

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sıddıka ERFEN

***ACIDOVORAX AVENAE* SUBSP. *CITRULLI*'NİN FARKLI
POPULASYONUNUN KÜLTÜRDE GELİŞİMİ VE KARPUZ FİDELERİNDE
ARANMASINDA UYGUN BESİ YERLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ACİDOVORAX AVENAE* SUBSP. *CİTRULLİ*'NİN FARKLI
POPULASYONUNUN KÜLTÜRDE GELİŞİMİ VE KARPUZ FİDELERİNDE
ARANMASINDA UYGUN BESİ YERLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sıddıka ERFEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 30/05/2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Yeşim AYSAN
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Mustafa MİRİK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: ZF2010YL23

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***ACIDOVORAX AVENAE* SUBSP. *CITRULLI*'NİN FARKLI
POPULASYONUNUN KÜLTÜRDE GELİŞİMİ VE KARPUZ FİDELERİNDE
ARANMASINDA UYGUN BESİ YERLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sıddıka ERFEN

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

Danışman : Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Yıl : 2011, Sayfa: 47
Jüri : Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Yard. Doç. Dr. Mustafa MİRİK

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* karpuzda bakteriyel meyve leke hastalığına neden olur. Bu hastalık ülkemiz de dahil karpuz üretimi yapılan pek çok ülkede önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışmada simptomsuz karpuz fidelerinden patojenin epifitik bulaşmalarının saptanmasında kullanılabilen genel ve yarı seçici besi yerlerinin tespiti araştırılmıştır. Denemeye alınan beş adet genel besi yeri (Nutrient Agar, King B, Yeast Extract Calcium Carbonate Agar, Tryticase Soy Agar ve Nutrient Broth Yeast Sucrose Agar) ve yedi adet yarı seçici besi yerleri (WFB 08, WFB 44, WFB 68, EBBA, mEBB, PYDAC ve P-278) kullanılmıştır. Bu besi yerlerinde patojenin farklı popülasyonunun gelişimi de karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak, karışık olmayan temiz bir popülasyondan *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* izolasyonu yapılacaksa genel besi yerlerinden King B ve tryticase soy agar besi yeri; yarı seçici besi yerlerinden P-278 ve EBBA veya mEBB tercih edilmelidir. Hastalık belirtisi gösteren veya göstermeyen karpuz fidelerinden *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* izolasyonunda yarı seçici besi yeri olan P-278 ve mEBB kullanımı tercih edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Karpuz, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, besi yeri, fide

ABSTRACT

MSc THESIS

DEVELOPMENT OF DIFFERENT POPULATION OF *ACIDOVORAX AVENAE* SUBSP. *CITRULLI* ON CULTURE AND INVESTIGATION OF SUITABLE MEDIA FOR DETECTION OF THE PATHOGEN FROM WATERMELON SEEDLINGS

Sıddıka ERFEN

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

Supervisor : Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Year : 2011, Pages: 47
Jury : Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU
Assist. Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* causes bacterial fruit blotch on watermelon. This disease causes important economic losses in many watermelon producing countries, also including our country. In this study, determination of general and semiselective media can be used for detection of epiphytic infection of pathogen from asymptomatic watermelon seedlings was investigated. Five general media (Nutrient Agar, King's Medium B, Yeast Extract Calcium Carbonate Agar, Trypticase Soy Agar and Nutrient Broth Yeast Sucrose Agar) and seven semi selective media (WFB 08, WFB 44, WFB 68, EBBA, mEBB, PYDAC and P-278) were used in the study. Different growth of pathogen populations were also compared in so-called media.

In conclusion, if *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* would like to be isolate from a clear population, general media, King's Medium B and trypticase soy agar, and semiselective media, P-278 and EBBA or mEBB should be preferred. Semi selective media, P-278 and mEBB can be preferred for isolation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from symptomatic or asymptomatic watermelon seedlings.

Key Words: Watermelon, *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*, medium, seedling

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana “*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*”nin farklı populasyonunun kültürde gelişimi ve karpuz fidelerinde aranmasında uygun besi yerlerinin araştırılması” konulu yüksek lisans tezini veren, yönlendirici fikirleri ile bana daima sabırla yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yeşim AYSAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU ve Sayın Yard. Doç. Dr. Mustafa MİRİK’e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Sağlıklı karpuz fidesi temini için Atlas Fide A.Ş.’den Ziraat Müh. Hüsniye GÜL’e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında emeği geçen Dr. Raziye ÇETİNKAYA YILDIZ’a, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Arş. Gör. Sümer HORUZ’a teşekkür ederim.

Tezim süresince manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım başta Zir. Yük. Müh. Eda GEYLANİ YÜZBAŞIOĞLU olmak üzere, Zir. Yük. Müh. Şebnem TİRENG KARUT ve Zir. Yük. Müh. Ayşe Dilara ÇETİNKIRAN’a teşekkür ederim.

Her an olduğu gibi, yüksek lisans eğitimim süresince de maddi, manevi desteğini ve sevgisini esirgemeyen, her türlü zorluk karşısında güçlü ve sabırlı olmamı öğreten başta ağabeyim olmak üzere, annem ve babama ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Genel ve Yarı Seçici Besi Yerlerinin Hazırlanması	16
3.2.2. Yarı Seçici Besi Yerlerinde Kullanılan Antibiyotik ve İndikatörlerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	20
3.2.3. Farklı <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> Populasyonunun Farklı Besi Yerlerinde Gelişimi ve Uygun Besi Yeri Seçimi	21
3.2.4. Farklı <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> Populasyonu ile Bulaştırılmış Karpuz Fidelerinde Patojenin Tespiti	22
3.2.5. Ticari Fideliklerin Ziyareti ve Alman Örneklerin Testlenmesi.....	23
3.2.6. Bakteri İzolatlarının Tanısı	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. Farklı <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> Populasyonunun Farklı Besi Yerlerinde Gelişimi ve Uygun Besi Yeri Seçimi..	25
4.2. Farklı <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> Populasyonu ile Bulaştırılmış Karpuz Fidelerinde Patojenin Tespiti	33
4.3. Ticari Fideliklerin Ziyareti ve Alman Örneklerin Testlenmesi	34

4.4. Bakteri İzolatlarının Tanısı	34
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 1.1. Karpuzun Dünya'daki üretimi	2
Çizelge 1.2. Karpuzun Türkiye'deki üretimi	3
Çizelge 1.3. Karpuzun Türkiye'deki üretimi	3
Çizelge 4.1. Besi yerlerinde patojenin farklı popülasyonunun gelişimi	25
Çizelge 4.2. Patojenin farklı popülasyonu ile bulaştırılmış fidelerden patojenin eldesi	33
Çizelge 4.3. Ticari fideliklerin ziyaretinde hastalık belirtisi gösteren bitkilerden elde edilen izolatların tanı testlerinin sonuçları	35

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 1.1. <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> 'nin fidelerdeki belirtileri...	7
Şekil 1.2. <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> 'nin karpuz ve kavun yaprağındaki belirtileri.....	7
Şekil 1.3. <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> 'nin karpuz meyvesindeki belirtileri.....	8
Şekil 1.4. <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> 'nin kavun meyvesindeki belirtileri	8
Şekil 4.1. Patojenin 1.44×10^5 hücre/ml popülasyonunun farklı besi yerlerindeki koloni gelişimi	27
Şekil 4.2. Patojenin farklı popülasyonunun P-278 besi yerindeki koloni gelişimi	27
Şekil 4.3. Patojenin ml'de 1440 adet bakteri popülasyonu farklı besi yerindeki koloni sayıları	28
Şekil 4.4. Patojenin King B besi yerindeki 2-3 mm çapında ve krem rengindeki kolonileri	29
Şekil 4.5. Patojenin nutrient broth yeast sucrose agar besi yerindeki 3- 4 mm çapında ve haleli kolonileri	29
Şekil 4.6. Patojenin mEBB besi yerindeki 1-2 mm çapında ve etrafı mavi renkli hale ile çevrili olan mavimsi yeşil renkteki kolonileri	30
Şekil 4.7. Patojenin EBBA besi yerindeki 2-3 mm çapında ve koyu yeşil renkte dalgalı kolonileri	30
Şekil 4.8. Patojenin WFB 08 besi yerindeki 1-2 mm çapında ve lila rengindeki kolonileri	31
Şekil 4.9. Patojenin WFB 68 besi yerindeki 2-3 mm çapında ve merkezi sarı renkte olan haleli kolonileri	31
Şekil 4.10. Patojenin P-278 besi yerinde 2-3 mm çapında açık lila renkte kolonileri	32

Şekil 4.11. Patojenin P-278 besi yerinde yaşlandıkça rengi koyulaşan merkezi açık yeşil renkte olan haleli kolonileri.....	32
Şekil 4.12. Ticari fideliklerden elde edilen izolatların tütünde HR testinin pozitif görünümü.....	36
Şekil 4.13. Ticari fideliklerden elde edilen izolatların ELISA testinin sonucu.....	36

1. GİRİŞ

Karpuz [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum ve Nahai], *Plantae* alemi, *Magnoliophyta* (kapalı tohumlular) bölümü, *Magnoliopsida* (iki çenekliler) sınıfı, *Cucurbitales* takımı, *Cucurbitaceae* familyasından olan tek yıllık bir bitkidir. Sıcak ve ılıman iklimde yetişir. Soğuklardan çok etkilendiği için yetiştirme devresinde don tehlikesi olmamalıdır. Tohum ekiminde toprak sıcaklığı 12°C'nin üzerinde olmalıdır. Gövdesi hafif tüylü olup kolları toprak yüzeyinde 3-4 m kadar uzayabilir. Kökleri susuz olarak yetiştirilen yerlerde oldukça derine inmesine rağmen sulak arazilerde saçak kökleri daha çok 40-50 cm derinlikte yoğunlaşır. Meyveleri ise, tatlı ve suludur (Anonim, 2010a).

