait 18 izolatın tamamı; F-243, F-281, F-296, F-311, F-313, F-323, F-546, F-554, F-562, F-570, F-575, F-578, F-588, F-608, F-614, F-641, F-658 ve F-778 birinci alt grubu meydana getirmiştir. Bu alt grupta yer alan izolatlara ait yağ asiti içerikleri incelendiğinde bütün izolatların 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0, 16:0 iso, 17:0 iso ve 17:0 anteiso yağ asitlerini ihtiva ettikleri ve özellikle 15:0 iso ve 15:0 anteiso yağ asitlerine yüksek oranda sahip oldukları belirlenmiştir. Bu yağ asitlerinin bulunma oranları incelendiğinde 15:0 iso yağ asidi maksimum %52,49, minimum %32,66 ve ortalama %42,54 oranında bulunmaktadır. 15:0 anteiso yağ asidi ise maksimum %41,13, minimum %30,94 ve ortalama %36,12 oranında bulunmaktadır. 16:0 yağ asiti maksimum %3,83, minimum %1,49 ve ortalama %2,09 oranında bulunmaktadır. 16:0 iso yağ asiti maksimum %2,75, minimum %0,42 ve ortalama %2 oranında bulunmaktadır. 17:0 iso yağ asiti maksimum %7,72, minimum %4,2 ve ortalama %5,68 oranında bulunmaktadır. 17:0 anteiso maksimum %10,91, minimum %5,37 ve ortalama %7,80 oranında bulunmaktadır.

Birinci temel grubun ikinci alt grubunu ise MIS tanısına göre; *C.indologenes* türüne ait; F-408, F-491, F-492, F-502, F-544, F-709, F-713 ve F-723 olmak üzere 8 izolatın tamamı oluşturmaktadır. Bu alt grupta yer alan izolatlara ait yağ asiti içerikleri incelendiğinde bütün izolatların 15:0 iso, ISO 17:1 w9c, 16:0, 15:0 iso 3OH, 17:0 iso, 17:0 iso 3OH ve 16:1 w7c yağ asitlerini ihtiva ettiği belirlenmiştir. İzolatların bu yağ asitleri içerisinde en fazla 15:0 iso, ISO 17:1 w9c, 17:0 iso 3OH ve 16:1 w7c yağ asitlerini içerdikleri belirlenmiştir. 15:0 iso yağ asiti maksimum %40,02, minimum %32,94 ve ortalama ise %36,09 oranında bulunmaktadır. ISO 17:1 w9c yağ asidini maksimum %25,28, minimum %21,25 ve ortalama %23,52 oranında bulunmaktadır. 17:0 iso 3OH yağ asiti maksimum %17,99, minimum %13,57 ve ortalama olarak %16,91 oranında bulunmaktadır. 16:1 w7c yağ asiti maksimum %15,93, minimum

%11,76 ve ortalama olarak %13,04 oranında yer almaktadır. Bütün izolatlarda daha düşük oranlarda bulunan diğer yağ asitleri ise sırasıyla; 16:0 maksimum %2,06, minimum %1,09 ve ortalama %1,45, 15:0 iso 3OH maksimum %3,56, minimum %2,82 ve ortalama %3,15 oranında ve 17:0 iso yağ asiti de maksimum %1,27, minimum %0,68 ve ortalama olarak da %0,99 oranında farklı izolatlarda bulunmaktadır.

İstatistik analiz sonuçlarına göre belirlenmiş ikinci temel grubu ise MIS tanısına göre; *P. c.* subsp. *carotovorum, P. c.* subsp. *atrosepticum, E. chrysanthemi, E. cloacae,* ve *P. viridiflava* türlerine ait izolatlar oluşturmaktadır. Bu grubta yer alan izolatlara ait yağ asiti içerikleri incelendiğinde bütün izolatların 16:0 ve 16:1 w7c yağ asitlerini ihtiva ettikleri belirlenmiştir. 16:0 yağ asiti maksimum %32,97, minimum %21,87 ve ortalama olarak da %27,24 oranında bulunmaktadır. 16:1 w7c yağ asiti ise maksimum %40,82, minimum %14,4 ve ortalama %31,64 oranında bulunmaktadır. Belirtilen yağ asitleri dışında bu grubta yer alan farklı türlere ait izolatların farklı yağ asitlerini değişik oranlarda ihtiva ettiği de gözlemlenmiş olup sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Elde edilen dendograma göre belirlenen iki temel grup arasında %16, birinci temel grupta yer alan iki alt grup arasında da herhangi bir fark olmadığı belirlenmiş olup sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir.

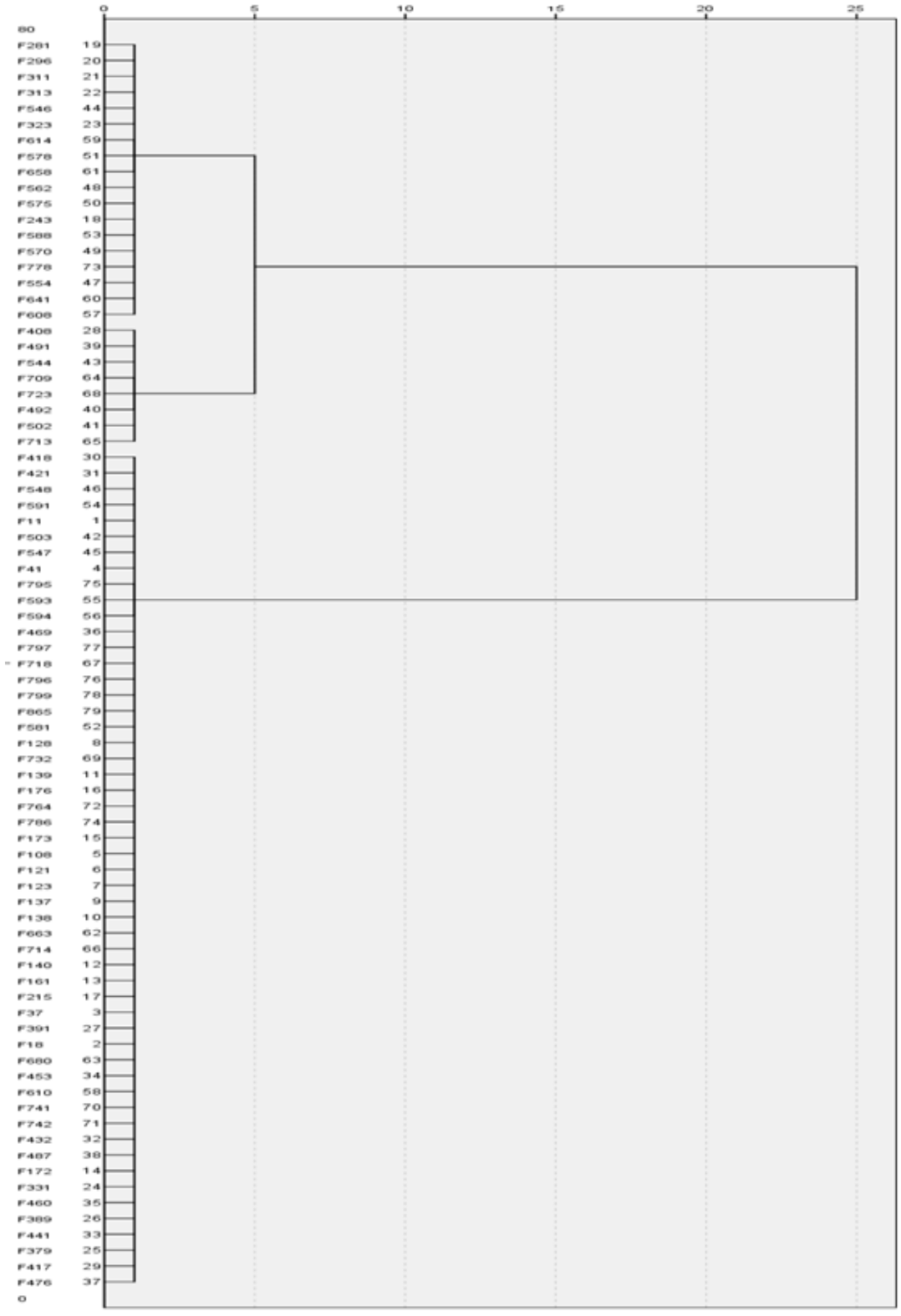
Çizelge 4.4. Patojen izolatların içerdikleri yağ asidi metil esterlerinin maksimum, minimum ve ortalama değerleri

Yağ Asidi	I. Temel grup						II. Temel grup		
	I. Alt grup			II. Alt grup					
	Maks.	Min.	Ort.	Maks.	Min.	Ort.	Maks.	Min.	Ort.
10:00	0	0	0	0	0	0	0,26	0	0,008
11:00	0	0	0	0	0	0	0,13	0	0,002
12:00	0,22	0	0,01	0,71	0	0,03	8,93	0	5,35
13:0 iso	0,49	0	0,09	0,8	0,45	0,58	0	0	0
13:0 anteiso	0,46	0	0,06	0	0	0	0	0	0
10:0 3OH	0	0	0	0	0	0	3,48	0	0,40
13:00	0	0	0	0	0	0	0,69	0	0,06
14:00	1,29	0	0,46	0,74	0	0,09	8,92	0	3,30
12:0 2OH	0	0	0	0	0	0	3,85	0	0,49
14:0 iso	0,83	0	0,5	0	0	0	0	0	0
15:0 anteiso	41,13	30,94	36,12	0,73	0	0,23	5,72	0	0,12
12:0 3OH	0	0	0	0	0	0	4,26	0	0,54
15:0 iso	52,49	32,66	42,54	40,02	32,94	36,09	3,55	0	0,07
15:00	0	0	0	0	0	0	2,42	0	0,65
16:00	2,83	1,49	2,09	2,06	1,09	1,45	32,97	21,87	27,24
16:0 iso	2,75	0,42	2	0	0	0	0,42	0	0,007
16:1 w7c alcohol	0,48	0	0,09	0	0	0	0	0	0
16:1 w5c	0	0	0	0	0	0	0,18	0	0,008
16:1 w11c	0,73	0	0,2	0	0	0	0	0	0
ISO 17:1 w9c	0	0	0	25,28	21,25	23,52	0,42	0	0,02
15:0 ISO 3OH	0	0	0	3,56	2,82	3,15	0	0	0
ISO 17:1 w10c	1,72	0	0,87	0	0	0	0	0	0
15:0 3OH	1,68	0	0,09	0	0	0	0,57	0	0,02
ANTEISO 17:1 w9c	0,94	0	0,77	1,15	0	0,14	1,61	0	0,12
16:0 3OH	0	0	0	1,27	0	1,41	0	0	0

Çizelge 4.4 (devam)

Yağ Asidi	I. Temel grup						II. Temel grup		
	I. Alt grup			II. Alt grup					
	Maks.	Min.	Ort.	Maks.	Min.	Ort.	Maks.	Min.	Ort.
17:1 w8c	0	0	0	0	0	0	1,36	0	0,02
17:0 Cyclo	0	0	0	0	0	0	4,4	0	1,71
17:00	0	0	0	0	0	0	1,96	0	0,46
17:0 ISO 3OH	0	0	0	17,99	13,57	16,91	0	0	0
18:1 w9c	0	0	0	0	0	0	23,92	0	0,86
18:1 w5c	0	0	0	0,92	0	0,53	0	0	0
18:00	0	0	0	0	0	0	1,68	0	0,30
11 methyl 18:1 w7c	0	0	0	0	0	0	1,39	0	0,05
12:0 ALDE	0	0	0	0,23	0	0,02	8,97	0	5,83
16:1 w7c	0	0	0	15,93	11,76	13,04	40,82	14,4	31,64
17:1 ISO	1	0	0,27	0,67	0	0,08	0,58	0	0,02
19:0 CYCLO w8c	1,05	0	0,05	0,61	0	0,07	0,89	0	0,01
20:2 w6,9c	1,6	0	0,14	0,4	0	0,05	1,85	0	0,15
18:1 w7c	2,89	0	0,16	3,46	0	0,43	25,7	0	19,17
17: 0 iso	7,72	4,2	5,68	1,27	0,68	0,99	0,93	0	0,02
17:0 anteiso	10,91	5,37	7,80	0	0	0	2,01	0	0,05

Çizelge 4.5 MIS sonucunda elde edilen dendogram



4.5. Patojen İzolatların Metabolik Enzim Profillerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının biyolog sistemi ile metabolik enzim profillerinin belirlenmesi hem alternatif bir tanı sağlamış hem de izolatların kullandıkları karbon kaynakları belirlenmiştir. Bu çalışmada sadece patojen oldukları belirlenen izolatlara biyolog yapılmış olup, test edilen bakteriler gram reaksiyonu özelliklerine göre gruplara ayrılmıştır. Gram pozitif bakteriyel izolatlar için GP2 kiti, gram negatifler için ise GN2 kiti kullanılarak farklı türlere ait izolatların kullandığı karbon kaynaklarına göre tanısı yapılmış ve benzerlik indeksleri belirlenmiştir.

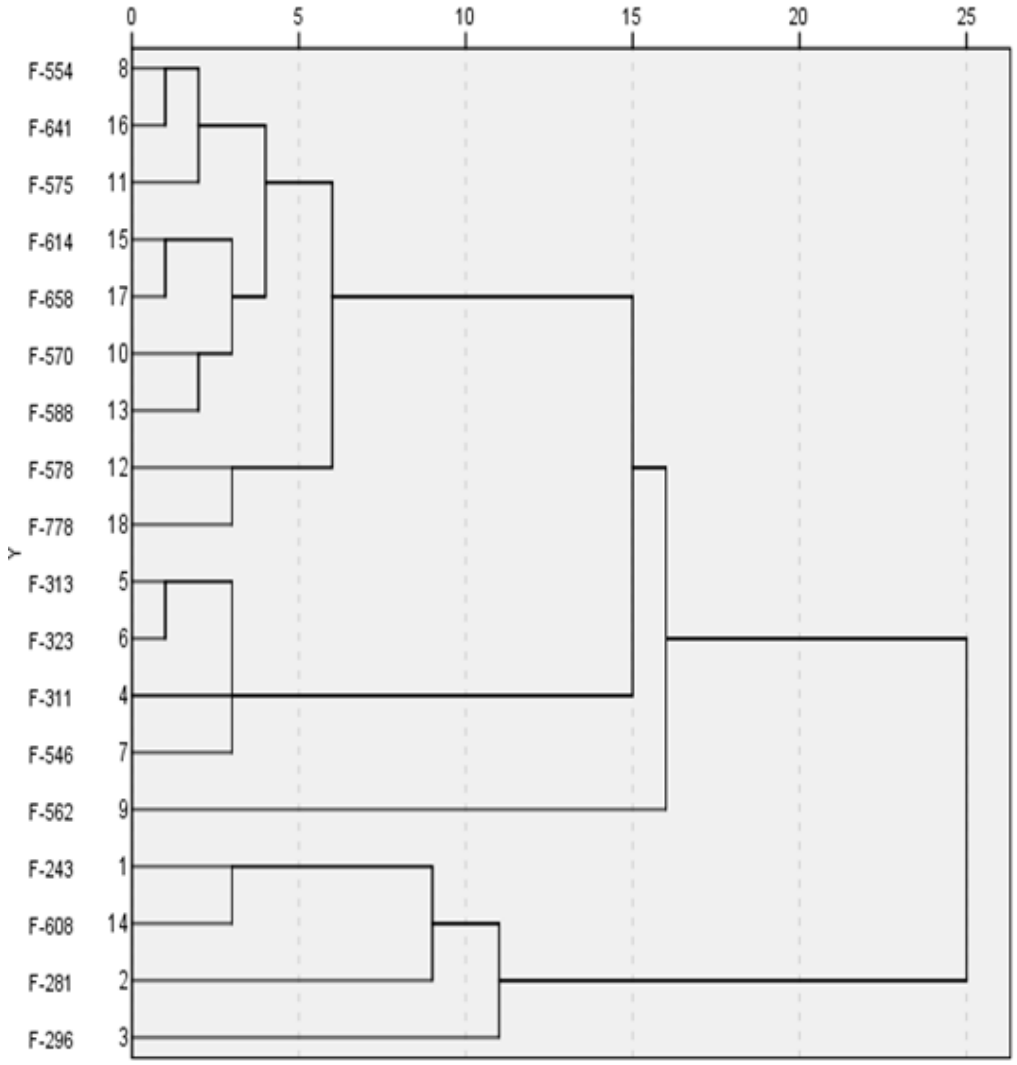
Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin metabolik enzim profillerine göre yapılan istatistik analizler sonucunda iki farklı dendogram elde edilmiştir. GP2 kitindeki karbon kaynaklarını kullanan izolatlardan elde edilen dendogramda; iki temel grup bulunmakta olup, bu gruplar arasında %20 oranında fark bulunmaktadır. Birinci temel grupta yer alan iki alt grup arasında da %64 oranında fark olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). GN2 kitindeki karbon kaynaklarını kullanan izolatlardan elde edilen dendogramda ise; yine iki temel grup elde edilmiş olup, bu gruplar arasında %28 oranında fark olduğu belirlenmiştir. Birnci temel grupta yer alan iki alt grup arasında %40 fark olduğu ancak, ikinci temel grupta yer alan iki alt grup arasında ise %5 fark olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.7).

Gram pozitif bakteriyel izolatlardan elde edilen dendogram sonuçlarına göre iki temel grub olduğu tespit edilmiştir. Birinci temel grub da kendi arasında iki alt gruba ayrılmıştır. F-554, F-641, F-575, F-614, F-658, F-570, F-588, F-578, F-778, F-313, F-323, F-311, F-546 izolatları birinci alt grubu oluşturmuşken, sadece F-562 izolatı ikinci alt grub da yer almıştır. İkinci temel grub incelendiğinde bu grubun da kendi arasında iki alt grub oluşturduğu belirlenmiştir. Birinci alt grub da F-243 ve F-608 izolatları, ikinci alt grub da ise F-281 ve F-296 izolatları yer almaktadır.

