

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KASTAMONU İLİ PATATES DEPOLARINDA GÖRÜLEN
BAKTERİYEL HASTALIKLARIN BELİRLENMESİ

ÖZGE ÇALIŞKAN PİRCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KASTAMONU İLİ PATATES DEPOLARINDA GÖRÜLEN
BAKTERİYEL HASTALIKLARIN BELİRLENMESİ

ÖZGE ÇALIŞKAN PİRCİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

SAMSUN
2018

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Özge Çalışkan Pirci tarafından hazırlanan “Kastamonu İli Patates Depolarında Görülen Bakteriyel Hastalıkların Belirlenmesi” adlı tez çalışması .././... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Hasan Murat AKSOY
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Üye Doç. Dr. Hasan Murat AKSOY
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım. .././.../2018

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak yazdığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

25/12/2018

Özge Çalışkan Pirci

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KASTAMONU İLİ PATATES (*Solanum tuberosum*) DEPOLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLARIN BELİRLENMESİ

Özge Çalışkan Pirci

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan Murat Aksoy

Gram - pozitif, coryneform grubu *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, tohumluk patates endüstrisi için ekonomik öneme sahip bir hastalık etmenidir. Hastalık etmeni, patates bitkilerinde solgunluğa ve yumruların iletim demetlerinde çürümeye neden olur. Ayrıca, etmen, patates yumrularında uzun süre belirti göstermeksizin latent olarak canlılığını sürdürebilir. Patatesin diğer önemli bakteriyel hastalık etmeni *Dickeya solani*'dir. Pektinolitik özellikteki bu bakteri, patates bitkisinde karabacak ve solgunluk belirtilerine neden olur. Bu çalışmada; 2014 - 2015 yılları arasında Kastamonu İl'inin patates üretiminde en fazla paya sahip olan Kastamonu Merkez köyleri ve Devrekani İlçe 'sindeki patates depolarında survey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Survey çalışmaları ile Kastamonu Merkez köylerinden toplanan 370 yumru örneğinden elde edilen 87 izolattan, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tanı sonucunda; izolatların yaklaşık % 2'sinin *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) ile yaklaşık % 1'inin *Dickeya solani* (Ds) olduğu tespit edilmiştir.

Aralık2018, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: Patates, yumru, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Dickeya solani*

ABSTRACT

Master's Thesis

DETERMINATION OF BACTERIAL DISEASES IN POTATO (*Solanum tuberosum*) STORAGE IN KASTAMONU PROVINCE

Özge Çalışkan Pirci

Ondokuz Mayıs University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan Murat Aksoy

Potato ring rot caused by the gram-positive coryneform bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* is an economically important disease for the potato seed industry. The disease agent causes wilting of potato plants and degradation of vascular tissue in rotting tubers. In addition, it can survive latently in potato tubers for long periods without causing symptoms. Other important bacterial disease agent of potato is *Dickeya solani*. The pectinolytic bacterium causes blackleg and slow wilt symptoms on potato. This study was carried out in potato deposits in Kastamonu central villages and Devrekani districts, which have the largest share of potato production in Kastamonu province, in 2014 - 2015. With the surveys, 87 isolates obtained from 370 tuber samples collected from the Kastamonu Province. The isolates were determined as a result of physiological, biochemical and molecular tests; about 2% of the isolates were *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) and about 1% of *Dickeya solani* (Ds).

December 2018, 54 page

Keywords: Potato, Potato tuber, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Dickeya solani*

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Çalışmamın hazırlanması ve yürütülmesi sırasında bana yol gösteren, yardımcı olan, destek sağlayan danışmanım Sayın Doç. Dr. Hasan Murat AKSOY'a ve arazi çalışmalarında bana yardımcı olan Nebiye Şentürk'e, tez çalışmam boyunca beni yalnız bırakmayan eşim Onur Erdem Pirci' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, zor günlerimde beni yalnız bırakmayan sevgili annem Safiye Çalışkan, sevgili babam Mustafa Çalışkan ve sevgili ablam Gözde Çalışkan Yoldaş'a teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca bana yardımcı olan Bitki Koruma Bölümündeki hocalarıma ve değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Aralık 2018, SAMSUN

Özge Çalışkan Pirci

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> ile İlgili Çalışmalar	7
2.2. <i>Dickeya solani</i> ile İlgili Çalışmalar.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Survey Çalışmaları.....	15
3.2. İzolasyon Çalışmaları.....	17
3.3. Tanılama	18
3.3.1. Biyokimyasal ve fizyolojik tanılama	18
3.3.1.1.Gram boyama testi	18
3.3.1.2. KOH testi	19
3.3.1.3. Katalaz testi.....	20
3.3.1.4. Oksidatif - Fermentatif testi	20
3.3.1.5. Jelatini eritme testi	21
3.3.1.6. Floresan pigmentasyon testi.....	21
3.3.1.7. Oksidaz testi.....	22
3.3.1.8. Arginin dehidrolaz aktivitesi testi	22
3.3.1.9. Eskulinin hidrolizi testi	23
3.3.1.10. Fosfataz testi	23
3.3.1.11. İndol oluşumu testi.....	24
3.3.1.12. Karbon kaynaklarının kullanımı testi.....	24
3.3.1.13. İzolatların 37 - 39 °C’de gelişimi testi	25
3.3.2. Patateste pektinolitik aktivite testi	25
3.3.3. Tütünde aşırı duyarlılık testi	25
3.3.4. Patojenisite testi	26
3.3.5. Moleküler tanılama	26
4. BULGULAR.....	29
4.1. Survey Çalışmaları.....	29

4.2. İzolasyon Çalışmaları.....	29
4.3. Tanılama	30
4.3.1. Biyokimyasal ve fizyolojik tanılama	30
4.3.1.1. Gram boyama testi	30
4.3.1.2. KOH testi	31
4.3.1.3. Katalaz testi.....	31
4.3.1.4. Oksidatif – Fermantatif testi	32
4.3.1.5. Jelatini eritme testi	33
4.3.1.6. Floresan pigmentasyon testi.....	33
4.3.1.7. Oksidaz testi.....	33
4.3.1.8. Arginin dehidrolaz aktivitesi testi	34
4.3.1.9. Eskulinin hidrolizi testi	34
4.3.1.10. Fosfataz testi	34
4.3.1.11. İndol oluşumu testi.....	35
4.3.1.12. Karbon kaynaklarının kullanımı testi.....	35
4.3.1.13. İzolatların 37 - 39 °C’de gelişimi testi	36
4.3.2. Patateste pektinolitik aktivite testi	37
4.3.3. Tütünde aşırı duyarlılık testi	37
4.3.4. Patojenisite testi	38
4.3.5. Moleküler tanılama	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGE VE KISALTMALAR

SİMGELER

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
da	Dekar
G	Gram
ha	Hektar
kb	Kilobaz
L	Litre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
rpm	Rotation per minute
µl	Mikrolitre

KISALTMALAR

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
FAO	Food and Agriculture Organization
Gram (-)	Gram Negatif
Gram (+)	Gram Pozitif
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidrojen Klorür
KCl	Potasyum Klorür
KOH	Potasyum Hidroksit
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NGA	Nutrient Glukoz Agar
NH ₄ H ₂ PO ₄	Amonyum Fosfat
O ₂	Oksijen
PCR	Polymerase Chain Reaction
REP - PCR	Repetative - Polymerase Chain Reaction

rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
TBE	Tris Borik Asit EDTA
T��K	Türkiye İstatistik Kurumu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Patates üretiminin dünyada dağılımı	2
Şekil 3.1.	Kastamonu'nun survey yapılan ilçeleri	15
Şekil 3.2.	Hastalıklı yumru örnekleri.....	17
Şekil 4.1.	Tütünde aşırı duyarlılığa ve patatestek nekrotik lekelenmeye yol açan izolatların kolonileri: a) <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (CmsMo4), b) <i>Dickeya solani</i> (DsAB7).	30
Şekil 4.2	KOH testi: a) <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (CmsMo4)'un negatif reaksiyonu, b) <i>Dickeya solani</i> (DsAB7)'nin pozitif reaksiyonu.....	31
Şekil 4.3.	Katalaz testi: a) Negatif reaksiyon; b) Pozitif reaksiyonu.....	32
Şekil 4.4.	Oksidatif-Fermentatif Testi: a) <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (CmsMo4)'un aerobik gelişimi; b) <i>Dickeya solani</i> (DsAB7)'nin fakültatif anaerobik gelişimi.....	32
Şekil 4.5.	Jelatin eritme testi.....	33
Şekil 4.6.	Oksidaz testi: a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon	33
Şekil 4.7.	Arginin dehidrolaz testi; Negatif reaksiyon.	34
Şekil 4.8.	Eskulinin hidrolizi testi: a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon	34
Şekil 4.9.	Fosfataz testi; a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon.....	35
Şekil 4.10.	İndol oluşumu testi; a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon	35
Şekil 4.11.	Karbon kaynakları kullanım testi: a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon.....	36
Şekil 4.12.	NGA'da 39 °C'de gelişen DsAB7'nin koloni gelişimi	36
Şekil 4.13.	Pektinolitik aktivite testi; a) Negatif kontrol, b) DsAB7 izolatının pozitif reaksiyonu.	37
Şekil 4.14.	Tütün bitkisi yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu.....	37
Şekil 4.15.	Patates bitkisi yapraklarında patojenisite testi; a) Negatif kontrol, b) Nekrotik alan oluşumu.....	38
Şekil 4.16.	PSA1/PSAR ve ADE1/ADE2 primer çiftleri ile yapılan PCR analiz ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünyada en fazla patates üreten ülkeler (Anonymous, 2018)	3
Çizelge 1.2. Türkiye’de patates üretimi yapan illere ait veriler (Anonim, 2018a)	4
Çizelge 3.1. Kastamonu ili patates üretim verileri (Anonim, 2018b).	16
Çizelge 3.2. Besiyerleri ve içerikleri.....	18
Çizelge 3.3. İzolatların tanısında kullanılan primer çiftleri	26
Çizelge 4.1. Elde edilen izolatlar (survey çalışmasının yapıldığı ilçe ve köylerden)	29
Çizelge 4.2. İzolatların biyokimyasal, fizyolojik ve patojenisite ile ilgili tanı testi sonuçları.....	40



1. GİRİŞ

Peru'nun And Dağları'nda sekiz bin yıl önce yaşayan İnka'ların üretime aldığı patates, 16 yüzyıldan sonra Avrupa'ya getirilmiş ve üretim açısından tahıllardan sonra 4. sırayı almıştır (Yıldırım ve Yıldırım, 2002).

Patates, Kanada adalarından Avrupa'ya ilk olarak Belçika'nın Anvers (1567) ve Fransa'nın Rouen (1574) limanlarından giriş yapmıştır. Patatesin Avrupa'da benimsenmesi, yetiştirilmesi ve tüketilmesi uzun zamanlar içerisinde olmuştur. Bunun nedeni patatesin çeşitli hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir. Örneğin; cevizin girintili çıkıntılı olması beyne benzediği düşünülerek akıl hastaları tedavisinde kullanılacağı düşünülürken, patates yumrularının farklı renklerde ve düzgün olmayan, eğri bükü oluşundan dolayı patateslerin cüzzam hastalığına neden olduğuna inanılmıştır. Daha sonra diğer Avrupa ülkelerinde patates botanik bahçelerinde ve süs bitkisi olarak yetiştirilmeye başlanılmıştır (Çetiner, 2016).

Patatesin ülkemizde ise Rusya ve Kafkaslar üzerinden getirilip Doğu ve Karadeniz yayla ikliminde yetiştirilmeye başlandığı bilinmektedir (İlisulu, 1986).

Günümüzde patates üretim alanları deniz seviyesinden 4.000 m yüksekliğe, 70. kuzey enleminden 50. güney eylemine kadar çok geniş bir alana yayılma göstermiştir (Hawkes, 1992). Böylesine geniş bir adaptasyon alanına sahip olan patates bitkisi aynı zamanda çevresel değişimlere de oldukça hassas olup, aynı çeşitler bile farklı çevre koşulları altında verim ve kalite özellikleri açısından büyük farklılıklar gösterebilmektedir (Çalışkan vd, 1999).

Dünyada yaygın olarak kültürü yapılan patates bir ılıman - serin iklim bitkisi olup bitki gelişimi ve verimi açısından en uygun sıcaklık aralığı 17 - 21 °C arasındadır (Struik ve Ewing, 1995). Sıcaklığın optimum değerlerin üzerine çıkması, patates bitkisinde bitki büyümesi ile verim ve kalite oluşumunu belirleyen, birbiriyle ilişkili birçok farklı fizyolojik işlevi önemli derecede etkilemektedir (Levy ve Veilleux, 2007).

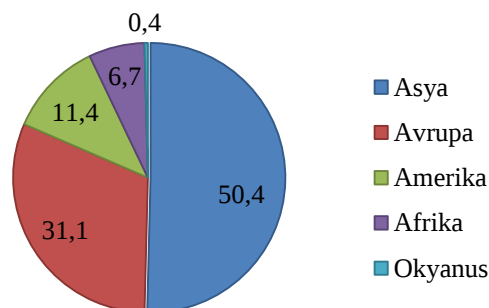
Patates, içerdiği karbonhidratlar, mineral maddeler ve vitaminler bakımından insanların dengeli beslenmesinde önemli bir yere sahip olan, dört önemli bitkisel kaynak (buğday, mısır, çeltik, patates) arasındadır (Anonymous, 2009).

Doğrudan insan beslenmesinde kullanıldığı gibi, son yıllarda gıda sanayi de ve çok değişik alanlarda da işlenerek değerlendirilmektedir (Anonymous, 2008). Yumrularında, nişasta halinde karbonhidrat, protein, vitaminler ve demir gibi önemli besin maddelerini içeren patates, insanlar tarafından mutfaklarda doğrudan tüketildiği gibi, işlenerek değişik şekillerde de (cips, parmak patates vs.) tüketilmektedir. Ayrıca, ekmeklik una belirli oranda (% 2,5 – 3,0) patates unu karıştırıldığında, ekmeklerin lezzetini artırarak bayatlamayı geciktirmektedir. Yüksek oranda nişasta içeren çeşitler, endüstride ham madde (un, nişasta, alkol, vs.) olarak ve bir kısmı da (ıskartalar) hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Arioğlu, 2002).

Ülkemizde geniş alanlarda tarımı yapılan patatesin ihracatımızda da önemli bir payı vardır. Yumruları, % 20 - 30 oranında nişasta, % 2 oranında protein, B1, B2 ve C vitaminleri ve bazı mineral maddeler içermektedir. Bu nedenle endüstri ham maddesi olarak ve insan beslenmesindeki kullanımı açısından tahıllardan sonra gelen önemli bir kültür bitkisidir (Alisdair vd, 2001).

Patates ucuz olması, birim alanda fazla verim sağlaması, yüksek besin değerine sahip Doğu Anadolu Bölgesi'nde, özellikle de İç Anadolu Bölgesi'nde önemli bir geçim kaynağıdır. Akdeniz Bölgesi'nde turfanda yetiştiriciliğide yapılmaktadır. Bu sebeple yüksek gelir getiren bir sebzedir. Üretilen diğer patatesler hem iç piyasada tüketilir hem de başta Ortadoğu ülkelerine ve birçok diğer ülkelere ihraç edilmektedir (Elçi vd, 1994).

Dünya patates üretiminin % 50,4'ünü Asya, % 31,1'ini Avrupa, % 11,4'ünü Amerika, % 6,7'sini Afrika ve % 0,4'ünü Okyanus ülkeleri gerçekleştirmektedir (Şekil 1.1) (Anonymous, 2018).



Şekil 1.1. Patates üretiminin dünyada dağılımı

Dünya’da 2015 ve 2016 yıllarında patatesin üretim miktarları Çizelge 1.1’de verilmiştir. Bunun sonucunda dünyada en fazla patates üretimi yapan ülkeler arasında Çin, Hindistan ve Rusya Federasyonu olduğu görülmektedir. Üretim açısından Türkiye ise 2015-2016 yıllarında toplam 9.510.000 ton üretimi ile 15.sırada yer almaktadır (Anonymous, 2018).

