



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI İLLERDE FASULYEDE BAKTERİLERİN  
NEDEN OLDUĞU HASTALIK ETMENLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**FATİH TEKİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2019**

**T.C.**  
**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI İLLERDE FASULYEDE BAKTERİLERİN**  
**NEDEN OLDUĞU HASTALIK ETMENLERİNİN**  
**BELİRLENMESİ**

**FATİH TEKİN**

**Bu tez,**  
**Bitki Koruma Anabilim Dalında**  
**YÜKSEK LİSANS**  
**derecesi için hazırlanmıştır.**

**KAHRAMANMARAŞ 2019**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Fatih TEKİN tarafından hazırlanan “BAZI İLLERDE FASULYEDE BAKTERİLERİN NEDEN OLDUĞU HASTALIK ETMENLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı bu tez, jürimiz tarafından 26/07/2019 tarihinde oy birliği ile Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KÜSEK (DANIŞMAN) .....

Bitki Koruma.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mikail ÖZCAN (ÜYE) .....

Su Ürünleri

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi İdris BEKTAŞ (ÜYE) .....

Amasya Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof.Dr. Mustafa YAZICI .....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Fatih TEKİN



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

**BAZI İLLERDE FASULYEDE BAKTERİLERİN NEDEN OLDUĞU HASTALIK  
ETMENLERİNİN BELİRLENMESİ  
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**FATİH TEKİN**

**ÖZET**

Fasulye tarımı yapılan arazilerde, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al. (*Xap*) ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye & Wilkie (*Psp*) ekonomik anlamda büyük bir sorun teşkil etmektedir. Bu amaçla Türkiye'nin 3 farklı bölgesini içeren 8 farklı şehirden 20 farklı lokasyondan arazi çalışması yapılarak hastalıklı bitki dokularından örnekler alınmış ve laboratuvar koşullarında bu bitkilerden bakteriyel izolasyon yapılmıştır. İzolatların biyokimyasal teşhisi için Sakkaroz Nutrient Agar, King B, Nutrient Agar besiyerlerindeki gelişimlerine ve levan oluşumuna bakılmış, tütünde hypersensitif reaksiyonlarına, oksidaz ve katalaz testi sonuçlarına, potasyum hidroksit testinde mukus yapısına, pektolitik aktivite testinde çürüme olup olmadığına, litmus milk testinde alkalın veya asidik durumlarına, oksidatif ya da fermantatif durumlarına, nişasta hidrolizasyonu sonuçlarına, patojenite testine bakılmıştır. Bu testlerin sonucunda izolatların tamamının fasulyede patojen olduğu tespit edilmiştir. Morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testlerin yanı sıra izolatların tür tanısı MALDI-TOF MS Biotyper otomatik tanılama sistemiyle de yapılmıştır. Tanılama sistemine göre 23 izolattan 13 tanesi *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (%56), 10 tanesi de *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola* (%44) olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fasulye, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, Tanılama, MALDI-TOF MS

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı, Temmuz / 2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KÜSEK

Sayfa sayısı: 41

**DETERMINATION OF THE DISEASES CAUSED BY BACTERIA IN BEANS IN  
SOME PROVINCES  
(M.Sc. THESIS)**

**FATİH TEKİN**

**ABSTRACT**

In bean cultivation, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al. (Xap) and *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye & Wilkie (Psp) poses a major economic problem. To this end, Turkey's third contains the different regions of tissue samples from diseased plants from the field work done in 20 different locations in 8 different bacterial isolation was carried out under laboratory conditions and were taken from these plants. For biochemical identification of isolates, Saccharose Nutrient Agar, King B, development of nutrient agar media and levan formation were examined. , oxidative or fermentative states, starch hydrolyzation results, pathogenicity reactions were examined. As a result of these tests, all isolates were found to be pathogenic in beans. In addition to morphological, biological and chemical tests, species identification of the strain was made with MALDI-TOF MS Biotyper automatic identification system. According to the diagnostic system, 23 strain were identified as 13 of them *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (56%), 10 of them *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (44%).

**Keywords:** Bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, Identification, MALDI-TOF MS

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Agriculture, July / 2019

Supervisor Dr.Lecturer Mustafa KÜSEK

Page Number: 41

## TEŞEKKÜR

Bu çalıŐmayı yaparken desteęini esirgemeyen ve her tŰrlŰ imkânı saęlayan danıŐman hocam Sayın Dr.Őęr. Űyesi Mustafa KŰSEK'eve yine çalıŐmamın birçok aŐamasında bana desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. M. Erhan GÖRE ve Sayın Doç. Dr. Göksele ÖZER'e, yine bu çalıŐma içerisinde maddi manevi desteęini hiçbir zaman benden esirgemeyen deęerli hocam Sayın Prof. Dr. Vahdettin ÇİFTÇİ'ye teŐekkŰrlerimi borç bilirim. Ayrıca çalıŐmamın baŐından sonuna kadar hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan deęerli aileme, eŐime çok teŐekkŰr ederim. Zor anlarımda moral kaynaęım olan minik oęlum'a da sevgilerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	6
2.1. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> ( <i>Psp</i> ) ile ilgili yapılan çalışmalar .....	6
2.2. <i>Xanthomonas axanopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> ( <i>Xap</i> ) ile ilgili yapılan çalışmalar .....	10
2.3. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) ile İlgili Yapılan Çalışmalar .....	13
3. MATERYAL VE METOD .....	15
3.1. Materyal .....	15
3.2. Metod .....	15
3.2.1. Bakterilerin izolasyonu .....	15
3.2.2. Fasulye ve Tütün bitkilerinin yetiştirilmesi .....	16
3.2.3. Fasulye Bakteriye Yanıklık ve Hale Yanıklığı etmenlerinin tanısı .....	16
3.2.3.1. SNA besiyerinde gelişim .....	16
3.2.3.2. Nutrient Agar besiyerinde gelişim .....	16
3.2.3.3. King B besiyerinde gelişim .....	17
3.2.3.4. Potasyum Hidroksit (KOH) testi .....	17
3.2.3.5. Oksidaz testi .....	17
3.2.3.6. Oksidatif/ Fermantatif (O/F) testi .....	17
3.2.3.7. Nişasta Hidrolizasyonu .....	18
3.2.3.8. Katalaz testi .....	18
3.2.3.9. Pektolitik Aktivite testi .....	18
3.2.3.10. Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyon testi .....	18
3.2.3.11. Patojenite testi .....	19



3.2.3.12. Litmus Milk testi .....	19
3.2.3.13. Maldi-TOF MS tanılama sistemiyle tanılama.....	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
4.1. <i>Psp</i> ve <i>Xap</i> etmenlerinin izolasyonu .....	20
4.2. <i>Psp</i> ve <i>Xap</i> etmenlerinin klasik metotlarla tanılanması .....	21
4.2.1. NA besiyerinde gelişim .....	21
4.2.2. SNA besiyerinde gelişim .....	21
4.2.3. King B besiyerinde gelişim.....	23
4.2.4. KOH testi .....	23
4.2.5. Oksidaz testi.....	24
4.2.6. O/F testi.....	24
4.2.7. Nişasta Hidrolizasyonu .....	25
4.2.8. Katalaz testi.....	25
4.2.9. Pektolitik Aktivite testi .....	26
4.2.10. Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyon testi .....	26
4.2.11. Patojenite testi .....	27
4.2.12. Litmus Milk testi .....	28
4.2.13. Maldi-TOF tanılama sistemi sonuçları .....	28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	30
KAYNAKLAR.....	32
EK 1. Besiyerlerinin İçerikleri.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	40

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.1. Kuru fasulye üreten önemli ülkelerdeki dünya üretim miktarı (FAO, 2017). ....	2
Şekil 1.2. Kuru fasulye üreten önemli ülkelerdeki dünya ekim alanı oranı (FAO, 2017). ....	2
Şekil 1.3. Taze fasulye üreten önemli ülkelerdeki dünya üretim alanı (FAO, 2017). ....	3
Şekil 1.4. Taze fasulye üreten önemli ülkelerdeki dünya üretim miktarı(FAO, 2017). ....	3
Şekil 4.1. <i>Xap</i> 'ın fasulye baklasında oluşturduğu kahverengi, içe çökük lekeler.....	20
Şekil 4.2. <i>Xap</i> 'ın fasulye yapraklarında oluşturduğu klorozlar .....	21
Şekil 4.3. SNA besiyerinde ft35 no'lu izolat'ın krem rengindeki gelişimi ve levan oluşturan kolonileri .....	22
Şekil 4.4. ft10 no'lu izolatin SNA besiyerinde oluşturduğu sarı renkli ve levan oluştururan kolonileri .....	23
Şekil 4.5. KOH testinde negatif sonuç veren ft15 no'lu izolatin ipliğimsi şekilde sünmesi	24
Şekil 4.6. Oksidaz pozitif (+) sonuç veren mor renk oluştururan ft51 no'lu(A) ve negatif (-) sonuç veren mor renk oluşturmayan ft26 no'lu (B) izolatlar .....	24
Şekil 4.7. Nişastayı hidrolize eden ft25 no'lu (A) pozitif (+)izolat ve edemeyen ft33 no'lu (B) negatif (-) sonuç veren izolat.....	25
Şekil 4.8. Katalaz reaksiyonu sonucunda pozitif reaksiyon gösteren ft36 no'lu izolat .....	26
Şekil 4.9. Pektolitik aktivite testi sonucunda pozitif (+) sonuç verenft38 no'lu izolat (A) ve negatif (-) sonuç verenft 67 no'lu izolat (B).....	26
Şekil 4.10. Tütün'de hipersensitif reaksiyonda pozitif (+) sonuç veren ft29 no'lu izolat (A) ve negatif (-) sonuç veren ft69 ve ft70 no'lu (B ve C) izolatlar.....	27
Şekil 4.11. Patojenite testi sonucundafasulye bitkisinde gözlenen simptom.....	27

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 4.1 İzolatların test sonuçları.....	22
Çizelge 4.2. Patojen bakteri izolatlarının Maldi_TOF MS tanı sonuçları ve benzerlik indeksi .....	29



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
g	Gram
KOH	Potasyum Hidroksit
l	Litre
Maldi-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight
ml	Mililitre
MS	Mass Spektrometrisi
NA	Nutrient Agar
O/F	Oksidatif / Fermantatif
<i>Psp</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>
pv	Pathovar
rpm	Revolutions Per Minute / Dakika Devir Sayısı
SNA	Sakkaroz Nutrient Agar
TPD	N,N,N,N-Tetramethyl-1,4 phenylene diammonium diclorid
<i>Xap</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
YDCA	Yeast Dekstrozu Klorat Agar
µl	Mikrolitre

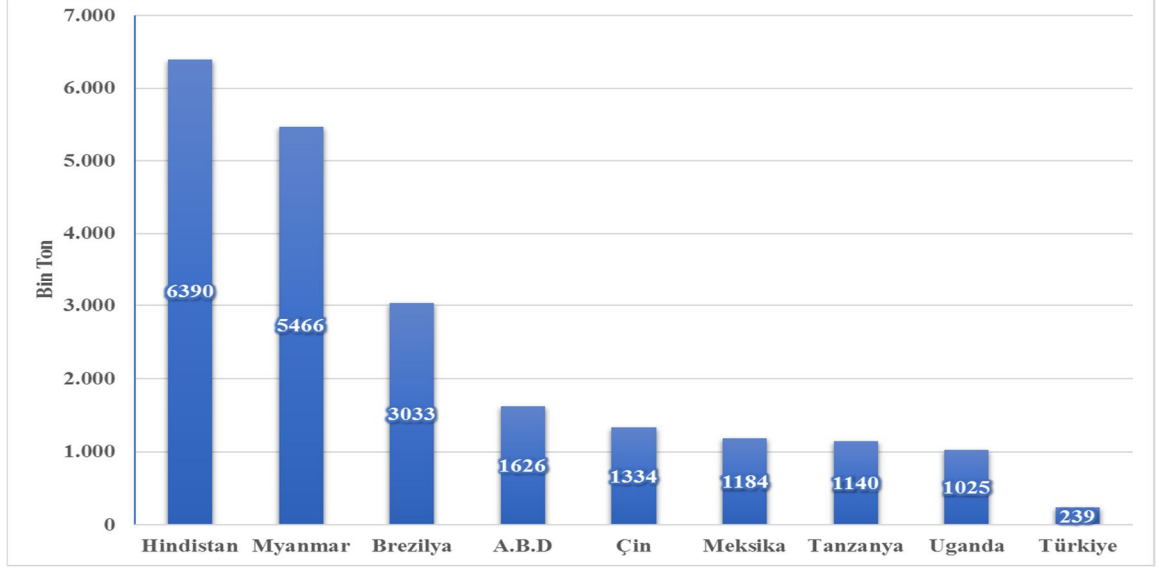
## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artmasına karşın, besin maddelerinin artışı istenilen hıza ulaşamamıştır. Pek çok ülkede açlık ve dengesiz beslenme, önemli bir sorun olup, her yıl binlerce insanın hastalanmasına ya da ölmesine neden olmaktadır. İnsanlar, protein gereksinimlerini bitkisel ya da hayvansal kaynaklı besinlerle karşılamaktadırlar (Çiftçi, 2004).