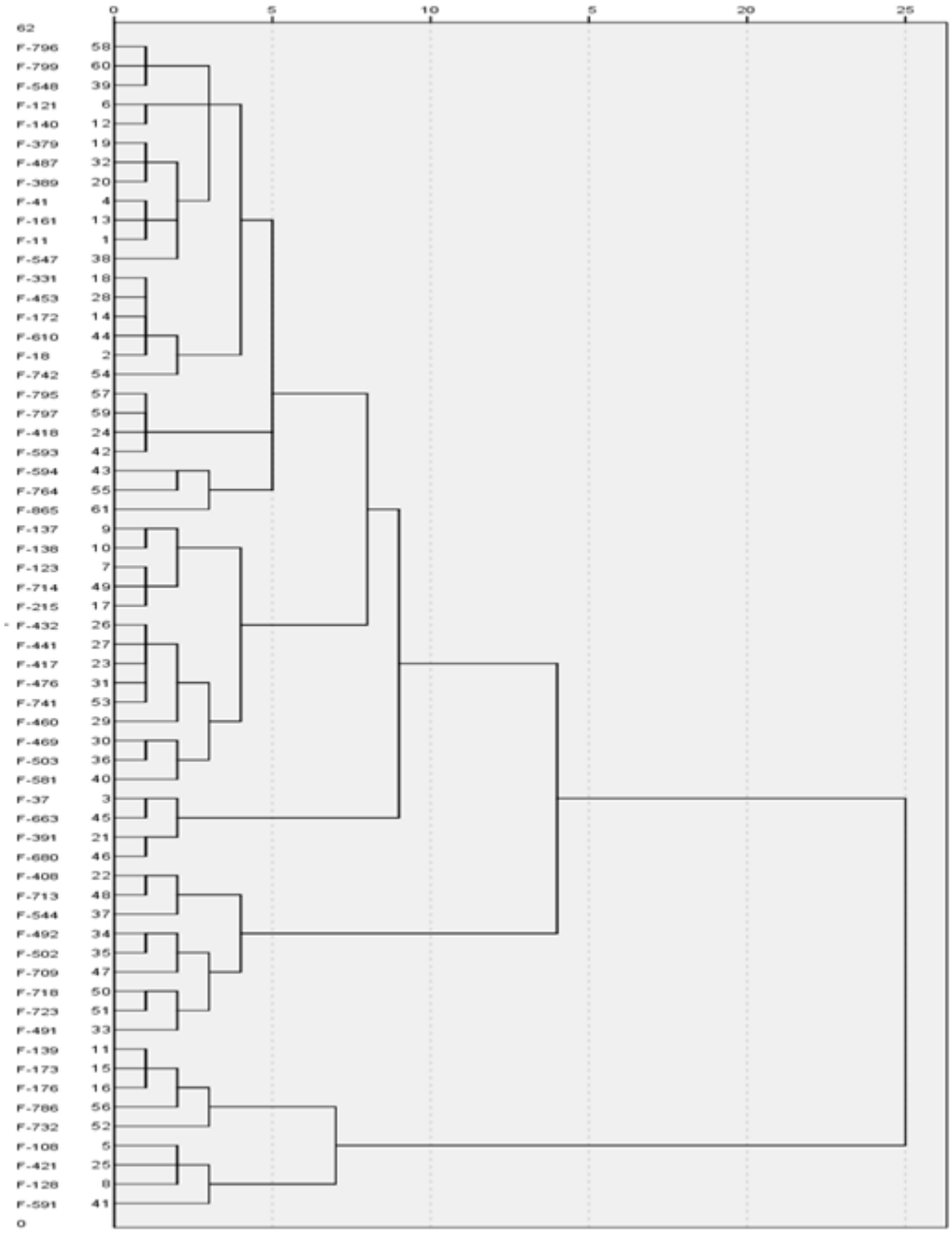
Gram negatif bakteriyel izolatlardan elde edilen dendogram sonuçlarına göre iki temel grub olduğu tespit edilmiştir. Birinci temel grub da kendi arasında iki alt gruba

ayrılmıştır. F-797, F-865, F-548, F-121, F-140, F-379, F-487, F-389, F-41, F-161, F-11, F-547, F-331, F-453, F-172, F-610, F-18, F-742, F-796, F-799, F-418, F-593, F-594, F-764, F-137, F-138, F-123, F-714, F-215, F-432, F-441, F-417, F-476, F-741, F-460, F-469, F-503 ve F-581 izolatları birinci alt grubu oluşturmuştur. F-408, F-713, F-544, F-492, F-502, F-709, F-718, F-723 ve F-491 izolatları ise ikinci alt grub da yer almıştır. İkinci temel grub incelendiğinde bu grubun da kendi arasında iki alt grub oluşturduğu belirlenmiştir. Birinci alt grub da F-108, F-421, F-128, F-139, F-173, F-176, F-795 ve F-732 izolatları, ikinci alt grub da ise F-37, F-663, F-391, F-680, F-591, ve F-786 izolatları yer almaktadır.

Çizelge 4.6. Gram pozitif bakterilerin biyolog dendogramı



Çizelge 4.7. Gram negatif bakterilerin biyolog dendogramı



GP2 kitindeki farklı karbon kaynaklarının farklı izolatlar tarafından yüzde kaç oranında kullanıldığı Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. İzolatların GP2 kitinde kullanmış oldukları karbon kaynakları incelendiğinde; D-Fructose ve Uridine karbon kaynaklarının tüm izolatlar tarafından kullanıldığı belirlenmiştir. N-Acetyl-D Glucosamine, Arbutin, D-Cellobiose, α-D-Glucose, D-Mannitol, D-Mannose, β-Methyl D-Glucoside, D-Psicose, Salicin, Sucrose, D-Trehalose, Turanose, L-Malic Acid, Glycerol ve Thymidine olmak üzere 15 karbon kaynağı F-562 izolatı hariç diğer bütün izolatlar tarafından kullanılmıştır. Benzer şekilde Gentiobiose karbon kaynağı *B. pumilus* (F-562) ve *B. pumilus* (F-658) izolatları hariç, D-Ribose karbon kaynağı *B. pumilus* (F-562) ve *B. pumilus* (F-778) izolatları hariç, L-Asparagine karbon kaynağı F-562 ve F-614 izolatları hariç, Inosine karbon kaynağı *B. pumilus* (F-562) ve *B. pumilus* (F-588) izolatları hariç diğer bütün izolatlar tarafından kullanılmıştır. α-Cyclodextrin, Inulin, Mannan, D-Arabitol, L-Fucose, D-Galacturonic Acid, m-Inositol, α-D-Lactose, Lactulose, D-Melezitose, β-Methyl D-Galactoside, α-Methyl D-Mannoside, Sedoheptulosan, Stachyose, Xylitol, α-Hydroxy Butyric Acid, β-Hydroxy Butyric Acid, p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid, Lactamide, D-Malic Acid, Propionic Acid, L-Pyroglutamic Acid ve Putrescine olmak üzere 23 karbon kaynağı ise hiçbir izolat tarafından kullanılmamıştır.

Çizelge 4.8. İzolatların GP2 kitinde kullandığı karbon kaynaklarının yüzde oranları

Kuyular	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	0	**0**	6	83	22	**0**	**0**	17	56	**94**	22	22
B	11	**0**	**94**	**94**	**100**	**0**	6	**0**	89	22	**94**	**0**
C	**0**	**0**	56	67	94	94	0	11	6	0	39	33
D	**94**	**0**	50	**94**	11	6	89	**94**	**0**	83	6	**94**
E	50	**94**	89	6	6	11	**0**	**0**	6	**0**	17	11
F	**0**	6	6	**0**	**94**	72	11	**0**	83	11	22	6
G	11	17	22	28	83	50	22	**0**	56	**0**	39	**94**
H	50	56	89	94	**100**	6	6	6	6	6	6	33

*BIOLOG GP2 MicroPlate: **A1:** water, **A2**: α-cyclodextrin, **A3**: β-Cyclodextrin **A4**: Dextrin **A5**: glycogen **A6**: Inulin **A7**: Mannan, **A8**: Tween 40, **A9**: Tween 80, **A10**: N-acetyl-D-glucosamine, **A11**: N-acetyl-D-Mannosamine, **A12**: Amygdalin, **B1**: L-Arabinose **B2**: D-arabitol, **B3**: Arbutin **B4**:D-Cellobiose, **B5**: D-Fructose, **B6**: L-Fucose, **B7**: D-galactose, **B8**: D-galacturonic acid, **B9**: Gentiobiose, **B10:** D-gluconic acid, **B11**: α-D-Glucose**, B12**: m-Inositol, **C1**: α-D-Lactose **C2**: Lactulose, **C3**: Maltose **C4**: Maltotriose **C5**: D-Mannitol **C6**: D-Mannose, **C7**: D-Melezitose **C8**: D-Melibiose, **C9**: α-Methyl D-Galactoside, **C10**: β-Methyl-D-Galactoside, **C11**: 3-Methyl-Glucose, **C12**: α-Methyl-D-Glucoside, **D1**: β-Methyl-D-Glucoside, **D2**: α-**Methyl-D-Mannoside**, **D3**: Palatinose, **D4**: D-Psicose, **D5**: D-Raffinose, **D6**: D-Rhamnose, **D7:** D-Ribose **D8:** Salicin, **D9:** Sedoheptulosan , **D10:** D-Sorbitol, **D11:** Stachyose, **D12:** Sucrose, **E1:** D-Tagatose, **E2:** D-Trehalose, **E3:** Turanose, **E4:** Xylitol, **E5:** D-Xylose, **E6:** Acetic AcidD, **E7**: α-Hydroxy Butyric Acid, **E8**: β-Hydroxy Butyric Acid, **E9**: γ-Hydroxy Butyric Acid, **E10:** p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid, **E11** α-Keto Glutaric Acid, **E12**: α-Keto Valeric Acid, **F1:** Lactamide, **F2:** D-Lactic Acid Methyl Ester, **F3:** L-Lactic Acid, **F4:** D-Malic Acid, **F5:** L-Malic Acid, **F6:** Methyl-Pyruvate, **F7**: Mono-methyl Succinate, **F8:** Propionic Acid, **F9:** Pyruvic Acid, **F10:** Succunamic Acid, **F11:** Succinic Acid, **F12:** N-Acetyl L-Glutamic Acid, **G1:** L-Alalinamide, **G2:** D-Alanine , **G3:** L-Alaline, **G4:** L-Alanyl-glycine, **G5:** L-Asparagine, **G6:** L-Glutamic-Acid, **G7:** Glycyl- LGlutamic Acid, **G8:** L-Pyroglutamic Acid, **G9:** L-Serine, **G10:** Putrescine, **G11:** 2,3-Butanediol, **G12:** Glycerol, **H1:** Adenosine, **H2:** 2'-Deoxy Adenosine, **H3:** Inosine, **H4:** Thymidine, **H5:** Uridine, **H6:** Adenosine-5'-Monophosphate, **H7:** Thymidine-5'-Monophosphate, **H8:** Uridine-5'- Monophosphate, **H9:** Fructose-6-Phosphate, **H10:** Glucose-1-Phosphate, **H11:** Glucose-6-Phosphate, **H12:** D-L-α-Glycerol Phosphate

GN2 kitindeki farklı karbon kaynaklarının farklı izolatlar tarafından yüzde kaç oranında kullanıldığı Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. İzolatların GN2 kitinde kullanmış oldukları karbon kaynakları incelendiğinde; L-Asparagine karbon kaynağı F-591 izolatı hariç diğer bütün izolatlar tarafından kullanılmıştır. D-Mannose F-421 ve F-591 izolatları hariç, Pyruvic Acid Methyl Ester F-108 ve F-591 izolatları hariç, D-Galacturonic Acid F-421 ve F-591 izolatları hariç, D-Gluconic Acid F-591 ve F-713 izolatları hariç, L-Glutamic Acid F-591 ve F-680 izolatları hariç, L-Serine F-591 ve F-865 izolatları hariç diğer bütün izolatlar tarafından kullanılmıştır. Sebacic Acid karbon kaynağı ise hiçbir izolat tarafından kullanılmamıştır.

Çizelge 4.9. İzolatların GN2 kitinde kullandığı karbon kaynaklarının yüzde oranları

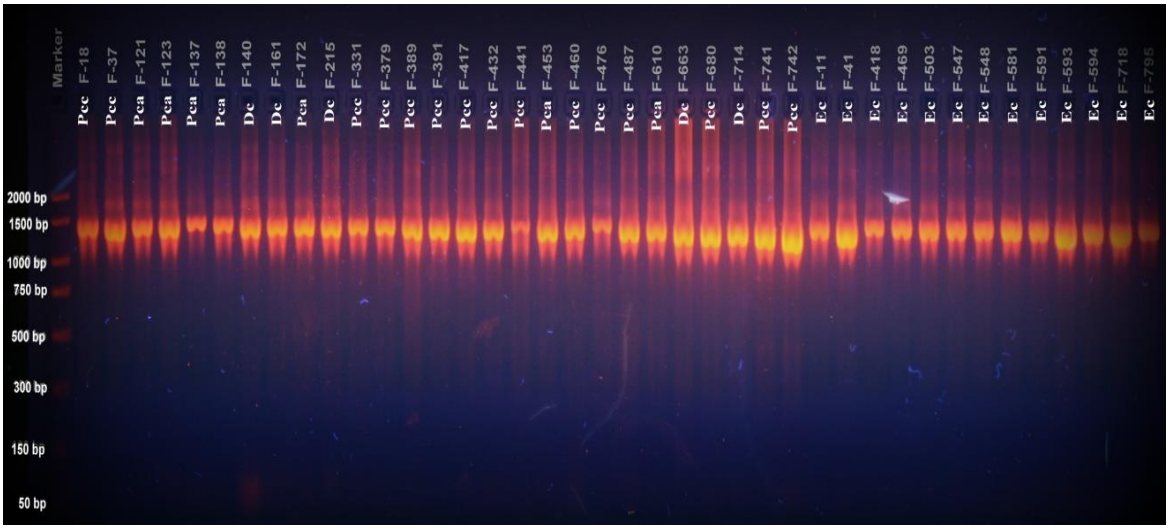
Kuyular	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	0	20	84	74	74	85	52	79	23	92	54	84
B	11	87	49	92	82	89	80	70	59	84	90	**97**
C	84	80	93	70	74	89	87	84	84	34	**97**	92
D	89	74	92	70	67	**97**	**97**	56	90	59	36	16
E	18	3	51	61	26	90	41	49	30	84	**0**	95
F	84	44	62	74	79	93	92	**98**	95	**97**	80	87
G	36	16	25	38	20	82	20	57	**97**	80	28	38
H	38	87	84	79	2	11	26	23	95	92	79	84

*BIOLOG GN2 MicroPlate: **A1:** water, **A2**: α-cyclodextrin, **A3**: dextrin, **A4**: glycogen, **A5**: tween 40, **A6**: tween 80, **A7**: N-acetyl-D-galactosamine, **A8**: N-acetyl-D-glucosamine, **A9**: Adonitol, **A10**: L-arabinose, **A11**: D-arabitol, **A12**: D-cellobiose, **B1**: i-erytritol, **B2**: D-fructose, **B3**: L-fucose, **B4**: D-galactose, **B5**: gentiobiose, **B6**: α-D-glucose, **B7**: m-inositol, **B8**: α-D-lactose, **B9**: lactulose, **B10**:maltose, **B11**: D-mannitol, **B12**: D-mannose, **C1**: D-melibiose, **C2**: β-methyl-D-glucoside, **C3**: D-psicose, **C4**: D-raffinose, **C5**: L-rhamnose, **C6**: D-sorbitol, **C7**: sucrose, **C8**: D-trehalose, **C9**: turanose, **C10**: xylitol, **C11**: pyruvic acid methil ester, **C12**: succinic acid mono-methil ester, **D1**: acetic acid, **D2**: Cis-aconitic acid, **D3**: citric acid, **D4**: formic acid, **D5**: D-galactonic acid lactone, **D6**: D-galacturonic acid, **D7:** D-gluconic acid, **D8:** D-glucosaminic acid, **D9:** D-glucuronic acid, **D10:** α-hydroxybutyric acid, **D11:** β-hydroxybutyric acid, **D12:** γ-hydroxybutyric acid, **E1:** p-hydroxy-phenlyacetic acid, **E2:** itaconic acid, **E3:** α-ketobutyric acid, **E4:** α-keto glutaric acid, **E5:** α-keto valeric acid, **E6:** D,Llactic acid, **E7:** malonic acid, **E8:** propionic acid, **E9:** quinic acid, **E10:** D-saccharic acid, **E11:** sebacic acid, **E12:** succinic acid, **F1:** bromosuccinic acid, **F2:** succinamic acid, **F3:** glucuronamide, **F4:** L-alaninamide, **F5:** D-alanine, **F6:** L-alanine, **F7:** L-alanyl-glycine, **F8:** L-asparagine, **F9:** L-aspartic acid, **F10:** L-glutamic acid, **F11:** glycyl-L-aspartic acid, **F12:** glycyl-L-glutamic acid, **G1:** L-histidine, **G2:** hydroxy-L-proline, **G3:** L-leucine, **G4:** L-omithine, **G5:** L-phenylalanine, **G6:** L-proline, **G7:** l-pyroglutamic acid, **G8:** D-serine, **G9:** Lserine, **G10:** L-threonine, **G11:** D,L-carnitine, **G12:** γ-aminobutyric acid, **H1:** urocanic acid, **H2:** inosine, **H3:** uridine, **H4:** thymidine, **H5:** phenylethyl-amine, **H6:** putrescine, **H7:** 2-aminoethanol, **H8:** 2,3-butanediol, **H9:** glycerol, **H10:** D,L,α-glycerol phosphate, **H11:** α-Dglucose-1 phosphate, **H12:** D-glucose-6 phosphate

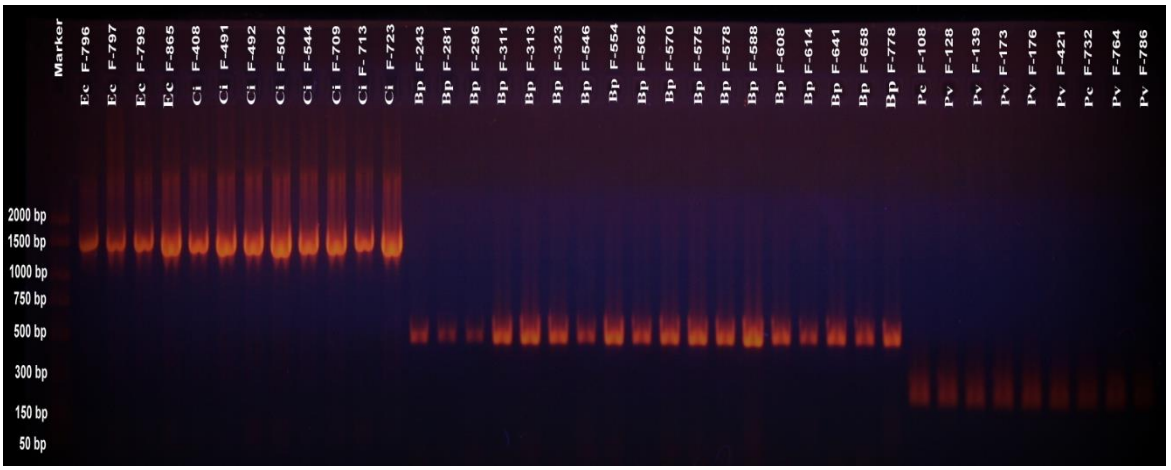
4.6. PCR Sonuçları

16S rDNA PCR Sonuçları

MIS tanısına göre; *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Enterobacter* ve *Chryseobacter* cinslerine dahil türlere ait izolatların 16S rDNA PCR sonuçlarına göre bütün izolatlar 1400-1500 bp aralığında bant vermiştir (Şekil 4.19). Yine 16S rDNA PCR sonuçlarına göre; *Bacillus* cinsine ait bakteriyel izolatlar ise; 454 bp uzunluğunda bant vermişken, *Pseudomonas* cinsine ait izolatlar 180 bp uzunluğunda bant vermiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Pcc: *P.c.* ssp. *carotovorum*, Pca: *P.c.* ssp. *atrosepticum*, Dc: *D. chrysanthemi* ve Ec: *E. cloacae* 16S rDNA bant görüntüleri



Şekil 4.20. Ec: *E. cloacae*, Ci: *C. indologenes*, Bp: *B. pumilus* ve Pv: *P. viridiflava* 16S rDNA bant görüntüleri

Rep PCR Sonuçları

Pectobacterium ve *Dickeya* cinslerine ait 27 izolatın Rep PCR görüntüleri aynı jelde yürütülerek elde edilmiştir (Şekil 4.21). Elde edilen sonuçlara göre; *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-441), *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-460), *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-476) ve *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-487) izolatları 280-3000 bp arasında 12 bant, *D. chrysanthemi* (F-161) izolatı 400-3000 bp arasında 6 bant, *D. chrysanthemi* (F-215) ve

(F-714) izolatları 400-3000 bp arasında 12 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-741) ve *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-742) izolatları 380-3000 bp arasında 8 bant, *D. chrysanthemi* (F-140) ve *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-121) izolatları 400-3000 bp arasında 6 bant, *D. chrysanthemi* (F-663) izolatı 400-3000 bp arasında 10 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-391) ve *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-123) izolatları 400-3000 bp arasında 8 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-137) izolatı 200-3000 bp arasında 9 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-331) izolatı 190-3000 bp arasında 8 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-417) izolatı 180-3000 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-680) izolatı 400-3000 bp arasında 10 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-37) izolatı 550-3000 bp arasında 10 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-18) izolatı 500-3000 bp arasında 6 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-138) izolatı 250-3000 bp arasında 14 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-172) izolatı 260-3000 bp arasında 12 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-379) izolatı 300-3000 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-389) izolatı 300-3000 bp arasında 6 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-432) ve *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-453) izolatları 300-3000 bp arasında 8 bant ve *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-610) izolatı 180-3000 bp arasında 6 bant vermiştir.