Beslenme uzmanları karpuzun içerisinde barındırdığı maddelerle tam bir sağlık kaynağı olduğunu belirtmektedir. Karpuzun faydalarını şöyle sıralayabiliriz: Karpuzun bedeni temizleyici özelliği vardır, çünkü yüzde 95'i sudur. Bu sebeple böbrekleri çok iyi çalıştırır. İdrar söktürür. Böbrekteki üre ve urat tuzlarını temizler. Ayrıca kum dökme, taş düşürmeye de etkilidir (Anonim, 2010b). Bol bol B, C vitamini ve antioksidan içerir. Sodyum, kalsiyum, potasyum, çinko ve demir mineralleri açısından zengin bir meyvedir. Böylelikle karpuz, bağışıklık sistemini güçlendirir, vücuda zindelik, serinlik ve ferahlık verir. Soğuk algınlığına iyi gelir. İçerdiği kalsiyum sayesinde kemik gelişimini de destekler. İçerdiği yüksek potasyum kalp fonksiyonlarının ve kan basıncının düzenlenmesine yardımcı olur. Çinko içermesi ile de cinsel gücü artırır. Ayrıca çeşitli kanser türlerine karşı etkili olan Beta-karoten ve kansere karşı koruma özelliği olan likopen maddesi bakımından da oldukça zengin bir meyvedir. Kansere yol açan en büyük sebeplerden biri, doku ve organların zararlı maddeler nedeniyle hasar görmesidir (Anonim, 2010c). "Likopen" maddesi ise, antioksidan özelliği sayesinde, serbest radikaller denilen zararlı toksinlerin sağlıklı doku ve organlara bağlanmasını engeller. Likopen, doku ve organlara bağlanarak zararlı maddelere karşı koruma sağlar. Bu nedenle karpuz, kansere karşı koruma sağlayan en önemli besinlerden biridir (Anonim, 2010d). Karpuzda bulunan likopenin kansere karşı koruyuculuğunun A vitamininden 2 kat, E vitamininden 10 kat fazla olduğu bilinmektedir. Likopen ayrıca kan basıncının

düzenlenmesine de yardımcı olur (Anonim, 2010e). Potasyum ve Beta Karoten maddesi kalbi enfarktüse karşı koruyucu özelliktedir. Karpuz çekirdekleri de içinde bulunan “Cucurbocitrin” adlı maddeyle kan basıncını düşürmeye ve böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur. Kilo sorunu olan bayanlara da bol bol karpuz tüketmeleri önerilir. Karpuz bol miktarda su içermesi ve şeker barındırmaması, ayrıca boşaltımı hızlandırması ve kabızlığı önlemesi gibi özellikleriyle kilo vermeyi hızlandırır. Bu sebeple hem fazla kilosu olan, hem de kilo almak istemeyenlerin bol bol karpuz yemeleri tavsiye edilir. Karpuz, yağ ve kolesterol içermez. Kalorisi de çok düşüktür. Bu sebeple yazın diyet yapanlar için bulunmaz bir gıdadır. Karpuz tam anlamıyla bir şifa kaynağıdır. Şifa kaynağı karpuzdan, azami şekilde faydalanabilmek için doğru tüketilmesi de çok önemlidir. Karpuz tüketiminde yapılan bir yanlış da şöyle dile getirebiliriz; “Karpuzu genelde yemeklerden sonra tüketilmesidir. Yemekten hemen sonra tüketilen karpuz şişkinlik, hazımsızlık ve sindirim problemleri meydana getirir. Bol bol tüketilemez. Karpuzu açken tüketmek içerdiği faydalardan azami şekilde yararlanılmasını sağlar. Bu sebeple karpuzun bu özelliklerinden yararlanmak için yemeklerden çok önce, mide boşken tüketilmesi gereklidir (Anonim, 2010f).

Karpuz, ülkemizde üretilen bitkisel ürünler arasında 4.002.285 milyon ton ile 19. sırada yer almaktadır (FAO, 2008). Dünya’da karpuz üretiminde 1. sırayı 67.203.275 milyon ton ile Çin almaktadır. Ülkemiz ise, 4.002.285 milyon ton üretimle 2. sırada yer almaktadır (Çizelge 1) (FAO, 2008). Ülkemizde karpuz üretiminde ilk sırayı 841.805 ton ile Adana (Çizelge 2); Adana ilinde ise ilk sırayı 242.500 ton üretim ile Karataş ilçesi almaktadır (Çizelge 3) (TÜİK, 2009).

Çizelge 1.1 Karpuzun Dünya’daki Üretimi (FAO, 2008)

SIRA	ÜLKE	ÜRETİM (Milyon Ton)
1	Çin	67.203.275
2	Türkiye	4.002.285
3	İran	2.566.660
4	Brezilya	1.995.206
5	Amerika Birleşik Devletleri	1.814.500

Çizelge 1.2 Karpuzun Türkiye'deki Üretimi (TUIK, 2010)

SIRA	ŞEHİR	ÜRETİM (Ton)
1	Adana	833.955
2	Antalya	370.453
3	İzmir	224.645
4	Diyarbakır	187.623
5	Ankara	136.112

Çizelge 1.3 Karpuzun Adana'daki Üretimi (TUIK, 2010)

SIRA	İLÇE	ÜRETİM (Ton)
1	Yüreğir	230.000
2	Karataş	205.000
3	Seyhan	159.750
4	Ceyhan	137.230
5	Yumurtalık	55.225

Tarımsal alanda ve insan beslenmesinde önemli bir paya sahip olan karpuzda birçok fungal, viral ve bakteriyel etmen tespit edilmiştir. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* bakteriyel etmenler içerisinde en önemlileri arasında yer almaktadır. Bu etmen karpuzda bakteriyel meyve leke hastalığına neden olmaktadır. Etmen ilk önce *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*, daha sonra *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli* olarak adlandırılmıştır (Willems ve ark., 1992). Son taksonomide ismi *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olarak değişmiştir. Patojen, gram negatif, aerobik, düz veya çubuk şeklinde ve tek bir polar kamçıya sahiptir, kamçı sayısı nadiren iki ya da üç de olabilmektedir. Boyutları 0.2-0.8 ile 1.0-5.0 µm arasındadır. Etmen, oksidaz pozitif özelliktedir ve tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmaktadır (Lelliott ve Stead, 1987; Schaad ve ark., 2001). Bakteri, taze lekelerden besi yerlerine kolaylıkla izole edilebilmektedir (Mirik ve Aysan, 2008).

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*'nin neden olduğu bakteriyel meyve lekesi hastalığı ilk defa 1988'de Mariana Adaları'nda ortaya çıkmıştır (Wall ve ark., 1990).

Bir yıl sonrasında da ABD'nin çeşitli eyaletlerinde (Florida, Güney Karolina Indiana ve Illinois) şiddetli epidemiler yapmıştır (Hopkins, 1989; Babadoost ve Pataky, 2002). 2001 yılının Nisan ayında Florida'da bir fidelikte şiddetli epidemilere rastlanmış ve fideler imha edilmiştir. Şu anda ABD'nin 17 eyaletinde hastalığın varlığı bilinmektedir. ABD dışında Gürcistan (Langston ve ark., 1999), Brezilya (Assis ve ark., 1999), Japonya (Takashi ve ark., 2000), Avustralya (Martin ve Horlock, 2002), Kosta Rika (Munoz ve Monterroso, 2002), Nikaragua (Munoz ve Manterroso, 2002), Tayland (Walcott ve ark., 2004), İsrail (Burdman ve ark., 2004), Çin (Ren ve ark., 2006), Tayvan (Tzeng ve Hsu., 2007), İran (Harighi, 2007), Macaristan (Palkovics ve ark., 2008) ve Yunanistan (Holeva ve ark., 2009)'da varlığı rapor edilmiştir. İsrail, bu hastalığın sınırlı yerlerde var olduğunu ve buraların artık karantinaya alınarak temizlenmeye çalışıldığını bildirmiştir (Burdman ve ark., 2004). Macaristan ise, 2007 yılında meydana gelen epideminin kaynağının belli olmadığını, ancak hasta tarlada kullanılan aşılı karpuz fidelerini Türkiye'den ithal ettiklerini belirtmiştir (Palkovics ve ark., 2008).

Ülkemizde hastalık, ilk defa 1996'da Edirne'nin Enez ilçesinin Sultanıçe Köyü'nde ortaya çıkmış ve üretim alanı yakılarak eradike edilmiştir (Demir, 1996). Çukurova Bölgesi'nde ise, ilk kez 2005 yılında Mirik ve ark., (2006) tarafından karpuz üretim alanlarında tespit edilmiştir. 2009 ve 2010 yıllarının yaz aylarında Çukurova Bölgesi'nde Adana (Tuzla, Karataş ve Merkez ilçeler) ve Osmaniye (Kadirli ilçesi) illerine bağlı köylerde, hastalık büyük epidemiler yaparak önemli ekonomik kayıplara neden olmuştur. Adana ve Osmaniye illerinde 4763 dekarlık karpuz üretim alanı Tarım Bakanlığınca karantinaya alınarak dört yıl boyunca bu tarlalarda kabakgil üretimi yasaklanmıştır (Aysan ve ark., 2011). Aynı yıllarda Adana, Mersin ve Antalya illerindeki pek çok ticari fidelikte bu etmeden dolayı çok sayıda fide imha edilmek zorunda kalmıştır (Aysan ve ark., 2011). Hastalık belirtileri 2010 yazında Çukurova Bölgesinde kavunda da epidemi yapmış ve bölgede hastalığın önemli bir konukçusu olarak kavun dikkat çekmiştir (Horuz ve ark., 2011).