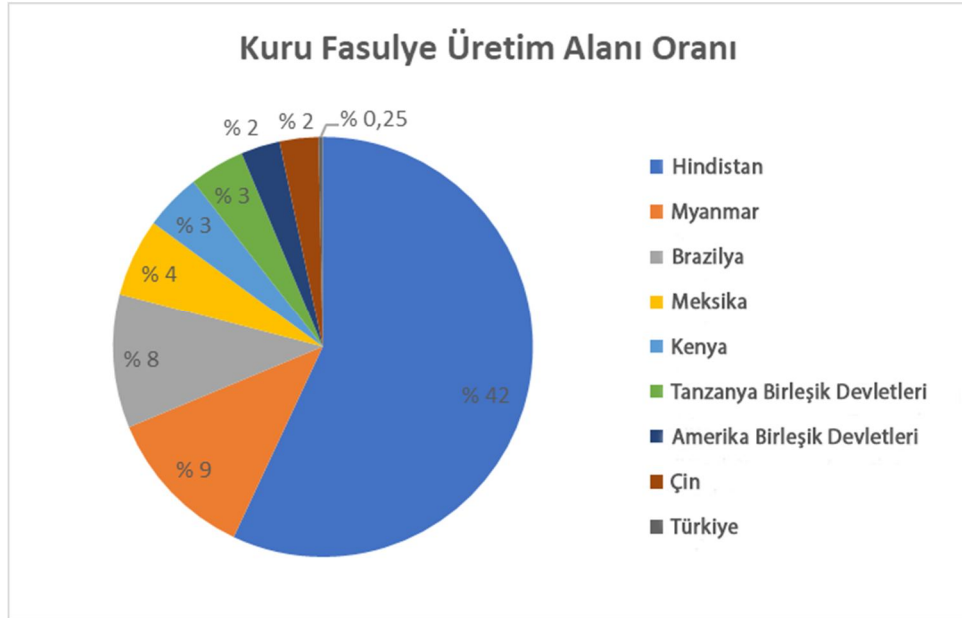
Fabaceae (Leguminaceae) familyasının bir türü olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), Güney Amerika'dan yayılarak subtropikal ve ılıman koşullara sahip birçok ülkede yetiştirilen, dünya genelinde soya fasulyesi ve yerfıstığından sonra en çok üretilen baklagil bitkisidir (Balkaya ve Yanmaz, 1999). Kuru taneye ek olarak taze sebze olarak da yaygın olarak tüketilen fasulye 38 milyon hektar ekim alanı ve 55 milyon tonluk üretimi ile yemeklik tane baklagiller içerisinde dünyada ilk sırada yer almaktadır (FAO, 2017). Kuru fasulye tarımında en geniş ekim alanına ve üretim miktarına Asya kıtası sahiptir. Fakat en yüksek tane verimi Amerika kıtasında elde edilmektedir (Aydoğan ve ark., 2015). Kuru fasulye üretim miktarı bakımından ilk sırada yaklaşık 6,5 milyon ton ile Hindistan bulunurken, Myanmar ise yaklaşık 5,5 milyon ton ile 2. sırada yer almakta ve Brezilya (3 milyon ton), ABD (1,6 milyon ton), Çin (1,3 milyon ton), Meksika (1,1 milyon ton) ise dünyadaki diğer önemli kuru fasulye üreticisi ülkeler konumundadır. Taze fasulye üretim miktarı bakımından Çin 19 milyon ton ile ilk sırada yer almakta, Endonezya (915 bin ton), Hindistan (675 bin ton), Türkiye (630 bin ton) ile ilk 4 sırada yer almaktadır (Anonymous, 2017).

Dünya üzerindeki besin kaynağı olarak tüketilen *Phaseolus*'un 30'dan fazla türünden birisi olan *Phaseolus vulgaris* L. insanlar için iyi bir protein kaynağıdır (Broughton ve ark., 2003). *Phaseolus vulgaris* L. Antartika hariç tüm kıtalarda yetişmekte ve *Phaseolus* ekim alanlarının %90'ından fazlasını kaplamaktadır (Singh, 1999). Fasulyenin önemli özelliklerinden bir diğeri ise toprakta bulunan *Rhizobium* bakterileri ile ortak yaşamak suretiyle atmosferde %78 oranında bulunan moleküler azotu toprağa bağlamalarıdır. Bu durum azotlu gübre kullanımını azaltmakta ve kendinden sonra ekilecek bitkinin verimini olumlu yönde etkilemektedir. Biyolojik azot fiksasyonu ile toprağa yıllık 139–170 milyon ton saf azot bağlanmaktadır. Bu miktar ticari olarak üretilen (65 milyon ton) azotla karşılaştırıldığında bunun iki katına denk gelmektedir (Kendi, 2009).

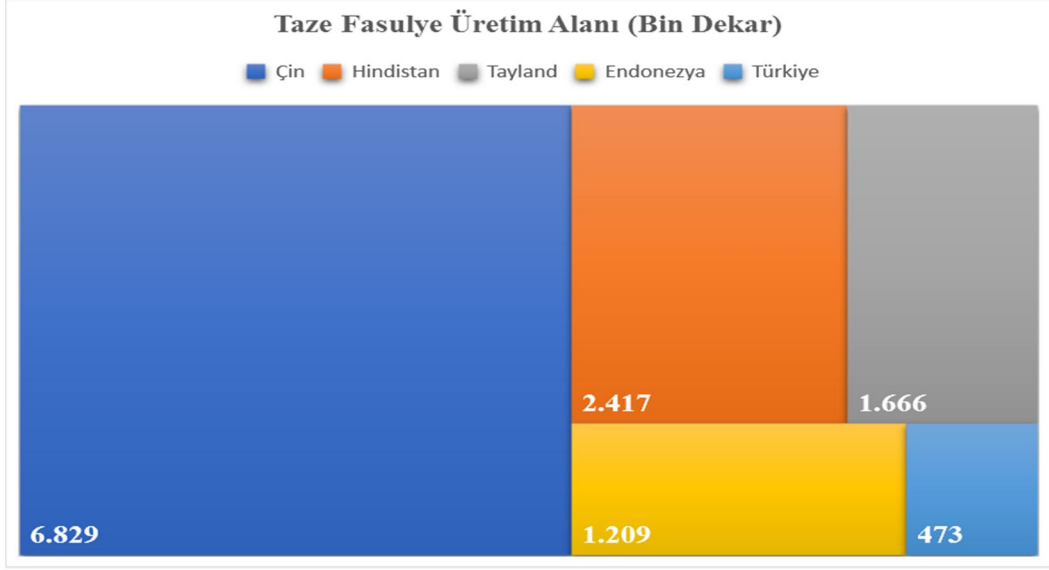
TUİK (2017) verilerine göre, Türkiye’de 2016 yılında kuru fasulye ekili alan 898.197 dekar, taze fasulye ekili alan ise 495.639 dekadır. Bu ekim alanlarından ise 235.000 ton kuru fasulye, 638.532 ton taze fasulye üretimi yapılmıştır. Şekil .1.1; 1.2; 1.3; 1.4’de dünyada en fazla fasulye üretimi yapan ülkeler ve ülkemizin durumu görülmektedir.



Şekil 1.1. Kuru fasulye üreten önemli ülkelerdeki dünya üretim miktarı (FAO, 2017).



Şekil 1.2. Kuru fasulye üreten önemli ülkelerdeki dünya ekim alanı oranı (FAO, 2017).



Şekil 1.3. Taze fasulye üreten önemli ülkelerdeki dünya üretim alanı (FAO, 2017).



Şekil 1.4. Taze fasulye üreten önemli ülkelerdeki dünya üretim miktarı(FAO, 2017).

Fasulye bitkisi yetiştirme periyodu boyunca üretim alanlarında birçok fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerinin saldırısına maruz kalmaktadır. Bu etmenler fasülyede verim, kalite ve pazar değeri düşüşüne yol açmaktadır.

Fasulyelerde görülen bakteriyel hastalık etmenleri ilk olarak tohum kaynaklı olarak ortaya çıkmakta, önemli verim ve kalite kaybına sebep olmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden en yaygın olanları *Psp* ve *Xap*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'dir (Borkar ve Yumlembam, 2016; Kendi, 2009).

*Psp* (Hale yanıklığı) etmeninin belirtileri enfekteli yapraklarda ve fasulye kapsüllerinde görülebilir. Enfeksiyonun ilk belirtileri, yapraklar üzerinde su emmiş leke şeklinde göze çarpan küçük lekelerdir. Kurak koşullar altında enfekteli doku ölür ve yanık renginde nekrotikleşme gözlenir. Bakteriyel yanıklığa karakterize olan dar sınırlarla çevrili parlak sarı lezyonların aksine hale yanıklığında geniş sarımsı yeşil hale oluşumu ve daha sonra nekrotik lekeler gözlenir (Borkar ve Yumlembam, 2016).

Hale yanıklığı etmeni serin havalarda ve nemli ortamlarda ve yaralanmış bitkilerde daha fazla ortaya çıkmaktadır. Patojen, ya enfekteli bitki artıklarında canlı kalmakta ya da tohumda canlılığını sürdürmektedir. Tohumla taşınabilen bu hastalık uygun epidemi koşullarında ve hassas çeşitlerin ekildiği bölgelerde %100'e varan ürün kaybına neden olmaktadır (Kendi, 2009).

*Xanthomonas*, patovar düzeyinde dar bir konukçu yelpazesi ile karakterize edilen çeşitli fitopatogenik türler içeren bir cinstir. Bununla birlikte, bu cinsin üyeleri, monokotiledon ve dikotiledon bitki türleri arasında geniş yelpazede çok çeşitli bitkileri enfekte edebilir (Denardin ve Agostini, 2013). *Xap* dünya çapında fasulyenin en önemli hastalıkları arasında yer almaktadır (Freytag ve ark., 1982; McElroy, 1985; Parker, 1985; Scott ve Michaels, 1992; Park ve Dhanvantari, 1994).

*Xap*, tohumda, enfekteli bitki artıklarında ve konukçu ve konukçu olmayan bitkilerde epifitik olarak canlılığını sürdürebilir (Saettler, 1991). Tohumla uzun mesafeye taşınması, patojenin yaşamını devam ettirmesinde önemli rol oynar (Trujillo ve Saettler, 1979). Çiçek tomurcukları ve genç baklaların enfeksiyonu, patojenin vasküler sistemden tohuma aktarılmasıyla sonuçlanabilir ve bu da iç enfeksiyona yol açar (Aggour ve ark., 1989). Enfekteli tohumdan yetiştirilen bitkiler, daha sonra ikincil enfeksiyonun yayılması için inokulum kaynağı oluşturur. Ayrıca tohum, hasat sırasında enfeksiyona uğrayabilir.

Hastalık belirtileri öncelikle yapraklarda su emmiş görünümünde başlar, sonra genişleyen bu su emmiş belirtiler yaprak yüzeyini kaplar ve nekrotik lekeler dönüşür. Bu lekelerin etrafında dar alanla sınırlı ince limoni sarı hale oluşumu gözlenir. *Psp* belirtilerine göre daha düzensiz, parçalı ve büyük yapıdadır. Bu belirtiler damar aralarında ve yaprak kenarlarında gözlenir. Büyüyen bu lekeler birleşerek yaprak yanıklığını meydana getirir. Meyvelerde, hafif çökük, dairesel şeklinde gelişen



simptomların etrafında kırmızımsı kahverengi sınır gözlenir. Yüksek nemli koşullarda lezyonlar açık sarı bir bakteriyel akıntıyla kaplanmaktadır (Soylu ve ark., 2013a).

Fitopatojen bakterilerin morfolojik olarak tanılanması oldukça zordur. Bu yüzden bakterilerin tanımlanabilmesi için biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi çok önem arz etmektedir. Biyokimyasal özelliklerine bakılarak birçok tür ve cins düzeyinde bakteri tanımlanabilmektedir (Saygılı ve ark., 2006).

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı şehirlerinden (Çanakkale, Bursa, Bilecik, Ankara, Konya, Karaman) *Psp* ve *Xap* etmenlerinin oluşturduğu simptomlara benzeyen hastalıklı bitki dokularından örnekler alınmış ve laboratuvar koşullarında bu bitkilerden bakteri izolasyonu yapılmıştır. Patojenlerin teşhisi için morfolojik, biyolojik, kimyasal testlerin yanısıra MALDI-TOF MS Biotyper otomatik tanılama sistemiyle tanıları yapılmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Psp*) ile ilgili yapılan çalışmalar

Gordon ve McLeod bazı bakteri gruplarını oksidaz pozitif olarak tespit etmiştir. Fakat Kovacs oksidaz reaksiyonunun duyarlılığını arttırarak bir petri kabına Whatman No:1 filtre kâğıdını yerleştirmiş ve kâğıdın ortasına %1'lik tetramethylparaphenylenediamine dihydrochloride solüsyonundan filtre kâğıdının ortasına 2-3 damla damlattıktan sonra teşhis etmek istediği *P. pyocyanea* izolatını platin bir çubukla almış ve bu filtre kâğıdının üzerine yaymıştır. Kovacs bu işlemleri yaptıktan sonra reaksiyon, yayılmış koloniyi 5-10sn içinde koyu mor renge döndürmüştür. Bu teknikle *P.pyocyanea* izolatı oksidaz pozitif sonuçlanmıştır. Ayrıca oksidaz reaksiyonu için hazırlanan solüsyon haftada bir hazırlanmalı ve bu bir hafta içerisinde buzdolabında koyu, cam bir damlatma şişesinde tutulmalıdır (Kovacs, 1956).