Çizelge 1.1. Dünyada en fazla patates üreten ülkeler (Anonymous, 2018)

Ülke	Üretim (ton)		Verim (hg/ha)		Hasat Edilen Alan (ha)	
	2015	2016	2015	2016	2015	2016
Çin	94.916.653	99.122.420	171.935	170.456	5.520.485	5.815.140
Hindistan	48.009.000	43.770.000	231.257	205.493	2.076.000	2.130.000
Rusya	33.645.799	31.107.797	159.337	153.176	2.111.613	2.030.858
Ukrayna	20.839.270	21.750.290	161.420	165.830	1.291.000	1.311.600
ABD	20.012.720	19.990.950	469.000	490.203	426.710	407.810
Almanya	10.370.200	10.772.100	438.116	444.210	236.700	242.500
Bangladeş	9.254.285	9.474.099	196.476	199.162	471.013	475.699
Polonya	6.313.669	8.872.445	210.207	284.720	300.355	311.620
Hollanda	6.651.692	6.534.338	427.319	419.961	155.661	155.594
Fransa	7.119.837	6.834.680	425.052	390.052	167.505	175.225
Belarus	5.995.298	5.985.810	193.630	204.712	309.626	292.401
İngiltere	5.588.000	5.373.000	433.178	386.547	129.000	139.000
İran	5.140.623	5.164.891	320.854	319.272	160.217	161.771
Mısır	4.955.445	5.029.022	269.646	272.440	183.776	184.592
Türkiye	4.760.000	4.750.000	309.489	328.252	153.802	144.706

Ülkemizde 2015 yılında en fazla 227.466 dekar alanda 674.773 ton patates üretimi ile Niğde ili 1. Sırada yer almıştır. Kastamonu ise 2015 yılında 8.004 dekar alanda 19.558 ton patates üreterek 30.sırada yer almıştır. 2016 yılında patates 237.851 dekar alanda 892.297 ton üreterek yine Niğde ilk sırada yer almıştır. Kastamonu ise 8.109 dekar alanda 21.569 ton üreterek 2016 yılında Türkiye’ de en çok patates üretimi yapılan iller arasında 29. sırada yer almıştır (Anonim, 2018a).

Çizelge 1.2. Türkiye’de patates üretimi yapılan illere ait veriler (Anonim, 2018a)

İller	2015			2016		
	Ekilen alan (da)*	Üretim (ton)	Verim (kg/da)	Ekilen alan (da)*	Üretim (ton)	Verim (Kg/da)
Erzurum	33.244	78.516	2.362	31.293	72.173	2.306
Erzincan	2.318	3.450	1.488	2.436	4.135	1.799
Bayburt	10.420	23.457	2.251	12.302	28.564	2.322
Ağrı	1.107	1.416	1.279	632	765	1.210
Kars	61.712	152.010	2.463	742	1.629	2.235
Van	2.326	6.602	2.849	2.460	6.652	2.714
Bitlis	53.859	212.490	3.945	45.159	163.992	3.631
Gaziantep	1.257	4.485	3.568	871	3.350	3.846
Adıyaman	1.209	2.854	2.361	825	1.953	2.367
Kırklareli	1.251	2.317	1.852	1.133	2.021	1.784
Balıkesir	2.586	6.475	2.504	2.260	5.431	2.403
İzmir	114.671	407.745	3.556	104.974	367.706	3.503
Aydın	2.998	6.238	2.329	2.799	6.715	2.399
Muğla	9.417	27.074	2.875	9.006	29.961	3.327
Afyon	149.424	434.929	2.911	139.958	476.900	3.407
Kütahya	8.330	11.889	1.442	10.949	28.664	2.618
Uşak	3.580	11.501	3.213	3.850	12.165	3.160
Bursa	14.342	35.005	2.441	13.123	30.936	2.357
Eskişehir	14.119	45.228	3.203	15.750	49.492	3.184
Sakarya	1.976	5.487	2.777	1.674	4.729	2.825
Bolu	90.422	249.603	2.761	84.603	226.919	2.682
Ankara	1.651	5.803	3.515	2.310	8.012	3.468
Konya	126.780	493.748	3.895	135.824	549.802	4.075
Karaman	9.375	28.857	3.078	9.123	28.027	3.072
Antalya	10.739	26.181	2.438	6.303	14.887	2.362
Isparta	4.037	10.258	2.572	3.477	8.861	2.548
Burdur	2.816	6.605	2.346	2.576	6.453	2.505
Adana	58.011	219.221	3.779	61.306	221.397	3.611
Mersin	2.148	7.123	3.316	2.026	6.572	3.244
Hatay	16.927	70.231	4.149	26.513	109.961	4.147

Çizelge 1.2. Türkiye’ de patates üretimi yapılan illere ait veriler (devamı)

İller	2015			2016		
	Ekilen alan (da)*	Üretim (ton)	Verim (kg/da)	Ekilen alan (da)*	Üretim (ton)	Verim (Kg/da)
Nevşehir	69.901	301.039	4.307	58.856	255.773	4.346
Kırşehir	1.136	4.503	3.964	998	3.136	3.142
Kayseri	77.007	287.835	3.738	84.931	305.470	3.597
Sivas	76.702	263.167	3.431	69.434	202.524	2.917
Yozgat	6.969	25.476	3.656	8.628	29.613	3.432
Bartın	1.809	3.170	1.752	1.715	2.986	1.741
Kastamonu	8.004	19.558	2.465	8.109	21.569	2.663
Çankırı	2.620	5.782	2.207	2.206	4.806	2.179
Samsun	11.189	24.918	2.227	7.981	17.488	2.191
Tokat	29.236	70.764	2.421	28.282	67.902	2.401
Çorum	16.074	37.734	2.348	12.155	41.821	3.441
Amasya	5.442	18.405	3.382	5.446	18.105	3.324
Trabzon	33.723	38.689	1.149	33.174	46.487	1.404
Ordu	20.148	25.753	1.278	18.921	23.180	1.225
Giresun	11.355	13.801	1.215	10.181	11.820	1.176
Artvin	12.752	15.098	1.184	11.774	16.941	1.439
Gümüşhane	22.005	46.387	2.108	19.144	43.862	2.291
K.maraş	7.710	14.356	1.862	8.894	18.595	2.091
Aksaray	69.425	242.302	3.490	66.854	210.959	3.158
Niğde	227.466	674.773	2.966	237.851	892.297	3.751

*Çizelgede 1000 dekardan fazla ekim alanına sahip illere yer verilmiştir.

Ülkemizde patates üretiminin en fazla yapıldığı iller arasında Niğde, Nevşehir, Adana, İzmir, Afyon, Bolu, Ordu, Nevşehir, Niğde, Giresun, Kayseri, Trabzon, Aksaray, Erzurum gelmektedir. Üretimin çok olduğu bu illerde 2001 yılından itibaren patatesten en büyük sorun patates siğili hastalığı (*Synchytrium endobioticum*) olmuştur. Karantinaya tabi olan bu hastalık Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından saptanan bölgelerde güvenlik kuşağına alınmaktadır (Günaçtı ve Erkılıç, 2010).

En önemli patates bakteriyel hastalık etmenleri arasında; *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum* ve *Streptomyces scabies* dünya genelinde risk teşkil etmekte olup, EK1-B karantina listesindedir. *Pectobacterium* ve *Dickeya* spp. etmenleri ise risk sırasında bu etmenlerden daha sonra gelmektedir. Patates üretiminde önemli ürün kayıplarına neden olan hastalıklar arasında bakteriyel hastalıklar gelmektedir. Bu hastalıklara neden olan etmenler arasında; karabacak ve yumuşak çürüklük hastalık etmenleri; *Dickeya dianthicola*, *D. solani*, *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *brasilinse*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *P. parmentieri*, Bakteriyel halka çürüklüğü hastalık etmeni; *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Kahverengi çürüklük etmeni; *Ralstonia solanacearum*, Uyuz hastalık etmeni *Streptomyces* spp. (en önemlisi *Streptomyces scabies*) olarak bilinmektedir (Sawyer, 1984). Dünya genelinde riskli olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum* ve *Streptomyces scabies* ise karantina listesinde yer almaktadır. Bu riskleri sahip diğer hastalık etmenleri *Pectobacterium* ve *Dickeya* spp. ise daha sonra gelmektedir. (Van der Wolf ve De Boer, 2007).

Bu çalışmada, Kastamonu ili merkez köylerinde ve Devrekani ilçesinde patates yetiştiriciliği yapılan köylerdeki -depolardan alınan- yumru örneklerinden elde edilen bakteriyel izolatların fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testlerle tanıları yapılarak bölgedeki bakteriyel hastalıkların tespiti amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ile İlgili Çalışmalar

Patates bakteriyel halka çürüklüğü hastalığı ilk olarak 1905'te Almanya'da görülmüştür (Appel, 1906) ve *Bacterium sepedonicum* etmeninden ismini almıştır (Spieckermann ve Kotthoff, 1914). 1932'de hastalık belirtisi Norveç' te raporlara geçmiştir (Jorstad, 1932) ve 1956 yılından önce İsveç'te tohumluk patateslerde ve depolarda yaygın olarak görülmüştür (Olsson, 1976). Fransa' da 1934 yılında hastalık tanımlanmış fakat uzun bir süre etmenin '*Verticillium*' olarak kayıtlara yanlış şekilde geçmiştir (Lansade, 1942). ABD'de ise ilk olarak 1932 yılında Maine'de, 1936 yılında Wisconsin'de ve 1938 yılında Wyoming ve Colorado'da hastalığın varlığı rapor edilmiştir (Starr ve Riedl, 1941). 1939 yılına kadar hastalık 27 eyalette ve 1948 yılında ise ABD'nin 45 eyaletinde görüldüğü rapor edilmiştir (Baribeau, 1948).

Hastalık etmeninin sistematikteki yeri ise şu şekildedir:

Alem:	Bacteria
Şube:	Actinobacteria (phylum)
Sınıf:	Actinobacteria
Takım:	Actinomycetales
Familiya:	Microbacteriaceae
Cins:	<i>Clavibacter</i>
Tür:	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (Spieckermann ve Kotthoff, 1914) Davis et al.

C. michiganensis subsp. *sepedonicus* 0.4 - 0.6 x 0.8-1.2 µm boyutunda, gram pozitif, hareketsiz bir bakteridir. Etmenin optimum gelişme sıcaklığı 21°C olup, yavaş gelişen bir bakteridir. Etmen, petrilere 21 - 24 °C'de yaklaşık 10 günde gelişir. Petrilere gelişen koloniler krem renklidir ve iğne ucu büyüklüğünde kubbemsi şekilde gelişir (Anonim, 2009; Anonim, 2011a).

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* doğal yolla enfeksiyon oluşturan en önemli ve tek konukçusu patatestir. Bunun yanı sıra doğal olarak belirti

göstermeden şekerpancarında da görülmektedir (Bugbee ve Gutmestad, 1988). Aynı zamanda daha doğrulanmamış bir rapora göre, bakterinin konukçuları arasında *Solanum sarrachoides* olabileceği düşünülmektedir (Zizz ve Harrison, 1991). Bazı raporlarda, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un bazı yabancı otlarda belirtiler gösterdiği görülmüştür. Knorr (1948), birçok bitki türlerine kök inokülasyonu yapmış ve belirtiler gösterenleri şu şekilde sıralamıştır: *Althenaea* sp., *Solanum lycopersicum* (domates), *S. antipoviczii*, *S. ballsii*, *S. chacoense*, *S. citrullifolium*, *S. commersonii*, *S. corymbosum*, *S. demissum atypicum*, *S. endlicheri*, *S. fendleri*, *S. jujuyense*, *S. melongena*, *S. mammosum*, *S. pampasense*, *S. parodii*, *S. radicans*, *S. tequilense*, *S. tlaxcalense*, *S. vavilovii*, *S. verrucosum*, *S. warscewiczii* ve *S. tuberosum*. Slack (1987), bazı bitki türlerini (potansiyel) alternatif bir konukçu olarak belirtmiştir fakat aşılama ve test edilme aşamalarını belirtilmemiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*, tohumlu patateslerin ekilmesiyle ve bulaşık depoların, ekipmanların, konteynırların varlığı ile yayılmaktadır. Eğer tohumluk olarak seçilen patatesler dikimden önce kesilirse ve bulaşık olan yumruların kesilmesinde kullanılan aletler dezenfekte edilirse yayılma önenebilir. Aksi taktirde etmen 20 - 30 civarında sağlıklı yumrulara da bulaşarak önemli bir yayılmaya neden olabilmektedir. *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ile enfekte olan yumrular diğer yumrulara doğrudan temas yoluyla ya da patateslerin temas ettiği makine ve diğer ekipmanların kirlenmesiyle yayılma gösterir. Bulaşık yumruların yayılmasında sınıflandırma makineleri ve nakliye kamyonları önemli yayılma alanları arasındadır. Tarladaki ekim alanlarında kullanılan aletler bu yayılıma göre genellikle daha düşüktür (Mansfeld - Giese, 1997). *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*'un böceklerle bulaşılabilmesine dair bir rapor yoktur (Christie vd,1991). Enfekteli yumrular bir alanda ekilmeden kendiliğinden bitebilir ve bu da enfeksiyon kaynağı olabilmektedir.

C. michiganensis subsp. *sepedonicus*, Avrupa iklim şartlarında belirtileri nadir ya da mevsim sonunda sıklıkla ortaya çıkar. Etmenin belirtileri çoğu zaman kendini göstermez, maskelenir. Belirtiler mekanik zararlar ve yaşlanmalarla karıştırılabilir. Bundan dolayı tarlada yapılan kontrollerde etmenin varlığı görülmeyebilir. Patateste kahverengi çürüklüğün (*Ralstonia solanacearum*) solgunluk belirtileri ile karıştırılabilir. Hastalık etmeninden dolayı meydana gelen solgunluk, ilk yaprak kenarlarında başlar ve yavaş gelişim gösterir. Genç yapraklarda enfekte olmuş

bölümlerde gelişme yavaşlar ve enfekte olmamış bölümlerde gelişme devam eder. Bu durum yapraklarda deformasyonlara neden olmaktadır. *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, patatesin iletim demetlerinin tıkanmasına neden olarak yaprağın sap kısmında sarımsı turuncu renkte klorotik bir gelişme gösterir. Daha sonra enfekte olmuş yaprak, sap ve yaprakçıklar ölür. Etmenin yaprakların ve yumruların büyümelerinde azalma meydana getirir ve bitkilerde cüceleşme meydana gelir.

C. michiganensis subsp. *sepedonicus*, patates yumrularında ilk olarak yumrunun göbek (yumrunun stolana bağlandığı nokta) kısmına yakın iletim demetinde şeffaf bir şekilde ve yumuşak olmayan, normalden daha koyu bir renk değişimine neden olur. Ayrıca iletim demetlerinde sarımsı renkte yapıların varlığı ile yumruları hafif bir şekilde sıkılması sonucunda peynir gibi yapıların oluşması, hastalığın ilk belirtileri arasındadır. Zamanla iletim demetleri kahverengileşir ve bu belirti yapraklarda solgunluk belirtisi gibi patatesteki kahverengi çürüklük (*R. solanacearum*) belirtisi ile karıştırılabilir. İletim demetlerindeki kahverengileşme başlangıçta göbek bölümünün yakinken zamanla tüm iletim demetine yayılır ve etmen hızla çoğalır. Zamanla iletim demetleri tahrip olur ve dış kısım iç kısmından kabuğa yakın yerden ayrılır. Etmen daha ileri safhalarda yumruların yüzeyinde çatlaklara neden olur. Bu çatlaklar kırmızımsı kahverengi rengindedir. Avrupa’da son yıllarda yapılan araştırmalarda etmenin iletim demetlerinde gösterdiği belirti ile yumruların ortasında gösterdiği çürüklük aynı anda görülmüştür. Son zamanlarda Avrupa’da birçok kez iletim demetlerinde oluşan belirti ve yumrunun ortasında çürüklüklerin olduğu belirtiler bir arada gözlenmiştir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* etmeni fungal ve ikincil olarak gelişen bakteriyel enfeksiyonlar tarafından kendini göstermeyebilir. Aynı zamanda diğer yumru ve halka çürüklüklerinden ayırt etmek oldukça zordur (Anonim, 2011a).