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* fidede, yaprakta ve meyvede belirti oluşturur. Gövde, yaprak sapı ve kökler genellikle hastalanmaz. Bu hastalık özellikle

karpuz fidelerini etkilemektedir. Fidelerde ilk belirtiler enfekteli kotiledonlar üzerinde su emmiş lekeler şeklinde görülmektedir (Şekil 1.1). Genç fidelerde hipokotil üzerindeki lezyonlar bitkinin yıkımına neden olabilmektedir. Kotiledonlar büyüdüğünde lezyonlar yapraklara geçer. Gerçek yapraklar üzerindeki lezyonlar küçük, koyu kahverengi ve genellikle sarı bir hale ile çevrilmektedir. Sarı renkli alanlar gelişmiş olan yaprak damarları boyunca ilerler. Yaprığın alttan görünüşüne bakıldığında lezyon sınırları özellikle yağmurlu ya da nemli havalarda su emmiş şekilde görülmektedir. Yaprak lekeleri bazen halesiz, yağ emmiş ve düzensiz lekeler şeklinde de gözlenebilir (Şekil 1.2) (Latin ve Hopkins, 1995; Mirik ve Aysan, 2008). Bakteriyel meyve lekesinin en karakteristik belirtileri, hasat zamanı meyveler üzerinde oluşur ve ürünün pazar değerini yok eder. Enfekteli meyvenin en üst kısmındaki koyu zeytin yeşili lekeler hastalığın karakteristik belirtileridir.. Karpuz meyvelerindeki lekelerin başlangıçta 1 cm'den küçük olduğu gözlenmiştir. Meyve yüzeyindeki lezyonlar 7-10 gün içerisinde tüm meyveyi saracak şekilde genişlemektedir (Şekil 1.3). Lekelerin büyüklüğü arttıkça ilk enfeksiyon yeri kahverengileşmektedir. Meyve üzerinde küçük çatlamış alanlar gözlenebilir. Meyve lezyonları meyve etine ilerleyerek bakterinin tohuma bulaşmasına neden olur. Genişleyen lezyon bölümü ilerleyerek kabuk epidermisini kırar ve yapışkan, temiz, kehribar rengi bir akıntı oluşur. Bakterinin asit üretmesinden dolayı nemli koşullarda meyvelerden dışarıya beyaz köpük çıkışı gözlenir.

Acidovorax avenae subsp. *citrull*'nin, tüm kabakgil (kabak, hıyar, kavun, karpuz) bitkileri konukçusu olmasına rağmen en büyük zararı kavun ve karpuzda yapar. Ayrıca domates ve kantalop kavunu da etmenin konukçusudur (Mirik ve Aysan, 2008).

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* adlı bakteri hasta karpuz meyvelerindeki lezyonların içe doğru ilerlemesiyle tohuma bulaşır ve etmen tohum kaynaklıdır. Etmen tohum kabuğunun iç ve dış kısmına lokalize olabilir. Patojenle bulaşmış tohumdan gelişen fidelerde uygun iklim şartlarında hastalık gözlenir. Karpuz tohumlarında bulunan patojen tohum çimlenmesi esnasında çoğalarak kotiledon yapraklarda su emmiş lekeler oluşturur. Özellikle ılık, nemli, aşırı sulanan fidelerde patojen kolaylıkla yayılır. 26-30 °C civarındaki sıcaklık başarılı enfeksiyon için

gereklidir. Etmen yaprakta çok fazla leke oluşturmaz, hatta pek çok yaprakta etmen epifitik olarak bulunur. Hasta tohumdan gelişen belirti göstermeyen fidelerde tarlada hastalığın yayılması için ilk inokulum kaynağı olarak görev yapar. Sekonder enfeksiyonlar özellikle yağmurlama sulama yapılan tarlalarda su sıçratması yoluyla, yaprak stomaları gibi doğal açıklıklardan meydana gelir. Üretim alanı içerisinde lezyon yüzeylerinde çoğalan bakteriler yeni gelişen yapraklara ve komşu bitkilere yayılırlar. Nemli, sıcak iklim koşulları, yağmurlama sulama, bitki yüzeyinin ıslak kalması, kullanılan çeşidin duyarlı oluşu ve bakım işlemleri esnasında yeşil aksamın yaralanması sonucu tarlada sekonder yayılmalar gerçekleşir ve şiddetli hastalık belirtileri meyvelerde gözlenir. Bazen yaprakta epifitik bulunan bakteri, yaprakta hiç belirti oluşturmazken sadece meyvede belirtiler gözlenebilir. Patojen yaprakтан meyveye bulaşır. Patojen bitkide sistemik olarak taşınmaz (Latin ve Hopkins, 1995; Latin, 1996; Mirik ve Aysan, 2008).

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* adlı bakteriyel etmenin mücadelesinde birinci koşul hastaliksız tohum kullanımıdır. Kullanmadan önce tohumlara ön çimlenme yapılarak tohumların hastalıklı olup olmadığı kontrol edilmelidir. Tohum partisinde tolerans düzeyi sıfırdır. Bu nedenle tohumluklarda hastalık tespit edilirse hemen imha edilmelidir.

Son yıllarda üreticilerimiz fide firmalarından kabak üzerine aşılı karpuz fideleri temin ederek tarlaya şaşırtma yoluyla üretim yapmaktadırlar. Üretim sezonunda görülen yoğun hastalık nedeniyle üreticiler ve fide firmaları sıkıntı yaşamaktadırlar. Bu nedenle *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin fidelerden izolasyonu ve teşhisi çok büyük önem taşımaktadır.



Şekil 1. 1. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin fidelerdeki belirtileri



Şekil 1. 2. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin karpuz ve kavun yaprağındaki belirtileri



Şekil 1. 3. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin karpuz meyvesindeki belirtileri



Şekil 1. 4. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin kavun meyvesindeki belirtileri

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı karantina laboratuvarlarında yapılan analizlerde 50 gr (yaklaşık 1000 adet) karpuz tohumu 250 ml fosfat buffer içinde yüksek döngüde (yaklaşık olarak 150 rpm/saat) 4 saat çalkalandıktan sonra tohumlar bir tülbentle süzülmemektedir. Geriye kalan tohum çalkalama suyu 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmakta ve tüpler 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üstteki süpernatant atılmakta, kalan pellet kısmına 2 ml fosfat buffer eklenip tekrar süspansiyon edilmektedir. Daha sonra elde edilen süspansiyondan 100 µl alınıp genel besiyerlerinden King B ve yarı seçici besiyerlerinden P-278 besi yerine 2 tekrarlı olarak ekimi yapılmaktadır. Ayrıca tohum çalkalama suyu Immuno Floresan Testi (IF) ile incelenmekte floresan boya ile işaretlenmiş koloniler aranmaktadır. Şüpheli görülen koloniler saflaştırılıp ELISA testleri ile diğer biyokimyasal testlere geçilmektedir.

Tohum ve fidelerde bulunan düşük bakteri popülasyonunu saptamak bazen oldukça güç olmaktadır. Bakteri izolasyonu için kullandığımız genel besi yerleri epifit ve latent bulaşıklıkları belirlemede yetersiz kalabilmektedir. Pek çok araştırmacı farklı besi yerleri veya bunların modifiye edilmiş şeklini kullanmaktadır. Tohum testlemelerinde standartları belirleyen Uluslararası Tohum Testleme Birliği (ISTA)'nin ve Avrupa Birliği Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO)'nun da bu etmen için önerdiği bir tohum testleme prosedürü bulunmamaktadır. Bu yüksek lisans çalışmasının amacı, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin en küçük yoğunluğunu saptayacak, 12 farklı besi yeri içinden en uygun genel veya yarı seçici besi yerinin tespitidir. Ayrıca bu etmenle suni olarak bulaştırılmış hastalık belirtisi göstermeyen karpuz fidelerinde ve bölgemizde bulunan ticari fideliklerden temin edilecek karpuz fidelerinde (hastalık belirtisi gösteren veya göstermeyen) bu etmenin bulaşıklığı yönünde araştırma yapılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Walcott ve Gitaitis (2000) karpuz tohumlarından *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin saptanmasında serolojik ve moleküler testlerin birleşimi olan immunomagnetik ayırım ve PCR'a dayalı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem genel bir besi yeri olan King B besiyeri kullanımına göre 10 kat daha duyarlı olarak bulunmuştur. Karpuz tohumlarından direk PCR yapmak tohumdaki engelleyicilerden dolayı başarısız olmaktadır. Ancak tohumdaki bakteri hücreleri serolojik bir test olan immunomagnetik ayırım ile tespit edildikten sonra PCR yapıldığında 1 ml tohum çalkalama çözeltisinde 10 bakteri hücrelerinin varlığını belirleyecek düzeyde olduğu saptanmıştır.

Xiao ve ark. (2007) karpuz tohumlarından *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin saptanmasında immunolojik ve moleküler testlerin birleşimi olan immuno capture (IC) PCR'a dayalı bir yöntem kullanmışlardır. IC-PCR yöntemi, spesifik PCR'a göre 100 kat daha duyarlı bulunmuştur. IC-PCR'ın saptayabildiği en düşük bakteri yoğunluğunun 10^2 - 10^4 hücre/ml olduğunu belirlemişlerdir. Bu yöntemin duyarlı, hızlı ve ucuz olduğu belirtilmiştir.

Grondeau ve ark. (2007) tatlı mısırdaki (*Valerianella locusta*) bakteriyel kara leke hastalığına neden olan *Acidovorax valerianellae*'nin topraktan ve bitki artıklarından izolasyonunda yarı-seçici bir besi yeri geliştirmişlerdir. Genel bir besi yeri olan tryptic soy agar (TSA) besiyerine 5 mg/litre 5-fluorouracyl, novobiocin ve propiconazole ekleyerek seçicilik kazandırmışlardır. Bu yarı seçici besiyerinin kullanımıyla topraktan, bitki köklerinden ve artıklarından patojen 39 gün sonra bile izole edilmiştir. Bu besiyerinin temeli, fluoresan *Pseudomonas*'ların gelişiminin 5-fluorouracyl ile engellenmesine dayanmaktadır. Böylece bu besiyerinde *Acidovorax valerianellae* daha dominant olarak gelişebilmektedir. Besiyerine 5 mg/litre dozundan daha yüksek oranda eklenen antibiyotikler *Acidovorax valerianellae* kolonilerinin küçük olmasına neden olur. Bu dezavantajı ortadan kaldırabilmek için besiyerine novobiocin eklenmiştir. Sonuç olarak, TSAV besiyeri farklı bakterilerle bulaşık örneklerden sadece *Acidovorax valerianellae*'nin değil aynı zamanda diğer *Acidovorax* türlerinin izolasyonu için basit, ucuz ve kullanışlı bir besiyeridir.