(Thornley, 1960), yaptığı bir çalışmada kovaks'ın oksidaz yöntemini kullanarak 156 *Pseudomonas* türünü oksidaz pozitif ve 188 *Achromobacter* türünü de oksidaz negatif olarak tespit etmiştir.

(Steel, 1961), çeşitli cinslerden 1660 farklı izolata oksidaz testi uygulamış ve bunların 210 tanesinde pozitif reaksiyon gözlemlerken 64 tanesinde de gecikmeli pozitif reaksiyon gözlemlenmiştir. *Pseudomonadaceae* üyeleri pozitif sonuçlanırken, *Enterobacteriaceae* üyeleri ve çoğu gram-pozitif organizmalar oksidaz negatif sonuçlanmaktadır. Kovacs oksidaz testi hassas olmasına rağmen basittir ve hızlı bir şekilde uygulanabilmektedir.

*Psp* için seçici besiyeri çalışması yapılmış, MSP ve cycloheximide, cephalixin ve borik asit eklenerek modifiye edilmiş King B (KBC) besiyerleri test edilmiştir. King B'de tespit edilemeyen patojenlerin bu seçici besiyerlerinde tespit edildiği bildirilmiştir (Mohan ve Schaad, 1987).

(Robinette ve Matthyse, 1990), *P. savastanoi*'deki aşırı duyarlılığı inhibe eden genleri incelemiş ve inhibasyon için oksin üretiminin gerekli olduğu fikrini ortaya atmıştır.

*Psp*, bakla kabuğu üzerinde su emmiş görünümde lekeler yapar. Grimsi yeşil belirtisi görülür. Bazı zamanlar bu hastalık yağlı leke olarak adlandırılır. Optimum gelişme sıcaklığı 16-20°C aralığındadır (Young ve ark., 1991).

Bir fitopatogenik bakteri olan *Psp*, iki kimyasal sistem tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) olumsuz etkilerine karşı bitkilerde çok hassastır. Konukçu bitkilerde hastalık belirtileri de ROS tarafından bastırıldığı tespit edilmiştir. Diğer birçok bitki patojeni bakterilerde (*P. syringae* pv. *lisi*, *Erwinia amylovora*, *X. campestris* pv. *pelargonii*) ve bunlara ek olarak *P. fluorescens* de ROS'un inhibe edici veya öldürücü etkisine in vitro duyarlı olmuştur. Yapılan çalışmada kullanılan  $O_2$ 'nin ve  $H_2O_2$ 'nin ROS'un mikroorganizmaları öldürücü etkisine olumlu yönde fayda sağlamasına rağmen OH'ın böyle bir etkisi olmadığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada bakteriler için tolerans artırıcı görev yapan EPS slime'lar yıkanarak temizlendiğinde ve hücreler santifüj edildiğinde bakteriler ROS'a daha hassas hale gelmiştir. Fakat EPS-Mutantlarının bu yönteme rağmen hassasiyetlerinde bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu sonuçlara göre EPS Slime'larının bakterileri dış etmenlerden koruduğu düşüncesi desteklenmektedir (Király ve ark., 1997).

(López-López ve ark., 2004), *Psp*'nin konukçuya özgü olmayan bir fazolotoksin sentezlediğini ve bu toksinin kendisine zarar vermemesi içinde fazolotoksin'e dayanıklı bir enzim olan ornitin karbamoiltransferaz enzimini (ROCT) sentezlediğini söylemiştir. ROCT'ın 18°C'de, fazolotoksin sentezi ile aynı zamanda üretilen *argK* tarafından kodlandığını belirtmiş ve bu sistemin düzenleyici mekanizmaları araştırmak için çalışmalar yapmıştır.

*Psp*'nin 1448A izolatının genom dizisiyle alakalı çalışma yapılmıştır. 365 ORF (Open Read Frame) bölgesinin *P. syringae* cinsine spesifik olduğu tespit edilmiştir (Joardar ve ark., 2005).

Hassas fasulye genotiplerinin yaprakları yaşlandıkça *Psp*'ye karşı direnç kazandığını bildirilmiştir (Sárdi ve Stefanovits-Bányai, 2006).

(Aguilera ve ark., 2007)'a göre, *Psp*, fasulyelerin hale yanıklık hastalığına sebep olan bir ajan olup, fazolotoksin olarak bilinen konukçuya özgü olmayan bir toksini salgılayarak klorotik haleyle çevrili su emmiş leke şeklindeki akıntılarla karakterizedir. Bu fitotoksin, arginin biyosentezinde yer alan ornitin karbamoyl transferaz enzimini önler. Değişik bulgular, fazolotoksin üretiminde rol alan genlerin bir arada olduğunu öne sürmektedir. Bakterinin kendi toksine karşı bağışıklığını sağlayan *argK* ve *homoargininin* sentezinde yer alan *amtA* genleri bunlardandır.

Yarı seçici besiyeri MT (Milk Tween Agar) ve MSP (Modified Sucrose Peptone Agar)'nin *Psp* izolasyonu için uygun olabildiği söylenmiştir (Balaz ve ark., 2008).

Fasulye bitkisindeki en önemli bakteriyel patojenlerin *Xap*, *Psp*, *P. syringae* pv. *syringae* ve *Curtobacterium flaccumfaciens*spv.*flaccumfaciens* olduğu bildirilmiştir (Kendi, 2009).

*Psp*'yi tanılamak için *Psp*-JHF ve *Psp*-JH-R PCR primerleri geliştirmiş ve bu primerlerin sadece *Psp*'ye ait 513 bp'lik bir bölgeyi çoğalttığı belirtilmiştir. Bu çoğaltılan bölgelerden tasarlanan iç içe geçmiş 169 bp'lik *psp*-JH-F ve *psp*-JH-R primerleriyle tanılamamın ELISA ve seçici besiyerlerine göre çok daha kesin sonuçlar verdiğini, çalışmada geliştirilen PCR testleriyle fasulye tohumlarından *Psp*'yi tespit etmenin daha kullanışlı olacağı bildirilmiştir (Cho ve ark., 2010).

*Psp* gram negatif, King B besiyerinde floresan pigment üreten, oksidaz ve arginin negatif sonuç veren LOPAT Ia grubundan bulunan bir bakteridir (Soylu ve ark., 2013b).

(Duncan ve ark., 2014), US14HBR6 benekli fasulye çeşidindeki *Psp* 'nin ırk 6'sına karşı direncin, bağımsız olarak kalıtım gösteren iki resesif gen tarafından kontrol edildiğini ifade etmiştir. Bu hale yanıklığına karşı bitkideki direnç genleri, fasulye germplazmasının ve diğer çeşitlerinin *Psp* ırk 6'ya karşı yüksek seviyelerde direnç geliştirilmesinde kullanılabileceğini belirtmiştir. Bu genler ayrıca, çeşitli *Phaseolus* germplazmından diğer ırklara spesifik direnç genleri ile kombinasyonlar yapılarak kullanılabileceğini bildirmiştir. Bilinen tüm *Psp* ırklarına karşı direnç gösteren germplazma hatları ve çeşitleri üretmek için kullanılabileceğini belirtmiştir.

*Psp* kolonileri, *Xap*'ın sarı renkli kolonilerinin aksine gümüşümsü krem rengindedir. *Psp*, oksijen gereksinimi olan (aerobik) bir bakteridir. *Psp*'ler genellikle yapay ortamda krem renginden beyaz renge kadar tanımlanabilir. Bununla birlikte, demirden yoksun kültür ortamında çözünebilir, fluoresan pigmentler de üretir. Bakterinin en fazla gelişimi ve daha önce tanımladığımız klorotik semptomlara sebep olan toksini en fazla ürettiği sıcaklık 17-20°C 'dir. Hale yanıklığı ılıman bölgelerde düşük sıcaklıkta çok yıkıcı olabilen bir hastalıktır. En fazla verim kaybını toksin üretimini arttıran sıcaklıklarda oluşturur (17-20°C). Elverişli koşullarda bitkinin vejetatif gelişmesinin başlangıcında sıklıkla görülür (Borkar ve Yumlembam, 2016).

(Borkar ve Yumlembam, 2016)'a göre haleler sıcak havalarda belirgin değildir. Bulaşma sistemik olursa, genç yapraklar kavisli ve klorotik hale gelir, nekrotik lekeler ya da geniş sarı haleli lekeler göstermez. Sıcaklık 24°C'nin üzerine çıktığında, toksin üretimi genellikle azalır ve klorotik belirtiler daha az fark edilir hale gelir. Belirtiler daha sonra kahverengi noktaya benzer şekilde görünür. Ciddi durumlarda, genel sistemik kloroz gelişebilir. Sistemik enfeksiyonlara sıkça rastlanmaz ancak bazı kuru fasulye çeşitlerinde daha kolay ortaya çıkar. Fasulye baklasındaki belirtiler, su emmiş leke şeklinde yuvarlak lekeler veya bakla dikişlerini takiben çizgiler şeklinde başlar. Bakteriyel akıntı, enfeksiyondan 7-10 gün sonra saplar, bakla veya yapraklardan ortaya çıkmaya başlar ve lezyonlar yağlı, su emmiş görünümde belirtiler ortaya çıkarır. Lezyonlar bakla kabuğu dikişlerine yayılır veya genç bakla kabuğuna enfekte olursa büzüşme ve renk değişimi görülebilir.

Enfekteli tohumlar kullanıldığında fideler hasarlı gelişir veya sürgünler tamamen ölebilir. Su emmiş lekeler şeklindeki düzensiz lekeler genellikle kotiledon yapraklarda zıt taraflarda görülür. Genç fidelerin gövde saplarındaki lezyonlar, gittikçe genişleyen su emmiş lekeler şeklinde ve zaman zaman çukurluklar oluşturarak meydana gelir. Eğer bu bitkiler ölmezse, kotiledonların koltuk altı bölümünde tomurcuklar ortaya çıkabilir ve birkaç baklalı bodur bir bitki üretebilir. Bitkiler günün sıcak dönemlerinde karakteristik bir solgunluk sergiler (Borkar ve Yumlembam, 2016).

Ekim alanındaki enfeksiyonu takiben, küçük, su emmiş leke şeklindeki alanlar yaprakta görünür, nispeten sınırlı bir limoni-sarı sınırla çevrili ve genişleyen lekeler oluşur. Bu lezyonlar daha sonra kahverengiye dönüşür, soluklaşıp nekrotikleşir ve yaprak dökümü meydana gelebilir. Hastalıklı ürün yanık görünümü alır; bu da hale yanıklığının meydana getirdiği sarı lezyonlardan bu enfeksiyonu ayırır. Sistemik enfeksiyonlarda, damarların rengi kırmızımsı kahverengiye döner ve bu damarlara bitişik dokularda su emmiş leke şeklindeki belirtiler oluşur. Yaprak dokusundaki enfeksiyonda ana damar ve üst dalları ilk başta suya batmış gibi görünür ve daha sonra tuğla kırmızısı bir renk alır. Sapların üzerindeki lezyonlar, sap boyunca uzanan kırmızımsı çizgiler olarak görülür. Sapta yüzeysel çatlaklar oluşur ve bu çatlaklardan sarı bakteriyel akıntı çıkar (Borkar ve Yumlembam, 2016).

## 2.2. *Xanthomonas axanopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) ile ilgili yapılan çalışmalar

*Xcp* izolasyonu için yapılan seçici besiyeri çalışmalarında hazırlanan MXP seçici besiyerinin *X. campestris* patovarlari için çok iyi bir ortam sağladığı ve bu seçici besiyerinde fasulyenin diğer bakteriyel patojenlerinin gelişmediğini bildirmiştir (Claflin, 1987).

*Xcp* nemli ve ılıman bölgelerde çok şiddetli olabilen etmendir. Farklı şekillerdeki su emmiş leke şeklinde hafif çökük belirti halinde görülür. Optimum gelişme sıcaklığı 25-30°C aralığındadır. Bu bakteriler yabancı otlarda, bitki artıklarında, tohum içinde veya üzerinde yaşamlarını sürdürebilir. Yağmurlama sulamayla yayılabilir (Snowdon, 1990).

*Xap*'ın bazı izolatları tarafından üretilen yayılabilir kahverengi pigmentin, önceden bildirildiği gibi tirozinaz aktivitesinden ziyade homojenik asit (2,5-dihidroksifenilasetik asit) salgılanması ve daha sonra bu asidin oksidasyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir (Goodwin ve Sopher, 1994).

*Xap* izolatlarının kesin tanısı amacıyla Audy ve ark., (1994), tarafından dizayn edilen X4c (5'-GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG -3') ve X4e (5'-CGC CCG GAA GCA CGA TCC TCG AAG -3') primerleri birçok çalışmada sıklıkla ve güvenilir bir şekilde kullanılmıştır.

Dolu veya böcek beslenmesi nedeniyle oluşan yaralar, bulaşma için uygun zemin oluşturabilir. Etmen bitki içine girdiğinde hücreler arası boşlukta hızla çoğalır ve bu ilk bulaşmayla sekonder yayılma arası 10-14 günü alabilir (Saettler, 1991). Enfeksiyonun oluşması için en uygun sıcaklık 28-32°C arasındadır (Schwartz ve ark., 2005). Genel olarak, bitkiler üreme evresinde vejetatif aşamada olduğundan daha hassas görünmektedir. Bakteri popülasyonu arttıkça yaprak yüzeyine sızabilir ve su ile daha fazla yayılabilir (Fininsa ve Tefera, 2001).