C. michiganensis subsp. *sepedonicus*’ un ülkemizdeki mevcut durumu ile ilgili ilk kayıt Bremer vd (1947)’e aittir ve etmenin Adapazarı’nda bulunduğunu bildirmiştir.

Karel ve Karahan (1962)’ ın yaptıkları çalışmada hastalığın Nevşehir ve Ürgüp orijinli patates yumrularında Ankara’da bir depoda % 37.47, Ankara kaynaklı patateslerde % 15.16 – 29.04 oranında tahribe sebep oldukları rapor edilmiştir. 1981 - 1983 yıllarında yapılan survey çalışmalarında patates hastalıkları incelenmiş ve

halkalı çürüklük hastalığının Türkiye’de bulunmadığı rapor edilmiştir (Turkensteen, 1985).

İç Anadolu bölgesinde 1988 ve 1989 yıllarında patateslerde *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* kaynaklı patates halka-çürüklüğü hastalığının tespiti için seçici özel ortamlar kullanılarak araştırılmıştır. Orta ve Doğu Anadolu bölgesinde 2007 yılında çiftçilerden alınan 200 yumru örneğinin 90’ında *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*’un varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca her numunenin yaklaşık olarak 50 yumrusunda yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium* spp. olduğu kayıt edilmiştir (Benlioglu vd. 1991).

Dünyada patates ticaretini etkileyen ve bütün ülkelerde toleransı sıfır olan patates halka çürüklüğü hastalığı çok tehlikeli ve önemli bir hastalıktır. Daha önceki yıllarda, Türkiye’de simptomlar göz önüne alınarak varlığı belirtilen hastalık, patates ihracatında zorluklara neden olmuştur. Avrupa Topluluğu ve EPPO / OEPP tarafından yürütülen bu çalışmada hastalığın gerçek durumu ve ihracattaki sorunlar önlenmeye çalışılmıştır. Ege bölgesinden 65 örnek incelenmiş ve Hollanda (18), Almanya (5) ve Kanada’dan (12) ithal edilen patates tohumlarından alınan 35 örnek alınmıştır. Bu çalışmada indirekt immünofloresan (IF) yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmanın 100 örneğinin *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*’un hem belirgin hem de latent enfeksiyonu açısından temiz olduğu belirlenmiştir (Demir ve Gündoğdu, 1991).

Kayseri’de 2007 yılında tohumluk olarak alınan 336 yumru örneğin de halkalı leke ve kahverengi çürüklük hastalıklarının varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda üç örnekte *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* için pozitif sonuç verdiği tespit edilmiş ve etmen Türkiye’de ilk rapor olarak kaydedilmiştir. Etmen Türkiye’de karantina listesindedir (Altundag vd, 2009).

2.2. *Dickeya solani* ile İlgili Çalışmalar

Bilinen en eski *Dickeya solani* ırkı ilk olarak sümbülünden izole edilmiştir (Parkinson vd, 2015). 2013 yılında *Dickeya solani* Çin’in Ningbo Limanında Hollanda’dan ihraç edilen hastalıklı *Hyacinthus orientalis* soğanlarında görülmüştür (Chen vd, 2015).

2004’ten beri *D. solani* enfekteli patates tohumları ticaretiyle 5 yıldan az bir süre Avrupa ve İsrail’e yayılmıştır (Toth vd, 2011).

Polonya’da ise 2005 yılında *D. solani* ilk olarak görülmüştür (Slawiak vd, 2009). Kaynağın Hollanda’dan ithal edilen patatesler olduğu tahmin edilmekteydi. Polonya’da patates tarlalarında ve su kaynaklarında 2009 - 2013 yılları arasında geniş bir araştırma yapılmış ve bu çalışma sonucunda *D. solani*’nin varlığı rapor edilmiştir. Yaz aylarının sıcak ve kuru geçtiği dönemlerde etmenin yoğunluğunun arttığı da rapor edilmiştir. Aynı çalışmada su kaynaklarında etmene rastlanılmadığı belirtilmiştir (Potrykus vd, 2016).

Norveç’te ise ilk kez 2012 yılında, ithal tohumdan yetiştirilen patateslerde *D. solani*’nin varlığına rastlanmıştır (Van der Wolf ve Bergsma Vlami, 2013). 2010 yılında İskoçya’da bir izleme programı ile *Dickeya* spp. görülmüştür (Cahill vd, 2010). Türkiye’de ise 2016 yılında Amasya’da patates yetiştirilen alanlardan *D. solani* ilk kez tespit edilmiştir (Ozturk ve Aksoy, 2017).

Hastalık etmeninin sistematikteki yeri ise şu şekildedir:

Alem:	Bacteria
Şube:	Proteobacteria
Sınıf:	Gammaproteobacteria
Takım:	Enterobacteriales
Familya:	Enterobacteriaceae
Cins:	<i>Dickeya</i>
Tür:	<i>Dickeya solani</i>

Dickeya solani peritrik kamçılı, hareketli, fakültatif anaerob ve gram negatif bir bakteridir. Etmen pektolitik enzimlerinden dolayı hücrelerdeki hücre duvarındaki pektik maddeleri ve orta lameli parçalayarak doğal açıklıklardan, yaralardan giriş yapmaktadır. Hastalık etmeninin optimum gelişme sıcaklığı 23 - 27° C, maksimum gelişme sıcaklığı ise 36-42° C’ dir (Anonim, 2015). *D. solani* hücreleri 1 - 3 µm boyutunda ve çubuk şekillidir (Perombelon ve Kelman, 1980; Agrios, 1997; Charskowski, 2006). Karbonhidratları aside fermante ederek nitratı nitrite indirgerler (Graham, 1964).

D. solani ‘nin birincil konukçusu patatestir. Aynı zamanda *D. solani* ‘nin konukçuları arasında *Hyacinthus orientalis* (sümbül) ve İsrail’de yaygın olarak

görülen *Cyperus rotundus* bulunmaktadır (Tsrör vd, 2010). *D. solani*, bugüne kadar yapılan tüm patates çeşitlerinde en azından bir dereceye kadar duyarlılık göstermiştir. Rouffiangue vd (2013), sera denemelerinde araştırılan altı çeşit arasında (Agria, Arinda, Charlotte, Innovator, Lady Claire ve Victoria) en duyarlı patates çeşidini Agria olarak not etmişlerdir.

Yumuşak çürüklük etmeni olan *D. solani*, rüzgar ve yağmur gibi atmosferik etkenlerle veya böceklerle, uzaktaki diğer sağlıklı bitkilere taşınabilir (Mc Carter-Zorner vd, 1985; Harrison vd, 1987). Bunun yanında farklı bölgelerde tohumluk patatesler, hastalığın taşınmasında ana nedenlerden biri olarak görülmektedir. Aynı zamanda etmenin konukçuları da hastalığın yayılmasında önemli bir etkidir. Bu nedenle etmenin; hem konukçuları ile hem de yabancı otlar aracılığı ile taşınma ile temiz alanlara yayılması, oldukça önemli bir problemdir (Toth vd, 2011).

Patates bitkisinde karabacak hastalığı olarak bilinen *Dickeya* spp. yumrularda yumuşak çürüklük, gövde çürüklüğü ve gövde ıslak çürüklüğü hastalıklarına neden olurlar (Czajkowski vd, 2015). Patateste sap kısmında tarla döneminde meydana gelen belirtiler karabacak olarak isimlendirilir. Patateste karabacak hastalığının en tipik semptomu; nemli koşullarda yumrudan gövdeye kadar yayılan siyah çürüklükler, sümüksü ve ıslak bir görünümüdür. Fakat etmen hava değişikliğinde özellikle kuru havada yapraklarda ve gövdede sarılık, solma, bodurluk ve kuruma olarak kendini göstermektedir. Tohum kökenli olmayan gövde çürüklüğü; böcek, mekanik zararlar ve dolu sonucunda yapılan yağmurlama sulama ile gövdenin üst kısmından aşağıya doğru yayılan çürüklük olarak tarif edilir (Perombelon ve Kelman, 1980).

D. solani; yumrulara stolon, lentisel ve yaralardan girerek tarladaki patateslerde enfeksiyona neden olur. Enfekteli patates yumrularına temas edildiğinde yumuşaklık hissedilir ve dokular krema yoğunluğundadır (Perombelon, 1974; Shroeder, 2003). Yumrulardaki yumuşak dokular hava yoluyla siyah renge döner ve çürükçül organizmaların oluşmasıyla kötü bir koku oluşur. Yumuşak çürüklük semptomları yeni bitkiden çıkacak yavru yumrularda da görülebilir. Etmenin enfeksiyon şiddetine bağlı olarak belirtilere ya da latent enfeksiyonlar gözlenebilir (Tsrör vd, 2009; Czajkowski, 2011). Hastalık etmeni, fakültatif anaerob bir bakteri olduğundan yüksek nemli ortamlarda ve düşük oksijenli ortamlarda hızla yayılma gösterir (Perombelon ve Van der Wolf, 2002).

Tohum kökenli olan patates karabacak hastalığı, bitkilerde solmalara, gövdelerde kararmalara ve yumrulara çürümelere sebep olurlar (Tsrör vd, 2009). Erlich vd (2012), 100 hektar alanda 3 çeşit üzerinde Gürcistan'da karabacak hastalığını incelemiştir. *Dickeya* spp. 2008 yılının bahar mevsiminde Hollanda ve Almanya merkezli patates bitkilerinde ve yumrularında belirlenmiş ve etmenin varlığının tespiti için İsrail'e gönderilmiştir. Yapılan izolasyonlar sonucu CVP besi ortamında pektolitik izolatların *Dickeya* spp.'ye ait olduğu belirlenmiştir. Nassar vd (1996), yapılan PCR sonucunda spesifik pelADE primerleriyle *Dickeya* cinsinde olduğunu belirlemişlerdir. İzolatların biyokimyasal testleri sonucunda da biovar 3 olduğu rapor edilmiştir (Palacio - Bielse vd, 2009). *Dickeya* biovar 3 Avrupa'da hızla hakim olmaya başlamıştır ve Gürcistan'da yayınlanan ilk rapor olmuştur (Laurila vd, 2008).

D. dianthicola ve *D. solani*; patatesten simpton gösterirken, *D. zeae* ve *D. chrysanthemi* su kaynaklarından izole edilmiştir. *Dickeya* spp.'nin Orta Avrupa'da ılıman iklime sahip patates yetiştirilen bölgelerden yıllarca izole edildiği bildirilmektedir (Potrykus vd, 2016).

Dickeya spp.'nin konukçu aralığı oldukça geniştir. Bazı konukçuları zakkum, karanfil, ananas, muz, soğan, havuç, patates, ayçiçeğidir (Toth vd, 2003; Henz vd, 2006; Palacio-Bielsa vd, 2006; Slawiak vd, 2009). Hastalık etmeninin tropik ve yarı tropik bölgelerde sıcaklığın 25 °C üzeri olduğu yerlerde daha şiddetli hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Boccaro vd, 1991; Nassar vd, 1996).

Hollanda ve Almanya kökenli patates yumrularında ve bitkilerinde *Dickeya* spp. etmenini belirlemek için; CVP besi ortamında geliştirilen izolatlar, *Dickeya* spp.'ye spesifik pelADE primerleriyle tanımlanmıştır (Nassar vd, 1996).

Yapılan araştırmalarda Avrupa'da son 10 yılda *Dickeya* spp.'nin soğuğa dayanıklı olan izolatları, *D. dianthicola* biovar 1 ve 7 olarak belirlenmiştir. *Dickeya* spp. izolatları Avrupa'da 2004 - 2005 yıllarında aslında *D. dianthicola* olarak tanımlama yapılmıştır. *Dianthus* spp. bitkilerinde hastalık etmeni ilk olarak bodurluk ve solma belirtilerine neden olmuştur (Parkinson vd, 2009; Slawiak vd, 2009).

2016 yılında Türkiye yapılan survey çalışmalarında Samsun, Amasya, Tokat, Ordu ve Çorum illerinde bulunan patateslerde yapraklarda solma, kök kısmında siyahlaşma ve yumuşak çürüklükler araştırılmış ve Amasya'da patates yetiştirilen

alanlarından alınan hastalıklı patates örneklerinden *D. solani*'nin tanısı yapılmıştır (Ozturk ve Aksoy, 2017).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmanın ana materyalini Kastamonu ili patates depolarından alınan hastalıklı patates yumruları oluşturmaktadır.

3.1. Survey Çalışmaları

Survey çalışmaları, 2014 – 2015 yılları arasında Tarım İl ve İlçe Müdürlüklerinin görüşleri doğrultusunda patates üretiminin yoğun olarak yapıldığı ve ilin yaklaşık % 70’ni temsil eden ilçelerine ait köylerdeki patates depolarında hastalıklı yumrular toplanarak yapılmıştır (Şekil 3.1) (Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. Kastamonu’nun survey yapılan ilçeleri

Çizelge 3.1. Kastamonu ili patates üretim verileri (Anonim, 2018b)

İlçe Adı	Ekilen Alan (dekar)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
Merkez	3.713	10.532	2.837
Ağlı	11	37	3.364
Araç	147	387	2.633
Azdavay	35	89	2.781
Bozkurt	532	555	1.043
Cide	12	27	2.455
Daday	133	274	2.060
Devrekani	1.513	4.363	2.884
Doğanyurt	9	20	2.222
Hanönü	37	95	2.568
İhsangazi	275	370	1.345
İnebolu	129	373	2.891
Küre	23	52	2.261
Seydiler	183	473	2.642
Taşköprü	550	1.983	3.605
Tosya	807	1.939	2.403

Her depoda hastalık belirtisi gösteren 10'ar adet yumru incelenmiş ve bu yumrulardan elde edilen patojen özellikteki izolat sayısını toplam izolat sayısına oranlayarak bakteriyel hastalık bulunma yüzdeleri elde edilmiştir (Bora ve Karaca, 1970).

Hastalıklı yumruların her biri ayrı ayrı kese kağıtlarına konularak; alındığı yer, örnek numarası ve örnekleme tarihini içeren etiket bilgileri kaydedilmiştir. Hastalıklı örnekler laboratuvara getirilerek izolasyon yapılmak üzere + 4 °C'de saklanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hastalıklı yumru örnekleri

3.2. İzolasyon Çalışmaları

Hastalıklı yumru örneklerinden bakteriyel etmenlerin izolasyonları için; karabacak belirtisi stolonun sonundan 2- 4 mm boyutlarında kesitler alınmış, doku parçaları % 1'lik NaOCl içerisinde 2 dakika süreyle yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulmuştur. Doku parçaları daha sonra steril kurutma kağıtlarında kurulanmıştır. Kurulanan doku parçaları, içerisinde 300 µl steril su bulunan 1.5 ml'lik steril ependorf tüpe konulmuş ve homojenizatör çubuk yardımıyla ezilmiştir. Ependorflar, 24 – 26 °C'de 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. İnkübe edilen özütlerden 10^{-1} - 10^{-6} seri seyreltmeler hazırlanmış, bu seyreltmelerin 10^{-4} ve 10^{-6} 'lık tüplerinden 50'şer µl alınarak KBA (King B Agar) ve NGA (Nutrient Glukoz Agar) besi yerlerine steril drigalski bağıet yardımıyla yayılmıştır. Petriler 24 - 26 °C'de 24 - 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Petride gelişen kolonilerden koloni morfolojilerine göre patojen olma ihtimali bulunanlar, yeni besi ortamına aktararak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar % 50'lik gliserinde tanı çalışmaları için - 20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Besiyerleri ve içerikleri

Nutrient Glukoz Agar (NGA) (g/L)	King B (g/L)
Beef ekstrakt 3.0	Proteoz pepton 20.0
Peptone 5.0	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O 1.5
Glukoz 2.5	MgSO ₄ .7H ₂ O 1.5
Agar 15.0	Agar 15.0
----	Gliserin 10.0
Saf su 1000 ml	Saf su 1000 ml
pH= 7.2	pH=7.2

3.3. Tanılama

3.3.1. Biyokimyasal ve fizyolojik tanılama

3.3.1.1. Gram boyama testi

Hücre duvarı yapısına göre bakteriyel izolatlarının Gram (+) veya Gram (-) olduğunu belirlemek için gram boyama testi yapılmıştır. Bu test için hazırlanan ortam içeriği:

<u>I. Solüsyonun İçeriği:</u>	<u>g/L</u>
A Çözeltisi: Kristal violet	2
Etil alkol (%95)	20 ml
B Çözeltisi: Amonyum okzalat	0.8
Saf su	80 ml

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlanıp, karıştırıldıktan sonra filtre kağıdından geçirilmiştir.