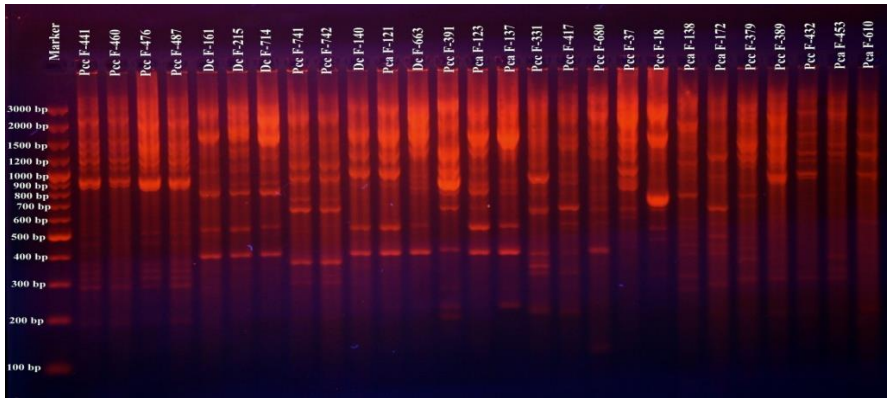
E. cloacae türlerine ait izolatların Rep PCR görüntüleri Şekil 4.22'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; F-795, F796, F-797 ve F-799 izolatları 180-3500 bp arasında 9 bant, F-591, F-593 ve F-594 izolatları 550-3500 bp arasında 12 bant, F-547 ve F-548 izolatları 650-3500 bp arasında 10 bant, F-718 izolatı 350-3500 bp arasında 12 bant, F-865 izolatı 550-3500 bp arasında 12 bant, F-496 izolatı 200-3000 bp arasında 16 bant, F-503 izolatı 200-1750 bp arasında 10 bant, F-581 izolatı 100-3500 bp arasında 13 bant, F-41 izolatı 400-3500 bp arasında 8 bant, F-11 izolatı 1500-3000 bp arasında 3 bant ve F-418 izolatı 400-3000 bp arasında 5 bant vermiştir.

B. pumilus türlerine ait izolatların Rep PCR sonuçları Şekil 4.23'de verilmiş olup elde edilen sonuçlara göre; F-281, F-311 ve F-313 izolatları 450-3000 bp arasında 7 bant, F-570, F-588 ve F-778 izolatları 450-3000 bp arasında 4 bant, F-578 izolatı 450-3000 bp arasında 6 bant, F-608 izolatı 450-1500 bp arasında 4 bant, F-554 ve F-641 izolatları 750-3000 bp arasında 4 bant, F-658 izolatı 350-800 bp arasında 2 bant, F-243 izolatı

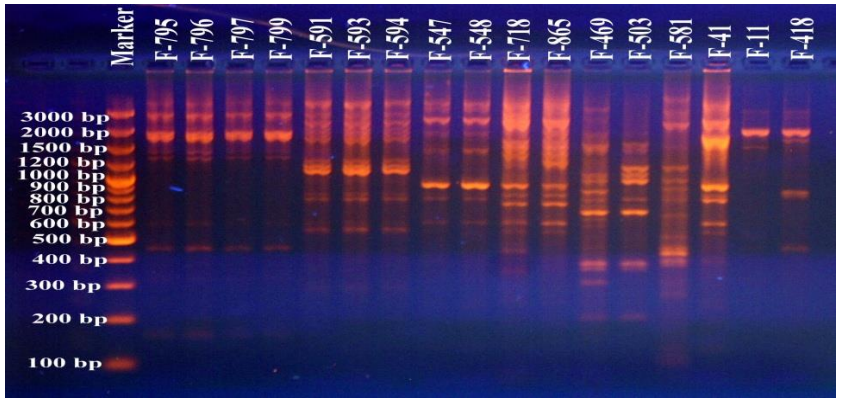
350-800 bp arasında 4 bant, F-323 izolatı 450-3000 bp arasında 8 bant, F-546 izolatı 450-3000 bp arasında 9 bant, F-575 izolatı 750-4000 bp arasında 7 bant, F-614 izolatı 350-2500 bp arasında 5 bant, F-562 izolatı 500-3000 bp arasında 4 bant ve F-296 izolatı 1000 bp de 1 bant vermiştir.

P. viriflava türlerine ait izolatlardan elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.24'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; F-764 izolatı 300-2100 bp arasında 8 bant, F-786 izolatı 300-3500 bp arasında 10 bant, F-176 izolatı 450-2500 bp arasında 8 bant, F-421 izolatı 400-3000 bp arasında 9 bant, F-732 izolatı 750-2500 bp arasında 6 bant, F-139 izolatı 300-3500 bp arasında 8 bant, F-173 izolatı 300-3000 bp arasında 7 bant, F-128 izolatı 400-3000 bp arasında 10 bant ve F-108 izolatı 200-3000 bp arasında 10 bant vermiştir.

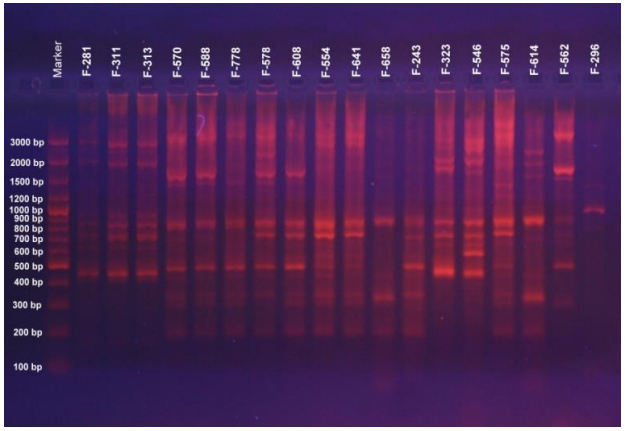
C. indologenes türlerine ait izolatlardan elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.25'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; F-709, F-713 ve F-723 izolatları 550-2500 bp arasında 6 bant, F-408 ve F-491 izolatları 1200-3000 bp arasında 4 bant, F-492 izolatı 550-1800 bp arasında 3 bant, F-502 izolatı 700-3500 bp arasında 5 bant ve F-544 izolatı 400-4000 bp arasında 5 bant vermiştir.



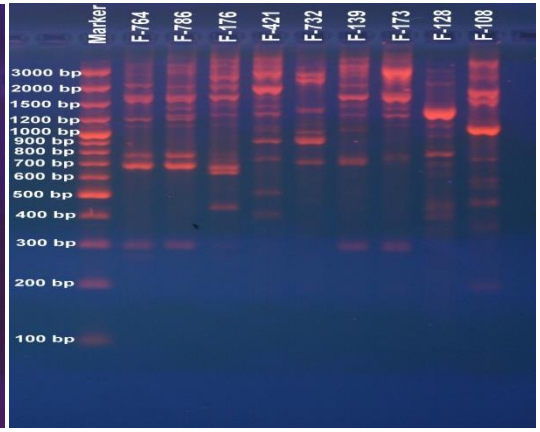
Şekil 4.21. Pcc: *P.c.* ssp. *carotovorum*, **Pca:** *P.c.* ssp. *atrosepticum* ve **Dc:** *D. chrysanthemi* izolatları Rep PCR görüntüleri



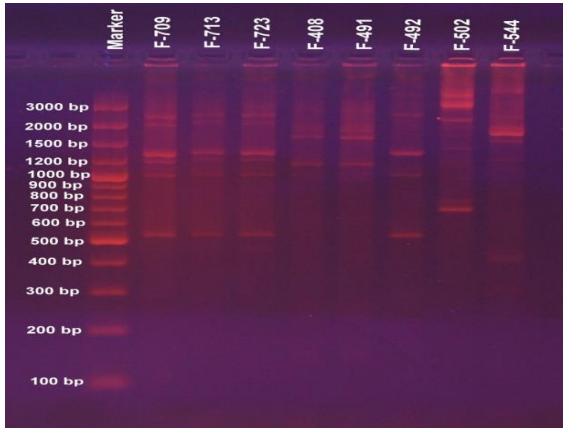
Şekil 4.22. *E. cloacae* izolatları Rep PCR görüntüleri



Şekil 4.23. *B. pumilus* izolatları Rep PCR görüntüleri



Şekil 4.24. *P. viridiflava* izolatları Rep PCR görüntüleri



Şekil 4.25. *C. indologenes* izolatları Rep PCR görüntüleri

ERIC PCR Sonuçları

Pectobacter ve *Dickeya* cinslerine ait 27 izolatın ERIC PCR görüntüleri aynı jelde yürütülerek elde edilmiştir (Şekil 4.26). Elde edilen sonuçlara göre; *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-432) izolatı 200-1500 bp arasında 14 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-441), *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-460), *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-487) ve *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-389) izolatları 200-1500 bp arasında 12 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-476) izolatı 100-2000 bp arasında 17 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-741) ve *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-742) izolatları 140-2000 bp arasında 13 bant, *D. chrysanthemi* (F-140) izolatı 140-1250 bp arasında 13 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-121) ve *D. chrysanthemi* (F-663) izolatları 200-1500 bp arasında 14 bant, *D. chrysanthemi* (F-161) izolatı 150-1250 bp arasında 10 bant, *D. chrysanthemi* (F-714) izolatı 150-700 bp arasında 7 bant, *D. chrysanthemi* (F-215) izolatı 150-1500 bp arasında 14 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-123) izolatı 150-1500 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-18) izolatı 150-2000 bp arasında 14 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-37) izolatı 100-2000 bp arasında 15 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-391) izolatı 200-1400 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-680) izolatı 100-2500 bp arasında 15 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-137) izolatı 200-2000 bp arasında 14 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-138) izolatı 150-2000 bp arasında 13 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-331) izolatı 100-2000 bp arasında 14 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-172) izolatı 100-1500 bp arasında 14 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-379) izolatı 200-1500 bp arasında 10 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-417) izolatı 150-1500 bp arasında 12 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-453) izolatı 400-1400 bp arasında 6 bant ve *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-610) izolatı 200-1000 bp arasında 9 bant vermiştir.

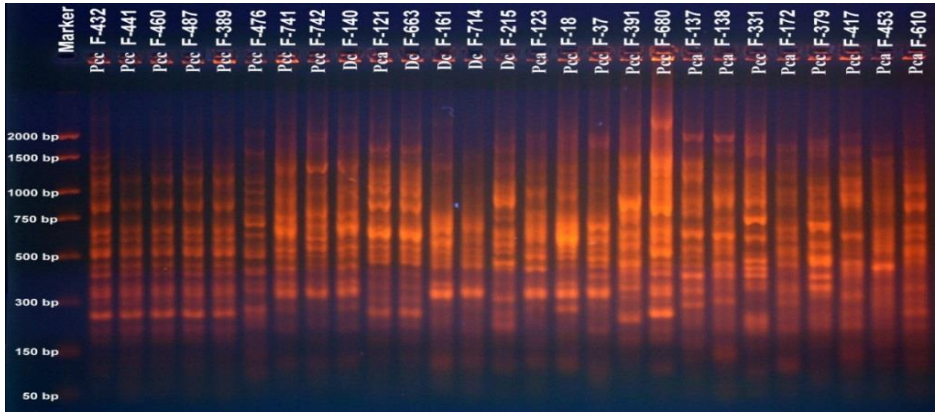
E. cloacae türlerine ait izolatların ERIC PCR görüntüleri Şekil 4.27'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; F-795, F796, F-797 ve F-799 izolatları 160-1500 bp arasında 11 bant, F-591, F-593 ve F-594 izolatları 200-1250 bp arasında 10 bant, F-547 ve F-548 izolatları 300-2000 bp arasında 11 bant, F-718 izolatı 300-1500 bp arasında 8 bant, F-581 ve F-865 izolatı 200-1500 bp arasında 10 bant, F-11 izolatı 200-2000 bp arasında 10 bant, F-41 izolatı 150-2000 bp arasında 10 bant, F-418 izolatı 100-1500 bp arasında

10 bant, F-496 izolatı 100-600 bp arasında 3 bant ve F-503 izolatı 150-750 bp arasında 8 bant vermiştir.

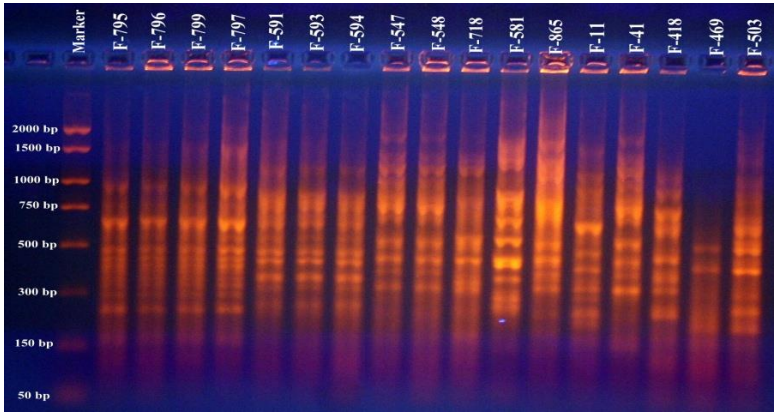
B. pumilus türlerine ait izolatların ERIC PCR sonuçları Şekil 4.28'de verilmiş olup elde edilen sonuçlara göre; F-562 ve F-570 izolatları 100-1500 bp arasında 9 bant, F-575 izolatı 100-1500 bp arasında 10 bant, F-578 ve F-588 izolatları 100-1500 bp arasında 9 bant, F-554 ve F-641 izolatları 100-2000 bp arasında 12 bant, F-778 izolatı 100-2000 bp arasında 14 bant, F-608 izolatı 50-1500 bp arasında 10 bant, F-243 izolatı 50-750 bp arasında 7 bant, F-311 ve F-313 izolatları 50-1500 bp arasında 11 bant, F-323 izolatı 50-1500 bp arasında 13 bant, F-546 izolatı 50-1500 bp arasında 12 bant, F-281 izolatı 50-1500 bp arasında 10 bant, F-614 izolatı 100-750 bp arasında 12 bant, F-658 izolatı 100-600 bp arasında7 bant ve F-296 izolatı 150-1500 bp arasında 11 bant vermiştir.

P. viriflava türlerine ait izolatlardan elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.29'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; F-176 izolatı 150-2000 bp arasında 14 bant, F-764 izolatı 150-750 bp arasında 7 bant, F-786 izolatı 150-1500 bp arasında 10 bant, F-139 izolatı 300-750 bp arasında 5 bant, F-173 izolatı 300-1000 bp arasında 8 bant, F-421 izolatı 150-1500 bp arasında 10 bant, F-108 izolatı 300-2000 bp arasında 10 bant, F-128 izolatı 50-1500 bp arasında 10 bant ve F-732 izolatı 100-2000 bp arasında 10 bant vermiştir.

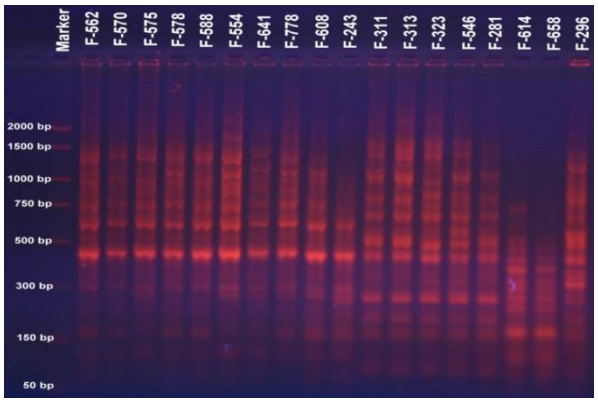
C. indologenes türlerine ait izolatlardan elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.30'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; F-492 izolatı 50-1500 bp arasında 14 bant, F-709 izolatı 100-1500 bp arasında 13 bant, F-713 izolatı 50-1500 bp arasında 15 bant, F-723 izolatı 100-2000 bp arasında 15 bant, F-408 ve F-491 izolatları 100-1000 bp arasında 11 bant, F-502 izolatı 50-1500 bp arasında 10 bant ve F-544 izolatı 100-1500 bp arasında 10 bant vermiştir.



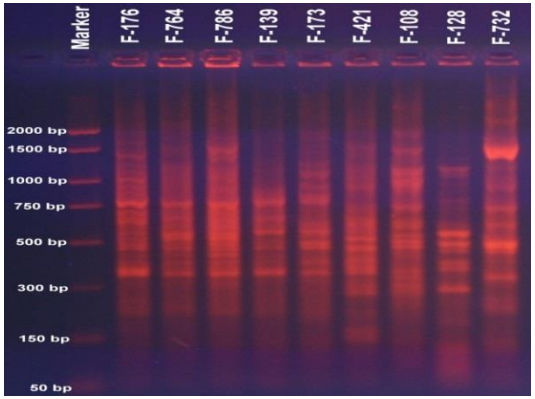
Şekil 4.26. Pcc: *P.c.* ssp. *carotovorum*, **Pca:** *P.c.*ssp. *carotovorum* ve görüntüleri



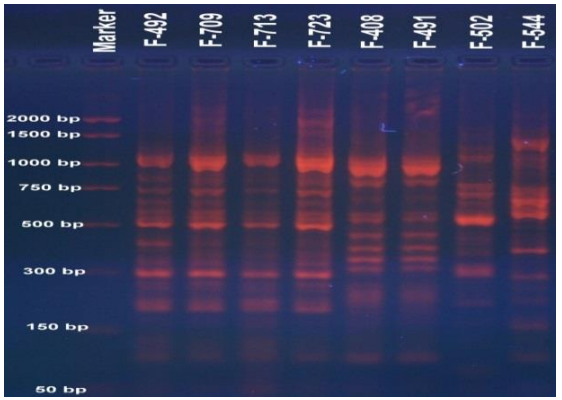
Şekil. 4.27. *Enterobacter cloacae* izolatları ERIC PCR **Dc:** *D. chrysanthemi* izolatları ERIC PCR görüntüleri



Şekil 4.28. *Bacillus pumilus* izolatları ERIC PCR görüntüleri



Şekil 4.29. *P. viridiflava* izolatları ERIC PCR görüntüleri



Şekil 4.30. *Chryseobacterium indologenes* izolatları ERIC PCR görüntüleri

BOX PCR Sonuçları

Pectobacter ve *Dickeya* cinslerine ait 27 izolatın BOX PCR görüntüleri aynı jelde yürütülerek elde edilmiştir (Şekil 4.31). Elde edilen sonuçlara göre; *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-432), *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-441), *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-460), *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-476) ve *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-487) izolatları 200-2000 bp arasında 13 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-741) ve *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-742) izolatları 200-1500 bp arasında 11 bant, *D. chrysanthemi* (161) izolatı 150-1500 bp arasında 13 bant, *D. chrysanthemi* (F-215) izolatı 150-1500 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-137) izolatı 150-1000 bp arasında 11 bant, *D. chrysanthemi* (F-140) izolatı 150-1500 bp arasında 9 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-121) izolatı 150-1500 bp arasında 8 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-680) izolatı 300-1250 bp arasında 11 bant, *D. chrysanthemi* (F-663) izolatı 150-1000 bp arasında 8 bant, *D. chrysanthemi* (F-714) izolatı 150-1000 bp arasında 10 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-391) izolatı 300-1000 bp arasında 9 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-138) izolatı 200-1500 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-123) izolatı 150-1000 bp arasında 9 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-18) izolatı 300-1500 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-37) izolatı 150-1000 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-331) izolatı 300-1500 bp arasında 9 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-379) izolatı 200-1500 bp arasında 11 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-389) izolatı 200-1500 bp arasında 10 bant, *P. c.* subsp. *carotovrum* (F-417) izolatı 200-1500 bp arasında 12 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-172) izolatı 300-750 bp arasında 6 bant, *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-453) izolatı 200-1500 bp arasında 13 bant ve *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-610) izolatı 300-750 bp arasında 9 bant vermiştir.