(Janse, 2005), bakteriyel simptom gözlenen materyali seçtikten sonra, materyalin dış yüzeyi kısa bir süre alkol ile dezenfekte etmiş ve daha sonra sağlıklı ve hastalıklı doku sınırındaki hastalıklı doku parçaları bistüri vb. ile keserek almıştır. Doku, saf su veya fosfat tamponlu salin içeren tüp içerisinde 30dk bekletmiş, böylece bakterilerin dokudan suya yayılmasını sağlamıştır. Daha sonra süspansiyondan 20 ile 100 µl katı ortalama yaymış, çoğu fitopatojenik bakterinin 20-27 C derece'de bol oksijenli bir atmosferde çok iyi geliştiğini belirlemiştir. 2-5 günlük inkübasyondan sonra besi ortamı üzerinde koloniler

oluşturduğunu ve patojenik olmayan bakterilerden kaçınmak için çoğu defa seçici veya yarı seçici besiyeri kullanıldığını bildirmiştir.

Popovic ve ark., (2010) doğal olarak enfekteli tohumlardan elde ettiği izolatların tanımlanmasında kullandığı X4c ve X4e primer çifti ile bütün izolatlardan tür için spesifik ürün olan 730 bp DNA fragmentini elde etmiştir.

İran'da yapılan bir çalışmada sera ve arazi koşullarında *Xap*'a karşı yapılan mücadelede *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* (*Rlp*) değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *Rlp* bir tohum uygulaması olarak kullanılmış ve hastalığın şiddeti üzerindeki etkisi bakteri uygulanmayan bitkilerle karşılaştırılmıştır. Bu bakterinin hem sera hem de arazi koşullarında, *Xap*'ın şiddetini azaltma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir (Osdaghi ve ark., 2011).

*Xap* gram negatif, amilaz pozitif, nutrient glokoz agar üzerinde mukoid koloniler oluşturan ve arabinose, cellobiose, galactose, glukoz, mannose, trehalose gibi karbonhidrat kaynaklarından asit üretebilen bir bakteridir (Soylu ve ark., 2013a).

Bulaşık tohumlar tekrar kullanılmamalıdır. Hastalıklara dayanıklı çeşitler ve sertifikalı tohumlar ekilmelidir. Ekim nöbeti yapılarak fasulye familyasına spesifik etmenlerin elemine edilmesi sağlanmalıdır. Bulaşık bitki artıkları ekim alanlarından uzak tutulmalıdır. Enfeksiyon fasulye baklalarının genç olduğu zamanda ortaya çıkarsa tohumlar çürüyebilir ve kırışıp şişkinleşebilir (Borkar ve Yumlembam, 2016).

Ana konukçu *Phaseolus vulgaris*'tir. Fakat diğer baklagil türlerini; *Phaseolus lunatus*, *Vigna aconitifolia* ve *Vulgaris radiata* da dâhil doğal olarak enfekte etmektedir. Bakteriyel patojen genellikle tohum kaynaklıdır. Tohumlar çimlenirken, bakteriler büyüyüp genişleyen kotiledonun yüzeyine bulaşır ve doğal açıklıklar, yaralar hatta vasküler sistem yoluyla yapraklara yayılır. Bakteriler, sezon boyunca yağın yağmurlarla, özellikle rüzgârın savurduğu yağmurlarla, doluyla, böceklerle, tarımsal uygulamalarla ya da insanlar tarafından diğer bitkilere yayılabilir. *Xanthomonas* bakteriler, bulaşık tohumlar ve bitki artıklarında kışlayabilir, buna ek olarak 15 yıl boyunca tohum içinde canlılığını koruyabilir (Borkar ve Yumlembam, 2016).

*Xap* yüksek nem içeren sıcaklıkları (28°C) tercih eder. Bakteriyel etmenlerin doğal hareket alanı çok sınırlıdır, yani uzak mesafelere yayılabilmesinin tek ihtimali

insanoğlunun bulaşık tohumları başka alanlara taşınmasıdır. *Xap* ve *Psp*'nin neden olduğu kayıplarda, iki etmeninde aynı bölgede aynı bitkide olması durumunda, oluşan simptome hangisinin neden olduğunu tespit etmek her zaman mümkün değildir. Ayrıca hava koşullarına bağlı olarak virülans etkisi değişiklik gösterebilir. Genel olarak, *Xap*, yüksek nem ve yağışında gerekli olduğu oldukça yüksek sıcaklıklarda (25-35°C) en virülans halini alır (Borkar ve Yumlembam, 2016).

*Xap*, *X. phaseoli* (Smith) Dowson, *X. fuscans* (Burkholder) Burkholder ve daha önceki literatürlerde de geçen ve kültürde kahverengi pigment oluşturan izolatlar verilen isim olan *X. phaseoli* var. *fuscans* (Burkholder) Starr & Burkholder olarak isimlendirilmiştir. RFLP analizlerine dayandırılarak yapılan öneriler *X.phaseoli*'nin *X.campestris* türleri arasında kalması ya da ayrılması şeklinde görüş ayrılığına yol açsa da *Xanthomonas*'ın patovaryları kapsamlı bir şekilde revize edilmiştir. (Bozkurt, 2009)'a göre, 1995 yılına kadar *X. campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye 1878 (*Xcp*), olarak isimlendirilen fasulye bakteriyel yanıklık etmeni, (Vauterin ve ark., 1995), tarafından yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarıyla *X. axonopodis*'in bir patovary olarak sınıflandırılmış ve etmen *X. axonopodis* pv. *phaseoli* olarak isimlendirilmiştir (Anonim, 2016).

*Xap*, tüm baklagil yetiştiriciliği alanlarındaki fasulye bitkilerini etkileyen en yıkıcı etmendir. Bitkinin yaprak, sap, bakla ve tohumlarında lezyonlara neden olan ciddi bir bakteri hastalığıdır. Hastalık tohum kalitesini etkilemekte ve verimi %45'e kadar azaltabilmektedir, hassas çeşitlerde bu oran daha da artabilmektedir. Bakterilerin tohum kaynaklı yapısı ve büyük miktarlarda sekonder inokulum üretme kapasitesi nedeniyle *Xap*'ın kontrol edilmesi oldukça zordur. Kimyasal tohum muamelesi ve uygun kültürel uygulamalar ile desteklenmiş dirençli çeşitlerin kullanılması, fasulye'nin bakteriyel yanıklık hastalığını yönetmede ve verim kaybını önlemede en iyi alternatif seçenekler olabilir. Entegre hastalık yönetimi tercih edilen bir stratejidir (Belete ve Baştaş, 2017).

Fasulye üretiminde çevresel koşullara ve genotipe bağlı olarak *Xap*, verimi %10 ile %45 arasında azaltmaktadır (Gillard ve ark., 2009; Belete ve Baştaş, 2017).

*Xap*, endüstriyel ölçekte fasulye yetiştiriciliğinde dünyanın çeşitli bölgelerinde tohum üretimi konusunda büyük kayıplara yol açan hastalıklardan birisi olmuştur. Kenya'da *Xap*'ın %75'e varan ürün kaybı bildirilmiştir. Bu yüzden fasulye üretimini önemli ölçüde kısıtlamaktadır (Fourie, 2002; Belete ve Baştaş, 2017).



(Baştaş ve Şahin, 2017)İç Anadolu Bölgesinde yer alan 12 ilden toplanmış Seker, Cali, Dermason, Bombay, Sira ve Battal çeşitlerinden 198 örneğin bakteriyel bulaşıklık durumlarını morfolojik ve moleküler teknikler kullanarak belirlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre tohum örneklerinin *Psp*, *Xap*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ile sırasıyla %22, %13, %11, %1,51 ve %0,5 yoğunlukta bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada *Psp* izolatların kesin tanısı için Prosen ve ark., (1993) tarafından üretilmiş HM6(5'CGTGTCCGTGGATAAAAAGC3') HM13 (5'GTTGAATTTCACTACCCG3') primer çifti ile Schaad ve ark., (1995) tarafından üretilmiş P5.1 (5'AGCTTCTCCTCAAAACACCTGC3') P3.1 (5'TGTTCCGCCAGAGGCAGTCATG3') primer çiftini kullanılmıştır.

Samsun ili fasülye ekim arazilerinden 2013-2014 yıllarında gerçekleştirilmiş olan sörveyler ile elde edilmiş *Xap* ve *Psp* izolatlarının 16S rDNA bölgelerinin sekans dataları elde edilerek incelenmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçta izolatlar türlerine göre iki ana grup altında toplanmıştır (Öztürk ve Aksoy, 2018).

### **2.3. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) ile İlgili Yapılan Çalışmalar**

MALDI-TOF-MS, biyokimyasal ekstraksiyon ve lipopeptitlerin karakterizasyonu ile karşılaştırıldığında antibiyotik üretiminin kontrolü için kolay ve daha az zaman alan bir yöntemdir (Athukorala ve ark., 2009).

1980'lerin başından bu yana, araştırmalarda protein analizi ve karakterizasyonu için özellikle güçlü bir araç olarak Mass spektrometrisi ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda, bakteriyologlar bakteri tanımlaması için Mass spektrometrisi(MS) ve özellikle MALDI-TOF kullanımına odaklanmışlardır. Ayrıca, son yapılan çalışmalar gösteriyorki MALDI-TOF-MS, geleneksel fenotipik tekniklere veya moleküler biyolojiye kıyasla, sağlam bakterilerin tanımlanması için hızlı, kesin ve uygun maliyetli bir yöntemdir. Ayrıca, bakterilerin doğrudan klinik örneklerden (örneğin kan kültürleri) tanımlanmasına izin verir (Carbonnelle ve ark., 2011).

Teşhis ve etkin tedavi için bakteriyel türlerin hızlı ve güvenilir tespiti ve tanımlanması gereklidir. Yakın zamana kadar klinik laboratuvarlardaki bakteriyel tanımlama esas olarak geleneksel fenotipik ve gen sekans tanımlama tekniklerine dayanıyordu. Anaerobik bakterilerin tanımlanması spesifik besiyeri gerektiren ve yavaş

büyüyen bakterilerin geleneksel yöntemler kullanılarak tanımlanması zaman alıcı, pahalı ve karmaşıktır. Pek çok anaerob zayıf gelişir veya çoğu teşhis sisteminde reaktif değildir. MALDI-TOF-MS, geleneksel fenotipik tekniklere veya moleküler biyolojiye kıyasla, sağlam bakterilerin tanımlanması için güçlü, hızlı, kesin ve uygun maliyetli bir yöntemdir. Çalışmalarımız bu tür bakterilerin tanımlanmasının, MALDI-TOF-MS'nin klinik laboratuvarlara gelmesiyle geliştiğini göstermektedir (Biswas ve Rolain, 2013).

MALDI-TOF MS her organizmada özgül bulunan proteinlerden mass spektrometrisine dayalı o mikroorganizmaya ait özgün bir tür parmak izi çıkarmakta, bu nedenle bakteri, virüs ve mantar tanınması yapılabilmektedir. Bu yöntem son zamanlarda mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan yeni bir tekniktir. Bu teknik, mikroorganizmaların protein yapılarını iyonize ettikten sonra elektrik alandan geçirerek protein profillerinin çıkarılması esasına dayanır. Elde edilen profiller sistemin kütüphanesindeki verilerle karşılaştırılarak tanımlama yapılır. Tanımlama için temel alınan mikroorganizma proteinleri ise esasen çevresel koşullardan az etkilenen ribozomal proteinlerden oluşmaktadır. MALDI-TOF MS ile yapılacak tanımlama çalışmaları taze kültürlerden yapılması tercih edilmektedir. Eski kültürlerde ribozomal proteinler bozulabilmektedir. Rutin bakteri izolatlarında %84,1 ile %95,2 arasında değişen oranda doğru tanımlama yapmaktadır. Maya tanımlamasında da başarı oranı %85-100 arasında değişmektedir. Örneklerde mikrolitrede  $10^5$  ve üzeri bakteri olduğunda da direkt örnekten tanımlama yapabilmektedir. Konvansiyonel ve moleküler tanımlama yöntemleri ile kıyaslanacak olursa MALDI-TOF MS örnek başı maliyeti ve tanımlama için geçen süre yönünden çok daha verimli görülmektedir (Yılmaz ve ark., 2014).