<u>II. Lugol Çözeltisinin İçeriği:</u>	<u>g/L</u>
İyot	1 g
Potasyum iyodür	2 g
Saf su	300 ml

<u>III. Safranin Çözeltisinin İçeriği:</u>	<u>g/L</u>
Stok Solüsyonu: Safranin	2.5
Etil alkol (%95)	100 ml
Kullanma Solüsyonu: Stok çözeltisi	10 ml
Saf su	90 ml

Boyama İşlemleri:

NGA' da 24 - 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle inkübe edilen bakteriyel kolonilerden süspansiyon hazırlanmış, bu süspansiyondan bir öze dolusu alınarak lamın ortasına damlatılmıştır. Daha sonra süspansiyon lam üzerine yayılmıştır. Bakteriyel hücrelerin lama sabitlenmesi için lam, alevden hafifçe geçirilip, oda sıcaklığında kuruması için bekletilmiştir. I. çözeltiden lam üzerine dökülerek, 1 dakika beklenmiş, daha sonra çeşme suyu ile indirekt olarak yıkanıp lamın üzeri hafifçe kurulanmıştır. İkinci olarak lamın üzerine Lugol çözeltisi dökülmüş, 1 dakika beklendikten sonra çeşme suyunda indirekt olarak yıkanıp kurutma kağıdı ile hafifçe kurulanmıştır. Lamlar % 96'lık etil alkol bulunan bir kaba 30 saniye batırılarak beklenmiş ve su ile durulandıktan sonra hafifçe kurulanmıştır. Son olarak Safranin çözeltisi lam üzerine dökülerek 10 saniye zıt boyama yapıp, suda indirekt olarak yıkanmış, kurutma kağıdı ile kurulanmış ve 100x'lik objektifte immersiyon yağı kullanılarak bakteriyel hücrelerin gram reaksiyonu incelenmiştir. Bakteriyel hücreler, eğer mavi – mor renkte ise Gram (+), pembe – kırmızı renkte ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Gram ve Friedlaender, 1884; Schaad vd, 2001).

3.3.1.2. KOH testi

Hazırlanan % 3'lük potasyum hidroksit çözeltisinden lam üzerine bir damla damlatılmış ve NGA'da 24 – 48 saatte 24 - 26° C'de geliştirilen izolatların kolonileri özeyle alınıp dairesel hareketlerle solüsyonda karıştırılmıştır. Yaklaşık 15 – 20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında ipliksi bir uzama meydana gelmişse, izolatın Gram (-), ipliksi bir uzama meydana gelmemişse Gram (+) olduğuna karar verilmiştir (Sands, 1990).

3.3.1.3. Katalaz testi

% 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) lam üzerine 1 damla damlatılıp, NGA' da 24-48 saatte 24 – 26 °C'de gelişen izolatların kolonilerinden bir öze dolusu alınarak çözeltiye batırılma işlemi yapılmıştır. Bu tepkime sonucunda hava kabarcıklarının çıkması, izolatın pozitif reaksiyon verdiğini, yani katalaz enzimine sahip olduğunu göstermiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.3.1.4. Oksidatif - Fermentatif testi

Bu test, oksijenli ve oksijensiz ortamda karbonhidratların kullanımlarını belirlemek için yapılmıştır.

<u>I. Grup</u>	<u>g/L</u>
$NH_4H_2PO_4$	1.0
KCL	0.2
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
Bromotimol mavisi	0.08
Saf su	900 ml
Agar	3
<u>II. Grup</u>	<u>g/L</u>
Glukoz	10.0
Saf su	100 ml

pH: 7.0-7.1

Agar haricinde bu kimyasalların hepsi tartılıp, erlenmayer içerisinde çözelti haline getirilmiştir. Çözeltinin pH'sı % 40'lık NaOH ile 7.0-7.1'e ayarlanmış, ortamın rengi zeytin yeşiline dönüşmüştür. Daha sonra ortama agar ilave edilerek 121 °C' de ısıtılan otoklovda homojenizasyon işlemine başlatılmıştır. Otoklovdan çıkan karışım 6 – 7 ml'lik ölçüde tüplere boşaltılmış ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra 10 g glikoz, 100 ml saf su içerisinde eritilerek tındalizasyon işlemi ile sterilize edilmiş ve daha önce hazırlanan 6 – 7 ml' lik tüplerin içindeki ortama 45 – 50 °C'de aseptik koşullarda 0,5 ml'lik

miktarlarda paylaştırılmıştır. Daha sonra Tüpler oda sıcaklığında dik konumda bekletilerek donmaları sağlanmıştır. Her bir izolat için oksijenli ve oksijensiz olmak üzere iki tüp kullanılmıştır. NGA'da 24-26 °C'de 24 - 48 saatte geliştirilen izolatlar tüplere bir öze dolusu alınarak bulaştırılmıştır. İki tüpten birisinin üzeri % 3'lük agar yardımıyla hava ile teması kesilmiştir. Her iki tüpün ağzı pamuk ile kapatılmıştır. Daha sonra izolatlar 24 - 26 °C'de 7 - 14 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hava ile teması kesilen ve kesilmeyen tüplerin glukozdan asit üretimi sonucunda ortamın zeytin yeşili renkten sarıya dönüşüp dönüşmediği kontrol edilmiştir (Ayers vd, 1919).

3.3.1.5. Jelatini eritme testi

<u>Ortam içeriği</u>	<u>Litre'de</u>
Peptone	5 g
Beef extract	3 g
Jelatin	120 g

Tartılan bu kimyasallar 1 L saf suda 121 °C'de homojenize edilmiş, cam tüplere 6 - 7 ml'lik ölçüde paylaştırıldıktan sonra, 20 dakika 121 °C'de otoklovda sterilize edilmiştir. NGA'da 24 - 26 °C'de 24 - 48 saatte geliştirilen izolatlar öze ile tüplere bulaştırılmış, 24 - 26 °C'de 7 - 14 gün inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların jelatini eritip eritmediğini anlamak amacıyla 30 dakika süreyle +4 °C'de buzdolabında bekletilmiştir. Tüpteki ortamın akıcı ve bulanık olması testin pozitif olduğunu, katı halde olması ise negatif olduğunu göstermiştir (Klement vd, 1990).

3.3.1.6. Floresan pigmentasyon testi

<u>King B besi ortamı içeriği</u>	<u>g/L</u>
Proteaz pepton	20.0
K ₂ HPO ₄	1.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5
Agar	15.0
Gliserol	15.0

Saf su

1.0

pH=7.2

Bakteriyel izolatlar, King B besi ortamına çizildikten sonra 24 – 26 °C’de 24 – 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra izolatların floresan özelliğe sahip olup olmadığını anlamak için UV (Ultraviyole) translimünatör altında floresan parlama özelliği incelenmiştir (King vd, 1954).

3.3.1.7. Oksidaz testi

İçerisinde % 1’lik glukoz olan Nutrient Agarda 24 - 26 °C’de 24 - 48 saat süreyle geliştirilen izolatların kolonilerinden öze ile alınmış ve üzerine % 1’lik tetramethyl - p-phenylenediamine dihydrochloride çözeltisi damlatılmış filtre kağıdına sürülmüştür. Yaklaşık 10 saniye süre sonunda mavimsi - mor renk oluşumu, pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956).

3.3.1.8. Arginin dehidrolaz aktivitesi testi

Bu yapılan test bazı izolatların anaerobik koşullarda gelişimini sağlayan iki enzime sahip olup olmadıklarını belirleyen bir testtir.

<u>Ortam içeriği</u>	<u>g/L</u>
Peptone	1.0
NaCL	5.0
K ₂ HPO ₄	0.3
Agar	3.0
Phenol red	0.01
L - Arginine	10.0

pH=7. 2

Ortam içeriği agar ilave edilmeden pH 7.2’ye ayarlanmış, daha sonra agar ilave edilerek, 121 °C’de homojenize edilmiş ve 5 - 7 ml’lik miktarlarda tüplere paylaştırılmıştır. Ortam, 121 °C’de 15 - 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

İzolatların kolonileri öze yardımıyla tüplere batırıldıktan sonra üzerleri yaklaşık olarak 3 cm yüksekliğinde % 3'lük steril agar ile örtülmüştür. Tüpler, 24 - 26 °C'de 7 - 14 gün süreyle inkübe edilmiştir. Ortamın açık pembe renginin kırmızı renk alması pozitif reaksiyon, ortam renginde hiçbir değişme olmaması ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

3.3.1.9. Eskulinin hidrolizi testi

<u>Ortam içeriği</u>	<u>g/L</u>
Yeast extract	5.0
NaCl	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	0.5
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
Ferric amonyum sitrat	50.0 mg
Esculin(Sigma)	1.0
pH 6.8	

Ortam 121 °C'de 15 – 20 dakika süreyle sterilize edildikten sonra petrilere dökülmüştür. İzolatların çiziminden sonra petrilere, 1 - 4 gün süre ile 24 - 26 °C'de inkübe edilmiştir. Ortam renginin kahverengi - siyaha dönüşmesi pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir.

3.3.1.10. Fosfataz testi

Bu testin içeriği; 10 g pepton ve 5 g beef ekstrakt 1 L suda magnetik karıştırıcı ile homojenize edilmiş, pH 7.0'ye ayarlanmış ve ortama 15 g agar ilave edilerek 121 °C'de 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Daha sonra besi yerine filtrasyon ile sterilize edilen 10 ml miktarında % 5'lik fenol fitalein difosfat tetra sodyum ilave edilmiştir. Hazırlanan ortam petrilere petrilere döküldükten sonra NGA'da geliştirilen 24 - 48 saatlik izolatların kolonileri, steril pipet ucu ile ortama bulaştırılmış ve 24 - 26 °C'de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Petri kapaklarına 50 µl amonyum hidroksit damlatılmış ve 15 - 30 saniye süre içerisinde kolonilerin

pembe - kırmızı renk alması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Cowan ve Young, 1973).

3.3.1.11. İndol oluşumu testi

Ortam için 10 g Tripton ve 1 g L-Triptofan 1 L su ile karıştırılarak 121 °C'de otoklavda homojenize edildikten sonra ortam 5 - 7 ml'lik hacimlerde test tüplerine paylaştırılmıştır. Tüplerin 121 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilmesinden sonra NGA'da 24 - 48 saat geliştirilen izolatların kolonilerinden steril öze ile alınarak ortama bulaştırılmıştır. Çalkalayıcı inkübatörde 24 – 26 °C'de 24 - 48 saat geliştirilen izolatlara, Kovaks ayırıcından 0.5 ml ilave edilmiş ve hafifçe çalkalanmıştır. Test tüpünün en üst kısmında koyu kırmızı renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Kovaks indol ayırıcı; 5 g p-dimetilaminobenzaldehit, 75 ml iso-amyl alkolde 50 - 55 °C'de çözülmüş, daha sonra soğutulmuş ve 25 ml'lik konsantre HCl yavaşça ilave edilerek hazırlanmıştır. Bu ortam, ışıktan korunmak amacıyla alüminyum folyo içerisinde +4 °C'de saklanmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

3.3.1.12. Karbon kaynaklarının kullanımı testi

<u>Ortam içeriği</u>	<u>g/L</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	5.0
Yeast ekstrakt	0.8
Agar	12.0
Brom cresol purple	0.7 ml
Karbon kaynağı	2.0
pH=6.8	

Yukarıdaki kimyasallar agar hariç belirlenen miktarlarda tartılarak hazırlanmış, % 40'lık NaOH ile pH'sı 6.8 olarak ayarlanıp agar eklenmiştir. Daha sonra 121

°C’de homojenize edilip tüplere 6 - 7 ml’lik ölçüde konulmuştur. Bu tüpler daha sonra 20 dakika süreyle 121 °C’de otoklovda sterilize edilmiştir. Bu testin uygulanmasında karbon kaynağı olarak; D (-) Arabinose, D (+) Mannose, D (+) Xylose, L (+) Rhamnose, D (+) Trehalose, Raffinose ve D (-) Sorbitol kullanılmıştır. NGA’da 24 - 26 °C’de 24 - 48 saatte geliştirilen izolatlar öze ile tüplere bulaştırılmış, 1 – 7 gün içerisinde ortamda asit oluşumuna bağlı renk değişikliğinin olup olmadığı gözlemlenmiştir (Saygılı, 1995).

3.3.1.13. İzolatların 37 - 39 °C’de gelişimi testi

İzolatların NGA’ya çizgi ekimi yapılmış ve inkübatörde 1 – 7 gün süre ile 37 ve 39 °C’lerde inkübe edilmiş, Kontrol olarak ise 24 - 26 °C’de geliştirilmiştir. Besi yerinde bakteri gelişimi gerçekleşmişse pozitif, gerçekleşmemişse negatif olarak kabul edilmiştir.

3.3.2. Patateste pektinolitik aktivite testi

İzolatların pektolitik özelliğe sahip olup olmadığını anlamak için; kabukları soyulmuş patates yumruları, yıkanarak % 70’lik etil alkol ile yüzeysel dezenfeksiyonu yapılmıştır. Yumrular 7 - 8 mm’lik kalınlıkta dilimlenerek, üzerlerine steril mantar delici ile küçük çukurlar açılmıştır. Daha sonra dilimler steril ıslak filtre kağıtları bulunan steril petrilere yerleştirilmiştir. NGA’da geliştirilen izolatların 10⁸ hücre/ml’lik süspansiyonlarından 25 µl’şer çukurcuklara konulmuştur. Daha sonra petriler, 24 - 26 °C’de 24 – 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Yapılan bu testte pozitif kontrol olarak *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatı kullanılırken, negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır. İnokule edilen bölgede yumuşuma görülmesi test sonucunun pozitif olduğunu göstermiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

3.3.3. Tütünde aşırı duyarlılık testi

Bütün izolatlar, NGA’ da 24 - 26 °C’de 24 – 48 saatte geliştirilmiş ve 10⁸ hücre/ml’lik süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonların her biri tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun N) bitkisinin yapraklarının altına iki damar arasındaki epidermisin arasına steril hipodermik iğne ile enjekte edilmiştir. Daha

sonra bu bitkiler 24 - 26 °C’de 24 – 72 saat inkübasyona bırakılarak, yapraklarda aşırı duyarlılık reaksiyonunun görülüp görülmediği gözlemlenmiştir (Klement vd, 1990).