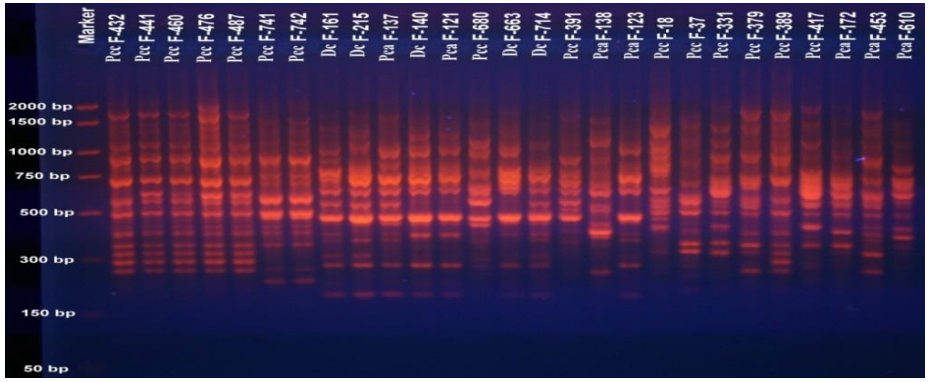
E. cloacae türlerine ait izolatların Rep PCR görüntüleri Şekil 4.32'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; F-591, F-593 ve F-594 izolatları 300-2000 bp arasında 14 bant, F-795, F796, F-797 ve F-799 izolatları 300-1500 bp arasında 11 bant, F-718 izolatı 200-1500 bp arasında 13 bant, F-865 izolatı 200-2000 bp arasında 16 bant, F-41, F-547 ve F-548 izolatları 200-1500 bp arasında 13 bant, F-11 izolatı 300-1500 bp arasında 13 bant, F-418 izolatı 300-1250 bp arasında 8 bant, F-496 izolatı 350-2000 bp arasında 13

bant, F-503 izolatı 300-2000 bp arasında 14 bant ve F-581 izolatı 400-1250 bp arasında 6 bant vermiştir.

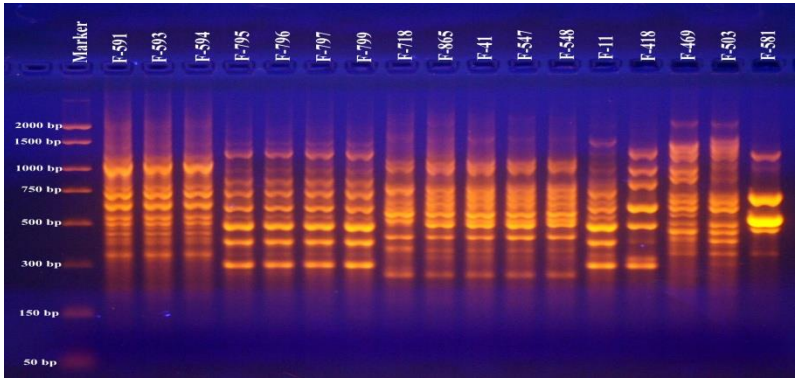
B. pumilus türlerine ait izolatların Rep PCR sonuçları Şekil 4.33'de verilmiş olup elde edilen sonuçlara göre; F-562, F-570, F-578 ve F-588 izolatları 400-1500 bp arasında 7 bant, F-608 izolatı 400-1500 bp arasında 8 bant, F-554, F-575 ve F-641 izolatları 300-1500 bp arasında 9 bant, F-778 izolatı 300-1500 bp arasında 7 bant, F-311 ve F-313 izolatı 300-2000 bp arasında 11 bant, F-323 izolatı 300-2000 bp arasında 12 bant, F-546 izolatı 300-2000 bp arasında 11 bant, F-614 izolatı 250-750 bp arasında 9 bant, F-658 izolatı 250-650 bp arasında 7 bant, F-243 izolatı 300-1000 bp arasında 7 bant, F-281 izolatı 300-1500 bp arasında 9 bant ve F-296 izolatı 200-1000 bp arasında 8 bant vermiştir.

P. viriflava türlerine ait izolatlardan elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.34'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; F-108 izolatı 300-1500 bp arasında 7 bant, F-128 izolatı 300-1250 bp arasında 9 bant, F-139 izolatı 200-1500 bp arasında 10 bant, F-173 izolatı 200-1500 bp arasında 11 bant, F-176 izolatı 300-1500 bp arasında 12 bant, F-421 izolatı 400-2000 bp arasında 10 bant, F-732 izolatı 250-2000 bp arasında 11 bant, F-764 izolatı 200-2000 bp arasında 14 bant ve F-786 izolatı 300-1500 bp arasında 10 bant vermiştir.

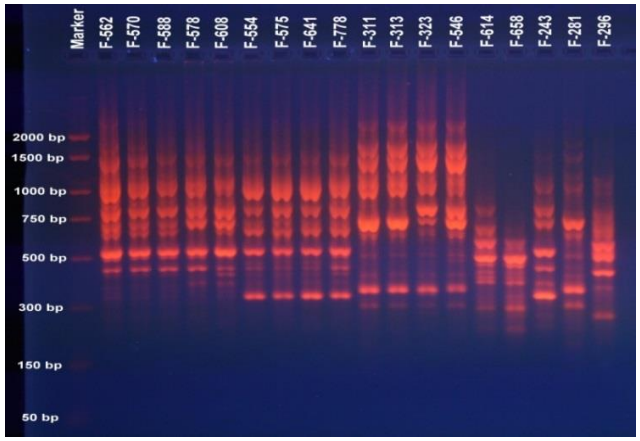
C. indologenes türlerine ait izolatlardan elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.35'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; F-408 ve F-491 izolatları 150-2000 bp arasında 6 bant, F-492 izolatı 150-1000 bp arasında 5 bant, F-709 izolatı 150-750 bp arasında 3 bant, F-502 izolatı 150-750 bp arasında 5 bant, F-544 izolatı 150-750 bp arasında 4 bant, F-713 izolatı 150-750 bp arasında 4 bant ve F-723 izolatı 150-750 bp arasında 3 bant vermiştir.



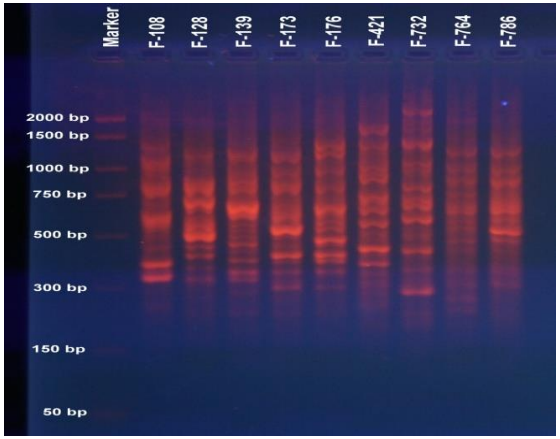
Şekil 4.31. Pcc: *P.c.* ssp. *carotovorum*, **Pca:** *P.c.*ssp. *carotovorum* ve **Dc:** *D. chrysanthemi* izolatları BOX PCR görüntüleri



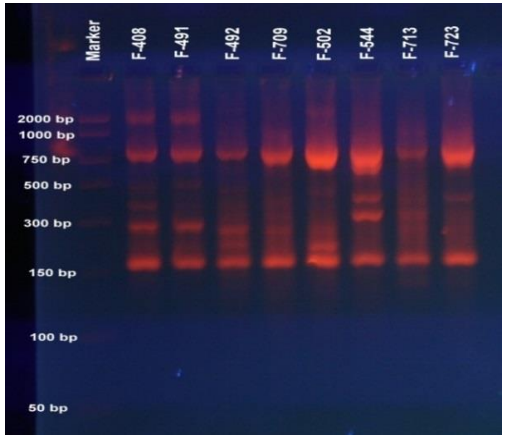
Şekil 4.32. *Enterobacter cloacae* izolatları BOX PCR görüntüleri



Şekil 4.33. *Bacillus pumilus* izolatları BOX PCR görüntüleri



Şekil 4.34. *P. viridiflava* izolatları BOX PCR görüntüleri



Şekil 4.35. *Chryseobacterium indologenes* izolatları BOX PCR görüntüleri

REP, ERIC ve BOX PCR metodlarından edilen sonuçlar incelendiğinde dikkat çekici sonuçların olduğu görülmektedir. *Pectobacter* ve *Dickeya* cinslerine ait izolatlardan *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-441), *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-460) ve *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-487) izolatları REP PCR yönteminde 280-3000 bp arasında 12 bant, ERIC PCR yönteminde 200-1500 bp arasında 12 bant ve BOX PCR yönteminde 200-2000 bp arasında 13 bant verdiği, aynı şekilde *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-741) ve *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-742) izolatları REP PCR yönteminde 380-3000 bp arasında 8 bant, ERIC PCR yönteminde 140-2000 bp arasında 13 bant ve BOX PCR yönteminde 200-1500 bp arasında 11 bant verdiği ve bantların aynı olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların alınmış oldukları alan ve konukçular açısından bakıldığında *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-441), *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-460) ve *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-487) izolatlarının hepsinin Iğdır'dan F-441 ve F-487 izolatlarının biber meyvesinden, F-460 izolatının ise domates meyvesinden alındığı, *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-741) ve *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-742) izolatlarının ise Pasinler'den ve patates yumrularından elde edildiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre F-441, F-460 ve F-487 izolatlarının kendi arasında, F-741 ve F-742 izolatlarının da birbirleriyle genetiksel olarak yakın akraba olduğu tespit edilmiştir.

E. cloacae türlerine ait izolatlardan F-795, F796, F-797 ve F-799 izolatları REP PCR yönteminde 180-3500 bp arasında 9 bant, ERIC PCR yönteminde 160-1500 bp arasında 11 bant ve BOX PCR yönteminde 300-1500 bp arasında 11 bant olmak üzere aynı bantları vermişlerdir. Aynı şekilde F-591, F-593 ve F-594 izolatları da REP PCR yönteminde 550-3500 bp arasında 12 bant, ERIC PCR yönteminde 200-1250 bp arasında 10 bant ve BOX PCR yönteminde 300-2000 bp arasında 14 bant olmak üzere aynı bantları vermişlerdir. F-795, F796, F-797 ve F-799 izolatlarının hepsi Erzincan'ın Çayırlı ilçesinden patates yumrularından, F-591, F-593 ve F-594 izolatlarının tamamı ise Erzincan'ın Uluköy ilçesinden kavun meyvelerinden alınmış bu izolatların da birbirleriyle yakın akraba olduğu tespit edilmiştir.

B. pumilus türlerine ait izolatlardan F-311 ve F-313 ile F-554 ve F-641 izolatları arasında da filogenetik açıdan yakın bir ilişki olduğu belirlenmiştir. F-311 ve F-313 izolatları REP PCR yönteminde 450-3000 bp arasında 7 bant, ERIC PCR yönteminde

50-1500 bp arasında 11 bant ve BOX PCR yönteminde 300-2000 bp arasında 11 bant olmak üzere aynı bantları vermişlerdir. Benzer şekilde F-554 ve F-641 izolatları REP PCR yönteminde 450-3000 bp arasında 7 bant, ERIC PCR yönteminde 100-2000 bp arasında 12 bant ve BOX PCR yönteminde 300-2000 bp arasında 11 bant olmak üzere aynı bantları vermişlerdir. F-311 ve F-313 izolatları Artvin'in Şavşat ilçesinden soğandan, F-554 ve F-641 izolatları ise Erzincan'dan biber ve patatesten elde edilmiş olup örneklerin alındığı yerlerin aynı olması bu izolatların da birbirleriyle yakın akraba olduğunu göstermektedir.

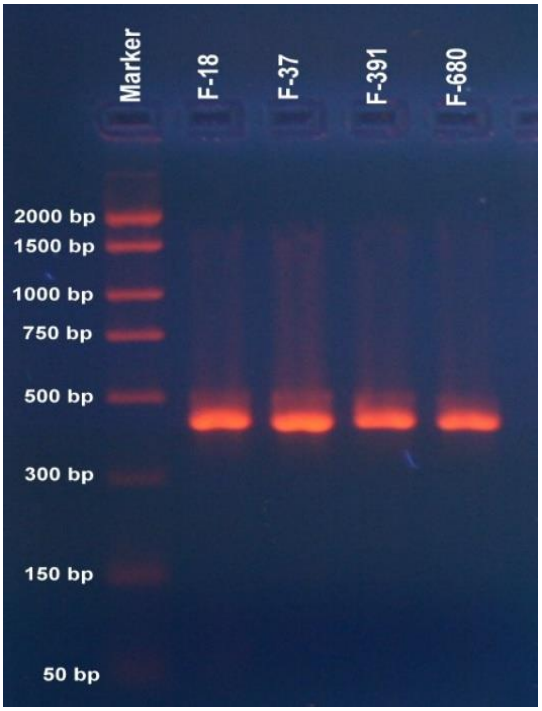
C. indologenes türlerine ait F-408 ve F-491 izolatlarının ikisi de hıyar meyvesinden izole edilmiş olmasına karşın farklı alanlardan alınmıştır. Ancak her iki izolatın da REP PCR yönteminde 1200-3000 bp arasında 4 bant, ERIC PCR yönteminde 100-1000 bp arasında 11 bant ve BOX PCR yönteminde 150-2000 bp arasında 6 bant olmak üzere aynı bantları vermiş olması bu izolatların arasında da genetiksel olarak yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Pseudomonas cinslerine ait izolatlarının tamamında ise REP, ERIC ve BOX PCR yöntemlerinin hepsinde farklı uzunluklarda farklı bantlar elde edilmiş olup, bu izolatlar arasında genetik açıdan yakın bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir.

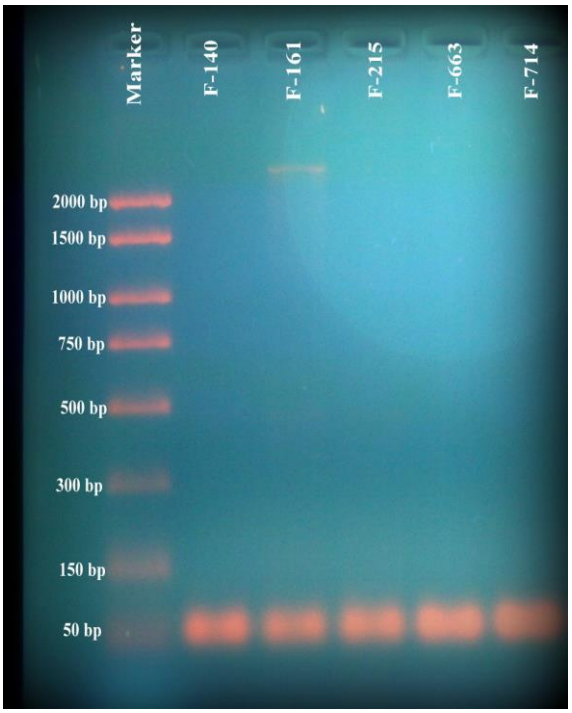
Spesifik PCR Sonuçları

Pectobacter ve *Dickeya* cinslerine ait 27 izolatın spesifik PCR sonuçları Şekil 4.36, Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de verilmiştir. MIS tanı sonucuna göre 15 adet *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* için spesifik olan Y1 ve Y2 primerleri, 7 adet *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* için spesifik olan ECA1f ve ECA2r primerleri ve 5 adet *D. chrysanthemi* için spesifik olan ADE1 ve ADE2 primerleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; *P. c.* subsp. *carotovorum* izolatlarından; F-18, F-37, F-391 ve F-680 izolatları Y1 ve Y2 primerleri kullanılarak yapılan spesifik PCR'da 434 bp uzunluğunda bant vermiş, geri kalan 11 izolattan ise herhangi bir bant elde edilememiştir. *D. chrysanthemi* için spesifik olan ADE1 ve ADE2 primerleri ile yapılan spesifik PCR'da ise 50-150 bp arasında tek bant elde edilmiştir. Ancak *P. carotovorum* subsp.

atrosepticum için spesifik olan ECA1f ve ECA2r kullanılarak yapılan spesifik PCR'da izolatların hiçbirisi herhangi bir bant vermemiştir.



Şekil 4.36. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*'a spesifik Y1 ve Y2 primerlerinde pozitif sonuç veren izolatlar



Şekil 4.37. *D. chrysanthemi*'ye spesifik ADE1 ve ADE2 primerlerinde pozitif sonuç veren izolatlar



Şekil 4.38. *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*'a spesifik ECA1f ve ECA2r primerleri ile yapılan spesifik PCR test sonucu

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yumuşak çürüklük oluşturan bakteriyel etmenlerin bazı meyve ve sebzelerin yumru, gövde, meyve, dal ve yaprakları olmak üzere konukçularının farklı aksamlarında oluşturmuş oldukları sulu lezyonlar, çürümeler, doku yumuşaması ve solgunluklar gibi tipik simptomlara neden oldukları bilinmektedir (Aysan *et al.* 2003; Fiori and Schiaffino 2004; Boyraz *et al.* 2006; Choi and Kim 2013). Bu patojenlerin özellikle önemli kültür bitkilerinde meydana getirdikleri şiddetli enfeksiyonlar nedeni ile ekonomik açıdan çok büyük kayıplar meydana getirdiği ve dünya genelinde yıllık yaklaşık olarak 50-100 milyon dolar kayba neden olduğu belirtilmektedir. Bunlar içerisinde, *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. ve *Flavobacterium* sp. içerisinde yer alan ve dünya genelinde çok sayıda konukçuda hem yumuşak çürüklük hem de farklı hastalıkların oluşmasından sorumlu türler yer almaktadırlar (Prombelon and Kelman 1980).

Yapılmış olan bu çalışmada da; söz konusu patojenlerden *Erwinia* spp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. ve *Flavobacterium* sp. ait türlerin yukarıda belirtildiği gibi çok sayıda konukçunun gövde, yumru ve meyve gibi farklı bitki organlarında yumuşak çürüklük oluşturduğu tespit edilmiştir.

Ülkemizde yumuşak çürüklük etmenleri ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok Akdeniz Bölgesi'nde yapılmış olup; bu hastalığa neden olan etmenlerden sadece *E. c.* subsp. *carotovora, E. chrysanthemi* ve *P. viridiflava* türlerine ait bakterilerin varlığı tespit edilmiştir (Aysan *et al.* 2005; Saygılı *et al.* 2005; Çetinkaya and Aysan 2006; Mirik *et al.* 2011). Benzer şekilde Ülkemizin birkaç farklı bölgesinde yumuşak çürüklük etmenlerinden *P. carotovorum* ve *P. atrosepticum* türleri ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır (Boyraz *et al.* 2006; Bastas *et al*. 2009). Ancak bu çalışmanın yapıldığı alanları kapsayan bölgede yumuşak çürüklük oluşturan etmenlerin varlığıyla ilgili herhangi bir kayda rastlanılmamıştır. Ayrıca bu çalışmada *Erwinia* ve *Pseudomonas* cinsi dışında Ülkemizde kaydı bulunmayan *Enterobacter, Bacillus* ve *Chryseobacter* cinslerine ait bakteriyel türlerin varlığı da ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir.

Çalışmanın başlangıcında MIS sisteminin tercih edilmesi ile elde edilen izolatların ön tanısı yapılmış böylece bu veriler dikkate alınarak çalışmanın kalan kısımlarının daha güvenli ve daha kolay planlanması sağlanmıştır. MIS sonuçlarına göre başlıca yumuşak çürüklük oluşturabilecek bakterilerden 19 *P. c.* subsp. *carotovorum*, 13 *P. c.* subsp. *atrosepticum*, 10 *D. chrysanthemi*, ve 10 *P. viridiflava* türü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca son zamanlarada yumuşak çürüklük etmeni olduğu tespit edilen 59 *B. pumilus*, 40 *E. cloacae* ve 8 *C. indologenes* türü olduğu belirlenmiştir.