MALDI-TOF kütle spektrometresi, mikroorganizmaların tanımlanmasındaki hızı ve güvenilirliği nedeniyle klinik Mikrobiyolojide rutin bir kaynaktır. Bakterilerin ve mayaların tanımlanmasındaki performansı farkedilebilir düzeydedir (Siller-Ruiz ve ark., 2017).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Çalışmamızda kullandığımız *Xap* ve *Psp* hastalık etmenlerini izole etmek için hastalık belirtisi gösteren fasulye örnekleri Çanakkale, Bursa, Bilecik, Ankara, Konya ve Karaman illerinden toplanmıştır. Toplanan hastalıklı fasulye örneklerini laboratuvara getirinceye kadar serin koşulları sağlamak için ısı geçirmeyen kap, buz kalıpları, kese kâğıdı kullanılmıştır. Koordinat bilgilerinin tespiti için navigasyon özelliği bulunan cihaz, etiket, kurşun kalem, patojen izolasyonu için labaravar ekipmanları (öze, cam baget, erlen, beher, petri kabı, pipet, cam tüp, pilastik ependorf tüp, piset, şırınga, pamuk, lam, lamel) ve kimyasallar ve besiyerleri; Nutrient Agar (NA), Sakkaroz Nutrient Agar (SNA), Nutrient Broth (NB), King B, Yeast Dekstroz Karbonat Agar (YDCA), fizyolojik su (%0,85'lik NaCl), sodyum hipoklorid (NaOCl), alkol, gliserin, N;N;N;N-Tetramethyl-1,4 phenylene diammonium diclorid (TPD), steril kabin, otoklav, hassas terazi, inkübatör, santifüj, spektrofotometre, buzdolabı, saf su cihazı, mikrodalga fırın kullanılmıştır. Ayrıca patojen teşhis testleri için çeşitli kimyasallar kullanılmıştır. Patojenite çalışmaları ise Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi'nden temin edilen fasulye tohumlarından elde edilen fasulye fideleri kullanılmıştır. *Xap* ve *Psp* izolatları hastalıklı olduğu düşünülen bitki örneklerinden laboratuvar koşullarında izolasyon yapılarak elde edilmiştir.

#### 3.2. Metod

##### 3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

Bu çalışmada 2017 ağustos ayında Türkiye'nin 6 farklı şehriden 20 farklı lokasyonda bulunan fasulye üretim alanlarından limoni sarı hale ile çevrili lezyona sahip yaprak ve bakla, su emmiş gibi görünen dal ve yaprak, su emmiş leke şeklindeki lezyonlardan ve bu lezyonların ilerlemesi sonucunda meydana gelen nekrotik lekelerden, çökmeler oluşmuş yaprak ve baklalardan hastalıklı örnekler toplanmış, etiketlenen örnekler kese kâğıtlarına konularak polietilen torbalar içine konulmuş ve laboratuvara getirilmiştir. Ankara'da 4 farklı lokasyonda survey yapılmış 8 bulaşık örnek toplanmış, Bilecik'te 2 farklı lokasyonda survey yapılmış 4 bulaşık örnek toplanmış, Bursa'da 3 farklı lokasyonda survey yapılmış 6 bulaşık örnek toplanmış, Çanakkale'de 2 farklı lokasyonda survey yapılmış 4 örnek toplanmış, Karaman'da 3 farklı lokasyonda survey yapılmış 10 bulaşık örnek toplanmış, Konya'da ise 6 farklı lokasyonda survey yapılmış ve 18 bulaşık örnek toplanmıştır.

Laboratuvara getirilen bu örneklerden bisturi yardımıyla birkaç mm'lik hastalıklı bölgeyle sağlıklı bölgeyi içeren bakteriyel etmenin hala aktif olduğu düşünülen bölgelerden parça alınmıştır. Kesilen parçalar % 70'lik alkol emdirilen pamuk arasına alınıp 30-40 sn bekletilerek steril edilmiştir. Bu parçalar steril bir lamel üzerine konup üzerine 100 mikrolitre fizyolojik su damlatıldıktan sonra steril cam baget yardımıyla ezilerek bakteriyel etmenlerin fizyolojik suya geçmesi sağlanmıştır. Homojenize edilen bu örnekler 60 dk bekletildikten sonra bu süspansiyondan öze ile alınarak önceden hazırlanmış SNA besiyerine ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan petripler inkübatörde  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiştir (Taylor, 1970). Gelişen sarı ve krem rengi levan koloniler saflaştırılmak amacıyla aynı besiyerinde tekrar kültüre alınmıştır. Saflaştırılan kültürler daha sonraki test çalışmalarında kullanmak için YDCA besiyerinde (EK-1) buzdolabında  $+4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve %20'lik gliserin içeren tüplerde  $-20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### **3.2.2. Fasulye ve Tütün bitkilerinin yetiştirilmesi**

Patojenite testinde kullanmak için Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesinden temin edilen hastalığa duyarlı fasulye tohumlarından yetiştirilen fideler ve aşırı duyarlılık testinde ise Samsun çeşidi tütün tohumlarından yetiştirilen tütün bitkileri kullanılmıştır. Tütün ve fasulye tohumları içinde otoklav edilmiş torf bulunan plastik saksılara ekilerek iklim odasında  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve % 60-70 nem koşullarında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olmak suretiyle yetiştirilmiştir. Tütün bitkileri çimlendikten sonra içinde torf bulunan daha büyük saksılara şaşırtılmıştır ve oluşan gerçek yaprakları aşırı duyarlılık testinde kullanılmıştır. Fasulye bitkileri ise 5 yapraklı dönemde patojenite testi için kullanılmıştır.

### **3.2.3. Fasulye Bakteriyel Yanıklık ve Hale Yanıklığı etmenlerinin tanısı**

#### **3.2.3.1. SNA besiyerinde gelişim**

SNA besiyerine (Ek 1) ekilen bakteriyel yanıklık etmeni patojenleri 48 saat  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyondan sonra incelenmiş kubbemsi görünümde olan levan koloni gelişimi levan pozitif olarak değerlendirilerek kaydedilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

#### **3.2.3.2. Nutrient Agar besiyerinde gelişim**

NA besiyerine (Ek 1) çizilen fasulye bakteriyel hastalık etmenleri 48 saat  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyondan sonra gelişimleri incelenmiş ve koloni özellikleri kaydedilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

### **3.2.3.3. King B besiyerinde gelişim**

İzole edilen fasulye bakteriyel hastalık etmenleri King B besiyerine (Ek 1) çizgi ekim şeklinde ekilmiş ve 48 saat  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Ultraviyole ışık altında floresan ışık yayan izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.3.4. Potasyum Hidroksit (KOH) testi**

Hastalık belirtisi gösteren fasulye bitkilerinden izole edilen bakteriyel izolatlar NA besiyerinde  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiştir. Sonra lamel üzerine % 3'lük KOH solüsyonundan pipet ile bir damla damlatılmış ve bir öze ucu dolusu kültür alınarak damlayla birlikte dairesel olarak karıştırılmıştır. İzolatlar, öze yukarı kaldırıldığında mukus şeklinde yapışkansı bir sünme oluşturduğundan gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990).

### **3.2.3.5. Oksidaz testi**

Bakteri izolatları 24-48 saat geliştirilen kolonilerden kürdan ile bir miktar alınmış ve üzerine sıvı % 1'lik TPD damlatılmış steril filtre kâğıdı üzerine sürülmüştür. Uygulama sonucunda 10 saniye içinde çizimin koyu mor renge dönüşmesi pozitif, 10-60 sn arasında koyu mor renge dönülmesi zayıf pozitif, herhangi bir renk değişikliği oluşturmayan kültür çizimleri negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956).

### **3.2.3.6. Oksidatif/ Fermantatif (O/F) testi**

Bakterilerin aerob ya da anaerob olduklarını tespit edebilmek amacıyla yapılan oksidatif/fermantatif testi için 2,0 g/L pepton, 5,0 g/L NaCl, 0,3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,0 g/L agar, 3,0 ml/L % 1'lik bromothymolblue içeren besiyeri hazırlanmıştır. Bu besiyerinden her bir izolat için 6 tüp olacak şekilde 10 ml'lik tüplere 4,5 ml paylaştırılmıştır. Besiyeri içeren tüpler  $121^{\circ}\text{C}$ 'de otoklavda steril edilerek  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra herbir tüpe soğuk sterilizasyon yapılmış 0,5 ml, % 10'lük glikoz solüsyonu eklenmiştir. Henüz 48 saatlik olan bakteri kültürleri özeyle bu besiyerine ekilmiştir. Ekimden sonra bu tüplerin yarısının yüzeyi 1 ml'lik ılık  $\frac{1}{3}$  oranında vazalin-parafin karışımıyla (Vaspar) kapatılmış, diğer yarısı kapatılmamıştır. Ekilen tüpler  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 5-6 günlük bir inkübasyon sürecinden sonra vaspar'lı tüplerden rengi değişmeyen ve vasparsız tüplerden sarı renk olanlar oksidatif olarak değerlendirilmiş, vasparlı besiyerinde renk değişimi olanlar fermantatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990).

### 3.2.3.7. Nişasta Hidrolizasyonu

%2'lik eriyik nişasta içeren ve 23 g/L NA bulunan besiyeri otoklavda 121 °C ve 15 dk steril edilerek, cam şişenin elle tutulabilir olana kadar soğutulmasından sonra petrilere dökülmüştür. Hazır olan besiyerine kültürler çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. 25 ±1°C'de 7-14 gün inkübe edildikten sonra üzerlerine Lugol Eriyiği (EK-1) dökülmüştür. Bakteri kolonilerinin etrafında oluşan parlak sarı renkli alanlar bakterinin nişastayı hidrolize ettiğini göstermektedir.

### 3.2.3.8. Katalaz testi

23 g/L NA içeren besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk otoklav edilmiş ve soğutulmuş plastik petrilere dökülmüştür. Hazır olan besiyerine izolatlar ekilmiş ve 25±1°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra petri kapaklarının iç yüzeyine kültürden bir öze dolusu alınarak üzerlerine 1 ml % 3'lük hidrojen peroksit solisyonu dökülmüştür. Kısa süre içerisinde tepkime oluşarak kabarcıklar meydana getiren izolatlar pozitif, hiç tepki vermeyen izolatlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Janse, 2005).

### 3.2.3.9. Pektolitik Aktivite testi

Patates yumruları üzerinde yapılan bu testte, öncelikle yumrular çeşme suyunda fırçayla sürtülmek suretiyle yıkanmış ve sonra 3 dk % 1'lik NaOCl'de bekletilmiştir. Bu aşama yüzey sterilizasyonunu oluşturmuştur. Daha sonra bu yumrulardaki NaOCl'yi yıkamak amacıyla 3 defa steril saf sudan geçirilmiştir. Sonra uç kısmı alkol-alevinden geçirilerek steril edilen patates soyacağıyla patatesin kabuğu soyulmuş ve petri kabının içine sığacak şekilde nemli steril filtre kâğıdı konularak, filtre kâğıdı üzerine 1'er cm kalınlığında dilimlenmiş patatesler koyulmuştur. Patates dilimlerinin ortasına küçük bir çukur açılarak bir öze dolusu bakteri kültürü inokule edilmiştir. Bu şekilde steril petrilereki patates dilimlerine inokulasyon yapılmış ve 25±1°C'de iki günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. Patates diliminin ortasında inokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.3.10. Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyon testi

Farklı bölge ve şehirlerdeki fasulyelerden izole edilen bakteriyel kültürler NA besiyerine ekilmiş, 48 saat sonra gelişen izolatlar fizyolojik su içerisine öze ile bir miktar alınarak, 10<sup>8</sup> hücre/ ml yoğunlukta ayarlandıktan sonra el ayası büyüklüğüne gelmiş tütün (*Nicotiana tabacum cv samsun N*) bitkisi yapraklarının alt yüzeylerindeki damar aralarına birer damar arası boşluk bırakmak suretiyle 2,5 ml'lik iğnesiz şırınga ile enjekte edilmiştir.

24 saat sonra oluşan şeffaf nekrotikleşme pozitif olarak değerlendirilmiştir (Klement ve Goodman, 1967).

### **3.2.3.11. Patojenite testi**

Bu çalışmada izolatlar, NA besiyerinde taze olarak geliştirildikten sonra buradan özeyle bir miktar alınarak fizyolojik su içerisine koyularak karıştırılmıştır. Bu süspansiyon spektrofotometre ile ölçülmek suretiyle  $10^8$  hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu süspansiyon 3-5 yapraklı dönemdeki fasulye bitkilerinin yapraklarına sprey ile 4 kez püskürtülmüştür. Negatif kontrol olarak saf su kullanılmıştır. İnokule edilen bitkiler, sıcaklığı 24-28°C'ye ayarlanmış, ortalama güneş ışığı dalga boylarında ışık sağlayabilen, günün saatlerine göre gece gündüz ortamı oluşturan iklim odasına yerleştirilmiş ve yüksek nem sağlamak için bitkiler 24 saat süreyle nemli polietilen poşetle kapatılmıştır. İnokulasyondan 7-10 gün sonra bitki yapraklarındaki tipik leke oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır (McGuire ve ark., 1986; Schaad ve ark., 2001).