Park ve ark. (2008) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin neden olduğu bakteriyel meyve lekesi hastalığının mücadelesinde önemli kriterin sağlıklı tohum kullanımı olduğunu vurgulamışlar ve ticari tohumların bu etmen yönünden incelenmesi gerektiğine dikkat çekmişlerdir. Tüm ülkelerde en geçerli tohum testleme yönteminin, direk tohum veya tohum çalkalama çözeltilerinden Walcott ve Gitaitis (2000) tarafından geliştirilen immunomagnetik ayırım ve PCR'a dayalı yöntemin kullanılmasıdır. Bu patojene karşı pek çok spesifik PCR primeri geliştirilmiştir. Araştırmacılar bu PCR primerlerinden Syngenta firması tarafından geliştirilen "ZUP 2288/2289", Seminis firması tarafından geliştirilen "Seminis WFB 1/2" ve Walcott ve Gitaitis (2000) tarafından geliştirilen "RST49/51" ve "RST63/64" kodlu 4 primer seti 12 bakteri türüne karşı testlemişlerdir. Bu 4 primer seti, *Acidovorax konjaci* ve *Acidovorax avenae*'nin diğer 3 alttürünü de tanımıştır. Primer setleri içinde RST49/51'in en duyarlı olduğu tespit edilirken Seminis WFB 1/2 kodlu primer setinin *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin diğer türlerden ayırımında çok kuvvetli bantlar verdiği tespit edilmiştir.

Bahar ve ark. (2008) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin PCR'a dayalı tanısında şimdiye kadar kullanılan primer setlerinin sadece türe spesifik olduğunu fakat alttür düzeyinde ayırım yapamadığını belirtmiş ve sadece *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'yi tanıyan ve diğer alt türlerden ayıran bir primer seti geliştirmişlerdir. Karpuz tohumlarından direk PCR yapmanın pek çok dezavantajı olduğunu özellikle karpuz tohumlarındaki engelleyicilerin yanlış negatif sonuçlar verebileceği belirtilmiştir. Yeni geliştirilen bu primer setini kullanarak *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin karpuz tohumlarından aranmasında immunomagnetik ayırım ve PCR'a (IMS-PCR) dayalı testte başarılı bulgular elde etmişlerdir. Bu çalışmada, 5.000 tohum içinde 1 adet hasta tohum (% 0.02 bulaşıklık) var olduğunda IMS-PCR yöntemiyle bakteriyel tohum çalkalama çözeltilerinde saptayabilmişlerdir.

Ha ve ark. (2009) kabakgil tohumlarından bakteriyel etmen *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'yi ve fungal etmen *Didymella bryoniae*'yi saptarken 2 ayrı prosedür takip etmek yerine magnetic capture hibridizasyon (MCH) ve multiplex real time polimerase chain reaction (PCR) kombinasyonu ile her iki patojeni tek işlemde saptamayı başarmışlardır. Bu yöntem tek başına yapılan real time PCR'a göre 10 kat

daha duyarlı bulunmuştur. Bu yöntemle *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'yi saptayacak en düşük inokulum yoğunluğunun 10 hücre/ml, *Didymella bryoniae*'yi saptayacak en düşük inokulum yoğunluğunun 10^5 konidi/ml olduğu belirlenmiştir. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ile bulaşık dört örnek MCH real time PCR yöntemiyle testlendiğinde tamanındaki bulaşıklık saptanırken, tek başına yapılan real time PCR ile sadece bir örnek bulaşık olarak belirlenmiştir. Bu araştırmada, 5.000 adet kavun ve karpuz tohumu içinde 1 adet *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ve *Didymella bryoniae* ile bulaşık tohumun (% 0.02 bulaşıklık) varlığı MCH ve multiplex real time PCR ile tespit edilebilmiştir. Bu yöntem özellikle her iki patojenin aranacağı karantina laboratuvarlarında emin ve hızlı sonuç elde etmek için kullanımı önerilebilir.

Zhao ve ark. (2009) kavun ve karpuzda tohum kökenli olarak tüm dünyaya yayılma potansiyelinde olan *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin, tohumdaki varlığını tespit etmek için karantina laboratuvarlarında rutin olarak kullanılabilen tohum çalkalama çözeltisi (tampon buffer) ve besi yeri tespiti üzerine bir araştırma yapmışlardır. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* bulaşıklığı yönünden testlenecek tohumlar vancomycin içeren çözeltide çalkalandıktan sonra yarı-seçici besi yeri olarak, etanol bromcresol purple/brilliant blue R içeren EBB ve ampisilin içeren EBBA besi yerine yayılmıştır. Bu yarı-seçici besi yerlerinde gelişen şüpheli kolonilere direkt real-time PCR veya real-time BIO-PCR testi yapılarak bakterinin *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olduğu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada tohum çalkalama çözeltisine antibiyotik ekleyerek tohum yüzeyindeki saprofitler uzaklaştırılmış ve besi yerinde seçicilik daha artırılarak kavun ve karpuz tohumlarında sadece *Acidovorax* cinsine ait bakterilerin gelişimi için uygun koşullar yaratılmıştır. Çalışmada tohum çalkalama çözeltisi, yarı seçici besi yeri ve real-time PCR'ın birleşimini içeren bir yöntem kullanılmıştır. Sonuç olarak, 1000 adet sağlıklı tohum içine sadece 1 adet hasta tohum karışığında, bu yöntemin bulaşık tohum partisini belirleyecek düzeyde olduğu ortaya konmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Patojen izolat: Prof. Dr. Yeşim AYSAN danışmanlığında doktora eğitimine devam eden Zir. Yük. Müh. Hatice ÖRNEK tarafından Adana ilinin Karataş ilçesine bağlı Taşçı köyünden izole edilen ve bu doktora tezi çerçevesinde geleneksel ve moleküler yöntemlerle *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olarak tanılanan Taşçı-1 kodlu izolat kullanılmıştır.

Besi yerleri: Çalışmada genel besi yeri olarak Nutrient Agar (Lelliott ve Stead, 1987), King B (King ve ark., 1954), Yeast Extract Calcium Carbonate Agar (Lelliott ve Stead, 1987), Tryticase Soy Agar (Lelliott ve Stead, 1987) ve Nutrient Broth Yeast Sucrose Agar besi yerleri (Bugbee ve ark., 1987); yarı seçici besi yeri olarak WFB 08 (Gitaitis, 1993), WFB 44 (Gitaitis, 1993), WFB 68 (Walcott ve ark., 1999), EBBA (Zhao ve ark., 2009), modifiye edilmiş ethanol bromcresol purple brilliant blue (mEBB) (Zhao ve ark., 2009), PYDAC (Grondeau ve ark., 2007) ve P-278 besi yerleri (Randhawa ve ark., 2001) kullanılmıştır.

Karpuz tohumları: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ile karpuz tohumlarının bulaştırılması ve buradan patojenin aranması çalışmalarında Nunhems tohum firmasına ait Crimson Sweet çeşidi hibrit karpuz (*Citrullus lanatus*) tohumları kullanılmıştır.

Karpuz fideleri: Patojenite çalışmalarında Atlas fide firması (Yeniyayla köyü, Adana) tarafından üretilen 2-3 gerçek yapraklı dönemdeki sağlıklı Zeugma çeşidi hibrit karpuz (*Citrullus lanatus*) fideleri kullanılmıştır.

Ticari fidelikler: Çukurova Bölgesinde Adana ve Mersin illerinde bulunan ticari olarak karpuz fidesi üretip satışını yapan üç adet ticari fidelikten örnekler toplanmış ve denemeler yürütülmüştür.

ELISA tanı kit: Agdia firmasına ait “SRA 14800 Reagent Set” kodlu ticari tanı kiti kullanılmıştır. DAS-ELISA testinde *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* için spesifik olan monoklonal antiserum ve alkaline fosfataz enzimiyle işaretlenmiş RUB3 kodlu konjugate kullanılmıştır.

Kullanılan alet ve makinalar: Çalışmada hassas terazi, saf su cihazı, magnetik karıştırıcı, pH metre, otoklav, steril kabin, inkübatör, erlen çalkalayıcı, tohum öğütücü ve ELISA okuyucusu kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3. 2. 1. Genel ve Yarı Seçici Besi Yerlerinin Hazırlanması

Nutrient Agar Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 1 gr beef extract, 2 gr yeast extract, 5 gr bakteriyolojik pepton ve 5 gr NaCl eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra pH: 7.2-7.4'e ayarlanmıştır. Karışım içerisine 15 gr agar ilave edilmiş ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak besi yeri sterilize edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yeri, steril kabinde bulunan 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

King B Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 20 gr proteose peptone, 1.5 gr $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1.5 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 10 ml gliserin eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra pH: 7.0-7.2'ye ayarlanmıştır. Karışım içerisine 15 gr agar ilave edilmiş ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak besi yeri sterilize edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yeri, steril kabinde bulunan 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

Yeast Extract Calcium Carbonate Agar Besi Yeri: Isıtılmış bir litre saf su içerisine 10 gr yeast extract, 20 gr glikoz ve 20 gr kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra pH: 7.0-7.2'ye ayarlanmıştır. Karışım içerisine 12 gr agar ilave edilmiş ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak besi yeri sterilize edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yeri, steril kabinde bulunan 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır.

Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

Trypticase Soy Agar Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 30 gr trypticase soy broth eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra pH: 7.0-7.2'ye ayarlanmıştır. Karışım içerisine 15 gr agar ilave edilmiş ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak besi yeri sterilize edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yeri, steril kabinde bulunan 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

Nutrient Broth Yeast Sucrose Agar Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 8 gr nutrient broth, 8 gr yeast extract, 0.5 gr K₂HPO₄, 0.5 gr sukroz eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra pH: 7.0-7.2'ye ayarlanmıştır. Karışım içerisine 15 gr agar ilave edilmiş ve 121°C'de 20 dk otoklavlanarak besi yeri sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yerine, filtreden geçirilerek steril edilmiş olan 1 ml MgSO₄×7H₂O steril şartlarda eklenmiş (Bugbee ve ark., 1987) ve 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

PYDAC Besi Yeri: Isıtılmış bir litre saf su içerisine 3 gr peptone, 3 gr yeast extract, 5 gr glukoz, 40 gr kalsiyum karbonat (CaCO₃) magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra pH: 7.0-7.2'ye ayarlanmış ve 15 gr agar eklenmiştir (Grondeau ve ark., 2007). Besi yeri 121°C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiş 50°C'ye soğutulduktan sonra 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

WFB 08 Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 5 gr NaCl, 1 gr NaH₄PO₄, 1 gr K₂HPO₄, 0.2 gr MgSO₄×7H₂O, 0.2 gr Berberine, 5 µl Pourite, 3 gr β-Hydroxybutyric acid eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra 0.01 gr Phenol red ve 1 ml Methyl violet B (% 1'lik stok solüsyonundan) eklenmiştir. pH'sı 7.0-7.2'ye ayarlanan besi yerine 15 gr agar ilave edilerek, büyük bir erlende içinde bir magnet

ile birlikte 121°C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yerine, filtreden geçirilerek steril edilmiş olan 0.1 gr cycloheximide adlı antibiyotik steril koşullarda eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Gitaitis, 1993). Hazırlanan besi yeri 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

WFB 44 Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 5 gr NaCl, 1 gr NH₄PO₄, 1 gr KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄×7H₂O eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra 0.01 gr Phenol red, 0.01 gr Methyl violet B (% 1'lik stok solüsyonundan), 0.2 gr Berberine, 0.02 ml Pourite, 26 gr CMC (Carboxymethylcellulose'ın çok viskoz olan sodyum tuzu) eklenmiştir. Carboxymethyl cellulose (CMC)'ın iyi bir şekilde karışabilmesi için, azar azar eklenmiştir. CMC iyice eridikten sonra besi yerinin donmasında sıkıntı yaşandığından içerisine literatürde bildirilen 5 gr agarın aksine 8 gr ilave edilmiş ve pH: 7.0-7.2'ye ayarlanmıştır. Büyük bir erlen içinde hazırlanan besi yeri bir magnet ile birlikte 121°C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yerine, filtreden geçirilerek steril edilmiş olan 30 mgr cefaclor adlı antibiyotik steril koşullarda eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Walcott ve ark., 1999). Besi yeri 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

WFB 68 Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 5 gr bacto-peptone, 0.25 gr CaCl₂.2H₂O, 10 ml Tween 80 eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra 0.2 gr berberine ve 0.01 gr methyl violet B eklenmiştir. Kimyasallar iyice eridikten sonra içerisine 15 gr agar ilave edilmiş ve pH 7.0-7.2'ye ayarlanmıştır. Büyük bir erlen içinde hazırlanan besi yeri bir magnet ile birlikte 121°C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yerine, filtreden geçirilerek steril edilmiş olan 0.05 gr carbenicillin adlı antibiyotik steril koşullarda eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Walcott ve ark., 1999). Hazırlanan besi yeri 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık

15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

EBBA Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 0.3 gr yeast extract, 2.6 gr $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.8 gr K_2HPO_4 , 0.3 gr KHPO_4 , 0.2 gr KCl, 0.2 gr $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 gr boric acid eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra pH: 5.3-5.5'e ayarlanmıştır. Besi yeri içerisine 15 mg/ml stok solüsyondan 0.6 ml bromcresol purple ve 10 mg/ml stok solüsyondan 1 ml brilliant blue R ilave edilmiş ve besi yeri tekrar karıştırılmış ve karışım içerisine 16 gr agar ilave edilmiştir. Büyük bir erlen içinde hazırlanan besi yeri bir magnet ile birlikte 121°C 'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra 50°C 'deki su banyosunda soğutulan besi yerine, filtreden geçirilerek steril edilmiş olan 1 mg/ml stoktan 1 ml ampicillin ve 250 mg/ml stoktan 2 ml cycloheximide adlı antibiyotikler ile 10 ml % 96'lık ethanol steril koşullarda eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Zhao ve ark., 2009). Hazırlanan besi yeri 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

Modifiye Edilmiş Ethanol Bromcresol Purple Brilliant Blue (mEBB) Besi Yeri: Bir litre saf su içerisine 2.6 gr $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.8 gr K_2HPO_4 , 0.3 gr KHPO_4 , 0.2 gr KCl, 0.2 gr $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 gr yeast extract, 0.5 gr boric acid eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra ph: 5.3-5.5'e ayarlanmıştır. Besi yeri içerisine 15 mg/ml stok solüsyondan 0.6 ml bromcresol purple ve 10 mg/ml stok solüsyondan 1 ml brilliant blue R ilave edilmiş ve besi yeri tekrar karıştırılmıştır. Karışım içerisine 16 gr agar ilave edilmiştir. Büyük bir erlen içinde hazırlanan besi yeri bir magnet ile birlikte 121°C 'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra 50°C 'deki su banyosunda soğutulan besi yerine, filtreden geçirilerek steril edilmiş olan 10 ml ethanol ve 250 mg/ml stoktan 2 ml cycloheximide steril koşullarda eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Zhao ve ark., 2009). Hazırlanan besi yeri 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

P-278 Besi Yeri: Bir litre saf su içerisinde 1.5 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 gr K_2HPO_4 , 15 ml gliserin, 20 gr proteose peptone eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra ph'sı 7.0-7.2'ye ayarlanmış besi yerine 10 mg/ml stok solüsyondan 1.5 ml brothymol blue, 10 mg/ml stok solüsyondan 100 µl Methyl violet ve 15 gr agar eklenmiştir. Büyük bir erlen içinde hazırlanan besi yeri bir magnet ile birlikte 121°C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir. Otoklavdan sonra 50°C'deki su banyosunda soğutulan besi yerine, filtreden geçirilerek steril edilmiş 100 mg/ml stok solüsyondan 1 ml cycloheximide, 1 mg/ml stok solüsyondan 1 ml vancomycin, 1 mg/ml stok solüsyondan 1 ml ampicillin, 10 mg/ml stok solüsyondan 100 µl gentamycin, 10 mg/ml stok solüsyondan 1 ml 5-flourosil ve 10 mg/ml stok solüsyondan 2 ml cefaclor eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda iyice besi yeri karıştırılmıştır (Randhawa ve ark., 2001). Hazırlanan besi yeri 9 cm çapındaki steril petrilere yaklaşık 15-20 ml dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Petrilerin yüzeyindeki nem kurutulduktan yaklaşık 24-48 saat sonra besi yeri kullanılmıştır.

3. 2. 2. Yarı Seçici Besi Yerlerinde Kullanılan Antibiyotik ve İndikatörlerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Yarı seçici besi yerlerine eklenen antibiyotikler (ampicillin, carbenicillin, cefaclor, cycloheximide, 5-flourosil, gentamycin ve vancomycin) ve indikatörler (brothymol blue, bromcresol purple, brilliant blue R, methyl violet ve phenol red) az miktarlarda stok solüsyon şeklinde hazırlanmıştır. İndikatörler sadece saf su içinde çözülürken antibiyotiklerin bir kısmı % 70' lik etil alkolde bir kısmı da saf su içinde çözülmüştür. Ampicillin ve cycloheximide adlı antibiyotikler % 70' lik etil alkolde çözülmüştür. Antibiyotikler ve indikatörler, milipore marka 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiş ve steril kapaklı cam kaplara alınmışlardır. Üzerine tarih etiketi yapıştırılan steril kaplarda 6 ay buzdolabında saklanmıştır. Örnek olarak bir antibiyotik ve bir indikatörün nasıl hazırlandığı aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

0.1 gr cycloheximide antibiyotiğinin hazırlanması: 1 litre besiyeri içerisinde 0.1 gr cycloheximide antibiyotiğinden ilave etmek için stok solüsyonu hazırlanmıştır. 10 ml % 70'lik etil alkol içerisinde 1 gr cycloheximide eklenmiş, bir magnet

yardımıyla karıştırılarak antibiyotikğin tamamen erimesi sağlanmıştır. Böylelikle 10 ml % 70'lik etil alkol içerisine 1 gr cycloheximide eklendiğinde 0.1 gr/ml stok solüsyonu elde edilmiştir. Sonuç olarak, hazırlanan 10 ml stok solüsyonundan 1 ml alınıp 1 litre besiyerine eklendiğinde litreye 0.1 gr cycloheximide içermiş olur.

10 mg/ml methyl violet stok solüsyonun hazırlanması: 10 ml saf su içerisine toz halinde bulunan methyl violetten 100 mg (0.1 gr) tartılmış, saf su ve tartılan methyl violet cam tüp içerisine aktarılmıştır. Stok solüsyon tüp karıştırıcısında iyice karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan stok solüsyonundan 100 µl alınarak 1 litrelik besiyerine eklenmiş, besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra otoklavda sterilize edilmiştir.

3. 2. 3. Farklı *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Populasyonunun Farklı Besi Yerlerinde Gelişimi ve Uygun Besi Yeri Seçimi

Adana ilinin Karataş ilçesine bağlı Taşçı Köyü'nden izole edilen ve *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olarak tanısı yapılmış Taşçı-1 kodlu izolat spektrofotometre'de A_{600} 'de 0.2'ye ayarlanarak 1.44×10^8 hücre/ml yoğunluğunda hazırlanmıştır. Elde edilen bu süspansiyon 7 kez seyreltilip *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin 8 farklı populasyonunu içeren süspansiyonları hazırlanmıştır. 3. 2. 1.'de içerikleri detaylı olarak anlatılan 12 adet besi yerlerine her bir patojen populasyonundan üç tekrarlı olarak 100'er µl yayılmıştır. Çalışmada kullanılan toplam 288 adet petriden 240 adedi, 24-72 saat 25°C'de mEBB ve EBBA besiyerlerini içeren petripler ise 5 gün 37 °C'de inkübasyona tabii tutulmuştur. Gelişen bakteri kolonileri sayılarak en düşük bakteri populasyonunun gelişebildiği besi yeri veya yerleri tespit edilmiştir. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin karpuz fidelerinden tespitinde seçilen bu besi yerleri kullanılmıştır.