3.3.4. Patojenisite testi

Bütün izolatlar, NGA’da 24 - 26 °C’de 24 – 48 saat inkübe edilerek geliştirilmiş ve 10⁸ hücre/ml’lik süspansiyonları hazırlanmıştır. Daha sonra bu hazırlanan süspansiyondan patates yapraklarının alt tarafından iki epidermis arasına hipodermik iğne ile enjeksiyon yapılmıştır. Kontrol olarak saf su kullanılmıştır. Bitkiler 24 - 26 °C’de 24 – 72 saat inkübe edilmiş ve yapraklar koyu kahverengi nekrotik alanların meydana gelip gelmediği kontrol edilmiştir (Van der Zwet, 1986).

3.3.5. Moleküler tanılama

İzolatların moleküler tanısı amacıyla; *Dickeya solani* için ADE1/ADE2 primer çifti (Nassar vd, 1996), *P. atrosepticum* için Y45/Y46 primer çifti (Frechon vd, 1998), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* için EXPCCF/EXPCCR primer çifti (Kang vd, 2003) ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* için PSA1/PSAR primer çifti kullanılmıştır (Pastrik, 2000).

Çizelge 3.3. İzolatların tanısında kullanılan primer çiftleri

Tür/Alt tür	Primer İsmi	Sekans 5’→3’	Ürün Boyutu (bp)	Kaynakça
<i>Dickeya solani</i>	ADE1	GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT	420	Nassar vd (1996)
	ADE2	CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTC GTGC		
<i>P. atrosepticum</i>	Y45	TCACCGGACGCCGAAGTGTGGCGT	439	Frechon vd (1998)
	Y46	TCGCCAACGTTTCAGCAGAACAAGT		
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	EXPCCF	GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA	550	Kang vd (2003)
	EXPCCR	GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG		
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	PSA1	CTCCTTGTGGGGTGGGAAAA	502	Pastrik (2000)
	PSAR	TACTGAGATGTTTCACTTCCCC		

Moleküler tanılamada kullanılan tampon çözeltisi

PCR ürünlerinin, agaroz jel elektroforez analizleri için Tris borate- EDTA (TBE) Buffer kullanılmıştır (Obradovic ve Kevresan, 2010).

5x TBE Buffer	1 L
Tris base	54 g
Boric acid	27.5 g
EDTA	20 ml 0.5M
Steril saf su	500 ml

Yukarıdaki karışım steril saf su ile çözündürülmüş ve karışımın pH'sı 8 olarak ayarlanmıştır. Toplam hacim 1 L'ye steril saf su ile tamamlanmıştır.

1x TBE Buffer'ı hazırlamak için:

100 ml'lik 5xTBE buffer, 900 ml steril saf su ile karıştırılmıştır.

PCR çoğaltma işleminde reaksiyon karışımı olarak Bioline firmasına ait 2x Biomix Red Master miks kullanılmıştır.

2x Biomix Red	10.0 µl
Forward primer	1.0 µl
Revers primer	1.0 µl
Bakteri DNA'sı	X
Steril saf su	8.0 µl
Toplam hacim	20.0 µl

İzolatların moleküler tanısı için touchdown koloni PCR'ı yapılmıştır. NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat geliştirilen izolatların kolonilerinden pipet ucu ile alınarak, son hacmi 20 µl olan master miksin içerisine ilave edilmiştir. Kontrol PCR tüplerine ise steril pipet ucu değdirilmiştir.

PCR döngü işlemi Sambrook vd (1989)'ye göre yapılmıştır. Buna göre; Touchdown koloni PCR' ı için kullanılan program şu şekildedir:

<u>Sıcaklık</u>		<u>Döngü</u>
95 °C		4'
95 °C		30"
65 °C		30"
	Decrease 1 döngü	
72 °C		1.5'
	Cycle 2 – 9 kez	
95 °C		30'
56 °C		30'
72 °C		30"
	Cycle 6 – 24 kez	
18 °C		Forever

PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde koşturulmuştur. Bunun için; 100 ml 1xTBE buffer içerisine, 1 g agaroz konulmuş, karışım mikro dalgada homojenize edilmiş ve içerisine 5 µl etidyum bromür eklenmiştir. Hazırlanan jel, jel tankına dikkatlice dökülmüş, taraklar dikkatlice takılmış ve jel kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra taraklar dikkatlice alınıp elektroforez tankına konulmuştur. Elektroforez tankındaki jelin üstüne 1x TBE buffer koyulmuştur. PCR ürünleri, agaroz jele yüklenmiştir. Moleküler ağırlık işaretleyici olarak Bioline Hyper Ladder 1kb DNA Ladder kullanılmıştır. PCR ürünleri 100 voltta 1 saat süreyle koşturulmuştur. Süre bitiminde PCR ürünleri UV transliminatörde (302 nm) incelenerek jelde oluşan bantlar fotoğraflanmıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

4. BULGULAR

4.1. Survey Çalışmaları

Kastamonu İli patates üretiminin yaygın olarak yapıldığı yaklaşık % 70'lik alanı kapsayan, Merkez ve Devrekani ilçelerine bağlı köylerde 2014 - 2016 Ekim aylarında patateslerin depolandığı depolarda bakteriyel hastalık etmenleriyle bulaşık yumruları bulmak amacıyla tarım il ve ilçe müdürlüklerinin tavsiyeleri göz önüne alınarak survey çalışması yapılmıştır. Buna göre Merkez İlçe'nin 7 köyünde toplam 21 depo, Devrekani İlçesi'ndeki 4 köyde toplam 16 depo gezilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Elde edilen izolatlar (survey çalışmalarının yapıldığı ilçe ve köylerden)

İlçeler	Köyler	Gezilen Depo Sayısı	İzolat Sayısı	İzolat Kodu
Merkez	Ahmet Bey Köyü	2	15	DsAB7
	Hoca Köyü	6	---	
	Koru Köyü	4	---	
	Molla Köyü	3	32	CmsMo4
	Has Köyü	2	9	CmsHa9
	Etyemez Köyü	2	23	CmsEty6
	Kurtgömeç Köyü	2	---	
Devrekani	Sazyaka Mahallesi	1	---	
	Kasaplar Mahallesi	4	---	
	Kadirbey Mahallesi	10	8	CmsKDB8
	Ahmetoğlu Mahallesi	1	---	
Toplam	11	37	87	

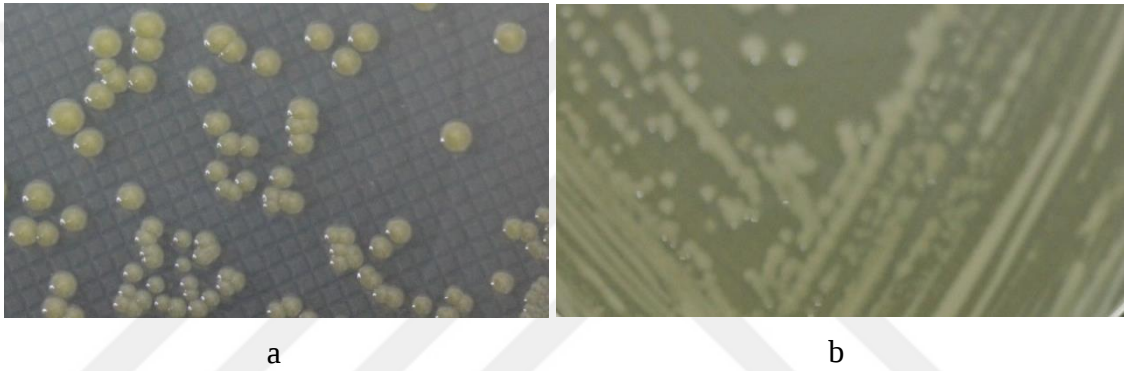
4.2. İzolasyon Çalışmaları

Hastalıklı yumrulardan toplam 370 adet hastalıklı yumru örneğinden 87 adet bakteriyel izolat elde edilmiştir. Bu izolatlardan 82 adeti, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu göstermediği ve patates yapraklarında nekrotik leke oluşturmadığı için

tanı testlerine tabi tutulmamıştır. Tütünde aşırı duyarlılığa neden olan 5 adet izolatın tamamı patates yapraklarında nekrotik leke oluşturmuştur (Çizelge 4.1.).

4.3. Tanılama

Tütünde aşırı duyarlılığa ve patojenisite testinde patates yapraklarında nekrotik leke oluşumuna neden olan bakteriyel izolatların fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tanı testleri sonucunda 5 izolattan *C.michiganensis* subsp. *sepedonicus*'a ait 4 izolatın kolonileri, NGA'da düzgün kenarlı, düzgün yüzeyli, kremimsi – sarı renkte, *Dickeya solani*'ye ait 1 izolatın ise kremimsi beyaz renkte koloniler şeklinde geliştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Tütünde aşırı duyarlılığa ve patatesteki nekrotik lekelenmeye yol açan izolatların kolonileri: a) *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* (CmsMo4), b) *Dickeya solani* (DsAB7)

4.3.1. Biyokimyasal ve fizyolojik tanılama

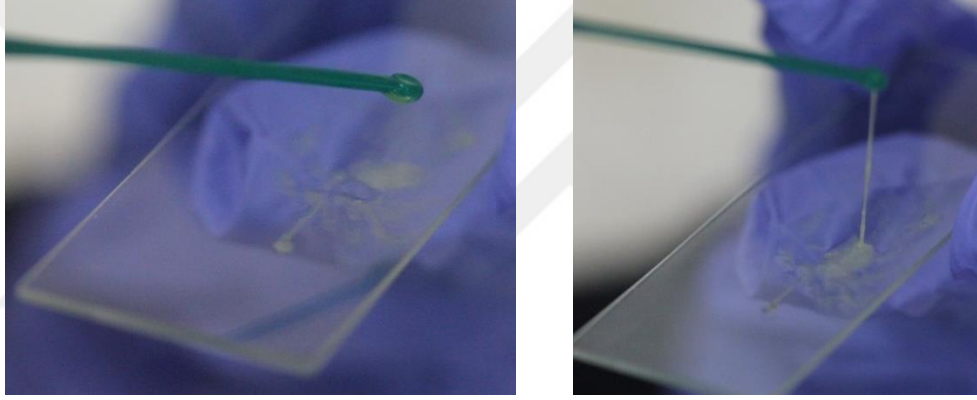
Tütünde aşırı duyarlılığa ve patatesteki nekrotik lekelenmeye yol açan izolatların gram boyama, KOH, katalaz, oksidatif-fermentatif, jelatini eritme, floresan pigmentasyon, oksidaz, arginin dehidrolaz, eskulinin hidrolizi, fofotaz, indol oluşumu, karbon kaynaklarının kullanımı, 37 - 39 °C'de gelişme ve patatesteki pektinolitik aktive testleri yapılmıştır (Çizelge 4.2).

4.3.1.1. Gram boyama testi

Bu test ile 4 izolatın Gram pozitif, 1 izolatın ise Gram negatif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

4.3.1.2. KOH testi

Bu test gram boyamayı doğrulayıcı test olarak yapılmıştır. Test sonucuna göre 4 izolatın Gram pozitif, 1 izolatın ise Gram negatif olduğu belirlenmiştir. Diğer bir ifade ile Gram pozitif izolatların hücre duvarı kalın olduğu için KOH çözeltisi, hücre duvarını parçalayamadığından bakteri DNA'sı ortama karışmamış ve ipliğimsi bir sünme meydana gelmemiştir. Bu nedenle reaksiyon negatif, bakteri hücresi ise Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir. Gram negatif izolatların hücre duvarı ise ince olduğu için KOH çözeltisi, hücre duvarını kolayca parçaladığından bakteri DNA'sı ortama karışmış ve ipliğimsi bir sünme meydana gelmiştir. Bu nedenle reaksiyon pozitif, bakteri hücresi ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.2) (Çizelge 4.2).



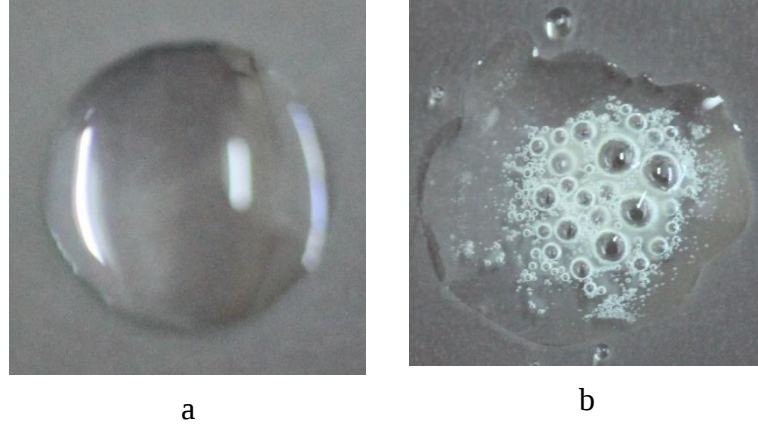
a

b

Şekil 4.2. KOH testi: a) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (CmsMo4)'un negatif reaksiyonu, b) *Dickeya solani* (DsAB7)'nin pozitif reaksiyonu

4.3.1.3. Katalaz testi

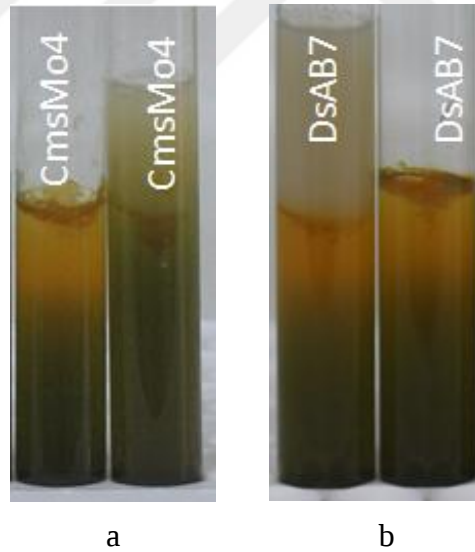
İzolatların tümü pozitif reaksiyon göstermiştir. Diğer bir ifade ile tüm izolatlardaki katalaz enzimi, H_2O_2 'den O_2 'yi serbest hale geçirdiği için çözeltide hava kabarcığı meydana gelmiştir (Şekil 4.3) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.3. Katalaz testi: a) Negatif reaksiyon; b) Pozitif reaksiyonu

4.3.1.4. Oksidatif – Fermantatif testi

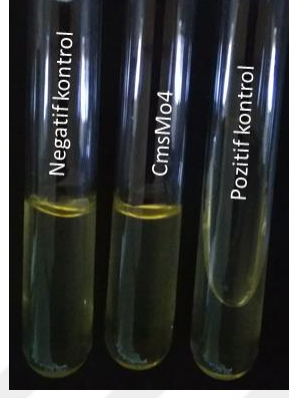
Bakteriyel izolatların oksijenli ortamda mı veya hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda mı geliştiğini tespit etmek amacıyla yapılan bu test ile 4 izolatın oksijenli ortamda (aerobik), 1 izolatın ise hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda (fakültatif anaerobik) geliştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.4. Oksidatif-Fermentatif Testi: a) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (CmsMo4)'un aerobik gelişimi; b) *Dickeya solani* (DsAB7)'nin fakültatif anaerobik gelişimi

4.3.1.5. Jelatini eritme testi

Test sonucunda izolatların tümü bu teste negatif sonuç vermiştir. Diğer bir ifade ile izolatların hiçbiri jeletinaz enzimine sahip olmadığından jelatini sıvılaştıramamıştır (Şekil 4.5) (Çizelge 4.2).



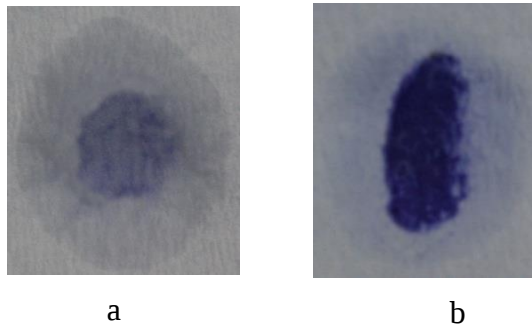
Şekil 4.5. Jelatin eritme testi

4.3.1.6. Floresan pigmentasyon testi

King B agar besiyeri üzerinde gelişen izolatlar UV (Ultraviyole ışık) altında incelenmiş ve hiçbir izolat, floresan parlama göstermemiştir.