### **3.2.3.12. Litmus Milk testi**

Bakteri izolatları, tindelizasyon yapılarak süt tozu ile hazırlanan Litmus Milk besiyerine (Ek 1) 3 tekrarlı olacak şekilde inokule edilmiştir. İnkübasyondan 7-14 gün sonra kiremit kırmızı gelişenler asidik, Mavi gelişenler Alkalin ve hiçbir renk değişikliğinin olmadığı izolatlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

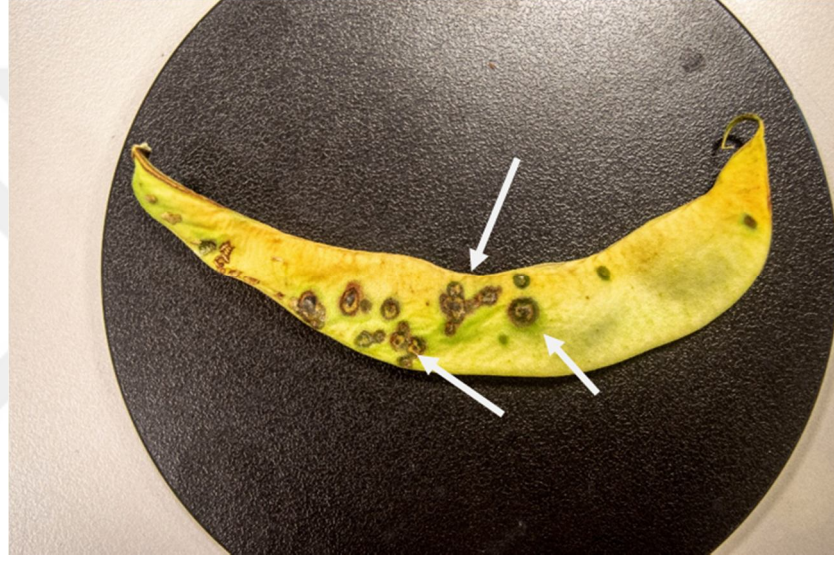
### **3.2.3.13. Maldı-TOF MS tanılama sistemiyle tanılama**

Biyokimyasal testler yapıldıktan sonra izolatların teyit amacı ile tür teşhisini yapmak için saf kültürden alınan ve NA besiyerinde 24-36 saat gelişen izolat petrilerinin Hatay Mustafa Kemal Üniversitesin'den MALDI-TOF MS hizmet alımı yapılmak suretiyle tanılamaları yapılmıştır. Teşhis sonucunda verilen skor değeri 2.30-3.0 aralığında tanının tür düzeyinde oldukça güvenilir olduğu; 2.00-2.299 aralığında tür düzeyinde muhtemel, cins düzeyinde yüksek güvenilir olduğu; 1.70-1.999 arasında tanının tür düzeyinde güvensiz, cins düzeyinde muhtemel olduğu; 1.7 değerinden aşağı olan değerler ise güvensiz tanı olarak değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. *Psp* ve *Xap* etmenlerinin izolasyonu

Laboratuvara getirilen su emmiş leke görünümündeki, çökük, klorozlu ve nekrozlu (Şekil 4.1; Şekil 4.2) hastalıklı bitki dokularından SNA, NB ve King B besi yerinde, izolasyonlarda sarı renkli veya kısmen şeffaf krem renkli, parlak, konveks ve etrafı düz koloniler seçilmiş ve bu şekilde saf kültürler elde edilmiştir. Hastalıklı fasulyelerden elde edilen izolatların tamamı tütün bitkisi yapraklarında hypersensitif reaksiyon oluşturmuştur. Yine bu izolatların tamamı fasulye’de patojenite testinde pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4,1).



Şekil 4.1. *Xap*'ın fasulye baklasında oluşturduğu kahverengi, içe çökük lekeler





Şekil 4.2. *Xap*'in fasulye yapraklarında oluşturduğu klorozlar

#### 4.2. *Psp* ve *Xap* etmenlerinin klasik metotlarla tanınması

##### 4.2.1. NA besiyerinde gelişim

NA besiyerine çizilen fasulye patojeni bakteriyel etmenler  $25\pm 1$  °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 10 izolat *Psp*'nin gelişim rengi olan krem renğinde, 13 izolat ise *Xap*'in gelişim rengi olan sarı renkte kültürler oluşturduğu gözlemlenmiştir (Borkar ve Yumlembam, 2016).

##### 4.2.2. SNA besiyerinde gelişim

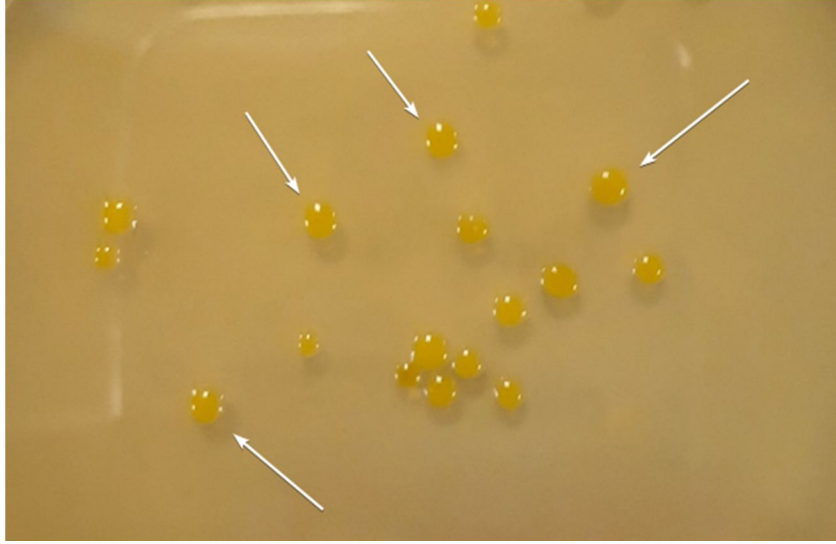
SNA besiyerinde geliştirilen fasulye bakteriyel hastalık etmenleri, bu ortamda  $25\pm 1$  °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. 10 izolatın *Psp*'ningelişme rengi olan krem renğinde (Şekil 4.3), 13 izolat ise *Xap*'ingelişim rengi olan sarı renkte koloniler oluşturduğu ve tüm izolatların levan geliştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4) (Borkar ve Yumlembam, 2016).

Çizelge 4.1. Fasulyeden izole edilen patojen bakteri izolatların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

Sıra No	İzolat	KOH (Gram)	Oksidaz	Katalaz	O/F	Nişasta Hidrolizasyon	Pektolitik Aktivite	Hipersensivite	Patojenite	Litmus Milk
1	ft04	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
2	ft06	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
3	ft09	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
4	ft10	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
5	ft11	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
6	ft12	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
7	ft14	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
8	ft15	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
9	ft18	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
10	ft20	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
11	ft21	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
12	ft22	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
13	ft24	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
14	ft25	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
15	ft26	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
16	ft27	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
17	ft29	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
18	ft31	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
19	ft32	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali
20	ft33	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
21	ft35	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
22	ft36	-	-	+	-	-	+	+	+	Alkali
23	ft38	-	-	+	-	+	+	+	+	Alkali



Şekil 4.3. SNA besiyerinde ft35 no'lu izolat'ın krem rengindeki gelişimi ve levan oluşturan kolonileri



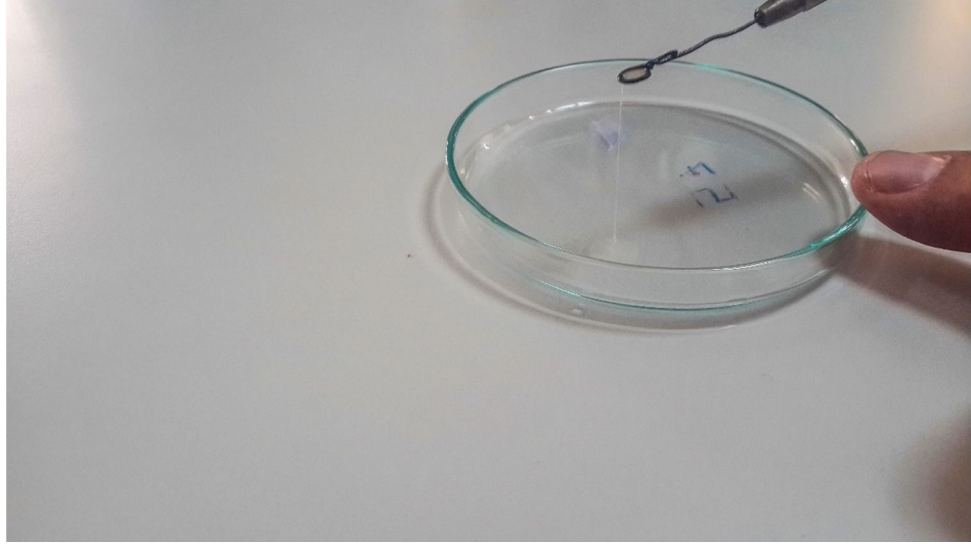
Şekil 4.4. ft10 no'lu izolatın SNA besiyerinde oluşturduğu sarı renkli ve levan oluşturan kolonileri

#### 4.2.3. King B besiyerinde gelişim

Fasulye bitkisinden izole edilen kültürler King B besiyerine çizilerek  $25\pm 1$  °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Hale yanıklık etmenine ait kültürler krem renğinde, bakteriyel yanıklık etmenine ait kültürlerse sarı renkli koloniler oluşturmuştur. Bu teste 10 izolat floresan özellik gösterirken 13 izolat ise floresan özellik göstermemiştir.

#### 4.2.4. KOH testi

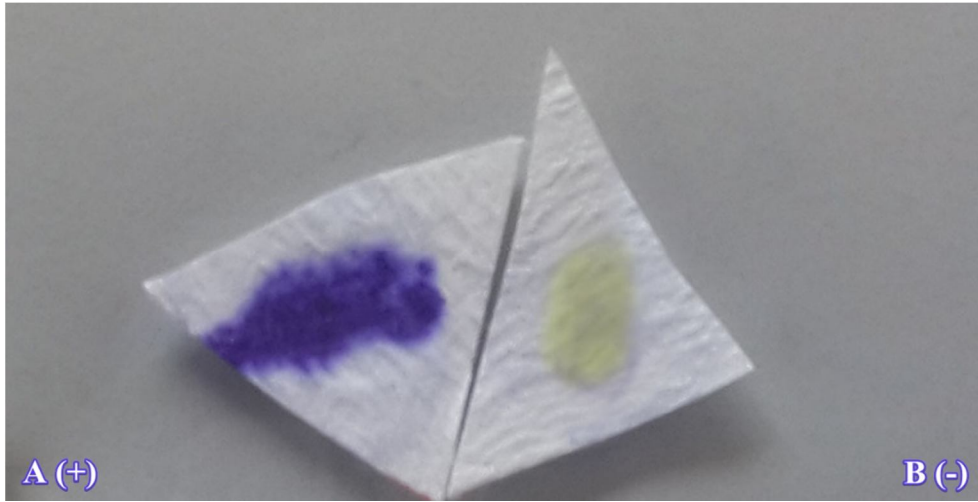
Önceki çalışmalar dikkate alındığında gram negatif bakteri kolonileri potasyum hidroksit ile reaksiyona girdiğinde ve koloniler özeyle karıştırılıp havaya kaldırıldığında mukoza yapısında, özeyle yapışıp uzadığı belirtilmiştir (Şekil 4.5). İzole edilen izolatların test sonucunda özeyle yapışıp uzamasından dolayı çalışmadaki 23 izolatın tamamı gram negatif çıkmıştır.



Şekil 4.5. KOH testinde negatif sonuç veren ft15 no'lu izolatın ipliğimsi şekilde sünmesi

#### 4.2.5. Oksidaz testi

Çalışmada, farklı bölgelerden izole edilen izolatların oksidaz test solüsyonu emdirilmiş filtre kağıdına çizilmesi sonucu hiçbir izolatta renk değişimi meydana gelmediğinden dolayı 23 izolatın tamamının oksidaznegatif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Oksidaz pozitif (+) sonuç veren mor renk oluşturan ft51 no'lu(A) ve negatif (-) sonuç veren mor renk oluşturmayan ft26 no'lu (B) izolatlar

#### 4.2.6. O/F testi

NA besiyerinde  $25 \pm 1$  °C'de 48 saat inkübe edilen izolatların tamamı bu test için hazırlanan oksijenli (vasparsız) besiyerinde gelişim göstererek besiyerinin rengini sarıya

çevirmişlerdir. Oksijensiz (vasparlı) besiyerinde izolatlar gelişmediğinden besiyerinde renk değişimi olmamıştır.

#### 4.2.7. Nişasta Hidrolizasyonu

Kültürler nişastalı besiyerine çizilip 2-7 günlük inkübasyondan sonra üzerlerine lugol eriyiği dökülmüş ortamın rengi siyah-mor hal almıştır. Gelişen bakteri kolonilerinin etrafında parlağimsı sarı alanlar gözleendiğinde nişasta hidrolizasyonu pozitifolarak değerlendirilmiştir. Buna göre bu çalışmadaki 23 izolattan 13 tanesipozitif, 10 tanesi negatif(Şekil 4.7) olarak değerlendirilmiştir.