3. 2. 4. Farklı *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Populasyonu ile Bulaştırılmış Karpuz Fidelerinde Patojenin Tespiti

Taşçı-1 kodlu izolat spektrofotometre'de A_{600} 'de 0.2'ye ayarlanarak 1.44×10^8 hücre/ml yoğunluğunda süspansiyon hazırlanmıştır. Elde edilen bu süspansiyon 7 kez seyreltilip *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin 8 farklı yoğunluktaki populasyonunu içeren süspansiyonları hazırlanmıştır. Her bir bakteri populasyonundan 50 ml süspansiyon bir el pülverizatörüyle sağlıklı 2-3 gerçek yapraklı dönemdeki Zeugma çeşidi karpuz fidelerine 5 tekrarlı olarak püskürtülmüştür. Çalışmada 40 fide hastalandırılırken, 5 fideye de kontrol olarak sadece su püskürtülmüştür. Patojen inokulasyonundan yedi gün sonra farklı yoğunluktaki *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* populasyonu ile bulaştırılmış hastalık belirtisi göstermeyen karpuz fidelerinin yeşil aksamından 9 gr alınıp 90 ml fosfat buffer içine konulmuştur. Örnekler 250 rpm/saat çalkalama hızında oda sıcaklığında 3 saat çalkalanmıştır. Süspansiyondan 5 kez seyreltme yapılmış ve her bir seyreltmeden üç tekrarlı olarak 100'er µl alınarak, seçilen besi yerlerine (King B, tryticase soy agar, mEBBve P-278) bagetle yayılmıştır. Petriler 25°C'deki inkübatörde besi yerinin özelliğine göre 2-5 gün, mEBB içeren petriler ise 5 gün 37 °C'de inkübe edilmiştir.

Besi yerinde gelişen *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* kolonilerine benzer bakteri kolonileri genel besi yerlerinden TSA veya King B besi yerlerine saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatların oksidaz reaksiyonu ve tütün bitkilerinde aşırı duyarlılık reaksiyonları testlenmiştir. Oksidaz reaksiyonları ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitif olan izolatlar ile *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'ye spesifik tanı kiti kullanılarak DAS-ELISA testi yapılmıştır. ELISA testinde pozitif bulunan izolatlar *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin farklı yoğunluktaki populasyonu ile bulaştırılan fide örneklerinde patojenin varlığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

3. 2. 5. Ticari Fideliklerin Ziyareti ve Alınan Örneklerin Testlenmesi

Karpuz fide üretimi dönemi olan 20 Aralık 2010, 15 Ocak 2011 ve 9 Şubat 2011 tarihlerinde Adana ve Mersin ilindeki ticari fidelikler ziyaret edilerek hastalık belirtisi gösteren ve göstermeyen karpuz fideleri toplanmıştır. Ticari fideliklerden toplanan örnekler 3.2.4'te detaylı şekilde anlatıldığı gibi testlenmiştir. Ticari fideliklerden izole edilen ve *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'ye benzer koloni morfolojisine sahip izolatların tanısı oksidaz reaksiyonu, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu ve patojene spesifik tanı kiti kullanılan DAS-ELISA testi ile yapılmıştır.

3. 2. 6. Bakteri İzolatlarının Tanısı

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*'nin farklı popülasyonu ile bulaştırılan karpuz tohumu ve karpuz fidelerinden izole edilen bakteri izolatları ile ticari fideliklere yapılan ziyaretlerde hastalık belirtisi gösteren ve göstermeyen karpuz fidelerinden elde edilen bakteri izolatlarının tanısı oksidaz reaksiyonu, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu ve patojene spesifik tanı kitinin kullanıldığı DAS-ELISA testi ile yapılmıştır.

Oksidaz reaksiyonunun belirlenmesi: Taze hazırlanan %1'lik N; N; N; N' - Tetramethyl-1.4 phenylene diammonium diclorid eriği steril filtre kağıdına damlatılmıştır. Testlenecek izolatların 48 saatlik kültürü platin öze ile ıslak kurutma kağıdına çizildiğinde 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak Taşçı-1 kodlu izolat kullanılmıştır.

Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonunun belirlenmesi: Tütün (*Nicotiana tabacum* cv Samsun) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına testlenecek izolatların 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak Taşçı-1 kodlu izolat kullanılmıştır.

DAS-ELISA testi: DAS-ELISA testi Agdia firmasının belirttiği prosedüre göre yapılmıştır. Negatif kontrol olarak sağlıklı karpuz bitkisi yaprağı ekstraktı, pozitif kontrol olarak Taşçı-1 izolatu kullanılmıştır. 26 adet *Aac* şüphesi bulunan örnek ELISA testine tabi tutulmuştur. Çalışmada, öncelikle capture antibody 1:200 oranında carbonate coating buffer (1.59 gr sodyum karbonat, 2.93 gr sodyum bikarbonat, 0.2 gr sodyum azid, 1 litre saf su, pH 9.6) ile seyreltilmiş ve ELISA çukurlarına 2 tekerrürlü olarak 200'er µl eklenmiştir. ELISA Plate naylon poşetle iyice kapatılarak 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Bu süre içerisinde general extract buffer (27.9 gr buffer tozu, 500 ml saf su) hazırlanmıştır. Daha sonra steril eppendorf tüpü içerisine 300'er µl general extract buffer (GEB2) eklenmiştir. 24-48 saatlik 26 örnekten kürdan yardımıyla ayrı ayrı alınarak GEB2 içeren eppendorf tüplerine bırakılmış ve karıştırıcıda karıştırılarak süspansiyon elde edilmiştir. Süre bitiminde ELISA Plate'i inkübatörden alınmış ve 1X PBST washing buffer (8 gr sodyum chloride, 1.15 gr dibazik sodyum fosfat, 0.2 gr monobazik potasyum fosfat, 0.2 gr potasyum chloride, 0.5 gr Tween 20, 1 litre saf su) ile yıkanmıştır. Çukurların iyice bufferdan arınması için plate hızlıca bir havlu üzerine vurulmuştur. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Ardından çukurlara örneklerden 200'er µl eklenmiş, aynı miktarda negatif kontrol (taze karpuz bitkisinden elde edilmiş ekstrakt), pozitif kontrol (Taşçı-1) ve general ekstrakt buffer plate'de belirtilen yerlerine konulmuştur. ELISA Kiti naylon poşetle sarılarak bir gün (24 saat) 4 °C'de bekletilmiştir. Plate alınarak 1X PBST washing buffer ile 6-8 kez yıkanmıştır. Alkaline fosfataz enzim conjugate RUB3 enzim conjugate diluent ile 1/200 oranında seyreltilmiştir. Daha sonra her bir çukura enzim conjugate eklenmiş ve plate naylon poşet ile kaplanarak 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plate 1X PBST washing buffer ile 6-8 kez yıkanmıştır. Ardından her bir çukura 200 µl 1X PNP buffer (0.1 mg magnezyum chloride hexahydrate, 0.2 gr sodyum acid, 97 ml diethanolamine 800 ml saf su içerisinde çözdürülmüştür. pH 9.8'e ayarlanmış, ardından hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır) eklenmiştir. Plate naylon poşetle kapatılarak 45 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Sonuçlar Medispec ESR 200 marka ELISA plate okuyucusunda 405 nm absorbans değerinde okunmuştur. Negatif kontrolün iki katı veya daha yüksek olan değerler pozitif kontrol olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4. 1. Farklı *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Populasyonunun Farklı Besi Yerlerinde Gelişimi ve Uygun Besi Yeri Seçimi

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*'nin 1.44×10^8 , 1.44×10^7 , 1.44×10^6 , 1.44×10^5 , 1.44×10^4 , 1.44×10^3 , 1.44×10^2 , 1.44×10^1 hücre/ml yoğunluğundaki populasyonu genel besi yerlerinden nutrient agar, King B, yeast extract calcium carbonate agar, tryticase soy agar ve nutrient broth yeast sucrose agar ile yarı seçici besi yerlerinden WFB 08, WFB 44, WFB 68, EBBA, mEBB, PYDAC ve P-278'de üç tekrarlı olarak geliştirilip ortalama koloni sayıları karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Patojenin 1.44×10^8 , 1.44×10^7 ve 1.44×10^6 hücre/ml yoğunluğundaki populasyonu genel ve yarı seçici besi yerlerinde sayılamayacak kadar yoğun geliştiğinden değerlendirme dışı bırakılmıştır.