4.3.1.7. Oksidaz testi

Steril filtre kağıdına damlatılan % 1'lik N,N,N,N-tetrametil - 1.4 fenilen diamonyum diklorit çözeltisi üzerine izolatların kolonileri öze yardımıyla çizilmiştir. Yaklaşık 10 saniye içinde koyu mavi renk oluşumu meydana gelmemesi nedeniyle bu teste tüm izolatlar, negatif reaksiyon göstermiştir (Şekil 4.6) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.6. Oksidaz testi: a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon

4.3.1.8. Arginin dehidrolaz aktivitesi testi

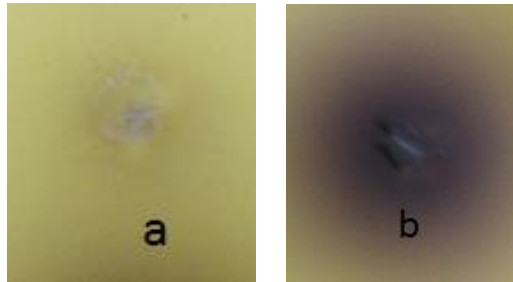
NGA'da 24 - 26 °C'de 24 - 48 saat süreyle geliştirilen izolatlar, tüplere aşılanmış ve 24 - 26 °C'de 7 - 14 gün süreyle inkübe edilmiştir. Ortamın rengine hiçbir değişme olmaması nedeniyle izolatlar bu teste negatif reaksiyon göstermiştir (Şekil 4.7) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.7. Arginin dehidrolaz testi; Negatif reaksiyon

4.3.1.9. Eskulinin hidrolizi testi

Eskulin içeren ortama izolatların çiziminden sonra petriler, 1 - 4 gün süre ile 24 - 26 °C'de inkübe edilmiştir. Ortam renginin kahverengi - siyaha dönüşmesi pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Bu teste 4 izolat pozitif, 1 ise negatif reaksiyon vermiştir (Şekil 4.8) (Çizelge 4.2).

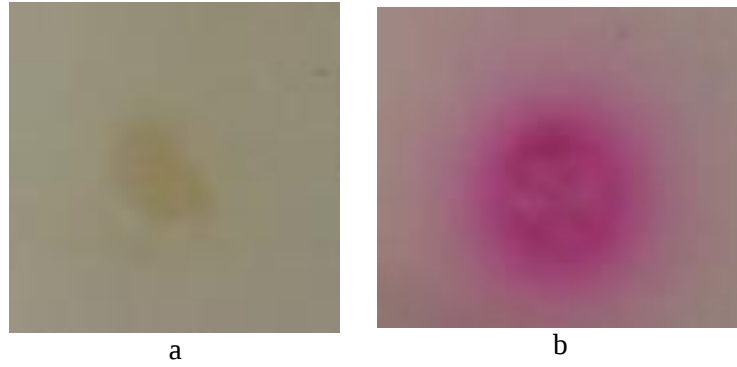


Şekil 4.8. Eskulinin hidrolizi testi: a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon

4.3.1.10. Fosfataz testi

İzolatların kolonileri, hazırlanan besi yerine steril pipet ucu yardımıyla bulaştırılmış, 24 - 26 °C'de 24 - 48 saat süreyle inkübe edilmiş ve petri kapaklarına 50 µl amonyum hidroksit damlatılmıştır. Kolonilerde pembe - kırmızı renk değişimi,

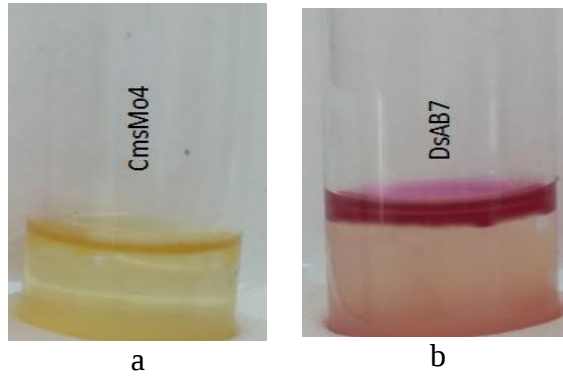
pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Bu teste 1 izolat pozitif ve 4 izolat negatif reaksiyon göstermiştir (Şekil 4.9) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.9. Fosfataz testi; a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon

4.3.1.11. İndol oluşumu testi

NGA'da 24 - 26 °C'de 24 - 48 saat geliştirilen izolat kolonilerinden bir öze alınarak hazırlanan ortama bulaştırılmış ve çalkalayıcı inkübatörde 24 - 26 °C'de geliştirilen izolatlarla, kovaks ayıracından 0.5 ml ilave edilerek hafifçe çalkalanması ile test tüpünün en üst kısmında koyu kırmızı renk oluşumu meydana gelmesi pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Bu teste 1 izolat pozitif, 4 ise negatif reaksiyon vermiştir (Şekil 4.10) (Çizelge 4.2).

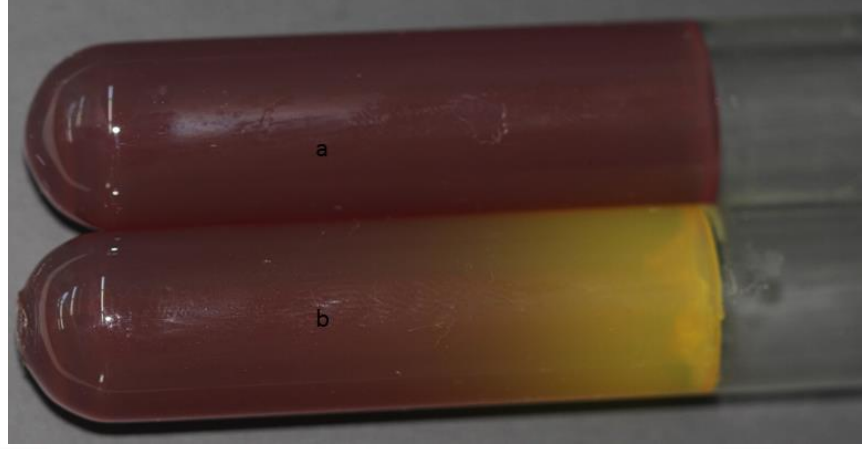


Şekil 4.10. İndol oluşumu testi; a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon

4.3.1.12. Karbon kaynaklarının kullanımı testi

NGA'da 24 - 26 °C'de 24 - 48 saat süreyle geliştirilen izolatlar, oksijenli ve oksijensiz ortamların her ikisine de aşılanmış, 1 - 7 gün içerisinde tüplerde ortam renginin glukozdan asit üretimi sonucu sarı renge dönüşmesi pozitif reaksiyon, sarı

renge dönüşmemesi ise negatif reaksiyon olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.11) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.11. Karbon kaynakları kullanım testi: a) Negatif reaksiyon, b) Pozitif reaksiyon

4.3.1.13. İzolatların 37 - 39 °C’de gelişimi testi

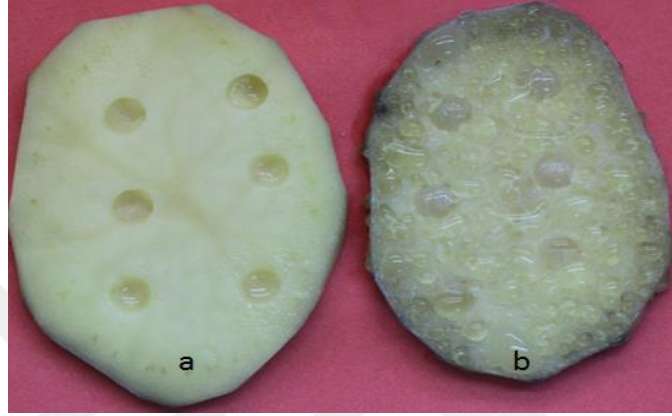
İzolatların NGA’ya çizgi ekimi yapılmış ve inkübatörde 1 – 7 gün süre ile 37 ve 39 °C’lerde inkübe edilmiş, Kontrol olarak ise izolatlar, 24 - 26 °C’de geliştirilmiştir. Besi yerinde bakteri gelişimi gerçekleşmişse pozitif, gerçekleşmemişse negatif olarak kabul edilmiştir. Bu teste; 37 - 39 °C’de 1 izolat gelişmiş, 4 izolat ise gelişme göstermemiştir. Tüm izolatlar 24 - 26 °C’de gelişmiştir (Şekil 4.12) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.12. NGA’da 39 °C’de gelişen DsAB7’nin koloni gelişimi

4.3.2. Patateste pektinolitik aktivite testi

İzolatların pektinolitik aktiviteye sahip olup olmadıkları belirlemek amacıyla, patates yumru dilimlerine inokule edilen bölgede yumuşamanın meydana gelip gelmemesi incelenmiştir. Bu teste 4 izolat negatif, 1 izolat ise pozitif reaksiyon vermiştir (Şekil 4.13) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.13. Pektinolitik aktivite testi; a) Negatif kontrol, b) DsAB7 izolatının pozitif reaksiyonu

4.3.3. Tütünde aşırı duyarlılık testi

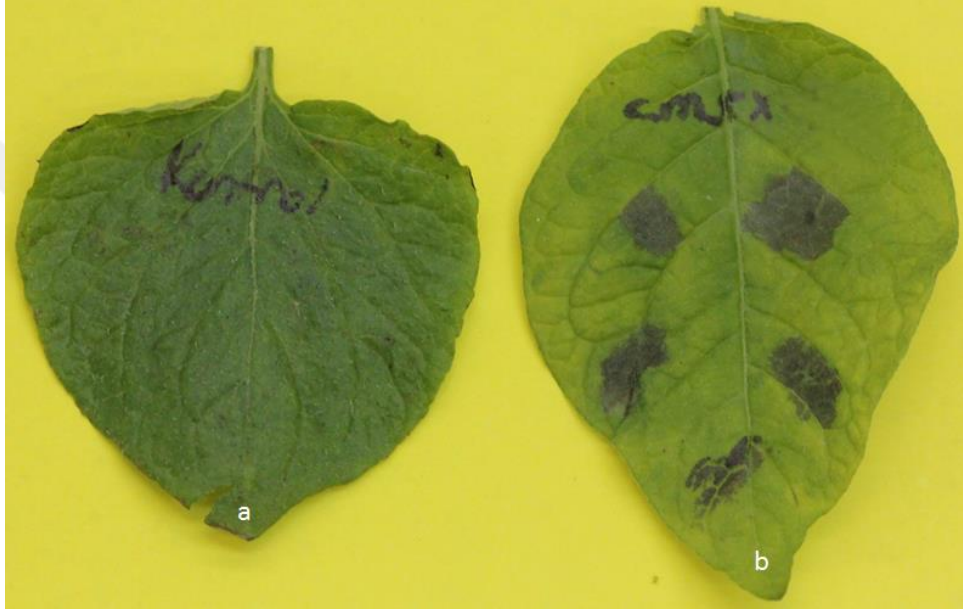
Bütün izolatlar, NGA' da 24 - 26 °C'de 24 – 48 saatte geliştirilmiş ve 10^8 hücre/ml'lik süspansiyonları *Nicotiana tabacum* cv. Samsun N yapraklarının altına iki damar arasındaki epidermisin arasına steril hipodermik iğne ile enjekte edilmiştir. Bitkiler 24 - 26 °C'de 24 – 72 saat inkübe edilmiş ve yapraklarda aşırı duyarlılık reaksiyonunun meydana gelip gelmediği incelenmiştir. Tüm izolatlar tütün yapraklarında aşırı duyarlılığa neden olmuştur (Şekil 4.14) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.14. Tütün bitkisi yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu

4.3.4. Patojenisite testi

Bütün izolatların NGA'da 24 - 26 °C'de 24 – 48 saat'lik kolonilerinden 10^8 hücre/ml'lik süspansiyonları hazırlanmış ve bu süspansiyonlar, patates yapraklarının alt tarafındaki iki epidermis arasına hipodermik iğne yardımıyla enjekte edilmiştir. Kontrol olarak yapraklara steril saf su enjekte edilmiştir. Bitkiler 24 - 26 °C'de 24 – 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. Tüm izolatlar yapraklarda koyu renkli nekrotik alanlar neden olmuştur (Şekil 4.15) (Çizelge 4.2).



Şekil 4.15. Patates bitkisi yapraklarında patojenisite testi; a) Negatif kontrol, b) Nekrotik alan oluşumu

Biyokimyasal, fizyolojik ve patojenisite ilgili tanı testi sonuçlarına göre *C. michiganensis subsp. sepedonicus*'a ait tüm izolatlar; gram pozitif, katalaz, eskulinin hidrolizi testleri ile tütünde aşırı duyarlılık ve ptojenisite testlerine pozitif, O/F testine aerobik, KOH, jelatini eritme, floresan pigmentasyon, oksidaz, arjinin dehidrolaz, fosfataz, indol oluşumu ve karbon kaynaklarından Arabinoz, Mannoz, Rafinoz, Ramnoz, Trehaloz ve Xyloz testleri ile 37 – 39 °C'de gelişme ve pektinolitik aktivite testlerine ise negatif reaksiyon göstermiştir.

Dickeya solani'ye ait izolat ise; gram negatif, KOH, katalaz, fosfataz, indol oluşumu, karbon kaynaklarından Arabinoz, Mannoz, Rafinoz, Trehaloz ve Xyloz testleri ile 37 – 39 °C'de gelişme ve pektinolitik aktivite, tütünde aşırı duyarlılık ve ptojenisite testlerine pozitif, O/F testine fakültatif anaerobik, jelatini eritme, floresan

pigmentasyon, oksidaz, arjinin dehidrolaz, eskulinin hidrolizi, karbon kaynaklarından Ramnoz testlerine ise negatif reaksiyon göstermiştir (Çizelge 4.2).