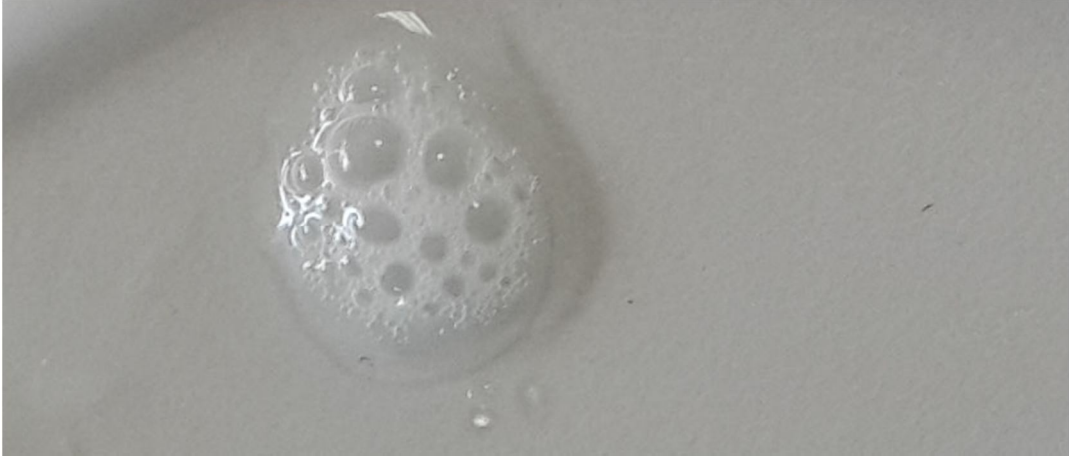


Şekil 4.7. Nişastayı hidrolize eden ft25 no'lu (A) pozitif (+)izolat ve edemeyen ft33 no'lu (B) negatif (-) sonuç veren izolat

#### 4.2.8. Katalaz testi

Fasulyebakteriyel hastalığı izolatları besiyerinde 24 saat geliştirilmiştir. Bu bakterilerden bir öze ucunda alınarak steril lam üzerine taşınmış ve bakteri üzerine bir damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>damlatılmış birkaç saniye içerisinde gaz kabarcıkları gösteren izolatlar (Şekil 4.8) katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmadaki izolatların tamamının katalaz pozitif olduğu belirlenmiştir.

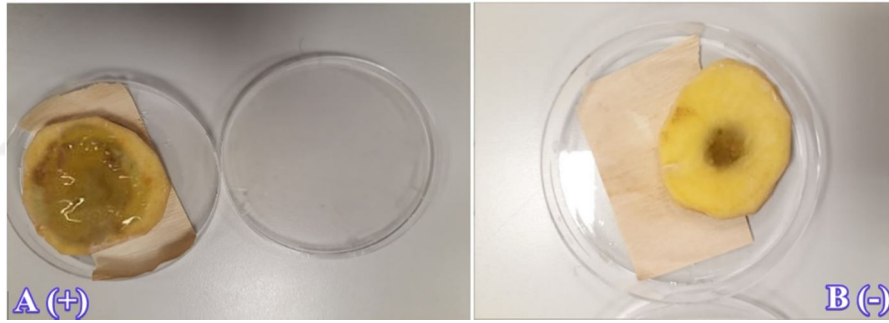




Şekil 4.8. Katalaz reaksiyonu sonucunda pozitif reaksiyon gösteren ft36 no'lu izolat

#### 4.2.9. Pektolitik Aktivite testi

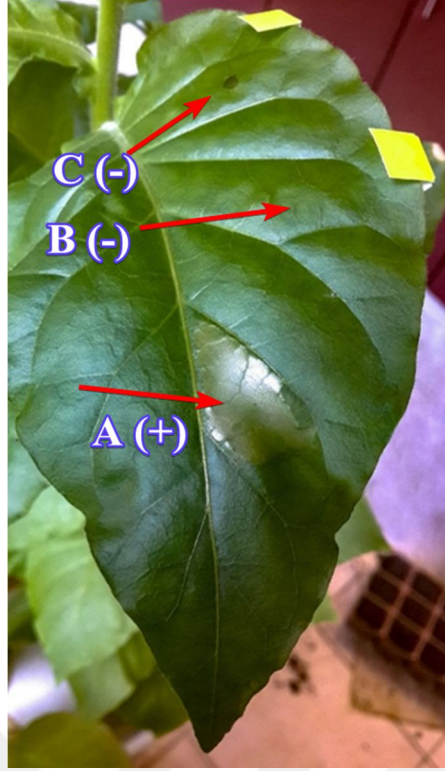
İzole edilen 23 izolatın tamamı, patates dilimleri üzerine inokule edilmesinden 48 saat sonra dilimler üzerinde pektolitik aktivite göstererek yumuşak çürüklük oluşturmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Pektolitik aktivite testi sonucunda pozitif (+) sonuç veren ft38 no'lu izolat (A) ve negatif (-) sonuç veren ft 67 no'lu izolat (B)

#### 4.2.10. Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyon testi

İnokulasyondan 24 saat sonra izolatların tamamı tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmuşlardır. Bu nedenle izole edilen kültürlerin tamamı pozitif olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Tütün'de hipersensitif reaksiyonda pozitif (+) sonuç veren ft29 no'lu izolat (A) ve negatif (-) sonuç veren ft69 ve ft70 no'lu (B ve C) izolatlar

#### 4.2.11. Patojenite testi

Bu çalışmada hipersensitif olduğu belirlenen 23 izolatın tamamı taze kültür olarak yeniden geliştirildikten sonra fasulye bitkisinde patojenite testi için kullanılmış ve fasulyede yaprak ve baklalarında tipik belirtiler olan sarı haleli lekeler ve nekrozlara neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Patojenite testi sonucundafasulye bitkisinde gözlenen symptom

#### 4.2.12. Litmus Milk testi

Bu çalışmada kullanılan bakteriyel etmeni izolatlar stoktan alınarak litmus milk besiyeri içeren tüplere ekilmiş ve 7-14 günlük inkübasyondan sonra bu izolatların tamamibesiyerini mavi renge çevirerek alkali yapmıştır.

#### 4.2.13. Maldi-TOF tanılama sistemi sonuçları

Bakteriyel yanıklık ve hale yanıklığı etmeni izolatları Maldi-TOF biyotyper sistemiyle tanılanarak skorlaması yapılmış ve teşhis sonucunda Çizelge 4.2'deki sonucu vermiştir. Buna göre 23 izolatın 13 tanesi *Xap* (1,980-2,490), 10 tanesi ise *Psp* (1,968-2,557) olarak belirlenmiştir. *Xap* olarak tanılanan izolatlardan 7 tanesi 2,3 ile 3 aralığında bir değer verdiği için tanısı tür düzeyinde yüksek güvenilir olarak bulunmuştur. Bu izolatlardan 5 tanesi 2,0 ile 2,3 aralığında bir sonuç vermiş olup cins düzeyinde güvenilir olup tür düzeyinde muhtemel olduğunu ve 1 izolat da ise 1,7 ile 2,0 aralığında değer elde edilmiş olup cins düzeyinde muhtemel olduğunu göstermektedir. *Psp* olarak tanılanan izolatdan ise 6 tanesi 2,3 ile 3 aralığında sonuçlar verdiği için tür düzeyinde yüksek güvenilir olarak belirlenmiştir. Diğer izolatlardan 3 tanesi 2 ile 2,3 aralığında bir değer verdiği için tür düzeyinde muhtemel cins düzeyinde kesin olduğu, 1 izolatın ise 1,7 ile 2 aralığında sonuç verdiği için cins düzeyinde muhtemel olduğu saptanmıştır.



Çizelge 4.2. Patojen bakteri izolatlarının Maldi-TOF MS tanı sonuçları ve benzerlik indeksi

Sıra No	İzolat	Maldi-TOF tanılama sonucu	Benzerlik İndeksi
1	ft06	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,435
2	ft11	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1,968
3	ft12	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,328
4	ft14	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,347
5	ft24	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,403
6	ft26	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,467
7	ft31	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,179
8	ft33	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,557
9	ft35	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,453
10	ft36	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2,225
11	ft04	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,485
12	ft09	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,490
13	ft10	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,286
14	ft15	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,378
15	ft18	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,481
16	ft20	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,409
17	ft21	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,263
18	ft22	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	1,980
19	ft25	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,200
20	ft27	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,284
21	ft29	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,485
22	ft32	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,535
23	ft38	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	2,067

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölge ve şehirlerinden fasulye bitkisi üzerinde hastalık yapan bakterilerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmadaki sonuçlara göre; elde edilen izolatlar morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak test'e tabi tutulmuştur. Bu çalışmaya göre izolatların tamamı katalaz testi testinde pozitif reaksiyon gösterirken, oksidaz testinde negatif reaksiyon göstermiştir. Yapılan KOH testinde bu izolatların tamamı gram negatif olarak belirlenmiştir. Vasparlı (oksijensiz) besiyerinde izolatlar gelişim gösterememiş ve Aerob oldukları tespit edilmiştir. Nişasta hidrolizasyon testinde izolatların 13 tanesi pozitif sonuç verirken 10 tanesi ise negatif sonuç vermiştir. İzolatların patojen olduklarını belirlemek için yapılan pektolitik aktivite testinde izolatların tamamı patates dilimleri üzerinde çürüklük oluştururken, tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonuna sebep olmuşlardır. İzolatlar fasulye bitkilerinin yapraklarına püskürtülme şeklinde uygulandığında bakteriyel yanıklık ve hale yanıklığının tipik semptomları gözlenmiştir.

Bu izolatlar daha sonra Maldi-TOF MS biotyper tanılama sistemi ile tanılanmış ve 7 tanesi kesin olarak *Xap* olarak tespit edilirken 5 tanesi kesin *Xanthomonas* fakat muhtemel tür düzeyinde *X.axonopodis* olduğu, 1 tanesinin ise muhtemel cins düzeyinde *Xanthomonas* olduğu tespit edilmiştir. İzolatların kalanlarından 7 tanesi tür düzeyinde kesin olarak *Psp* tespit edilirken, 3 tanesi kesin olarak *Pseudomonas* iken tür düzeyinde muhtemel *P.syringae*, 1 tanesi muhtemel cins düzeyinde *Pseudomonas* olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmanı yapıldığı illerde fasulyede bakteriyel hastalık etmeni olarak *Psp* ve *Xap* türlerinin yaygın olduğunu ortaya koymuştur. Bu illerdeki fasulye yetiştiricilerin bu iki hastalık etmenine karşı gerekli önlemleri almaları gerekmektedir.

Bu etmenlerle mücadele için hastaliksız ve sertifikalı tohum kullanılması, hastalıkla bulaşık olmayan alanlardan tohumluk temin edilmesi gerekir. Bulaşık tarlalarda hastalığın konukçusu olmayan bitkilerle rotasyon yapılması önerilmektedir. Ürün artıkları, hastalığın yaşamını sürdürebileceği yabancı otlar veya konukçu olabilecek bitkiler yetiştirme ortamından uzaklaştırılmalıdır. Hastalığın yayılmasında önemli rol oynayan yağmurlama sulama sistemi ile sulama yapmaktan kaçınılmalıdır. Hastalıklı bitkilerle beslenen çiftlik hayvanlarının gübrelerinin tam olarak kompost haline gelmeden veya steril edilmeden kullanılmaması gerekmektedir.

Fasulye ıslahçılarının bölge için çeşit geliştirirken bu hastalık etmenlerine karşı dayanıklı veya tolerant çeşitlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir.



## KAYNAKLAR

- Aggour, A.R., Coyne, D.P., Vidaver, A.K., Eskridge, K.M., (1989). Transmission of the common blight pathogen in bean seed. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 114(6), ss.1002-1008.
- Aguilera, S., K. López-López, Y. Nieto, Garcidueñas-Piña, R., Hernández-Guzmán, G., Hernández-Flores, J.L., Murillo, J., Alvarez-Morales, A., (2007). Functional characterization of the gene cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 involved in synthesis of phaseolotoxin. *Journal of Bacteriology*. 189(7), ss.2834-2843.
- Anonim, (2016). <http://isparta.tarim.gov.tr> . (Erişim tarihi: 16 Şubat 2016).
- Athukorala, S.N.P., Fernando, W.G.D., Khalid.Y. Rashid, (2009). Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology*. 55(9), ss.1021-1032.
- Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H.C., Gilbertson, R.L., (1994). Detection of the Bean Common Blight Bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, Using the Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology*. 84(10), s.1185.
- Aydoğan, M., Demiryürek, K., Abacı, N.İ., (2015). Türkiye’de Kuru Fasulye Üretiminin Mevcut Durumu ve Gelecek Dönemler Üretimine Tahmin Edilmesi. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 3(12), s.962.
- Balaz, J., Popovic, T., Vasic, M., Nikolic, Z., (2008). Elaboration of methods for detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on bean seeds. *Pesticidi i fitomedicina*. 23(2), ss.81-88.
- Balkaya, A., Yanmaz, R., (1999). The promising green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars candidate determined by pedigree selection method in the Black Sea region *İçinde*: Ankara University, ss.504-508.
- Baştaş, K.K., Şahin, F., (2017). Evaluation of seedborne bacterial pathogens on common bean cultivars grown in central Anatolia region, Turkey. *European Journal of Plant Pathology*. 147(2), ss.239-253.
- Belete, T., Baştaş, K.K., (2017). Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of Beans with Special Focus on Ethiopian Condition. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 08(03).
- Biswas, S., Rolain, J.M., (2013). Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of Microbiological Methods*. 92(1), ss.14-24.
- Borkar, S.G., Yumlembam, R.A., (2016). *Bacterial Diseases of Crop Plants*. Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL

33487-2742: CRC Press. <https://www.taylorfrancis.com/books/9781498755993> .  
(Erişim tarihi: 26 Mart 2019).