MIS sistemi kullanılarak tanısı yapılmış olan bakterilerin tamamına HR testi yapılmış ve 115 izolatın pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Ancak MIS tanı sonucuna göre yumuşak çürüklük etmeni olabilecek izolatların tamamı bu testte pozitif sonuç vermemiştir. Yapılmış olan bazı çalışmalarda da bu bakterilerin tütünde aşırı duyarlılık testlerinde hem pozitif hem de negatif sonuç verdiği kaydedilmiştir (Gallelli *et al.* 2009; Pitman *et al.* 2010; Mikicinski *et al.* 2010). Bu nedenle pozitif sonuç veren 115 izolat ile daha önce yapılmış çalışmalardan yumuşak çürüklük etmeni olarak bilinen ve MIS tanı sonucuna göre; *Pectobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., ve *Chryseobacterium* sp. cinslerine ait izolatlar içerisinden seçilen izolatların tamamına kendi konukçularında patojenite testleri yapılmıştır. Bu testler sonucunda yumuşak çürüklük etmenlerinden MIS tanı sonucuna göre; 15 *P. c.* subsp. *carotovorum*, 7 *P. c.* subsp. *atrosepticum*, 5 *D. chrysanthemi*, 17 *E. cloacae*, 8 *C. indologenes*, 9 *P. viridiflava* ve 18 *B. pumilus* türü olmak üzere toplam 79 patojen izolat elde edilmiş ve çalışmanın kalan kısmı bu izolatlar ile yürütülmüştür. Patojen izolatların 37'si Erzurum, 21'i Erzincan, 14'ü Iğdır ve 7'si de Artvin il ve ilçelerinden alınan örneklerden elde edilmiştir. Patojenlerin yaklaşık % 73'ü konukçuların meyve ve yumrularından, geri kalan %27'lik kısmı ise gövdeden izole edilmiştir. Yapılmış olan bir çok çalışmada da bu patojenler daha çok bitkilerin meyve ve yumrularından elde edilmiştir (Saygılı *et al.* 2005; Maisuria and Nerurkar 2012; Van Vaerenbergh *et al.* 2012).

Birçok bakteri türü, bitki dokularında hastalık oluşturan enzimleri üretebilme potansiyeline sahip olmasına rağmen; yalnızca birkaçı canlı bitki dokularında yumuşak çürüklükten sorumludur (Prombelon and Kelman 1980). Bilindiği gibi yumuşak çürüklük oluşturan bakteriyel etmenlerin patojenitedeki en önemli rolü üretmiş oldukları

pektolitik enzimler ile konukçularının hücre duvarlarında bulunan pektini parçalamak suretiyle hastalık oluşturmalarıdır. Bu amaçla patojen olduğu belirlenen 79 izolatın tamamına pektolitik aktivite testi yapılmış ve bütün türlerin pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde yapılmış olan çok sayıda çalışmada da bu etmenlerin patates dilimlerinde pektolitik aktivite test sonuçlarının pozitif olduğu kaydedilmiştir (Ngadze *et al*. 2012; Crepin *et al*. 2012).

Pectobacter ve *Dickeya* cinslerine yapılan morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları incelendiğinde bütün izolatların hareketli ve çubuk şeklinde olduğu *P. c.* subsp. *carotovorum*'a ait izolatlardan 4 tanesinin açık krem 11 tanesinin ise açık sarı koloni renginde olduğu belirlenmiştir. *P. c.* subsp. *atrosepticum*'a ait izolatlar ile *D. chrysanthemi*'ye ait izolatların tamamının hareketli ve çubuk şeklinde olduğu aynı zamanda bütün izolatların açık sarı renkli koloniye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak izolatların belirtilen bu morfolojik özellikler bakımından literatürlerde belirtilen özellikler ile örtüştüğü görülmüştür (Brenner *et al.* 2007). İzolatların tamamı Gram negatif olup 37 ˚C'de gelişme göstermişlerdir. Zaten *Pectobacterium* türlerinin optimum gelişme sıcaklıklarının 25-30˚C, maksimum gelişme sıcaklıklarının ise 40˚C olduğu kaydedilmiş olup bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir (Brenner *et al.* 2007). Bütün izolatların katalaz test sonuçları pozitif iken oksidaz test sonuçları ise negatif olarak belirlenmiştir.

Eritromisin antibiyotiğine karşı yapılan duyarlılık testlerinde türler arasında farklılık olmakla birlikte, genel olarak bu antibiyotiğe karşı duyarlı izolatların oranının yaklaşık %71 olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde izolatların tamamı % 5 NaCl'ye toleranslı olup normal gelişme gösterebilmiştir. Ancak, bu cinslere ait türlerin bazılarının genelde % 5 NaCl'ye toleranslı oldukları ama bu konsantrasyonda gelişme gösteremeyen duyarlı türlerin varlığı da tespit edilmiştir (Ngadze *et al.* 2012). *Pectobacter* ve *Dickeya* cinslerine ait patojenlere yapılan indol üretim testi sonuçları incelendiğinde ise; tüm patojenlerin negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Yapılmış olan benzer çalışmalarda ise; *Dickeya* cinsine ait türlerin bu test de genellikle pozitif sonuç verdiği, ancak bazı çalışmalarda değişken sonuçların elde edildiği ifade edilmiştir (Dickey 1978; Baghaee-

Ravari *et al.* 2011; Ngadze *et al.* 2012). Bu türlerle ilgili yapılan fosfataz testinde genellikle pozitif sonuçlar elde edilmişken nadir de olsa bazı türlerde negatif sonuçların olabileceği de kaydedilmiştir (Palacio-Bielsa *et al.* 2010; Tavasoli *et al.* 2011; Sarris *et al.* 2011). Bu çalışmada ise; türlerin tamamı fosfataz testinde pozitif sonuç vermiş olup; bu açıdan literatürlere göre yakın sonuçların elde edildiği düşünülmektedir. Sukrozun indirgenmesi testinde ise *P. c.* subsp. *atrosepticum* (F-138) ve *P. c.* subsp. *carotovorum* (F-391) izolatları negatif, geri kalan bütün izolatlar pozitif sonuç vermiş olup; bu şekilde farklı sonuçların bulunduğu çalışmalara rastlanmaktadır (Gallelli *et al.* 2009; Van Der Merwe 2009). Bu türlerin karbonhidratlardan asit üretimini belirlemek için; sukroz, mannitol, glukoz, fruktoz, laktoz, mellibioz ve sorbitol gibi çok sayıda farklı karbonhidratlardan yararlanılmıştır (Dickey 1978; Sarris *et al.* 2011; Rahman *et al.* 2012; Mausuria and Nerurkar 2012). Bu çalışma kapsamında ise; glukoz, fruktoz, laktoz ve mannitol olmak üzere 4 farklı karbonhidrat kullanılmıştır. *Enterobacter*, *Dickeya* ve *Pectobacterium* cinslerine ait türlerin tamamı fruktoz ve mannitolden asit üretiminde pozitif sonuç vermiş olup, diğer karbonhidratlardaki testlerden ise hem negatif hem de pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bilindiği gibi *Pectobacter* ve *Dickeya* cinsleri bütün dünyada yumuşak çürüklük denince akla ilk gelen patojen gruplarını oluşturmaktadırlar. Bu nedenle yapılmış olan bu çalışmada da bu patojenler ile ilgili hemen hemen tüm çalışmalarda yararlanılmış olan morfolojik ve biyokimyasal testlerden en önemlileri olduğu düşünülen testlere yer verilmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak; daha önce bu cinslere ait türler ile ilgili yapılmış olan birçok çalışmada da kullanılan aynı morfolojik ve biyokimyasal testlerden elde edilmiş sonuçlar incelendiğinde bu çalışmada belirlenen sonuçlar ile büyük oranda benzerlik olduğu tespit edilmiştir (Aysan *et al.* 2005; Boyraz *et al.* 2006; Van Der Merwe, 2009; Maisuria and Nerurkar 2012).

Dünyadaki yaygınlığı açısından düşünüldüğünde yumuşak çürüklük oluşturan bakteriyel etmenler içerisinde ikinci önemli grubu hiç şüphesiz ki *Pseudomonas* cinsi içerisinde yer alan izolatlar oluşturmaktadırlar. Çalışmada bu cins içerisinde yer alan *P. viridiflava*'ya ait 9 izolat elde edilmiştir. Elde edilen toplam bu 9 izolatın kesin tanı ve karakterizasyonu içinde yukarıdaki morfolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Bu izolatları diğerlerinden ayıran en önemli özelliklerden birinin King

B besi yerinde oluşturmuş oldukları floresan pigment üretimidir. Bu izolatların oksidaz testinde pozitif, indol testinde negatif sonuç verdiği tespit edilmiş olup; bu testler ve yukarıda belirtilen bütün testlerden elde edilen sonuçlar literatürle uyumludur (Gonzalez *et al.* 2003; Mirik *et al.* 2011; Almeida *et al.* 2012).

Son zamanlarda; *E. cloacae*, *B. pumilus* ve *C. indologenes* türlerine ait izolatlarında yumuşak çürüklük oluşturduğunu kanıtlayan çalışmalar saptanmıştır (Mashayıt *et al.* 2009; Mikicinski *et al.* 2010). Ancak bu etmenlerin Ülkemizde yumuşak çürüklük oluşturduğuna dair herhangi bir kayda rastlanılmamıştır. Bu nedenle yapılmış olan bu çalışma yumuşak çürüklüğe sebep olan *E. cloacae*, *B. pumilus* ve *C. indologenes* türlerinin Ülkemiz açısından ilk kayıtları oluşturması açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca hıyar, kabak, kavun ve domates gibi farklı konukçularda yumuşak çürüklük oluşturan bu türlere ait izolatların belirtilen konukçularda Dünya literatürlerinde bu hastalık açısından ilk kayıtlar olacağı da açıkca görülmektedir.

Çalışmada diğer izolatlarda olduğu gibi *E. cloacae*, *B. pumilus* ve *C. indologenes* türlerine ait izolatlar içinde morfolojik ve biyokimyasal testler uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile bu türlerle ilgili daha önce yapılmış çalışmalardan çıkan sonuçlar arasında büyük oranda uyum olduğu tespit edilmiştir (Wang *et al.* 2009; Santana *et al.* 2012). *B. pumilus* türleri gram pozitif iken *E. cloacae* ve *C. indologenes* türleri gram negatiftir. Her üç türe ait izolatların katalaz, fosfataz test sonuçları pozitif iken amilaz test sonuçları negatif olarak belirlenmiştir. Diğer türlerden farklı olarak *C. indologenes* türlerine ait bütün izolatlar indol üretim testinde pozitif sonuç vermiştir. Bütün izolatlar fruktozdan asit üretme yeteneğine sahiptir. *B. pumilus* türlerine ait izolatların mannitolden asit üretme sonucu negatif olup; *E. cloacae* türleri pozitif pozitif sonuç vermişlerdir. Bu çalışmada *C. indologenes* izolatları ile ilgili dikkat çeken en önemli özelliklerden biri de; karbonhidratlardan asit üretimi testinde kullanılan 4 farklı karbonhidratın tümünde negatif sonuç elde edilmiş olmasıdır. *C. indologenes* türleri ile ilgili yapılmış olan bazı çalışmalarda kullanılan ve burada kullanılmış olan karbonhidratların bazıları için pozitif sonuç elde edilmiş olsa bile, genel olarak negatif sonuçların olduğu da bildirilmiştir (Mikicinski *et al.* 2010).

E. cloacae türleri insandan, topraktan, bitkilerden, böceklerden ve sulardan yaygın bir şekilde izole edilebilmektedirler (Clementino *et al.* 2001; Jang *et al.* 1990; Marchini *et al.* 2002 and Richard 1984). *E. cloacae* türlerinin papaya, soğan gibi bitkilerde patojen olduğu daha önce yapılan çalışmalarda kaydedilmiştir (Nishijima et al. 1987; Schroeder 2010). Yapılan bu çalışmada da bu patojenin kavun, karpuz ve patates gibi bitkilerde yumuşak çürüklük hastalığına neden olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçların Ülkemiz ve Dünya literatürleri açısından ilk kayıtlar olabileceği çalışmanın önemini daha da artırmaktadır.

Bilindiği gibi *Bacillus* cinsine ait türler daha çok topraktan ve sudan yaygın bir şekilde izole edilmektedirler. Ancak bu cins içerisinde bitkilerde de patojen olan türlerinin olduğunu kanıtlayan çalışmalar yer almaktadırlar. *B. pumilus* patates ve mangoda yumuşak çürüklük (Ciampi and Huguelet 1979; Galal *et al*. 2006; Bathily *et al*. 2010), *B. pumilus, B. subtilis* ve *B. polymyxa* sebzelerde yumuşak çürüklük (Chiu *et al.* 1964), *B. pumilus* ve *B. polymyxa* lahanada baş çürüklüğü (Gabr and Gazar 1983) ve *B. pumilus, B. subtilis, B. coagulans* ve *B. polymyxa*'nın son zamanlarda hasat sonrası sarımsakta çürüklük oluşturduğunu (Saleh 1995; Galal *et al.* 2002) gösteren kayıtlar bulunmaktadır. Bu çalışmada da; *B. pumilus* türüne ait 18 bitki patojeni izolat elde edilmiştir. Bu izolatların patates, çilek, elma, soğan, erik, turp, biber, domates, kavun, karpuz, kabak, dut ve lahana gibi çok sayıda konukçuda yumuşak çürüklük oluşturduğu belirlenmiş olup çalışmada elde edilen bu sonuçların hem Ülkemiz hem de Dünya açısından yeni kayıtlar olabileceği düşünülmektedir.

C. indologenes türlerine ait izolatların TSA ve NA besi yerinde oluşturmuş oldukları turuncu renkli kolonilere ve hareketsiz olması sayesinde kolayca ayırt edilebilmektedirler. Bilindiği gibi *Chryseobacterium* önceden *Flavobacterium* olarak adlandırılmakta olup bu cinse ait izolatlarında tipik turuncu renkli koloni oluşturdukları tespit edilmiştir (Goszczynska *et al.* 2000). *C. indologenes* türleri doğada yaygın olarak bulunan ancak insanda nadiren patojen olarak karşımıza çıkmakta ve insan florasının elemanları içinde yer almamaktadırlar. Gıda maddeleri, bitkiler, toprak, tatlı su ve deniz suyunda yaygın olarak bulunabilirler (Çelik vd. 2009). Dünyada *C. indologenes* türüne

ait bakterilerin yumuşak çürüklük oluşturduğuna dair çok az çalışma bulunmakta olup; Ülkemizde ise herhangi bir kayda rastlanmamıştır (Mikicinski *et al*. 2010).

Bu çalışmada MIS ve BIOLOG sistemleri kullanılarak patojen izolatların hem alternatif yöntemler ile tanısı yapılmış hem de tanılanan bu izolatların yağ asit profilleri ile kullanmış oldukları karbon kaynakları hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. MIS sistemi kullanılarak elde edilen tanı sonuçları yukarı da belirtilmişti. Ancak BIOLOG tanı sonuçları ile MIS tanı sonuçları karşılaştırıldığında *C. indologenes* türlerinin hemen hemen hepsi tür düzeyinde aynı sonucu vermişken, *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinslerine ait izolatların ise cins düzeyinde aynı sonuçları verdiği görülmüştür. Öte yandan MIS tanı sonucuna göre *Pectobacterium*, *Dickeya* ve *Enterobacter* cinslerine ait izolatların ise BIOLOG tanı sonuçları hem cins hem de tür düzeyinde çok az benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Kotan (2002) yapmış olduğu çalışmada da benzer şekilde MIS ve BIOLOG sonuçlarınının her zaman uyum içinde olmadığını belirtmiştir. MIS tanı sonucuna göre patojenlerden %0,7-%92 arasında tanı sonuçları elde edilmişken, BIOLOG tanı sonucuna göre %0,1- %85 arasında tanı sonuçları elde edilmiştir. Florida da süs bitkilerinden elde edilen bakteriyel izolatların MIS sistemi ile yapılan tanısında 12 izolat *E.carotovora* spp. olarak tanılanmıştır (Norman *et al.* 2003). BIOLOG ve MIS sisteminden yararlanılarak yapılan farklı bir çalışmada da elde edilen bakteriyel etmenler *Serratia marcescens, Enterobacter aerogens, Enterobacter cloacae* ve *Citrobacter farmeri* olarak tanılanmıştır (Adams and Boopathy 2005). Örnek olarak gösterilen bu çalışmalarda olduğu gibi gerek ülkemizde gerekse Dünyada mikroorganizmaların tanısında MIS ve BIOLOG sistemini yaygın bir şekilde kullanıldığı; ancak sonuçların mutlaka alternatif yöntemlerle de desteklenmesi gerektiği bilinmektedir (Oka *et al.* 2000; Kotan 2002; Aysan *et al.* 2003; Kotan vd. 2009; Wang *et al.* 2010; Mirik ve Aysan 2011).

Patojen bakterilerin yağ asit profillerine göre yapılan istatistiki analizler sonucunda iki temel grup belirlenmiştir. Birinci temel grupta iki alt grup olduğu ve bunlardan birinci grubu *B. pumilus* türlerine ait izolatlar, ikinci grubu ise *C. indologenes* türlerine ait izolatlar oluşturmaktadır. İkinci temel grubu ise *P. c.* subsp. *carotovorum, P. c.* subsp.

atrosepticum, D. chrysanthemi, E. cloacae, ve *P. viridiflava* türlerine ait izolatlar oluşturmaktadır. Yağ asit profillerine göre mikroorganizmaların cins ve/veya tür seviyesinde duyarlı ve güvenli bir şekilde gruplandırılabilecekleri birçok farklı çalışmada bildirilmiştir (Stead *et al.* 1986; Şahin 1999). Birinci temel gruptaki izolatların tamamı 15:0 iso, 16:0 ve 17:0 iso yağ asitlerini yüksek oranda içerdiklerinden dolayı aynı grupta yer almaktadırlar. Ancak 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso ve 17:0 anteiso yağ asitlerinin *Bacillus pumilus* izolatlarının tamamında bulunması buna karşın, ISO 17:1 w9c, 15:0 iso 3OH, 17:0 iso 3OH ve 16:1 w7c yağ asitlerinin ise *C. indologenes* izolatlarının tamamında bulunmasından kaynaklanan farklılıklardan dolayı birinci temel grupta iki alt grup oluşmuştur. Birinci alt grupta yer alan izolatlar 15:0 iso yağ asidini %32-56 arasında, 15:0 anteiso yağ asidini ise %30-41 arasında ihtiva ettiği, Venkateswaran ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları bir çalışmada benzer olarak *B. pumilus* izolatlarının 15:0 anteiso yağ asidini %25 oranında, 15:0 iso yağ asitini ise %45-49 arasında ihtiva ettiği tespit edilmiş olup elde edilen sonuçların birbiriyle büyük oranda uyum gösterdiği açıkça görülmektedir. Benzer şekilde ikinci alt grupta yer alan *C. indologenes* izolatları 15:0 iso yağ asitini %32-40 arasında, ISO 17:1 w9c yağ asidini %21-25 arasında ve 17:0 iso 3OH yağ asitini %13-19 arasında ihtiva etmektedirler. Yapılan bir çalışmada aynı cinse ait türlerden *Chryseobacterium meningosepticum* türünün 15:0 iso yağ asitini %33-42 arasında, ISO 17:1 w9c yağ asidini %5-9 arasında ve 17:0 iso 3OH yağ asitini %18-24 arasında ihtiva ettiği belirtilmiştir (Vancanneyt *et al.* 1994).