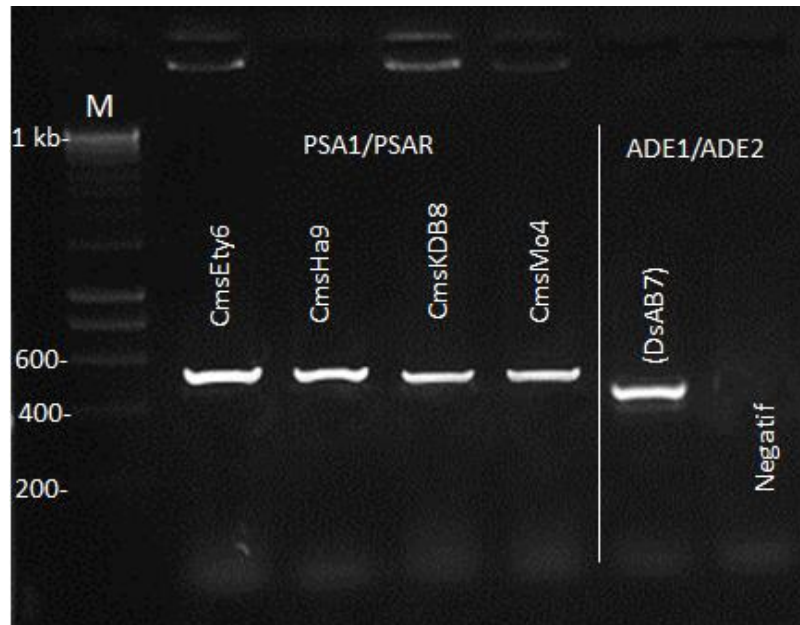
Çizelge 4.2. İzolatların biyokimyasal, fizyolojik ve patojenisite ile ilgili tanı testi sonuçları

Sıra no	Tür Adı	İzolat Adı	GB	KOH	Katalaz	O/F	JE	FP	Oksidaz	AD	EH	Fosfataz	İO	Karbon Kaynakları						Fizyolojik				
														Ar	Mn	Ra	Rh	Tr	Xy	37°C	39°C	PA	HR	PT
1	Cms*	CmsEty6	+	-	+	A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2	Cms	CmsHa9	+	-	+	A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3	Cms	CmsKDB8	+	-	+	A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
4	Cms	CmsMo4	+	-	+	A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5	Ds	DsAB7	-	+	+	FA	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

*Cms, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*; Ds, *Dickeya solani*; GB, Gram boyama, O/F, Oksidatif/Fermantatif (A, aerobik; FA, Fakültatif anaerobik); JE, Jelatini eritme; FP, Floresan pigmentasyon; AD, Arginin dehidrolaz; EH, Eskulinin hidrolizi; İO, İndol oluşumu; Ar, Arabinoz; Mn, Mannoz; Ra, Rafinoz; Rh, Ramnoz; Tr, Trehaloz, Xy, Xyloz; PA, Pektinolitik aktivite; HR, Tütünde aşırı duyarlılık; PT, Patojenisite testi; - ; Negatif reaksiyon; +; Pozitif reaksiyon

4.3.5. Moleküler tanılama

Surveyler sonucunda hastalıklı yumrulardan toplam 87 adet izolat elde edilmiş, bu izolatlarda 5 adetinin patojen özellikte olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların koloni morfolojilerine göre *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum* ve/veya *Dickeya solani* olabileceği düşüncesiyle türe spesifik primerler kullanılarak PCR analizi yapılmıştır. Buna göre *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*'a spesifik PSA1/PSAR primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda beklenen bant büyüklüğü olan 502 bp seviyesinde PCR ürünü meydana gelmiş ve bu PCR ürününe sahip 4 izolat (CmsEty6, CmsHa9, CmsKDB8 ve CmsMo4) *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* olarak tanılanmıştır. ADE1/ADE2 primerleri ile yapılan PCR sonucunda ise 1 izolat beklenen bant büyüklüğü olan 420 bp seviyesinde PCR ürünü meydana gelmiş ve bu PCR ürününe sahip 1 izolat (DsAB7), *Dickeya solani* olarak tanılanmıştır. *Pectobacterium atrosepticum*'a spesifik Y45/Y46 primer çifti ile *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*'a spesifik EXPCCF/EXPCCR primer çiftleri ile yapılan PCR testlerinde herhangi bir bant oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. PSA1/PSAR ve ADE1/ADE2 primer çiftleri ile yapılan PCR analiz ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

5. TARTIŞMA

Bu araştırma; Kastamonu İli Merkez ve Devrekani ilçelerindeki patates depolarındaki bakteriyel hastalıkların belirlenmesi amacıyla yapılmış olup, çalışma sonucunda *C.michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve *Dickeya solani* hastalık etmenleri tespit edilmiş, diğer bakteriyel hastalık etmenlerine rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve *Dickeya solani* Kastamonu için ilk tespittir.

C. michiganensis subsp. *sepedonicus* Bremer vd (1947) tarafından Türkiye’de ilk defa varlığı Adapazarı’nda rapor edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise Karel ve Karahan (1962) etmenin Ankara’daki depolarda Nevşehir, Ürgüp ve Ankara kaynaklı patates yumrularında tahribata neden olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak Hollandalı araştırmacı Turkensteen 1985 - 1983 yıllarında yaptığı çalışmada “Türkiye patates hastalıkları” surveyi sonucunda etmenin ülkemizde olmadığını rapor etmiştir.

Dünyada patates ticaretini engelleyen ve en çok önemsenen patates hastalıklarından biri patates halkalı çürüklük hastalığıdır. Yapılan çalışmalarda Orta Anadolu Bölgesinde etmenin varlığına rastlanılmamıştır. Ülkemizde tohumluk patates, büyük oranda ithal edilmektedir. İthalat yaptığımız ülkeler arasında Hollanda, Almanya, A.B.D ve Kanada yer almaktadır (De Boer ve Slack,1984). Etmenin yumrulara latent olarak bulunması tohumluk olarak ithal edilen ülkelere hastalığın ülkemize giriş riskini artırabileceği düşünülmektedir.

Dickeya (eski adıyla *Erwinia chrysanthemi*) önemli bitkilerde kara lekeye ve yumuşak çürüklüğe neden olan bir hastalık etmenidir.

İlk olarak Avrupa’da Polonya’da görülen *Dickeya* spp., sadece bir yumruda gözlenmiştir. Etmen daha sonra Macaristan, İsveç (Perrson, 1991), İsviçre (Cazelles ve Schwarzel, 1992), Fransa (Helias vd, 2006), Belçika, İspanya (Palacio-Beilsa vd, 2006), İngiltere (Parkinson vd, 2009), İsrail (Tsrer vd, 2009), Hollanda (Czajkowski vd, 2010), Gürcistan (Erlich vd, 2012) ve Türkiye’de rapor edilmiştir (Ozturk ve Aksoy, 2017).

Hollanda, Finlandiya, Polonya, İsrail ve Avrupa’nın bazı yerlerinde 2004 yılında sonra izolatlardan sekans verileri, biyokimyasal ve REP-PCR analiz çalışmaları

yapılmış ve diğer türlerden farklı olarak *Dickeya solani* biovar 3 olan yeni bir tür olarak belirlenmiştir.

Smid vd (1995), *Dickeya* spp.'nin yumrularda latent olarak bulunan popülasyonları belirlemek için geleneksel yöntemler yeterli olmamıştır ve türe özel PCR kullanılmıştır. *Dickeya* spp.'yi tanımlarken 450 bp'lik bant ERWFOR ve CHRREV primer çifti kullanılmıştır.

Dickeya içerisinde 6 genomik tür; *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiaca* ve *D. zeae* (Samson vd, 2005) belirlenmiştir. Bu grubun daha sonraki revizyonu ile *D. dieffenbachiae*'nin yeniden sınıflandırılması ve *D. dadantii*'nin alt türü olmasının gerektiği belirtilmiştir (Ngadze vd, 2012).

Yapılan bu çalışmada biyokimyasal testlerden gram boyama testi *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* pozitif iken, *Dickeya* için negatif sonuç verdiği, her iki etmenin de jelatini eritme testine, floresan pigmentasyon testine, oksidaz testine, arginin dehidrolaz aktivitesi testine negatif reaksiyon verdiği görülmüştür. KOH testi *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* negatif, *Dickeya* için pozitif; Katalaz testi *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* için pozitif, *Dickeya* için negatif sonuç verdiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında Ayers vd (1919), Lelliot ve Stead (1987), Sands (1990), Saygılı (1995), bulguları ile de uyum göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen izolatların tütünde aşırı duyarlılık, patatesta pektolitik aktivite ve patojenisite testlerine verdikleri reaksiyonlar; Van der Zwet (1986), Lelliot ve Stead (1987), Klement vd (1990)'in bulguları ile uyum göstermektedir.

Laboratuvara getirilen hastalıklı bitki örneklerinin tümü, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve *D. solani*'ye ait hastalık belirtilerini içeren simptomlara sahip olmasına ve hastalıklı bitki örneklerinden toplam 87 adet izolat izole edilmesine rağmen; tütünde aşırı duyarlılık, patojenisite, biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler tanı testleri sonucunda *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve *D. solani*'ye ait sadece 5 izolatın saf olarak elde edilmesinin; izolasyon çalışmaları ve/veya saflaştırma çalışmaları ya da saf olarak elde edilen izolatların tanı çalışmaları için tekrar canlandırılması sırasında meydana gelen bulaşmalar nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Kastamonu ilinde böyle bir çalışmanın daha önce yapıldığına dair bir rapora rastlanmamıştır. Bu sebeple Kastamonu ilinde yapılan bu çalışma, bilimsel olarak

alışmalara bilgi kaynağı oluşturması bakımından önemlidir. Yapılan bu çalışmada elde edilen izolatların biyokimyasal ve moleküler tanısı yapılmıştır.

Bulunan izolatların ırk farklılıklarının belirlenmesine yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Moleküler tanısı yapılan bu izolatların tür içinde ırk düzeyindeki farklılıkları sekans analizleri yapılarak belirlenebilir.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Kastamonu Merkez ve Devrakani ilçelerine ait köylerde patates üretim alanlarında *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve *D. solani* etmenlerinin fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal testler daha önce hiçbir çalışmada mevcut olmadığından dolayı bu tez çalışması daha sonraki çalışmalara kaynak oluşturmaktadır. Bu çalışmada Merkez ve Devrakani ilçelerine ait 11 köyden toplanan hastalıklı örneklerden toplam 87 adet izolat elde edilmiş, bu izolatlardan tütünde aşırı duyarlılık ve patates yapraklarında nekrotik lezyon oluşturan 5 adet izolattan 4 adetinin *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve 1 adetinin ise *D. solani* olduğu fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler testler sonucunda belirlenmiştir.

Patates de özellikle depolama yerlerinin uygunsuz, yetersiz, rutubetli, havasız ve serin olmaması sebebiyle bu hastalıkların olmasına olanak sağladığı düşünülmektedir.

İyi bir depolama öncelikle, patates yumrularının filizlenmesinin engellenmesi, aşırı nem kaybının önlenmesi ve kullanım amacına göre kalitesinin korunması ile mümkündür. Başarılı bir depolamada uygulanacak sıcaklık, patatesin yetiştirme ve hasat koşulları, havalandırma ve nem düzeyleri önemli olan etkenler arasındadır. Patates hasat döneminde oluşabilecek ezilmelere ve yaralanmalara dikkat edilmelidir. Depolama sırasında oluşan hastalıkların büyük bir çoğunluğu hatalı hasat sonucu oluşmaktadır. Funguslar ve bakteriler gelişimleri için anaerob ortamlar veya yüksek bağıl neme ihtiyaç duyarlar. Patates yumruları üzerindeki su kondansasyonu, yumru yüzeyindeki gözeneklerin oluşması sonucunda mikroorganizmaların hızla yayılmasına neden olur. Böyle bir durumda yumrulardaki yaraların iyileşmesi için +15°C' de yumruların iki hafta beklemesi gerekir (İşler, 2016).

Depolarda sıcaklık uygun olmadığında hücrelerin ölümü gerçekleşerek yumrunun merkezindeki oksijen eksikliğinden dolayı yumru içi kararmalara neden olabilir. Bu nedenle yetersiz havalandırma bulunan, hasattan önce tarlada uzun süreli sıcaklıklar ve depo sıcaklığının düşük olması oksijen yetersizliğine neden olduğundan patateste depolama koşullarında dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır (Anonim, 2011).

Patates hasat edildikten sonra soğutulmuş depolara koyulmadan önce yumruların üzerindeki toz, toprak ve bitki artıkları temizlenmelidir. Modern depolama alanlarında depo alanının tüm iç kısımları dezenfekte edildikten sonra yumrular depoya alınmalıdır. Yumruların kabuklarının iyice olgunlaşması ve yara dokularının oluşmaması için 15 -20 °C'de 1 - 2 hafta % 85'in üzerinde nem koşulları göze alınarak ön depolama yapılması gerekir. Bu ön depolama aşamasından sonra yumruların kullanma amaçlarına göre depo şartları ayarlanarak depo içerisine yumrular koyulmalıdır (Anonim, 2015a).

Patateslerde bulunan bu bakteriyel hastalıkların mücadelesinde alınacak tedbirler başta temiz ve sertifikalı tohumluk kullanılması olup bunun yanında depolama sırasında hasta yumrular ayıklanarak uzaklaştırılarak yumruların yaralanmamasına da dikkat edilmelidir.

Patates üretiminde verimi etkileyen tohumlukların sertifikalı kullanımı çok önemlidir. Bu yüzden sertifikalı tohumluk kullanımı üreticilere teşvik edilmesi üretimde önemli bir paya sahiptir (Anonim, 2005).

Konukçu sayısının çok olmasından dolayı özellikle *Dickeya* türleri, temiz alanlara hastalığın taşınmaması için gerekli önlemlerin alınması gerekir (Toth vd, 2011).

Avrupa' da son yıllarda patatesteki önemli kayıplara neden olan *D. solani* etmeni % 3.3 orandaki varlığı ciddi kontroller yapılması gerektiğini göstermektedir. Konukçu sayısının fazla olmasından dolayı *Dickeya* spp.'nin ekonomik açıdan kayıplara neden olmaktadır. *Dickeya* spp.'nin topraktaki ve sulama suyundaki varlığı Türkiye'de bazı illerde yetiştirilen soğan, lahanagiller, şeker pancarı ve açık alanda yetiştirilen domates ve biber yetiştiriciliğinde kontrol altında olması sağlanmalıdır.

Eğer tohumluk patatesler dikimden önce kesilirse enfekteli bir yumrunun kesilmesiyle kullanılan bıçak sağlıklı yumrulara geçerek bulaşma gözlenebilir. Bunun için bu gibi durumlarda kullanılan aletlerin % 10'luk NaOCl ile dezenfeksiyonu kesinlikle yapılmalıdır (Anonim, 2017).

Hastalığın mücadelesinde etkin ve ekonomik bir kimyasal mücadele olmadığından kültürel mücadeleye daha fazla önem verilmelidir.

Patatesi tarlada yeterli ve düzenli yapılmadığında çatlak yumrulara ve yumru içinde kararma - boşluklar meydana getirir. Bu nedenle ilk sulama yumrular fındık b y kl   ndeysen yapılmalıdır. Hastalıkların  nlenmesinde önemli bir kültürel mücadeledir.

Elde edilen bakteriyel hastalıkların ürün kayıplarının en aza indirilmesinde en etkili yöntem temiz ve sertifikalı tohumluk kullanılmasıdır. Aynı zamanda depolama koşullarının uygun olması hastalığın yayılmasında önemli bir etkidir. Bu konuda çiftçilerimizin bilinçlendirilmesi amacıyla Tarım ilçe müdürlükleri ile eğitim seminerleri düzenlenebilir.



KAYNAKLAR

- Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press, New York, USA.
- Alisdair, R., Fernie R. and Willmitzer, L. 2001. Update on Tuber Formation, Dormancy, and Sprouting Molecular and Biochemical Triggers of Potato Tuber Development. *Plant Physiol.*, December 2001, 127:1459-1465.
- Altundag, S., Karahan, A., Kılinc, A.O. and Ozakman, M. 2009. First report of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* causing bacterial ring rot of potato in Turkey. *Plant Pathology* 58:4, 794.
- Anonim, (2005). Türkiye Ziraat Odaları Birliği. Patateste Ekim Zamanı. <http://www.tzob.org.tr/>, (Erişim tarihi: 15.02.2018).
- Anonim, (2009). Patates halka çürüklüğü. Ziraai Mücadele Teknik Talimatları, Ankara, 51-53, (Erişim tarihi: 18.03.2018).
- Anonim, (2011a). Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri. Patateste Görülen Depo Hastalıkları. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/19432/mod_resource/content/0/Konu%2011.pdf (Erişim tarihi: 05.03.2018)
- Anonim, (2011b). Patates Halka Çürüklüğü Hastalığı ile Mücadele Hakkında Yönetmelik(2011). T.C. Resmi Gazete, 28064, 24 Eylül 2011, (Erişim tarihi: 18.03.2018).
- Anonim, (2015). Patates hastalıkları ve mücadele yöntemleri <https://www.tarimdanhaber.com/haber/tarim-ve-ziraat-bilgi-bankasi/patates-hastaliklari-ve-mucadele-yontemleri//>. (Erişim tarihi: 15.12.2017)
- Anonim, (2015a). Tarla bitkileri patates ders notları. Çukurova Üniversitesi Bilgi Sistem http://abs.cu.edu.tr/Dokumanlar/2015/TEP201/436849399_tarla_bitkileri.patates-_eklenecek.ppt. (Erişim tarihi 10.06.2017)
- Anonim, (2017). Patates Halka Çürüklüğü Hastalığı ile Mücadele Hakkında Yönetmelik T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. <https://www.tarim.gov.tr/> (Erişim tarihi: 05.03.2018)
- Anonim, (2018a). Türkiye’de patates üretimi yapılan illere ait veriler. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. (Erişim tarihi: 20.06.2018).
- Anonim, (2018b). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). Kastamonu ilçelerinde patates üretim miktarı istatistikleri. <http://rapory.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi 10.01.2018)
- Anonymous, (2008). Food and Agriculture Organization of the United Nations Classifications and Standards. <http://faostat.fao.org/> (Erişim tarihi: 15.01.2018)
- Anonymous, (2009). Food and Agriculture Organization of the United Nations Classifications and Standards. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Erişim tarihi: 15.02.2018)
- Anonymous, (2018). Food and Agriculture Organization, www.fao.org, Erişim tarihi: (20.06.2018)
- Appel O, 1906. (Neuere Untersuchungen uber Kartoffel und Tomatenerkrankungen) Jahresber. Ver. Agew. Bot, 3:122-136.