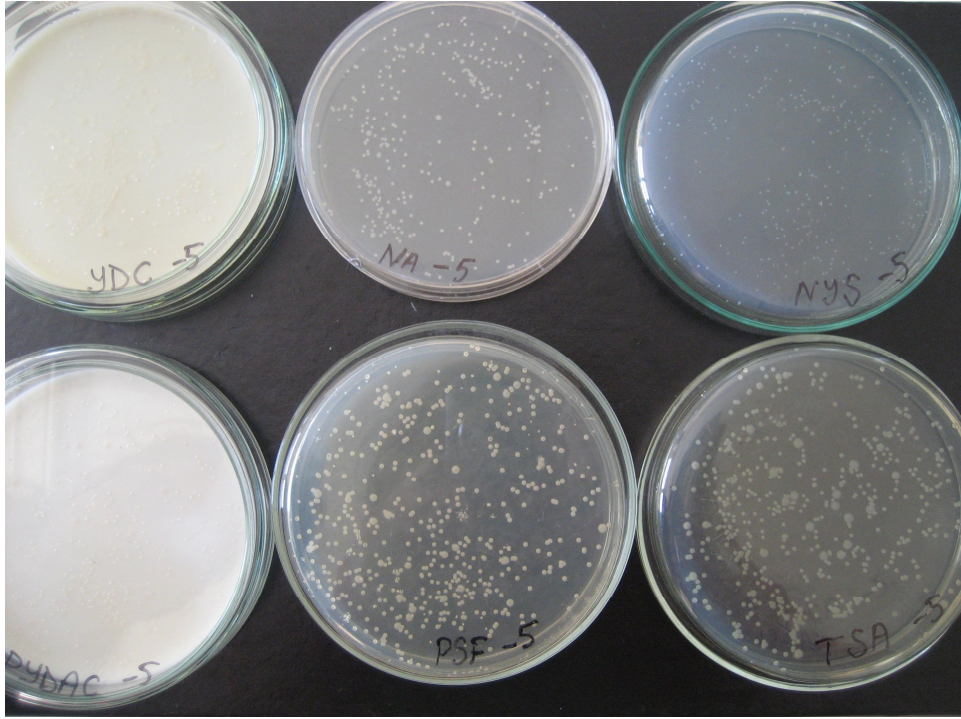
Çizelge 4.1. Besi yerlerinde patojenin farklı populasyonunun gelişimi

Populasyon /Besi Yeri	1.44×10^5 hücre/ml	144.000 hücre/ml	1.440 hücre/ml	144 hücre/ml	14,4 hücre/ml
NA	yoğun	Yoğun	268	22,33	2
KB	yoğun	Yoğun	355	61,67	7,667
YDC	yoğun	Yoğun	337	14,67	5,667
TSA	yoğun	Yoğun	536	39	5,333
NYS	yoğun	Yoğun	248	24	3,333
WFB 08	669	47	4	0	0
WFB 44	167,3	19,3	0	0	0
WFB 68	yoğun	1106	114	21	1
EBBA	yoğun	1836	190	21,67	1,667
mEBB	yoğun	1656	194	20,67	1
PYDAC	yoğun	Yoğun	282	27	3,333
P-278	yoğun	907	221	22,67	2

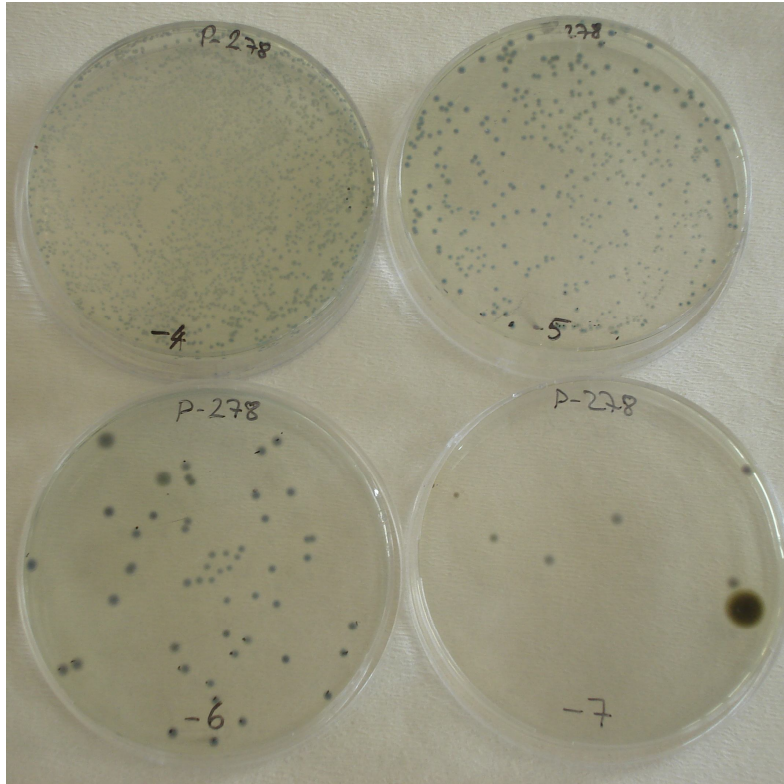
Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi 1.44×10^5 hücre/ml yoğunluğundaki patojen popülasyonu gelişimi, yarı seçici besi yerlerinden WFB 08 ve WFB 44 hariç diğer 10 besi yerinde çok yoğun olmuştur. Bu besi yerlerindeki bakteri popülasyonun sayılamayacak kadar yoğun olduğu gözlenmiştir. 1.44×10^4 hücre/ml yoğunluğundaki patojen bakteri popülasyonu genel besi yerlerinin (nutrient agar, King B, yeast extract calcium carbonate agar, tryticase soy agar ve nutrient broth yeast sucrose agar) tümünde ve PYDAC besi yerinde en iyi gelişim göstermiştir (Şekil 4.1). Yarı seçici besi yerleri arasında karşılaştırma yaptığımızda en iyi gelişim sırasıyla EBBA, mEBB, WFB 68, P-278 (Şekil 4.2), WFB 08 ve WFB 44 besi yerlerinde olmuştur. Patojenin ml’de 1440 adet bakteri hücrelerinin bulunduğu popülasyon en iyi gelişimi sırasıyla tryticase soy agar, King B, yeast extract calcium carbonate agar, PYDAC, nutrient agar, nutrient broth yeast sucrose agar, P-278, mEBB, EBBA, WFB 68 ve WFB 08 besi yerlerinde göstermiştir. Bu popülasyon WFB 44 besi yerlerinde gelişim göstermemiştir. Bulgular diğer iki popülasyon olan 144 ve 14,4 hücre/ml yoğunluğunda da benzer olmuştur.

Patojenin ml’de 1440 adet bakteri hücrelerinin yer aldığı popülasyonu ortalama TSA’da 536, King B besi yerinde 355, YDC besi yerinde 337, PYDAC besi yerinde 282, nutrient agar besi yerinde 268, nutrient broth yeast sucrose agar besi yerinde 248, P-278’de 221, modifiye edilmiş EBB besi yerinde 194, EBBA besi yerinde 190, WFB 68 besi yerinde 114 ve WFB 08 besi yerinde 4 koloni gelişimi olmuştur. Bu popülasyon WFB 44 besi yerinde gelişmemiştir (Şekil 4.3).

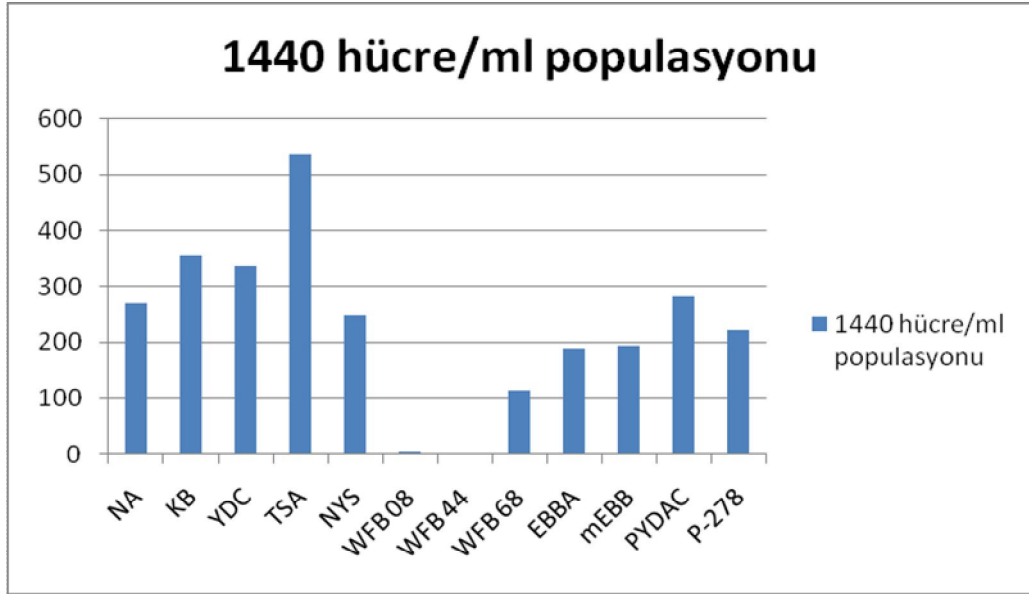
Benzer şekilde patojenin ml’de 144 adet bakteri hücrelerinin yer aldığı popülasyonu, ortalama olarak King B besi yerinde 62, tryticase soy agar besi yerinde 39, PYDAC besi yerinde 27, nutrient broth yeast sucrose agar besi yerinde 24, P-278 besi yerinde 23, nutrient agar ve EBBA besi yerinde 22, WFB 68 besi yerinde 21 ve yeast extract calcium carbonate agar besi yerinde 15 adet bakteri kolonisi geliştirmiştir. Bu popülasyon WFB 08 ve WFB 44 besi yerinde gelişim göstermemiştir.