İstatistik analiz sonuçlarına göre belirlenmiş ikinci temel grubu oluşturan izolatların tamamının en yüksek oranlarda içermiş oldukları 16:0 ve 16:1 w7c yağ asitleri bu grubun temelini oluşturmaktadırlar. Bu grupta *Pectobacter, Dickeya, Pseudomonas* ve *Enterobacter* cinslerine ait farklı izolatlar bulunmakta, ancak bu izolatlardan bazıları hariç hemen hemen her izolat 18:1 w7c, 12:0 yağ asitlerini de yüksek oranda ihtiva etmektedirler. Bu nedenden dolayı farklı cinslere ait izolatlar aynı grup içerisinde yer almıştır. Çalışmada tüm izolatların ihtiva ettikleri 16:0 yağ asiti %21-32 arasında, 16:1 w7c yağ asiti ise %14-40 arasında bulunmaktadır. Hasat sonrası bazı meyve ve sebzelerden elde edilen 6 farklı cinse ait 190 bakteriyel izolat MIS sistemi kullanılarak

tanılanmış ve izolatların yağ asidi içerikleri belirlenmiştir. Tanılanan izolatlar arasında yumuşak çürüklük etmenlerinden *E. c.* subsp. *carotovora*, *E. c.* subsp. *atroseptica*, *E. chrysanthemi* ve *P. viridiflava* türlerine ait izolatların olduğuda belirtilmiştir. Wells ve arkadaşlarının (1993), yaptıkları çalışmada tanılanan bakteriyel izolatların yağ asit profilleri incelendiğinde *Erwinia* ve *Pseudomonas* cinslerine ait izolatların 16:0 yağ asitini sırasıyla; %19-41 ile %16-34 arasında, 12:0 yağ asitini de sırasıyla; %2-8 ve % 1-11 arasında ihtiva ettiği tespit edilmiştir. Avustralya'da yapılan bir çalışmada *Erwinia* cinsi olarak tanılanan izolatlarda dominant yağ asitlerinin 16:0 ve 16:1 w7c olduğu ve %50-65 arasında bütün izolatlarda olduğu tespit edilmiştir (Geider *et al.* 2006). Yapmış olduğumuz çalışmada da belirtilen yağ asitlerinin *Erwinia* cinsine ait izolatlarında içerisinde yer aldığı ikinci temel gruptaki bütün izolatlarda maksimum %40,82, minimum %14,4 ve ortalama %31,64 oranda bulunduğu böylece her iki çalışmanın birbirini desteklediği açıkça görülmektedir.

Bitki gelişimini teşvik edici özellikte *Enterobacter* cinsi bakterilerin tanılanması amacı ile yapılan bir çalışmada tanılanan *Enterobacter* cinsi bakterilerin 16:0, 18:1 w7c, 16:1, 14:0-3OH ve 16:1 w7c yağ asitlerini ihtiva ettikleri, çalışmanın en önemli ayrıntısı ise kullanılmış olan Ah-143^{T} tip izolatında bu yağ asitlerini içerdiğini bu nedenle izolatlar arasında %97-98,7 oranında benzerlik olduğu ifade edilmiştir (Madhaiyan *et al.* 2010). Yapılmış olan bu çalışmada da izolatlar arasında %90-95 oranında benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Pseudomonas cinslerinin ihtiva ettikleri yağ asit profillerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada; bu cinsin ihtiva etmiş olduğu 16:0 ve çeşitli izomerleri olan 16:1 ve 18:1 yağ asitlerinin bütün taksonomik gruplarının sahip olduğu temel yağ asitleri olarak ifade edilmiştir (Vancanneyt *et al.* 1996). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise *P. cichorii* türüne ait izolatların 16:0 yağ asitini %24-26 arasında, 18:1 w7c yağ asitini %18-23 arasında, 12:0 yağ asitini %4-6 arasında ihtiva ettiği belirtilmiştir (Mirik *et al.* 2011). Tüm bu çalışmalar ile yapılmış olan bu çalışma karşılaştırıldığında patojen türlerin içermiş oldukları yağ asitleri ile literatürlerde belirtilen aynı ve/veya benzer türlerin

sahip oldukları yağ asitleri ve benzerlik oranları arasında tam bir uyumun olduğu söylenebilir.

Gram pozitif bakterilerin (*B. pumilus* izolatları) GP2 kitinde kullanmış oldukları karbon kaynaklarına göre elde edilen sonuçların istatistiki analizi sonucu oluşan dendogramda iki temel grup oluşmuştur. Birinci gruptaki izolatların kullanmış oldukları karbon kaynaklarının oranı %0-100 arasında değişmekte olup Fructose ve Uridine bütün izolatlar tarafından kullanılmış iken, α-cyclodextrin, D-arabitol, Lactulose, α-Methyl-D-Mannoside, Lactamide, D-Malic Acid, Inulin, L-Fucose, Mannan, D-galacturonic acid, β-Hydroxy Butyric Acid, Propionic Acid, L-Pyroglutamic Acid, Sedoheptulosan, p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid ve m-Inositol karbon kaynakları ise hiçbir izolat tarafından kullanılmamıştır. Yapılmış olan bu çalışma ile benzer sonuçların elde edilmiş olduğu bir çalışmada depolanmış patates yumrularında yumuşak çürüklük etmeni olduğu tespit edilen *Bacillus pumilus* izolatlarının biyolog testleri sonucunda Galactose, Glucose ve Mannitol'ü kulandıkları, Lactose, Maltose ve Arabinose karbon kaynaklarını ise kullanmadıkları tespit edilmiştir (Bathily *et al.* 2010).

Gram negatif bakterilerin (*P. c.* subsp. *carotovorum, P. c.* subsp. *atrosepticum, D. chrysanthemi*, *E. cloacae*, *C. indologenes*, ve *P. viridiflava* izolatları) GN2 kitinde kullanmış oldukları karbon kaynaklarına göre elde edilen sonuçların istatistiki analizi sonucu oluşan dendogramda iki temel grup oluşmuştur. Birinci gruptaki izolatların kullanmış oldukları karbon kaynaklarının oranı %0-98 arasında değişmekte olup, D-mannose, pyruvic acid methil ester, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, L-asparagine, L-glutamic acid ve L-serine karbon kaynakları izolatların %97-98'i tarafından kullanılmış olup, sadece Sebacic acid karbon kaynağı hiçbir izolat tarafından kullanılmamıştır. Duarte ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmada; Brezilya'da patateslerde hastalık etmeni olan *E. carotovora* ve *E. chrysanthemi* izolatlarının biyolog test sonuçlarına göre; D-cellobiose, D-galactonic acid lactone, D-melibiose, D-trehalose, thymidine, inosine, gentiobiose ve D-gluconic acid karbon kaynaklarını izolatların %60-100'ünün kullandığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ise; belirtilen karbon kaynaklarının izolatların %67-97'si tarafından kullanıldığı belirlenmiştir. Bu grup

içerisinde yer alan diğer cinslere ait bakteriyel izolatların da benzer şekilde biyolog testlerinde farklı karbon kaynaklarını değişik oranlarda kullandığını belirten çok sayıda çalışma yapılmıştır (Kotan 2002; Adams and Boopathy 2005; Mathaiyan *et al.* 2010; Mirik ve Aysan 2011).

Moleküler bitki patolojisinde önemli bitki patojenlerinin belirlenmesi amacı ile yapılmış olan ilginç bir araştırmada en önemli 10 patojen grup belirlenmiştir. Araştırmacılar bu patojenleri şu şekilde gruplandırmıştır; (1) *Pseudomonas syringae* patovarları, (2) *Ralstonia solanacearum*, (3) *Agrobacterium tumefaciens*, (4) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, (5) *Xanthomonas campestris* patovarları, (6) *Xanthomonas axonopodis* patovarları, (7) *Erwinia amylovora*, (8) *Xylella fastidiosa*, (9) *Dickeya (dadantii* and *solani)*, (10) *Pectobacterium carotovorum* (and *Pectobacterium atrosepticum*) (Mansfield *et al.* 2012). Bu sonuçlardan yola çıkarak yumuşak çürüklük etmenlerinin en önemli grubunu oluşturan *Pectobacter* ve *Dickeya* cinslerine ait patovarların Dünya genelinde moleküler bitki patolojisi açısından ne kadar önemli bir yere sahip olduğu tartışılmazdır. Bilindiği gibi son zamanlarda oldukça büyük ilerleme kaydeden moleküler yöntemlerin başta sağlık olmak üzere tarım, endüstri ve hatta hemen hemen bütün alanlarla dolaylı ve/veya direkt bir ilişkisinin olduğu açıkça görülmektedir.

Mikroorganizmaların tanısında yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemlerden birisi olan PCR yöntemi; bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir (Schochetman and Jones 1988; Arda 1995).

Bakterilerin ve diğer yaşam formlarının filogenetik ilişkisinin, genetik şifrenin değişmeyen bir bölgesinin kıyaslanması ile saptanabilir olduğu 1985'li yıllarda ortaya konulmuştur (Woese *et al.* 1985). 16S rDNA genindeki değişim oranı kesin olarak bilinmese de, organizmalar arasındaki bağlantıyı ve evrimsel mesafeyi gösterir (Kimura 1980; Pace 1997; Harmsen ve Karch 2004).

Prokaryot ve ökaryotların büyük bölümünün genomlarında birçok tekrarlı repetetive DNA dizisinin bulunduğu tespit edilmiştir. Rep-PCR çoğu bakterinin genomunda birçok kopyasının doğal olarak bulunduğu, oldukça korunmuş ve tekrarlanan DNA sekanslarının amplifikasyonu üzerine kurulmuş bir genomik parmakizi tekniğidir (Lupski and Wolfenbarger 1992). Bugüne kadar tekrarlanan DNA sekanslarının 3 türü tanımlanmıştır (Lupski and Wolfenbarger 1992). Bunlardan birincisi; tekrarlanan ekstrajenik palindromik (REP) olarak adlandırılan 35-40 baz çifti büyüklüğünde ve çeşitli halkaları yapısında bulunduran elementlerdir. Enterobakteriyel tekrarlanan interjenik palindromik konsensus (ERIC) ise; 124-127 baz çifti büyüklüğünde ve merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Son olarak BOX dizisi ise 154 baz çiftlik box A, box B, ve box C şeklinde isimlendirilmiş korunmuş alt ünitelere sahip elementlerdir. Bakteriler arasında bütün bu alt üniteler arasında sadece box A-1 alt ünitesi oldukça korunmuştur. ERIC, REP ve BOX PCR metotları populasyonlardaki genetiksel çeşitliliğin ortaya konulmasında önemli bilgiler vermektedir. Tiplendirme amacıyla primerler DNA'yı çoğaltmak için REP ve ERIC'de tekrarlanan bölgelerin dışından, BOX'da ise box A alt ünitesinden başlayacak şekilde tasarlanabilirler. Bu primerlerin kullanımıyla REP, ERIC ve BOX elementlerinin arasında yerleşmiş ayırıcı bölgeler çoğaltılabilmekte ve REP-PCR, ERIC-PCR ve BOX-PCR genomik parmakizi olarak adlandırılmaktadır (Prakash *et al.* 2007).

Yapılmış olan bu çalışmada da patojen bakterilerin güvenilir bir şekilde tanısı için farklı PCR metotlarından (16S rDNA-PCR, Rep-PCR, Eric-PCR, Box-PCR ve Spesifik PCR) yararlanılmıştır.

Pectobacter, Dickeya, Enterobacter ve *Chryseobacter* cinslerine ait 52 izolatın 16S rDNA-PCR metodunda universal primerlar olan fD1 ve rP2 kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; bu cinslere ait izolatların yaklaşık 1500 bp uzunluğunda bant verdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Pectobacter* ve *Dickeya* cinslerine ait izolatların 1470 bp uzunluğunda bant verdiği, benzer şekilde *Enterobacter* ve *Chryseobacter* cinslerininde 16S rDNA-PCR sonucunda yaklaşık 1500 bp uzunluğunda bantlar verdiği

bildirilmiştir (Kang *et al.* 2003; Rattanasuk and Ketudat-Cairns 2009; Santana *et al.* 2012).

18 *B. pumilus* izolatının tamamı EUB-F ve EUB-R primerleri kullanılarak yapılan 16S rDNA-PCR metodunda yaklaşık 500 bp uzunluğunda bantlar vermiştir. Parvathi ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada *B. pumilus* türleri için yapmış oldukları 16S rDNA-PCR metodunda aynı primeleri kullanarak aynı şekilde 500 bp uzunluğunda bantlar elde etmişlerdir. Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile belirtilen çalışma arasında tam bir uyum olduğu açıkça gözükmektedir.

Benzer şekilde *Pseudomonas* cinslerine ait 9 izolatın 16S rDNA-PCR metodunda PsV-F ve PsV-R primerleri kullanılmıştır. 16S rDNA-PCR sonucunda yaklaşık 180 bp uzunluğunda bantlar elde edilmiş olup, yine bire bir uyum gösteren bir çalışmada aynı primerler kullanılarak 180 bp uzunluğunda bantların elde edildiği ifade edilmiştir (Alimi *et al.* 2011).

16S rDNA-PCR metodunda elde edilen sonuçlar ile *Pectobacter*, *Dickeya*, *Enterobacter, Chryseobacter, Bacillus* ve *Pseudomonas* cinslerine ait izolatların tamamı MIS sonucu ile aynı sonucu vermiştir. Ancak, BIOLOG sonuçları ile karşılaştırıldığında *Chryseobacter* ve *Bacillus* cinsleri arasında tam bir uyum olduğu, ancak *Pectobacter*, *Dickeya*, *Enterobacter* ve *Pseudomonas* cinslerine ait izolatlar arasında farklılıkların olduğu belirlenmiştir.

ERIC, REP ve BOX PCR metotları ekosistemdeki çeşitliliğin ortaya konulmasında, izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemede ve genetiksel olarak birbiriyle yakın olan mikroorganizmaları ayırmada oldukça etkin ve güvenilir yöntemlerdir (Rademaker *et al.* 1998).

Rep PCR metodunda *P.c.* ssp. *carotovorum*, *P.c.* ssp. *atrosepticum* ve *D. chrysanthemi* izolatları için elde edilen bant profillerinde çok büyük bir farklılığın olduğu, *E. cloacae* için 10 grup, *B. pumilus* için 12 grup, *C. indologenes* için 5, ve *P. viridiflava* için 7

farklı grupta değerlendirilecek bant profilleri elde edilmiştir. Aynı türün farklı izolatları arasındaki bu varyosyonunda konukçu yada lokasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir.

ERIC PCR metodunda *P.c.* ssp. *carotovorum*, *P.c.* ssp. *atrosepticum* ve *D. chrysanthemi* izolatları için elde edilen bant profillerinde çok büyük bir farklılığın olduğu, *E. cloacae* için 9 grup, *B. pumilus* için 4 grup, *C. indologenes* için 4, ve *P. viridiflava* için 4 farklı grupta değerlendirilecek bant profilleri elde edilmiştir. Aynı türün farklı izolatları arasındaki bu varyosyonunda konukçu ya da lokasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir.

BOX PCR metodunda *P.c.* ssp. *carotovorum*, *P.c.* ssp. *atrosepticum* ve *D. chrysanthemi* izolatları için elde edilen bant profillerinde çok büyük bir farklılığın olduğu, *E. cloacae* için 6 grup, *B. pumilus* için 8 grup, *C. indologenes* için 8, ve *P. viridiflava* için 4 farklı grupta değerlendirilecek bant profilleri elde edilmiştir. Aynı türün farklı izolatları arasındaki bu varyosyonunda konukçu yada lokasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir.

MIS tanı sonucuna göre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olarak tanılanan 15 izolat, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* olarak tanılanan 7 izolat ve *Dickeya chrysanthemi* olarak tanılanan 5 izolat sırası ile Y1-Y2, ECA1f-ECA2r ve ADE1-ADE2 primerleri kullanılarak spesifik PCR testlerine tabi tutulmuştur. Spesifik PCR testleri sonucunda; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatlarının 4'ü 434 bp uzunluğunda bant vermiştir. Nitekim Y1 ve Y2 primerleri kullanılarak *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ile ilgili yapılmış olan spesifik PCR çalışmalarında da yine aynı uzunlukta bantların elde edildiği kaydedilmiştir (Yahiaoui-Zaidi *et al*. 2003; Phokum *et al*. 2006).

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum* izolatlarının bant vermediği tespit edilmiştir. Bu türün tanısı için ECA1f-ECA2r primerleri kullanılarak yapılan spesifik PCR çalışmalarında 690 bp uzunluğunda bant verdiği kaydedilmiştir (De Boer and Ward 1995; Tavasoli *et al*. 2011).

Dickeya chrysanthemi izolatlarının ise 50-150 bp arasında tek bant verdiği görülmüştür. ADE1 ve ADE2 primerleri kullanılarak *Dickeya chrysanthemi* ile ilgili yapılan bir çalışmada ise; 420 bp uzunluğunda bantların elde edildiği kaydedilmiştir (Nassar *et al*. 1996). Ancak 2013 yılında aynı tür ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise; bu primerler kullanılarak belirtilen şekilde 420 bp uzunluğunda bantların elde edilemediği belirtilmiştir (Azadmanesh *et al*. 2013). Spesifik PCR testlerinden elde edilen bulgular değerlendirildiğinde yukarıda belirtilen spesifik primerlerin sağlıklı bir şekilde tanıda kullanılamayacağına dair bir kanaat uyanmıştır. Söz konusu patojen izolatların 16-23 S rDNA skans analizleri yapıldıktan sonra daha sağlıklı yorumların yapılabileceğini düşünmekteyiz.

Tüm bu sonuçlara göre; Artvin, Erzincan, Erzincan ve Iğdır illerinden alınan bazı meyve (çilek, dut, hurma, nar, üzüm, kayısı, böğürtlen, elma, erik, kiraz, kavun ve karpuz) ve sebzelerde (patates, domates, kabak hıyar, patlıcan, marul, biber, havuç, turp, maydanoz, bamya, lahana ve soğan) çok sayıda yumuşak çürüklük belirtisi olduğu gözlemlenmiştir. Belirtilen konukçulardan toplam 882 bakteri izolatı izole edilerek saflaştırılmış ve MIS sistemi kullanılarak tanılanmıştır. Tanılanan bu izolatların tamamına tütünde HR testi yapılmıştır. HR ve MIS tanı sonucuna göre; yumuşak çürüklük etmeni olabilecek *Pectobacterium, Dickeya, Bacillus, Pseudomonas, Enterobacter* ve *Chryseobacterium* cinslerine ait izolatlara patojenite ve pektolitik aktivite testleri yapılmış ve yumuşak çürüklükten sorumlu olan toplam 79 bakteri izolatı olduğu tespit edilmiştir. Bu bakterilerin MIS tanı sonucuna göre; 22'si *Pectobacterium*, 5'i *Dickeya*, 9'u *Pseudomonas*, 18'i *Bacillus*, 17'si *Enterobacter*, 8'i *Chryseobacterium* cinsine dahil olduğu belirlenmiştir. Patojen olduğu belirlenen izolatlar BIOLOG sisteminde de tanılanmış ancak, MIS ve BIOLOG tanı sonuçları karşılaştırıldığında bütün izolatlar arasında tam bir uyumun olmadığı belirlenmiştir. Patojen izolatların kesin tanı ve karakterizasyonu için bazı biyokimyasal testler ve PCR (16S rDNA-PCR, Rep-PCR, Eric-PCR, Box-PCR ve spesifik PCR) metodları da kullanılmıştır. 16S rDNA-PCR metodundan elde edilen sonuçlara göre; 22 *Pectobacter*, 5 *Dickeya*, 9 *Pseudomonas*, 17 *Enterobacter*, 18 *Bacillus* ve 8 *Chryseobacterium* izolatı cins düzeyinde teşhis edilmiştir. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ortaya koymak,

genetiksel olarak birbiriyle yakın olan bakterileri belirlemek amacı ile de Rep-PCR, Eric-PCR ve Box-PCR yöntemleri tercih edilmiştir. Bu bakterilerin Rep-PCR, Eric-PCR ve Box-PCR sonuçlarında izolatlar arasında geniş bir varyasyonun olduğu ve bunun konukçu ya da lokasyona bağlı olmadığı görülmüştür. Yine *P. c.* subsp. *carotovorum, P. c.* subsp. *atrosepticum* ve *D. chrysanthemi* türlerine spesifik primerler temin edilerek bu patojenler için de spesifik PCR yöntemi ile kesin tanı yapılmıştır. MIS tanı sonucuna göre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* olarak tanılanan 15 izolat, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* olarak tanılanan 7 izolat ve *Dickeya chrysanthemi* olarak tanılanan 5 izolat sırası ile Y1-Y2, ECA1f-ECA2r ve ADE1-ADE2 primerleri kullanılarak spesifik PCR testlerine tabi tutulmuştur. Spesifik PCR testleri sonucunda; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatlarının 4'ünün 434 bp uzunluğunda bant verdiği, 11 izolatın ise herhangi bir bant vermediği, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* izolatlarının bant vermediği ve *Dickeya chrysanthemi* izolatlarının ise 50-150 bp arasında tek bant verdiği görülmüştür.