- Arioğlu, H. 2002. *Nışasta Şeker Bitkileri Ders Kitabı*. Genel Yayın No: 188. Ders Kitapları Yayın No: A-57, s:234, Adana.
- Ayers, S.H., Rupp, P. and Johnson, W.T. 1919. A study of the alkali-forming bacteria in milk. U. S. Dept. of Agric. Bull.782: 1-39.
- Baribeau, B. 1948. Bacterial ring rot of potatoes. *American Potato Journal*, 25:71-82.
- Benlioglu, K.Y., Öktem, E. ve Özakman, M. (1991) Bacterial diseases of potatoes in the major potato-growing areas in Turkey. EPPO Bulletin 21, 67-72.
- Boccaro, M., Vedel, R., Lalo, D., Lebrun, M.H. and Lafay, J.F. 1991. Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 4: 293-299.
- Bora, T. ve Karaca, İ. 1970. *Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi*. Bornova Ege Üniversitesi Matbaası, 1970, Yayın No: 167
- Bremer, H., İşmen, G., Karel, H. and Özkan, M. 1947. Studies on the parasite fungi of Turkey. *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası*, Seri-B 13 : 1-55.
- Bugbee, W.M., Gudmasted, N.C. 1988. The recovery of *Corynebacterium sepedonicum* from sugarbeet seed. *Phytopathology* 78:205-208
- Cahill, G., Fraser, K., Kowalewska, M.J., Kenyon, D.M., Saddler, G.S. 2010. Recent findings from the Dickeya survey and monitoring programme. In: The Dundee Conference. Crop Protection in Northern Britain 2010, Dundee, UK, 23-24 February 2010. Dundee, UK: The Association for Crop Protection in Northern Britain, 171-176.
- Cazelles, O. and Schwarzel, R. 1992. Survey of bacterial diseases caused by *Erwinia* in seed potato fields in western Switzerland. *Revue Suisse d'Agriculture*, 24: 215-8.
- Charskowski, A. 2006. The soft rot *Erwinia*. *Plant-Associated Bacteria*, 423-505, Netherlands.
- Chen, X.F., Zhang, H.L., Chen, J. 2015. First report of *Dickeya solani* causing soft rot in imported bulbs of *Hyacinthus orientalis* in China. *Plant Disease*, 99:1,155. <http://apsjournals.apsnet.org/loi/pdis>
- Christie, R.D., Sumalde, A.C., Schulz, J.T., Gudmestad, N.C. 1991. Insect transmission of the bacterial ring rot pathogen. *American Potato Journal*, 68:6,363-372; 17 ref.
- Cowan, R., Young, K.A. (1973). Evaluation of serum alkaline phosphatase determination in patients with positive bone scans, *Cancer*, 32: 887-889.
- Czajkowski, R. 2011. Ecology and control of *Dickeya* spp. In potato. Doctoral Dissertation, Institute of Biology Leiden University, The Netherlands.
- Czajkowski, R., de Boer, W.J., Velvis, H. and Van der Wolf, J. 2010. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology*, 100,134-42.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., Van der Wolf, J.M. and Sledz, W., 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg

- and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology*, doi:10.1111/aab.12166.
- Çalışkan, M. E., Mert, M. ve Günel, E. 1999. Bazı stres şartlarına patates bitkisinin morfolojik ve fizyolojik tepkileri. II. Ulusal Patates Kongresi, 28-30 Haziran 1999: 245-257, Erzurum.
- Çetiner, S. 2016. "Patates nasıl Avrupalı oldu?" *Tarlasera Tarım ve Kültür Dergisi, Tematik Yayınları*, İstanbul. s.24-25.
- De Boer, and Slack, S.A. 1984. Current status and prospects for detecting for detecting and controlling bacterial ring rot of potatoes in North America. *Plant Disease*, 68:841-844.
- Demir, G. and Gündoğdu, M. (1991) Detection of ring rot disease (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*) of potato tubers. *The Journal of Turkish Phytopathology*. 20, 117.
- Elçi, S., Kolsarıcı, Ö., Geçit, H.H., 1994. *Tarla Bitkileri Ders Kitabı*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, no:1385, Ankara.
- Erlich, O., Hazanovsky, M., Ben Daniel, B., Zig, U. and Lebiush, S. 2012. Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hot climate conditions. *Plant pathology*, 61:1,161-168.
- Fréchon, D., Exbrayat, P., Helias, V., Hyman, L.J., Jouan, B., Llop, P., Lopez, M.M., Payet, N., Pérombelon, M.C.M., Toth, I.K., van Backhoven, J.R.C.M, van der Wolf, J.M., Bertheau, Y. 1998. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Research*. 1998,41:163–173.
- Graham, D. 1964. Taxonomy of the soft rot coliform bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 2,13-42.
- Gram, H.C.J. and Friedlaender, C. 1884. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt-und Trockenpräparaten. Theodor Fischer's medicinischer Buchhandlung.
- Günaçtı, H. and Erkılıç, A. 2010. Determination of variety reaction to Potato Wart Disease (*Synchytrium endobioticum*) in Potato Planting Areas of Nevşehir Province, Turkey. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 39,1-3.
- Harrison, M.D., Franc, G.D., Maddox D.A., Michaud J.E. and Mccarter-Zorner N.J. 1987. Presence of *Erwinia carotovora* in surface water in north America. *Journal of Applied Microbiology*, 62, 565-70.
- Hawkes, J.G.,1992. History of the Potato. The Potato Crop the Scientific Basis for Improvment (ed.P.M.Haris) Chapman and Hall, London, 1-12.
- Helias, V., Le Roux, A.C. and Monfort, F. 2006. Potato blackleg in France: incidence of causal *Erwinia* species and field symptoms expression. In 1st International *Erwinia* workshop.
- Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. and Duarte, V. 2006. *Erwinia chrysanthemi*: Pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41:1567-1571.

- İlisulu, K. 1986. *Nışasta ve şeker bitkileri ve Islahı Ders Kitabı*. s:279. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakóltesi yayınları:960,. Ank.üniv. basımevi, Ankara.
- İşler, 2016. Patates ürününün depolanması. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Tarla Bitkileri Bölümü <https://docplayer.biz.tr/16104341-Patates-urununun-depolanmasi.html>. (Erişim tarihi:15.11.2018)
- Jorstad, I. 1932. Beretning om planteskdemmer i land-og-hage bruket VII. Sopp-og bakteriesykdommer pa potater. Landbruksdircktores beretning. Tillegg, C:-63.
- Kang, H.W., Kwon, S.W., 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 Pathology*.52:127–133.
- Karel, G. ve O.Karahan, 1962. Orta Anadolu Bölgesinde patateslerde erken kuruma ve yumru çürümelerine neden olan faktörler. Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Yayınları No:42, Tarım Bakanlığı, Ankara.
- King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The journal of laboratory and clinical medicine*, 44:2, 301-307.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C. 1990. Methods in phytobacteriology, Akademia Kiado, Budapest, Xıv+568s.
- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, Lond.*, 178, 703.
- Knorr, L.C. 1948. Suspect range of the potato ring rot bacterium. *American Potato Journal* 25, 361-371.
- Lansade, M. 1942. La maladie du Fletrissement Bacterien de la pomme de terre. Jour. La Pomme de Terre Francaise, 41.
- Laurila, J., Ahola V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A. and Pirhonen, M. 2008. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 122, 213-225.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Uk.
- Levy, D. and Veilleux, R.E. 2007. Adaptation of potato to high temperatures and salinity-A review. *American Journal of Potato Research*, 84: 487-506.
- Mansfeld-Giese, K. 1997. Plant-to-plant transmission of the bacterial ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Potato Research*, 40:2,229-235; 19 ref.
- Mc Carter- Zorner, N.J., Harrison, M.D., Franc, G.D., Quinn, C.E., Sells, I. and Graham, D.C. 1985. Soft rot *Erwinia* bacteria in the rhizosphere of weeds and crop plants in Colorado, United states and Scotland, *Journal of Applied Bacteriology*, 59:4, 357-368.
- Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R. and Bertheau, Y. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis

- of PCR-amplified fragments of *pel* genes, *Applied and Environmental Microbiology*, 62:7, 2228-2235.
- Ngadze, E., Brady, C. L., Coutinho, T.A. and Van der Waals, J.E. 2012. Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, 134:3, 533-549.
- Obradovic, D. and Kevresan, S. 2010. Optimization of PCR in application of hot Start Taq DNA Polymerase for Detection of *Erwinia amylovora* with Primers ER1-F and FER1-R. *Microbiology*, 79, No: 6, 816-821.
- Olsson, K. 1976. Experience of ring rot caused by *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. et Kotth.) Skapt. et Burkh. in Sweden. Particularly detection of the disease in its latent form. EPPO Bulletin [Olsson, K. : Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in Sweden.], 6(4):209-219.
- Ozturk, M. and Aksoy, H.M. 2017. First report of *Dickeya solani* associated with potato blackleg and soft rot in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 99:1.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A. and Lopez, M.M. 2006. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. *The Annals of Applied Biology*, 148, 157-164.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A. and López, M. M. 2009. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). *Journal of Plant Pathology*, 249-297.
- Parkinson, N., Pritchard, L., Bryant, R., Toth, I., Elphinstone, J. 2015. Epidemiology of *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* in ornamental hosts and potato studied using variable number tandem repeat analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 141:1, 63-70.
- Parkinson, N., Stead, D., Bew, J., Heeney, J, Tsrer, L. and Elphinstone, J. 2009. *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of *recA* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2388-93.
- Pastrik, K.H. 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 155–165.
- Perombelon, M.C.M. and Van der Wolf, J.M. 2002. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica*) on potatoes: a laboratory manual. *Scottish Crop Research Institute Annual Report*, 10.
- Perombelon, M.C.M. 1974. The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Research*, 17, 187-99.
- Perombelon, M. C. M. and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 361-387.
- Perrson, P. 1991. Soft rot *Erwinia* species attacking potatoes in Sweden. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences. Plant Protection Reports And Dissertations, 20.

- Potrykus, M., Golanowska, M., Sledz, W., Zoledowska, S., Motyka, A., Kolodziejska, A., Butrymowicz, J., and Lojkowska, E. 2016. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. *Plant Disease*. 100:408-417.
- Rouffiang, J., Gerardin, D., Kellenberger, I., Schaerer, S., Dupuis, B. 2013. Potato susceptibility to aerial stem rot caused by *Dickeya* spp. (Sensibilité de la pomme de terre aux pourritures de tiges provoquées par *Dickeya* spp.) Recherche Agronomique Suisse, 4:10,424-431. <http://www.agrarforschungschweiz.ch>
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. A4.40-42. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le, Saux M., Achouak, W., Gardan, L., Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 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*. 2005;55:1415–1427. [PubMed] Harbor, New York.
- Sands, D.C. 1990. Physiological criteria-determinate tests. In *methods in phytobacteriology*. (Eds. Klement, Z.; Rhudolp, K.; Sands, D. C.) Academia Kiado, Budapest, Hungary.
- Sawyer, R.L. 1984. Potatoes for the developing world. International Potato Center, Lima, Peru.
- Saygılı, H. 1995. *Fitobakteriyoloji Ders Kitabı*. Doğruluk matbaası Çankaya İzmir 201.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.
- Shroeder, B.K. 2003. Observation of a pathogen shift among the bacterial soft rot pathogens on potato in Washington State. *Proceedings of the Washington State Potato Conference*. 47 - 52.
- Slack, S.A. 1987. Biology and ecology of *Corynebacterium sepedonicum*. *American Potato Journal* 64, 665-670.
- Slawiak, M., Van Beckhoven, J. R., Speksnijder, A. G., Czajkowski, R., Grabe, G. and Van der Wolf, J. M. 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.
- Smid, E.J., Jansen, A.H.J. and Gorris, L.G.M., 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 44,1058–69

- Spieckermann, A. and Kotthoff, P. 1914. Untersuchungen über die Kartoffelpflanze und ihre Krankheiten. I. Die Bakterienringfaule der Kartoffelpflanze. Landw. Jahrb, 46:659-732.
- Starr, G.H. and Riedl, W.A. 1941. Bacterial ring-rot of potatoes. Wyoming Agricultural Experiment Station Bulletin, 244:3-12.
- Struik, P.C. and Ewing, E. E. 1995. Crop physiology of potato (*Solanum tuberosum*): responses to photoperiod and temperature relevant to crop modelling. Potato Ecology and Modelling of Crops under Conditions Limiting Growth (A.J. Haverkort and D.K.L. MacKerron, Editors). Kluwer Academic Publishers, 19-40, Dordrecht.
- Toth I.K., Bell K.S., Holeva M.C. and Birch P.R. J. 2003. Soft rot *Erwiniae*: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4, 17-30.
- Toth, I.K., Van der Wolf, J. M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M. and Elphinstone, J. G. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe, *Plant Pathology*, 60:3, 385-399.
- Tsror (Lahkim), L., Erlich, O., Lebiush, S., Hazarovsku, M., Zig, U., Slawiak, M., Grabe, G., Van der Wolf, J. M. and Van der Haar, J. J. 2009. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *European Journal of Pathology*, 123, 311-320.
- Tsror, L., Lebiush, S., Erlich, O., Ben-Daniel, B., Wolf Jvan der, 2010. First report of latent infection of *Cyperus rotundus* caused by a biovar 3 *Dickeya* sp.(Syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Israel. *New Disease Reports*, 22:Article 14.
- Turkenstenn, L.J. 1985. Türkiye patates hastalıkları surveyi. Ege Bölge Ziraat Araştırma Enstitüsü Yayınları, No:62, Menemen, İzmir.
- Van der Wolf, J. M. and De Boer, S. H. 2007. Bacterial pathogens of potato. In potato biology and biotechnology: Advances and perspectives, 595-617.
- Van Der Zwet, T. 1986. Identification, symptomatology and epidemiology of fire blight Le Conte pear in Nil Delta of Egypt. *Plant Disease*.72:230-234.
- Van der Wolf, J. M. ve Bergsma-Vlami M, 2013. Final report - *Dickeya* species in potato and management strategies. Euphresco, phytosanitary ERA-NET. http://www.kartoffelafgiftsfonden.dk/rappport/Rap12/AU_Final_Dickeya13.pdf
- Yıldırım, M.B. ve Yıldırım, Z., 2002. *Patates Islahı ve Biyoteknoloji*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitapları, Ofis-ser, Bornova-İzmir. 101.
- Zizz, J.D. ve Harrison, M.D. 1991. Detection of *Clavibacter michiganenses* subsp. *sepedonicum* (Spieck. & Kotth.) (Carlson & Vidaver) in common weed species found in Colorado potato fields. *Phytopathology*, 81:1348.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Özge Çalışkan Pirci

Doğum Yeri : Kastamonu

Doğum Tarihi : 14.10.1991

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Kuzeykent Lisesi (2009)

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü (2014)

Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

SERAPARK PEYZAJ, SÜS BİTKİSİ VE FİDANCILIK Yalova Ziraat Mühendisi (2015 -2016)