- Bozkurt, İ.A., (2009). *Fasulye bakteriyel yanıklık hastalığına (Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli) karşı antagonist bakterilerle mücadele olanakları*. Ulusal Tez Merkezi - Türkiye: Ege Üniversitesi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp> . (Erişim tarihi: 5 Ağustos 2019).
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J., (2003). Beans (Phaseolus spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*. 252(1), ss.55-128.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.L., Ferroni, A., Gutmann, L., Nassif, X., (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*. 44(1), ss.104-109.
- Cho, J.H., Jeong, M.J., Song, M.J., Yim, K.O., Lee, H.I., Kim, J.H., Baeg, J.H., Cha, J.S., (2010). Development of PCR Primers to Detect Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola from the Bean Seeds. *Research in Plant Disease*. 16(2), ss.129-135.
- Clafin, L.E., (1987). MXP, a Semi-Selective Medium for Xanthomonas campestris pv. phaseoli. *Phytopathology*. 77(5), s.730.
- Çiftçi, C.Y., (2004). Dünyada ve Türkiye’de Yemeklik Tane Baklagiller Tarımı. , s.188.
- Denardin, N.D., Agostini, V.A., (2013). Detection and quantification of Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli and its variant fuscans in common bean seeds. *Journal of Seed Science*. 35(4), ss.428-434.
- Duncan, R.W., Gilbertson, R.L., Lema, M., Singh, S.P., (2014). Inheritance of resistance to the widely distributed race 6 of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in common bean pinto US14HBR6. *Canadian Journal of Plant Science*. 94(5), ss.923-928.
- FAO, (2017). <http://www.fao.org> . (Erişim tarihi: 5 Ağustos 2019).
- Fininsa, C., Tefera, T. (2001). Effect of primary inoculum sources of bean common bacterial blight on early epidemics, seed yield and quality aspects. *International Journal of Pest Management*. 47(3), ss.221-225.
- Fourie, D., (2002). Distribution and Severity of Bacterial Diseases on Dry Beans (Phaseolus vulgaris L.) in South Africa. *Journal of Phytopathology*. 150(4-5), ss.220-226.
- Freytag, G.F., Bassett, M.J., Zapata, M., (1982). Registration of XR-235-1-1 Bean Germplasm1 (Reg. No. GP42). *Crop Science*. 22(6), s.1268.
- Gillard, C.L., Conner, R.L., Howard, R.J., Pauls, K.P., Shaw, L., Taran, B., (2009). The performance of dry bean cultivars with and without common bacterial blight resistance in field studies across Canada. *Canadian Journal of Plant Science*. 89(2), ss.405-410.

- Goodwin, P.H., Sopher, C.R. (1994). Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentisic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 40(1), ss.28-34.
- Janse, J.D. (Editör)., (2005). *Phytopathology: principles and practice*. Wallingford: CABI. <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20063102507> . (Erişim tarihi: 9 Nisan 2019).
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., DeBoy, R., Durkin, A.S., Giglio, M.G., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D.H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H., Feldblyum, T., White, O., Fraser, C.M., Chatterjee, A.K., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Mansfield, J., Collmer, A., Buell, C.R., (2005). Whole-Genome Sequence Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A Reveals Divergence among Pathovars in Genes Involved in Virulence and Transposition. *Journal of Bacteriology*. 187(18), ss.6488-6498.
- Kendi, D., (2009). *İç Anadolu Bölgesinde Fasülye Tohumlarında Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Bulaşıklığının Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. Ulusal Tez Merkezi - Türkiye: Selçuk Üniversitesi.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 44(2), ss.301-307.
- Király, Z., El-Zahaby, H.M., Klement, Z., (1997). Role of Extracellular Polysaccharide (EPS) Slime of Plant Pathogenic Bacteria in Protecting Cells to Reactive Oxygen Species. *Journal of Phytopathology*. 145(2-3), ss.59-68.
- Klement, Z., Goodman, R.N., (1967). The Hypersensitive Reaction to Infection by Bacterial Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 5(1), ss.17-44.
- Kovacs, N., (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the Oxidase Reaction. *Nature*. 178(4535), ss.703-703.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E., (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*.
- López-López, K., Hernández-Flores, J.L., Cruz-Aguilar, M., Alvarez-Morales, A., (2004). In *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, expression of the *argK* gene, encoding the phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase, is regulated indirectly by temperature and directly by a precursor resembling carbamoylphosphate. *Journal of Bacteriology*. 186(1), ss.146-153.
- McElroy, J.B., (1985). *Breeding dry beans, Phaseolus vulgaris L., for common bacterial blight resistance derived from Phaseolus acutifolius A. Gray. Thesis (Ph.D.)*. Ithaca, NY, USA: Cornell University. [http://library.ciat.cgiar.org/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=54659&shelfbrowse\\_itemnumber=69037](http://library.ciat.cgiar.org/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=54659&shelfbrowse_itemnumber=69037) .

- McGuire, R.G., Jones, J.B., Sasser, M., (1986). Tween Media for Semiselective Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Soil and Plant Material. *Plant Disease*. 70(9), s.887.
- Mohan, S.K., Schaad, N.W., (1987). An Improved Agar Plating Assay for Detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in Contaminated Bean Seed. *Phytopathology*. 77(10), s.1390.
- Moore, L., Bouzar, H. Burr, T., (2001). Gram-negative Bacteria, *Agrobacterium İçinde*: N. W. Schaad, J. B. Jones ve W. Chun, ed. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul, Minn: APS Press, ss.17-35.
- Osdaghi, E., Shams-Bakhsh, M., Alizadeh, A., Lak, M.R., Maleki, H.H., (2011). Induction of Resistance in Common Bean by *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and Decrease of Common Bacterial Blight. *Phytopathologia Mediterranea*. 50(1), ss.45-54-54.
- Öztürk, M., Aksoy, H.M., (2018). Isolation and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* causing disease in common bean producing areas. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*. 33(2), ss.105-115.
- Park, S.J., Dhanvantari, B.N., (1994). Registration of Common Bean Blight-Resistant Germplasm, HR45. *Crop Science*. 34(2), s.548.
- Parker, J.P.K., (1985). *Interspecific transfer of common bacterial blight resistance from Phaseolus acutifolius*. University of Guelph.
- Popovic, T., Balaz, J., Nikolic, Z., Starovic, M., Gavrilovic, V., Aleksic, G., Vasic, M., Zivkovic, S., (2010). Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. *African journal of agricultural research*. 5(19).
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N.W., Panopoulos, N.J., (1993). Specific Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in Bean Seed by Polymerase Chain Reaction-Based Amplification of a Phaseolotoxin Gene Region. *Phytopathology*. 83(7), s.965.
- Robinette, D., Matthyse, A.G., (1990). Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology*. 172(10), ss.5742-5749.
- Saettler, A.W., (1991). Common bacterial blight *İçinde*: Hall R, ed. *Compendium of Bean Diseases*. APS Press, ss.29-30.
- Sands, D.C., (1990). Physiological Criteria-Determinate Tests *İçinde*: Z. Klement ve K. Rudolph, ed. *Methods in phytobacteriology (Edts. Klement, Z.; Rhudolp, K.; Sands, D. C.)*. Budapest: Akad.Kiadó, ss.133-143.

- Sárdi, É., Stefanovits-Bányai, É., (2006). Relationship between peroxidase activity and the amount of fully N-methylated compounds in bean plants infected by *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 28(2), ss.95-100.
- Saygılı, H., Şahin, F., Aysan, Y., (2006). *Fitobakteriyoloji*. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri.
- Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., Panopoulos, N.J., (1995). A Combined Biological and Enzymatic Amplification (BIO-PCR) Technique to Detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean Seed Extracts. *Phytopathology*. 85(2), ss.243–248.
- Schaad, N.W., J.B. Jones, W. Chun (ed.), (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* 3. ed. St. Paul, Minn: APS Press.
- Schwartz, H.F., Steadman, J.R., Hall, R., Forster, R.L., (2005). *Compendium of bean diseases*. USA: American Phytopathological Society (APS Press). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20053196166> .
- Scott, M.E., Michaels, T.E., (1992). Xanthomonas Resistance of Phaseolus Interspecific Cross Selections Confirmed by Field Performance. *HortScience*. 27(4), ss.348-350.
- Siller-Ruiz, M., Hernández-Egido, S., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J.M., Muñoz-Bellido, J.L., (2017). Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 35(5), ss.303-313.
- Singh, S.P. (ed.), (1999). *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*. Dordrecht: Springer Netherlands. <http://link.springer.com/10.1007/978-94-015-9211-6> . (Erişim tarihi: 26 Mart 2019).
- Snowdon, A.L., (1990). *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables Vol.1* Vol. 1 , 2. London: Wolfe Scientific.
- Soylu, S., Dönmez, F., Şahin, F., (2013a). Fasulye Adi Yaprak Yanıklığı İçinde: H. Saygılı, F. Şahin ve Y. Aysan, ed. *Bitki Bakteri Hastalıkları*. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, ss.177-178.
- Soylu, S., Dönmez, F., Şahin, F., (2013b). Fasulye Hale Yanıklığı İçinde: H. Saygılı, F. Şahin ve Y. Aysan, ed. *Bitki Bakteri Hastalıkları*. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, ss.105-106.
- Steel, K.J., (1961). The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool. *Journal of General Microbiology*. 25(2), ss.297-306.
- Taylor, J.D., (1970). The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson. *Annals of Applied Biology*. 66(1), ss.29-36.
- Thornley, M.J., (1960). The Differentiation Of *Pseudomonas* from Other Gram-Negative Bacteria On The Basis Of Arginine Metabolism. *Journal of Applied Bacteriology*. 23(1), ss.37-52.



- Trujillo, G.E., Saettler, A.W., (1979). A Combined Semi-Selective Medium and Serology Test for The Detection of Xanthomonas Blight Bacteria in Bean Seed. *Journal of Seed Technology*. 4(2), ss.35-41.
- TÜİK, (2017). www.tuik.gov.tr . (Erişim tarihi: 12 Mayıs 2019).
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J., (1995). Reclassification of Xanthomonas. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45(3), ss.472-489.
- Yılmaz, S., Duyan, S., Artuk, C., Diktaş, H., (2014). Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları. *TAF Preventive Medicine Bulletin*. 13(5), s.421.
- Young, J.M., Bradbury, J.F., Gardan, L., Gvozdyak, R.I., Stead, D.E., Takikawa, Y., Vidaver, A.K, (1991). Comment on the Reinstatement of Xanthomonas citri (ex Hasse 1915) Gabriel et al. 1989 and X. phaseoli (ex Smith 1897) Gabriel et al. 1989: Indication of the Need for Minimal Standards for the Genus Xanthomonas. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41(1), ss.172-177.

## **EK 1. Besiyerlerinin İçerikleri**

### **NA Besiyeri**(Lelliott ve Stead, 1987)

Nutrient Agar	13,0 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

### **SNA Besiyeri**(Lelliott ve Stead, 1987)

Saccarose	50 g
Nutrient Agar	8 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

### **King B Besiyeri**(King ve ark., 1954)

Proteose Peptone	20,0 g
Gliserin	10,0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	41,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Agar	15,0 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

### **YDCABesiyeri**(Lelliott ve Stead, 1987)

Yeast Extract	10,0 g
Dextrose	20,0 g
Calcium Carbonate	20,0 g
Agar	15,0 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

### **Lugol Eriyiği**

Iyot	1,0 g
Potassium Iyodur (KI)	2,0 g
Distile Su	300 ml

Eldiven kullanılarak, havalandırılabilen bir mekanda hazırlanmıştır.

**Litmus Milk Besiyeri**(Moore ve ark., 2001)

Toz skin milk 100,0 g

Bromcresol purple 4,0 mg

Distile Su 1000 ml

NaOH (1,0 N) ile pH'ı 7,0'a ayarlanmıştır. Birbirini takip eden 3 gün 100°C'de 30 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı : Fatih TEKİN  
Uyruğu : T.C.  
Doğum Tarihi ve Yeri : 16.02.1986/Erdemli  
Medeni Hali : Evli  
Telefon : -  
e-posta : zmfatihTekin@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ/Bitki Koruma	-
Lisans	HRÜ/Bitki Koruma	2013

### İş Denevimi

- Meddata Medical Software 2007
- Donat Tarımsal Danışmanlık 2014
- Balcı Tarımsal Danışmanlık 2015
- Abant İzzet Baysal Üniversitesi 2015

### Katıldığı Kongreler

- IGENS Sarajevo

### Görev Yaptığı Projeler

- Değişik konukçulardan elde edilmiş önemli bitki patojeni funguslar içerisindeki türler arası ve tür içi genetik farklılıkların iPBS-retrotranspozon markörleri ile incelenmesi, ARAŞTIRMA PROJESİ, Araştırmacı, , 11/01/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
- Patateste Siyah Leke Etmeni Colletotrichum coccodes'te Vejetatif Uyum Grupları, ARAŞTIRMA PROJESİ, Araştırmacı, , 13/03/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
- Türkiye Yetiştirilen Tescilli Kuru Fasulye Çeşitlerinin Fungal, Bakteriyel ve Viral Hastalıklara Karşı Dayanıklılık Durumlarının Moleküler Markör Yöntemleri Kullanılarak Tespiti, ARAŞTIRMA PROJESİ, Araştırmacı, , 09/09/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)

- Türkiye'nin en önemli iki domates üretim alanında Phytophthora infestans popülasyonlarının fenotipik çeşitliliği ve patojenisiteleri, ARAŞTIRMA PROJESİ, Araştırmacı, , 09/09/2016 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
- Türkiye'de domatesten elde edilen Phytophthora infestans izolatlarının karakterizasyonu, ARAŞTIRMA PROJESİ, Araştırmacı, , 15/03/2017 (Devam Ediyor) (ULUSAL)