KAYNAKLAR

Abd-Alla, M.H., Bashandy, S.R., Ratering, S. and . Schnell, S.2011. First report of soft rot of onion bulbs in storage caused by *Pseudomonas aeruginosa* in Egypt. Journal of Plant Interactions, 6:4, 229-238.

Aboaba and Ekundayo 2000. Microbial rotting of purple variety of Onions (*Allium cepa*. L.) in the Lagos area of Nigeria. Journal of Sci. Res. Dev, 5: 2000, 159-169.

Aboaba, O.O. 2007. Growth studies of *Pseudomonas fluorescens* implicated in soft rot of purple variety of Onions in Southern Nigeria. Nature and Science, 5, 4.

Adams, L., Boopathy, R., 2005. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. Bioresour. Technol. 96, 1592–1598.

Agrios, G. N., 1997. Plant Pathology. Department of Plant Pathology, University of Florida, 4th edn. Academic Press, 635p, USA.

Agrios, G. N., 2005. Plant Pathology. Department of Plant Pathology, University of Florida, Fifth Edition Elsevier Academic Press, 922p, USA.

Akbay, C., Candemir, S. ve Orhan, E. 2005. Türkiye'de Yaş Meyve ve Sebze Ürünleri Üretim ve Pazarlaması. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2), s, 96-107.

Aksoy, H.M. ve Kara, Ç. 2012. Bitki Patojeni Bakterilerde Salgı Sistemleri. Anadolu Tarım Bilim. Derg., 27:1, 48-54.

Alexandra, T., Bernards, L., Dijkshoorn, J., Van der Toorn, B., Bochner, R. and Van Boven, C. P. A., 1995. Phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains of 13 DNA-DNA hybridisation groups by means of the biolog system. Journal of Medical Microbiology, 42, 113-119.

Alimi, M., Rahimian, H., Hassanzadeh, Nader., Darzi, M. T., Ahmadikhah, A., Heydari, Asghar. and Balestra G.M. 2011. First detection of *Pseudomonas viridiflava*, the causal agent of blossom blight in apple by using specific designed primers. African Journal of Microbiology Research, 5:26, pp. 4708-4713.

Alippi, A. M., Dal Bo, E., Ronco,L. B. and Casanova,P. E. 1997. Plant Disease, 81:2, 230.

Almeida, I.M.G., Maciel, K.W., Neto, J. R. and Beriam, L.O.S. 2012. *Pseudomonas viridiflava* in imported carrot seeds. Australasian Plant Dis. Notes.

Anonim 2000**.** Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Ankara 36, s 522.

Anonim 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Cilt 4.

Anonim, 2004. Biyoteknoloji Ve Gen Teknolojileri Stratejisi Vizyon 2023 Projesi Biyoteknoloji Ve Gen Teknolojileri Strateji Grubu s, 18-20. Ankara

Anonim, 2010. Patates Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 1-48, Ankara

Anonymous, 2010. Food and Agricultural Organisation. http://faostat.fao.org.

Araki, H., Tian, D., Goss, E. M., Jakob, K., Halldorsdottir, S. S., Kreitman, M. and Bergelson, J. 2006. Presence/absence polymorphism for alternative

pathogenicity islands in *Pseudomonas viridiflava*, a pathogen of Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 5887- 5892.

Arda, M. 1995. Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara.

Aysan, Y. ve Ö. Çınar, 2001. Doğu Akdeniz bölgesi domates seralarında bakteriyel gövde nekrozu hastalığının yaygınlığı ve bu seralarda yapılan gözlemler. IX. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. 51-56. 3-8 Eylül, Tekirdağ.

Aysan, Y., A. Karatas and O. Cinar, 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. Crop Protection 22 (6) 807-811.

Aysan, Y., M. Mirik, A. Ala, F. Sahin and O. Cinar, 2003. First report of *Pseudomonas viridiflava* on melon in Turkey. Plant Pathology 52 (6) 800.

Aysan, Y., S. Sahin, G. Ulke and F. Sahin, 2003. Bacterial rot of lettuce caused by *Pseudomonas cichorii* in Turkey. Plant Pathology 52 (6) 782.

Aysan, Y., F. Sahin, R.Cetinkaya-Yildiz, M. Mirik, and Y. Yucel, 2005. Occurence and primer inoculum sources of bacterial stem rot caused by *Erwinia* species on tomato in the eastern Mediterraanean region of Turkey. Journal of Plant Diseases and Protection. 112:1, 42-51.

Azadmanesh, S., Marefat, A. and Azadmanesh, K. 2013. Detection of Pectobacteria Causal Agents of Potato Soft Rot in North Western Provinces of Iran. J. Plant Pathol. Microb., 4:1, 2-6.

Baghaee-Ravari S, Rahimian H, Shams-Bakhsh M, Lopez-Solanilla E, Antúnez-Lamas M, Rodríguez-Palenzuela P (2011). Characterization of *Pectobacterium*species from Iran using biochemical and molecular methods. Eur. J. Plant. Pathol. 129: 413-425.

Barras, F., Van Gijsegem, F. and Chatterjee, A. K. 1994. Extra-cellular enzymes and pathogenesis of soft-rot Erwinia.Annu Rev. Phytopathol. 32, 201-234.

Bastas, K.K., Hekimhan, H., Maden S. and Tör M. 2009. First report of bacterial stalk and head rot disease caused by *Pectobacterium atrosepticum* on sunflower in Turkey. Plant Disease 93:12, s, 1352.

Bathily, H., Babana, A. H. and Samake, F. 2010. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on potato tubers in storage in Mali. African Journal of Microbiology Research, 4:20, pp. 2067-2071.

Benlioğlu, K., Öktem, Y.E. ve Özakman, M. 1991. Bacterial diseases of potatoes in the major potato-growing areas in Turkey. EPPO Bulletin, 21:1, 67-72.

Boccara, M., Diolez, A., Rouve, M. and Kotoujansky, A. 1988. The role of individual pectate lyases of *Erwinia cbrysantbemi* strain 3937 in pathogenicity on Saintpaulia plants. Pbysiol Mol Plant Patbol 33, 95-104.

Bochner, B., 1989. Breathprints at The Microbial Level, ASM News, 55, 536-539.

Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H. C. and Hutcheson, S. W. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. Mol Microbiol 20, 681–683.

Bouley, J., Condemine, G., Shevchik. V.E., 2001. The PDZ domain of OutC ve the N-terminal region of OutD determine the secretion specificity of the type II out pathway of *Erwinia chrysanthemi*. J. Mol. Biol., 308: 205–219.

Boyer, M.H., Cami, B., Chambost, J.P., Magnan, M. and Cattaneo, J. 1987. Characterisation of a new endoglucanase from *Erwinia chrysanthemi*. Eur. J. Biochem., 162, 311-316.

Boyraz, N., Bastas, K.K., Maden,S. and Yasar, A. 2006. Bacterial leaf and peduncle soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* on Tulips in Konya, Turkey. Phytoparasitica, 34:3, 272-280.

Bradbury, J.F. 1977a. *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* CMI. Description of pathogenic fungi and bacteria. N° 551. Kew: Commonwealth Mycolological Institute.

Bradbury, J.F. 1977b. *Erwinia carotovora* var. *carotovora* CMI. Description of pathogenic fungi and bacteria. N° 552. Kew: Commonwealth Mycolological Institute

Brenner, J.D., Kieg, N.R. and Garrity, M.G., 2007. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed p, 721-733

Burkholder, W.H. 1930. The bacterial diseases of the bean. Memoirs. Cornell University Agricultural Experiment Station 127: 1–88.

Canaday, C. H., Wyatt, J. E. and Mullıns, J. A. 1991. Resistance in Broccoli to Bacterial Soft Rot Caused by *Pseudomonas marginalis* and Fluorescent *Pseudomonas* Species. Plant Dis. 75: 715-720.

Charkowski, A.O, 2006. The Soft Rot *Erwinia*. In: Gnanamanickam, S.S. (ed.), Plant Associated Bacteria, Springer pp,: 423–506.

Caster, J. C. 1945. Wetwood of elms. III. Nat. Hist. Surv. Bull. 23:407-448.

Catara, V., Bella,P. and Polizzi, G. 2001. First Report of Bacterial Stem Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum carotovorum* and *P.carotovorum atrosepticum* on Grafted Eggplant in Italy. Plant Disease, 85:8, 291.

Cetinkaya-Yildiz, R., Mirik, M., Aysan Y., Kusek M., and Sahin F., 2004. An Outbreak of Bacterial Stem Rot of Dieffenbachia amoena Caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. Plant Diseases Vol:88 (3), 310

Charkowski, A. O. 2006. The soft rot *Erwinia*. gnananmanickam S.S. (Ed.) Plant-Associated Bacteria, Netherlands, 423-505.

Chiu, W. F., Di,Y. P., Chotic,Y. Y. and Si, F. J. 1964. Some bacteria causing decay of Chinese cabbage in storage. Acta Phytopathol. Sin. 7, 127-134.

Choi, O. and Kim, J. 2013. Pectobacterium Carotovorum Subsp. Brasiliense Causing Soft Rot on Paprika in Korea. Journal of Phytopathology, 161:2, p. 125.

Choi, J.E., Park, J.S. and Kang, H.W., 1988. Bacterial soft rot of banana fruit caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Pseudomonas cichorii*. Korean Journal of Plant Pathology. 4 (3), 202-206.

Ciampi, L.R., Huguelet, J.E. 1979. Internal bacterial in healthy potato tubers. Fitopatologia, 14: 22-28

Clementino, M. M., de Filippis, I., Nascimento, C. R., Branquinho, R., Rocha, C. L., and Martins, O. B. 2001. PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter- and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. J. Clin. Microbiol. 39:3865-3870.

Cooper, V. J. C. & Salmond, G. P. C. (1993). Molecular analysis of the major cellulase (CelV) of Erwinia carotovora: evidence for an evolutionary 'mix and match' of enzyme domains. Mol. Gen. Genet., 241, 342–350.

Costa, A.B., Eloy, M., Cruz,L., Janse, J.D. and Oliveira, H. 2006. Studıes on Pectolytic *Erwinia* spp. In Portugal Reveal Unusual Strains of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. Journal of Phtopathology, 88:2, 161-169.

Cother, E.J; Derbyshire, B. and Brewer, J, Pseudomonas aeruginosa, cause of an internal brown rot of onion. Phytopathology 66: 1976, 828-834.

Crepin, A., Barbey, C., Cirou, A., Tannieres, M., Orange N., Feuilloley, M., Dessaux, Y., Burini, J. F., Faure, D. and Latour, X. 2012. Biological control of pathogen communication in the rhizosphere: A novel approach applied to potato soft rot due to Pectobacterium atrosepticum. Plant Soil, 358, 27-37.

Çelik, A.D., Yuluğkural, Z., Durmuş, G., Kuloğlu, F., Sarıdoğan, K. ve Akata, F. 2009. *Chryseobacterıum indolegenes*'in Etken Olduğu Nozokomiyal Septik Artrit Olgusu. Turkish Journal of Infection, 23 (3): 133-135.

Çetinkaya Yıldız, R., Y. Aysan, Ö. Çınar, ve H. Saygılı, 2005. Domateste *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi*'ye karşı çeşitli fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının etkisi. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi, 9-11 Kasım 2005, Adana Sf: 360.

Çetinkaya Yıldız, R. ve Y. Aysan, 2006. Çukurova Bölgesinde Saksılı Süs Bitkilerinde Bakteriyel Yumuşak Çürüklük Hastalıgı Üzerine Araştırmalar. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, sayfa 356-362. 8-10 Kasım 2006, İzmir

Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A. and Bertheau Y., 1994. PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism of a pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1437-1443.

De Boer, S.H. and Ward, L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. Phytopathology 85, 854±858.

Dickey, R.S. and Kelman, A. 1988. *Erwinia*: "Carotovora" or soft rot group. In: Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria.p. Schaad, N.W. 2 ed. St. Paul: APS. pp.44-59.

Dolar, F.S., Demirci, E., Basım, H., Demirci, F. ve Elibüyük, İ.E. 2011. Fitopatoloji. Anadolu Üniversitesi, 199, Eskişehir.

Dowson, W. 1939. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. Zentralbl Bakteriol, II Abt 100: 177–193.

Duarte V, De Boer SH, Ward LJ, De Oliveira AMR. (2004) Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. J Appl Microbiol 96:535–545.

Fahy, P. C. and Hayward, A. C., 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. plant bacterial disease. Academic Press, 337-378, Sydney.

Ferreira, R.S., Brandao, F.F.B. and Lobo, S.M. 2010. Chryseobacterium indologenes infection: a case report. Rev. Bras. Ter. Intensiva. 22:1, pp. 96-98.

Fiori, M. and Schiaffino, A. 2004. Bacterial Stem Rot in Greenhouse Pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sardinia (Italy): Occurrence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora.* Journal of Phtopathology, 152:1, 28-33.

Gabr, M.R.and Gazar, A.A. 1983. Cabbage head rot due to spore-forming bacteria. Ann. Agric. Sci., Ani Shams, Cairo, 28: 1163-1185.

Galal, A.A., El-Bana, A.A. and Janse, J. 2006. *Bacillus pumilus* a new pathogen on mango plants. Egypt. Journal Phytopathology. 34:1, pp. 17-29.

Gallelli, A., Galli, M., De Simone, D., Zaccardelli, M. and Loreti, S. 2009. Phenotypic and Genetic Varıability of *Pectobacterium carotovorum* Isolated from Artichoke in the Sele Valley. Journal of Plant Pathology, 91**:**3, 757-761.

Ghigo, J.M., Wveersman, C., 1992. Cloning, nucleotide sequence ve characterization of the gene encoding the *Erwinia chrysanthemi* B374 PrtA metalloprotease: a third metalloprotease secreted via a C-terminal secretion signal. Mol. Gen. Genet. 236:135–144.

Geider, K., Auling, G., Du, Z., Jakovljevic, V., Jock, S. and Volksch, B. 2006. *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from apple and pear trees. Int J Syst Evol Microbiol 56, 2937–2943

George, M., Potty, V. P., and Jayasankar, N. P. 1976. Association of *Enterobacter* with coconut root (wilt) disease. Curr. Sci. 45:677-678.

Gessard, C. 1882. Sur les colorations bleue et verte des lignes a pansements. C. R. Acad. Sci. serie D. 94:536-538.

Godfrey S.A.C. and Marshall, J.W. 2002. Identification of cold-tolerant *Pseudomonas viridiflava* and *P. marginalis* causing severe carrot postharvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand. Plant Pathol 51, 155-162.

Golkhandan, E., Kamaruzaman,S., Sariah, M., ZainalAbidin, M.A., Nazerian,E. and Ya ssoralipour,A 2012. First Report of Soft Rot Disease Caused by*Pectobacterium wasabiae* on Sweet Potato, Tomato, and Eggplant in Malaysia. Plant Disease, 97:5, 685.

Gonzalez A.J. Rodicio M.R. and Mendoza, M.C.2003. Identification of an emergent and atypical Pseudomonas viridiflava lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. Appl Environ Microbiol 69: 2936–2941.

Goszczynska, T., Serfontein, J.J. and Serfontein, S. 2000. Introduction to practical Phytobacteriology. Safrinet, the southern African loop of bionet International, ARC-Plant Protection Research Institute, Pretoria, South Africa.

Goumans, D.E. and Chatzaki, A.K. 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. European Journal of Plant Pathology 104: 181-188.

Grogan RG, Misaghi IJ, Kimble KA, Greathead AS, Ririe D, Bardin R. (1977) Varnish spot, destructive disease of lettuce in California caused by *Pseudomonas cichorii*. Phytopathology 67:957–960.

Guillorit-Rondeau, C., Malandrin, L. and Samson, R., 1996. Identification of two serological flagellar types (H1 and H2) in *Pseudomonas syringae* pathovars. European Journal of Plant Pathology, 102, 99-104.

Harmsen, D. and Karch, H. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. ASM News, 70:19–24.

Harley, J.P. and L.M. Prescott, 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. 5th Edn., McGraw Hill, New York.

He, S.Y., Nomura, K. and Whittam, T.S., 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian ve plant pathogens. Biochim. Biophys. Acta, 1694:181-206.

Helias V., Le Roux A.C., Bertheau Y., Andrivon D., Gauthier J.P. and Jouan B. 1998. Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia*

carotovora subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology* 104: 685-699.

Heydari, A., Khodakaramian, G. and Zafari, Doostmorad. 2012. Characterization of Pseudomonas viridiflava Causing Alfalfa Root Rot Disease in Hamedan Province of Iran. J Plant Pathol. Microb., 3:5, 2-5.

Hibar, K., Daami-Remadi, M., and El Mahjoub, M. 2007. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* on tomato plants in Tunisia. Tunisian Journal of Plant Protection 2: 1-5.

Hikichi Y, Saito A, Suzuki K. (1996a) Relationship between population dynamics of Pseudomonas cichorii on lettuce and disease incidence of bacterial rot of lettuce. Ann Phytopathol Soc Jpn 62: 141–146.

Hikichi Y, Saito A, Suzuki K. (1996b) Infection sites of Pseudomonas cichorii into head leaf of lettuce. Ann Phytopathol Soc Jpn 62:125–129.

Hildebrand, P.D. 1989. Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. Can. J. Plant Pathol. 11: 205-214.

Hill, D. E. 1989. Cauliflower and broccoli trials-1988. Conn. Agric. Exp. Stn. New Haven Bull. 869, pp 18.

Holmes, B., Costas, M., Ganner, M., On, S. L. W. and Stevens, M., 1994. Evaluation of biolog system for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance. Journal of Clinical Microbiology, 1970-1975.

Hosford, R.M. 1982. White blotch incited in wheat by *Bacillus megaterium* pv. *cerealis.* Phytopathology. 72: 1453-1459.

Jackman, P. J. H., 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. The Society for Applied Bacteriology, 415-429.

Jang, E. B., and Nishijima, K. A. 1990. Identification and attractancy of bacteria associated with *Dacus dorsalis* (*Diptera*, *Tephritidae*). Environ. Entomol. 19:1726-1731.

Jinhua, L., Zhaoxiang, C., Hetong, Y., Guoquan, L.and Di, W. 2007. First report of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* as a cause of soft rot of potato in China. Australasian Plant Disease Notes, 2:1, p.71-73.

Jinping, W., Zili, D., Ying, D. and Zhongli, H. 2011. First report on *Enterobacter* sp. causing soft rot of *Amorphophallus konjac* in China. Journal of General Plant Patholohy. 77:5, 312-314.

Kang, H.W., Kwon, S.W. and Go, S.J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. Plant pathol 52: 127-133.

Kararah M.A., Barakat F.M., Mikhail M.S. and Fouly H.M. 1985. Pathophysiology in garlic cloves inoculated with *Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, and Erwinia carotovora*. Egyptian J. Phytopathol., 17(2):131-140.

Kersters, K., 1985. Numerical methods in the classification of bacteria protein electrophoresis. Society for General Microbiology, 337-368.

Kılıç, M. 2011. Süs Bitkilerinde Yumuşak Çürüklük Etmeni *Erwinia* Türleri ve Alttürlerinin Moleküler Tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö. 2011. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda/ tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler. Erciyes Ün. Fen Bil. Enst. Derg., 27(1): 62-74.

Kim, H.J., Joen, Y.H., Kim, S.G. and Kim, Y.H. 2007. First Report on Bacterial Soft Rot of Graft-cactus *Chamaecereus silvestrii* Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Korea. The Plant Pathology Journal, 23:4, 314-317.

Kimura M (1980). "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". Journal of Molecular Evolution 16:2, 111–120.

Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D. C., 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademıaı Kıado, Budapest, p547.

Konopka, A., Oliver, L. and Turco, R. F., 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. Microbial Ecology, 35, 103-115.

Kotan, R. 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen patojen ve saprofitik bakteriyel organizmaların klasik ve moleküler metodlar ile tanısı ve biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı.

Kotan, R., Karagöz, K. ve Şahin, F. 2009. *Erwinia amylovora* Strainlerinin Streptomisin Sülfata Karşı Duyarlılıkları ve Strainlerin Yağ Asidi Metil Esterleri ile Antibiyotiğe Duyarlılıkları Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi. Atatürk Üniv. Ziraat Fak.Derg. 40:1, 1-7.

Krejzar, V., Mertelik, J., Pankova, I., Kloudova, K. and Kudela, V. 2008. Pseudomonas marginalis Associated with Soft Rot of Zantedeschia spp. Plant Protect Sci., 44:3, 85-90.

Laurila J, Hannukkala A, Nykyri J, Pasanen M, Hélias V, Garlant L, Pirhonen M, 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. European Journal of Plant Pathology**,** 126, 249-62.

Leary, J.V. and Chun, W.W.C. 1989. Pathonegicity of *Bacillus circulans* to seedlings of date palm (*Phoenix dactylifera*). Plant Disease 73: 353-354.

Lelliott RA, Billing E, Hayward AC 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. J Appl Microbiol 29: 470–489.

Lelliott, R.A.; Dickey, R.S. 1984. Genus VII. *Erwinia*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, pp. 469-476. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Lelliott, R. A. and Stead D. E., 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blacwell Scientific Publications. p216.

Letoffe, S., Delepelaire, P. and Wandersman, C. 1990. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion func-tions are analogous to those of Escherichia coli a-haemolysin. EMBO J, 9, 1375-1382.

Lin, B.R., Shen,H.F., Pu, X.M. and Tian, X.S. 2010. First Report of a Soft Rot of Banana in Mainland China Caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*). Plant Disease, 94:5, 640.

Lindeberg, M., Salmond, G.P., Collmer, A., 1996. Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* out genes with *Erwinia carotovora* out homologues reveals OutC ve OutD as cveidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. Mol. Microbiol. 20: 175–190.

Lupski, J.R. and Wolfenbarger, L.L. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes, J. of Bacteriol, 174, 4525-4529.

Maisuria, V.B. and Nerurkar, A.S. 2012. Characterisation and differantiation of soft rot causing Pectobacterium carotovorum of Indian origin. Eur. J. Plant Pathol. 136:1, pp, 87-102.

Maki-Valkama T., Karjalainen R., 1994. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. Annals of Applied Biology 125: 301-309.

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G. and Foster, G.D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13:6, 614-629.

Marchini, D., Rosetto, M., Dallai, R., and Marri, L. 2002. Bacteria associated with the oesophageal bulb of the medfly *Ceratitis capitata* (*Diptera*:*Tephritidae*). Curr. Microbiol. 44:120-124.

Marits, R., Koiv, V., Laasik, E. and Mae, A. 1999. Isolation of an extracellular protease gene of Erwinia carotovora subsp. carotovora strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. Microbiology 145, 1959-1966.

Marquez-Villavicencio MDP, Groves RL, Charkowski AO. (2011) Soft rot disease severity is affected by potato physiology and Pectobacterium taxa. Plant Dis 95:232–241.

Masyahit, M., Sıjam, K., Awang, Yahya. and Mohd Satar, M. G. 2009. First Report on Bacterial Soft Rot Disease on Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) Caused by *Enterobacter cloacae* in Peninsular Malaysia. International Journal of Agriculture and Biology, 11, 659-666.

Michael, M., James, W. B., Virginia, K. Q. and James, C. M., 1993. Evaluation of biology for identification of members of the family Micrococcaceae. Journal of Clinical Microbiology, 67, 3170-3173.

Mikicinski A., Sobiczewski P., Sulikowska M., Pulawska J. and Treder J., 2010. Pectolytic bacteria associated with soft rot of calla lily (Zantedeschia spp.) tubers. Journal of Phytopathology 158: 201-209.

Miller, I., and Berger, T., 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett-Packard Gas Chromatography Application Note, Hewlett-Packard Co., Alto, CA., 228-238.

Miller, S. A. and Joaquim, T. R., 1993. Diagnostic techniques for plant pathogens. Biotechnology in Plant Disease Control, 17, 321-339.

Miller, S. A. and Martin, R. R., 1988. Molecular Diagnosis of plant disease. Phytopathology, 26, 409-432.

Mirik M., Y. Aysan, F. Sahin, 2011. Characterization of *Pseudomonas cichorii* isolated from different hosts in Turkey. International Journal of Agriculture and Biology 13 (2) 203-209.

Mirik M., Y. Aysan, F. Sahin, 2011. Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from several host plants in Turkey and report of Fontanesia as a new host. Journal of Plant Pathology, 93:2, s, 1-8.

Mirik M. ve Y. Aysan. 2011. Marmara Bölgesinde Zeytin Dal Kanseri Hastalığının Yaygınlığı ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi, 17, 279-290.

Murdoch, C. W., and Campana, R. J. 1983. Bacterial species associated with wetwood of elm. Phytopathology 73:1270-1273.

Nassar A., Darrasse A., Lemattre M., Kotoujansky C.D., Vedel R. and Bertheau Y. 1996. Characterisation of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCRamplified fragments of pel genes. Applied and Environmental Microbiology 62: 2228-2235.

Nazerian, E., Sijam, K., Abidin, Z., Ahmad, M. and Keshavarz, K. 2011. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* causing a new soft rot disease on okra in Malaysia. J Gen Plant Pathol, 77:292–294.

Ngadze, E., Brady, C.L., Coutinho, T. A. and van der Waals, J. E. 2012. European Journal of Plant Pathology, 134:533–549.

Nishijima, K. A., Couey, H. M., and Alvarez, A. M. 1987. Internal yellowing, a bacterial disease of papaya fruits caused by *Enterobacter cloacae*. Plant Dis. 71:1029-1034.

Norman,D. J.J., Yuen,M.F., Resendiz, R. and Boswell,J. 2003. Characterization Of *Erwinia* Populations From Nursery Retention Ponds And Lakes Infecting Ornamental Plants İn Florida. Plant Disease, 87:2, 193-196.

Oguntuyo, O.O. Studies of microbial spoilage of onions (Allium cepa L). PhD thesis. University of Lagos. Lagos.1981.

Oka, N., HarteL, P. G., Finlay-Moore, O., Gagliardi, J., Zuberer, D.A., Fuhrmann, J.J., Angle, J.S. and Skipper, H.D. 2000. Misidentification of soil bacteria by fatty acid methyl ester (FAME) and BIOLOG analyses. Biology and Fertility of Soils, Volume 32, Issue 3, pp 256-258.

Öden, S. 1991. İzmir ve İstanbul illerinde önemli süs bitkilerinde görülen bakteriyel hastalıklar ve etmenlerin saptanması üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı – Doktora Tezi, İzmir, 88s.

Pace, N. 1995. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. Science, 276:5313, 734-740.

Palacio-Bielsa J, Cambra MA, Lopez MM, 2006. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. Annals of Applied Biology. 148, 157-164.

Palleroni N.J. 1984. Pseudomonads. In: Krieg NR, ed. Bergey's manual of systematic Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins. pp 141–199.

Panagiotis, F.S., Emmanouil, A.T., Evaggelia, M., Filippos, V. and Dimitrios, E.G. 2012. Pseudomonas viridiflava, a Multi Host Plant Pathogen with Significant Genetic Variation at the Molecular Level.PLoS ONE 7:4, e36090.

Pauwelyn, E., Vanhouteghem, K., Cottyn. B., De Vos, P., Maes, M., Bleyaert, P and Höfte, M. 2011. Epidemiology of Pseudomonas cichorii, the Cause of Lettuce Midrib Rot. Journal of Phytopathology. 159: 298-305.

Perombelon, M.C.M. and Kelmani A. 1980. Ecology of the Soft Rot Erwinias. Ann. Rev. Phytopathol, 18, 361-387.

Perombelon MCM. 2002. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. Plant Pathol 51:1–2.

Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S.K., Khanna, M. and Lal, R. 2007. Polyphasic approach of bacterial classifification: An overview of recent advances, Indian J. of Microbiol, 47, 98-108.

Prombelon, M.C.M. and Van Der Wolf, J.M. 2002. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication No. 10 Revised Version. Scotland, UK.

Pitman, A. R., Harrow, S. A. and Visnovsky, S.B. 2010. Genetic characterisation of Pectobacterium wasabiae causing soft rot disease of potato in New Zealand. Eur J Plant Pathol. 126:423–435.

Phokum, C., Jitareeat, P., Phochananchai, S. and Cheevadhanarak, S. 2006. Detection and classification of soft rot erwinia of vegetables in Thailand by DNA polymerase chain reaction. Acta horticulturae, 712: 917-926.

Possot, O.M., Gerard-Vincent, M. and Pugsley, A.P., 1999. Membrane association and multimerization of secreton component *pulC*. J. Bacteriol., 181: 4004 – 4011.

Rademaker J. L. W. and de Bruijn F. J., 1997. Characterization and Classification of Microbes by rep-PCR Genomic Fingerprinting and Computer Assisted Pattern Analysis. DNA markers: protocols, applications and overviews. *In* G Caetano-Anolle´s and P. M. Gresshoff (ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York NY; p. 151 171.

Rahman,M. M., Eaqub Ali, M., Khan, A. A., Hashim, U., Akanda, A. M. and Hakim, M. A. 2012. Characterization and identification of soft rot bacterial pathogens in Bangladeshi potatoes. African Journal of Microbiology Research, 6:7, pp. 1437-1445.

Rattanasuk, S. and Ketudat-Cairns, M. 2009. *Chryseobacterium indologenes*, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin J. of Sci and Tech 31:4, 395-399

Rezaei R and Taghavi SM 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of Iranian soft rot bacterial isolates from different hosts. Phytopathologıa Medıterranea, 49: 194-204.

Richard, C. 1984. Genus VI. *Enterobacter* Hormaeche and Edwards 1960, 72; Nom. Cons. Opin. 28, Jud. Comm. 1963, 38. Pages 465-469 in: Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Vol. I. N. R. Kreig and J. G. Holt, eds. Williams & Wilkins, Baltimore.

Ristaino, J.B., Madritch, M., Trout, C.L. and Parra, G. 1998. PCR Amplification of Ribosomal DNA for Species Identification in the Plant Pathogen Genus Phytophthora. Applied and Environmental Microbiology. pp. 948-954.

Rosen, H. R. 1922. The bacterial pathogen of corn stalk rot. Phytopathology 12:497-499.

Rossiter, M. C., Howard, D. J., and Bush, G. L. 1983. Symbiotic bacteria of *Rhagoletis pomonella*. Pages 77-84 in: Fruit Flies of Economic Importance. R. Cavalloro, ed. A. A. Balkema, Rotterdam.

Saaltink, G. J. and Kamerman, W. 1971. Begonia bertinii, a new host of *Erwinia chrysanthemi*. Neth. J. Plant Pathol. 77:25-29.

Saleh O.I. and Stead D. 2003. Bacterial soft rot disease of pea in Egypt. Integrated control in protected crops, Mediterranean climate IOBC WPRS Bulletin, 26 (10): 115-120.1-218. Editura Ceres, Bucharst, Romania.

Saleh O.I., Huang P.Y. and Huang J.S. 1997. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature peach. J. Phytopathol., 145: 447-453.

Saleh, O.I. 1995. Identification of phytopathogenic bacteria associated with post harvest disease of garlic cloves in relation to cell wall degrading enzymes. Egyptian J. Microbiol. , 30: 177-202.

Saleh, O.I. and Gabr M.R. 1989. Studies on core rot of carrot in relation to cell wall-degrading. Minia J. Agric. Res. Dev., 11, 1713 - 1722.

Salmond, GPC. 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology, 32,181–200.

Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L, 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.*, 1953) Brenner I. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55**,** 1415–27.

Santana, M.A., Rodrıguez, M., Matehus, J., Faks, J., Bocsanczy,A., Gerstl, A., Romay, G., Montılla, J., Fernande, C.E., Moreno Zambrano, N. and Marval, D. 2012. A New Bacterial Disease of Cassava in Venezuela Caused by *Enterobacter cloacae*. International Journal of Agriculture Biology. 14:2, 183-189.

Sarris, P.F., Trantas, E., Pagoulatou, M., Stavrou, D., Ververidis, F. and Goumas, D.E. 2011. First report of potato blackleg caused by biovar 3 *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Greece. New Disease Reports, 24, 21.

Sasser, M., 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis in methods in phytobacteriology (Z. Klement, K. Rudolph, and D. Sands, eds.). Akademia Kiado, Budapest, 199-204.

Saygili, H., Y. Aysan, F. Sahin, M. Mirik, and N. Ustun, 2005. Phenotypic characterization of tomato pith necrosis pathogens in Turkey. APS Annual Meeting, July 30-Agust 3, 2005, Austin, Texas, USA.

Saygılı, H., Şahin, F. And Aysan, Y. 2006. Fitobakteriyoloji. ISBN: 9944- 5882-0-2, s, 530, İzmir.

Saygılı, H., Şahin, F. ve Aysan, Y., 2008. Bitki Bakteri Hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. s, 317.

Seo, S.T., Furuya, N., Lim, C.K., Takanami, Y. and Tsuchiya, K. 2003. Phenotypic and genetic characterisation of *Erwinia carotovora* from mulberry (*Morus* spp.). Plant Pathology, 52, 140-156.

Schochetman G, Ou C-Y, Jones WK. 1988. Polymerase chain reaction. J Infect Dis;158:1154-7.

Schroeder, B.K. 2010. Evaluation of Onion Cultivars for Resistance to *Enterobacter cloacae* in Storage. Plant Dis. 94: 236-243.

Scortichini, M., Janse, J. D., Rossi, M. P. and Derks, J. H. J., 1996. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* strains from different host by pathogenicity test and analysis of whole-cell fatty acids and whole-cell proteins. Journal of Phytopathology, 144, 69-74.

Skerman, V. B. D., McGowan, V. and Sneath, P. H. A. 1980**.** Approved lists of bacterial names. Int J Syst Bacteriol., 30, 225–420.

Slawiak M, Beckhoven JRCMv, Speksnijder AGCL, Czajkowski R, Grabe G and Wolf JMvd, 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 Dickeya spp. strains isolated from potato in Europe. European Journal of Plant Pathology. 125, 2, 245-261.

Sledz W., Jafra S., Waleron M., Lojkowska E., 2000. Genetic diversity of *Erwinia carotovora* strains isolated from infected plants grown in Poland. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 30: 403-407.

Stead, D.E.; Sellwood, J.E.; Wilson, J.; Viney, I. (1992). Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. J. Appl. Bacteriol., 72(4), 315-321.

Suparyono; Pataky, J.K. 1989. Influence of host resistance and growth stage at the time of inoculation on Stewart's wilt and Goss' wilt development and sweetcorn hybrid yield. Plant Disease 73, 339-345. Disease 73, 339-345.

Şahin, F., 1999. Mikroorganizmaların yağ asitleri profillerine göre tanısı (Microbial Identification System). Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu. Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 66, Erzurum-Türkiye.

Sahin, F., Abbasi, P. A., Lewis, I. M. L., Zhang, J. and Miller, S. A., 2003. Diversity Among Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* from lettuce. Phytopathology, 93, 64-70.

Tavasoli, E., Marafat, A. R. and Hassazadah, N. 2011. Identity and genetic diversity of pectobacterium spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan,Iran. Africa journal of plant science, 5:6, 329-336.

Toth I.K., Bertheau Y., Hyman L.J., Laplaze L., López M.M., McNicol J., Niepold F., Persson P., Salmond G.P.C., Sletten A., Van der Wolf J.M. and Pérombelon M.C.M. 1999. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Journal of Applied Microbiology 87: 158-166.

Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Helias, V., Pirhonen, M., Tsror, L. and Elphinstone, J.G. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathology, 60:3,385-399.

Türkmenoğlu, Z., Gündoğdu, M. ve Kaya, S. 1975. Enginar Çiçek Tomurcuklarında Zarar Yapan Siyah Çürüklük [*Erwinia caratovora* Holland] Üzerinde Çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 15:1, 43-57.

Vancanneyt, M., Segers, P., Hauben,L., Hommez, J., Devrıese, L. A. Hoste, B., Vandamme, P. and Kersters, K. 1994. *Flavobacterium meningosepticum*, a Pathogen in Birds. Journal of Clinical Microbiology, 32:10, 2398-2403.

Vancanneyt, M., Torck, U., Dewettinck, D., Vaerewijck, M., and Kersters, K. (1996) Grouping of pseudomonads by SDS-PAGE of whole-cell proteins. Syst. Appl. Microbiol. 19: 556 – 568.

Van Der Merve, J. J. 2009. Etiology of Soft Rot and Blackleg on Potatoes in South Africa. MS Thesis, University of Pretoria, Pretoria.

Van der Merwe JJ, Coutinho TA, Korsten L, van der Waals JE. 2010. Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis causing blackleg on potatoes in South Africa. Eur J Plant Pathol 126:175– 185.

Van der Wolf J.M., Van Beckhoven J.M., De Vries P.M. and Van Vuurde J.L. 1996. Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensivity on a crystal violet pectate medium or by PCR. Journal of Applied Bacteriology 80: 487-495.

Van Hall, C.J.J. 1902. *Bijdragen tot de kennis der Bakterieele Plantenzeikten.* Coöperatieve Drukkerij-vereeniging "Plantijn", Inaugural dissertation. Amsterdam, The Netherlands.

Venkateswaran, K., Satomi, M., Chung, S., Kern, R., Koukol, R., Basic, C. and White, D. 2001. Molecular microbial diversity of a spacecraft assembly facility. Syst Appl Microbiol 24, 311–320.

Van Vaerenbergh J, Baeyen S, De Vos P, Maes M (2012) Sequence Diversity in the *Dickeya fliC* Gene: Phylogeny of the *Dickeya* Genus and TaqMan® PCR for *'D. solani'*, New Biovar 3 Variant on Potato in Europe. PLoS ONE 7(5): e 35738.

Verniere, C., Pruvost, O., Civerolo, E. L., Gambin, O., Jacquemound-Collet, J. P. and Luisetti, J., 1993. Evaluation of the biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic vatiation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri,* Applied and Environmental Microbiology, 243-249.

Wang, G.F., Xie, G.L., Zhu, B., Huang, J.S., Liu, B., Kawicha, P., Benyon, L. and Duan, Y.P. 2010. Identification and characterization of the Enterobacter complex causing mulberry (*Morus alba*) wilt disease in China. Eur. J. Plant Pathol. 126:465–478.

Wells, G. L., Rydell, S. M., & Seelau, E. P. (1993). On the selection of distractors for eyewitness lineups. Journal of Applied Psychology, 78, 835–844.

Wilson, K., 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. Current Protocols in Molecular Biology, 2.4.1-2.4.5.

Wimalajeewa, D. L. S., Hallam, N. D., Hayward, A. C. and Price, T.V. 1987. The etiology of head rot disease of broccoli. Aust. J. Agric. Res. 38: 735-742.

Woese, C.R., E. Stackebrandt, T.J. Macke and G.E. Fox, 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. Syst. Appl. Microbiol., 6: 143-151.

Yahiaoui R., Jouan B., Andrivon D., 2003. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. Plant Pathology 52: 28-40.

Yong-Ki, K., Seung-Don, L., Chung-Sik, C., Sang-Bum, L. and Sang-Yeob L. 2002. Soft Rot of Onion Bulbs Caused by *Pseudomonas marginalis* Under Low Temperature Storage. Plant Pathol. J. 18(4) : 199-203.

Yahiaoui-Zaidi, R. Jouan, B. and Andrivon, D. 2003.Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. 52:1, 28-40.

Zhang, Y. and Geider, K., 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed-field gel electrophoresis. Applied and Enviromental Microbiology, 63, 4421-4426.

ÖZGEÇMİŞ

1980 Yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 1998 yılında Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı. 2002 yılında aynı fakülteden mezun oldu ve aynı tarihte Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalın'da yüksek lisanas eğitimine başladı. 2007 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak aynı bölümde doktoraya başladı. 2010 yılında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Halen aynı birimdeki görevine devam etmektedir.