Şekil 4.1. Patojenin 1.44×10^5 hücre/ml popülasyonunun farklı besi yerlerindeki koloni gelişimi

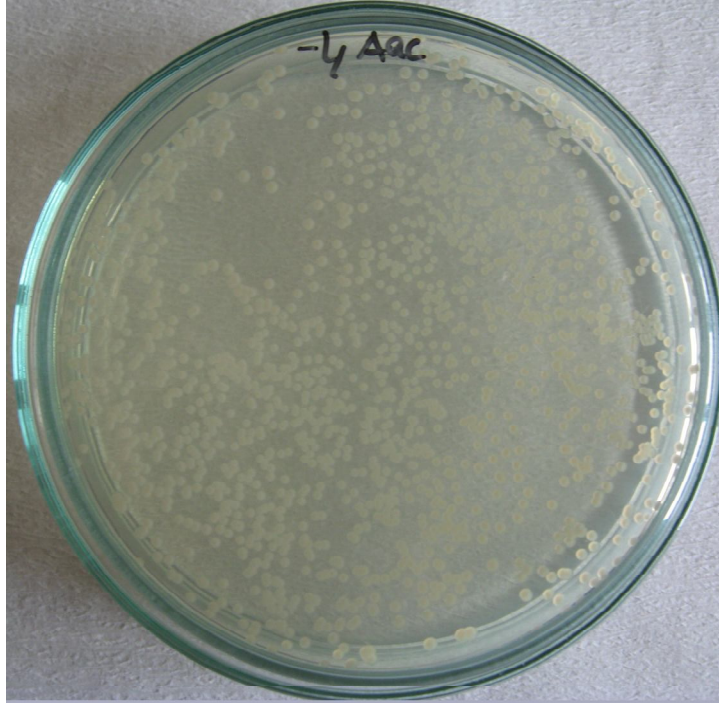


Şekil 4.2. Patojenin farklı popülasyonunun P-278 besi yerindeki koloni gelişimi

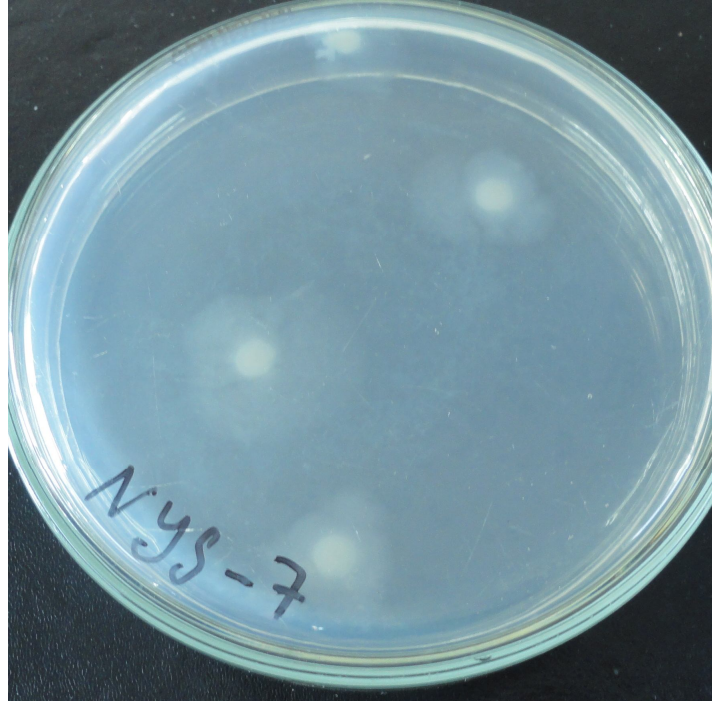


Şekil 4.3. Patojenin ml'de 1440 adet bakteri popülasyonu farklı besi yerindeki koloni sayıları

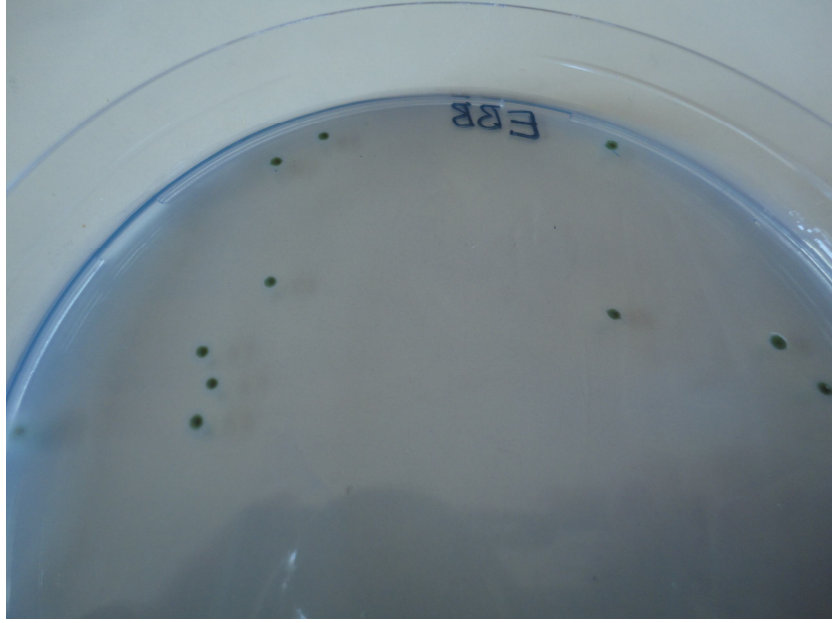
Genel besi yerlerinden biri olan King B besi yerinde *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin kolonileri 2-3 mm çapında ve krem renğinde (Şekil 4.4) gelişim gösterirken nutrient broth yeast sucrose agar besi yerinde aynı renkte fakat 3-4 mm çapında olan etrafı haleli koloniler (Şekil 4.5) gelişmiştir. Yarı seçici besi yerlerinden saydam renkte olan mEBB besi yerinde koloniler 1-2 mm çapında etrafı hale ile çevrili mavimsi yeşil renkte (Şekil 4.6); EBBA besi yerinde 2-3 mm çapında, koyu yeşil renkte etrafı dalgalı koloniler şeklinde gelişim göstermiştir (Şekil 4.7). WFB 08 (Şekil 4.8), WFB 44 ve WFB 68 (Şekil 4.9) besi yerleri pembe renklidir, patojenin kolonileri WFB 44 ve WFB 08 besi yerlerinde 1-2 mm çapında ve mor renkte gelişmiştir. WFB 68 besi yerinde ise 2-3 mm çapında ve merkezi sarı renkte olan haleli kolonilerin gelişimi gözlenmiştir. Koloniler yaşlandıkça rengi açılmış ve konilerin etrafında temiz alanlar (haleler) belirmiştir. P-278 besi yerinde patojenin kolonileri daha büyük gelişerek 2-3 mm çapına ulaşmış ve lila (açık mor)renkte (Şekil 4.10) gelişmiştir. Koloniler yaşlandıkça merkezi daha koyu renkte, morumsu yeşil koloniler (Şekil 4.11) gözlenmiştir.



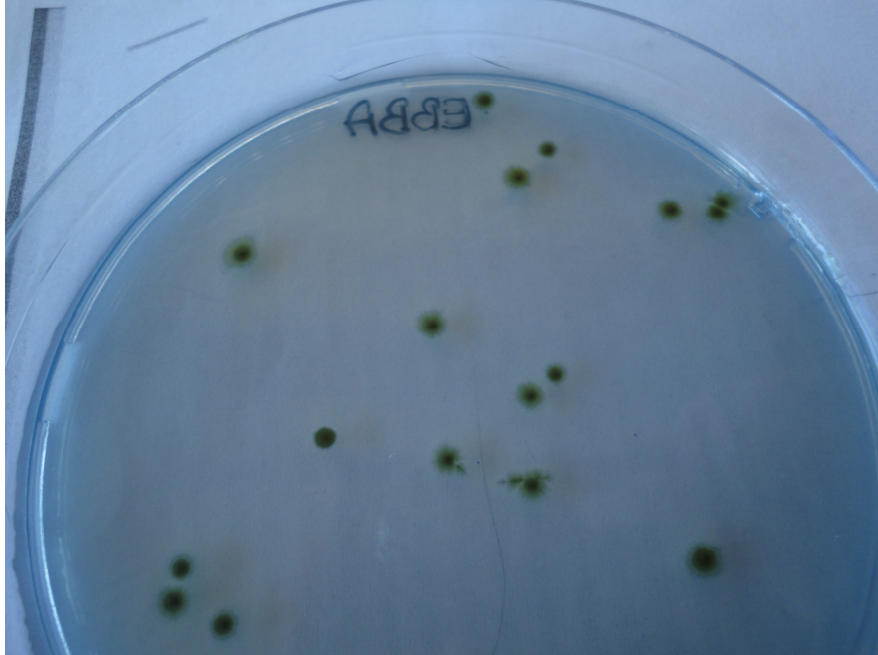
Şekil 4.4. Patojenin King B besi yerindeki 2-3 mm çapında ve krem rengindeki kolonileri



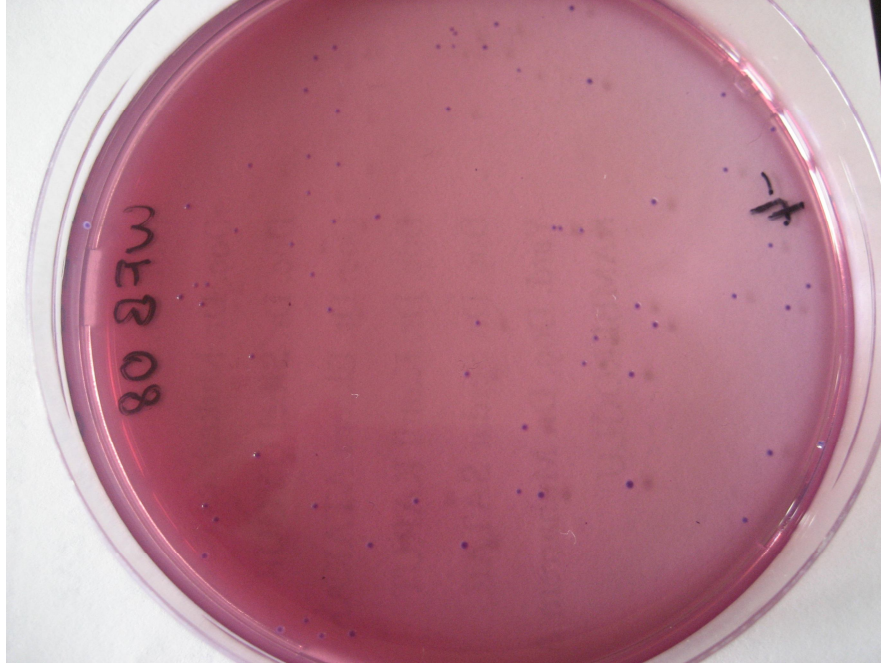
Şekil 4.5. Patojenin nutrient broth yeast sucrose agar besi yerindeki 3-4 mm çapında ve haleli kolonileri



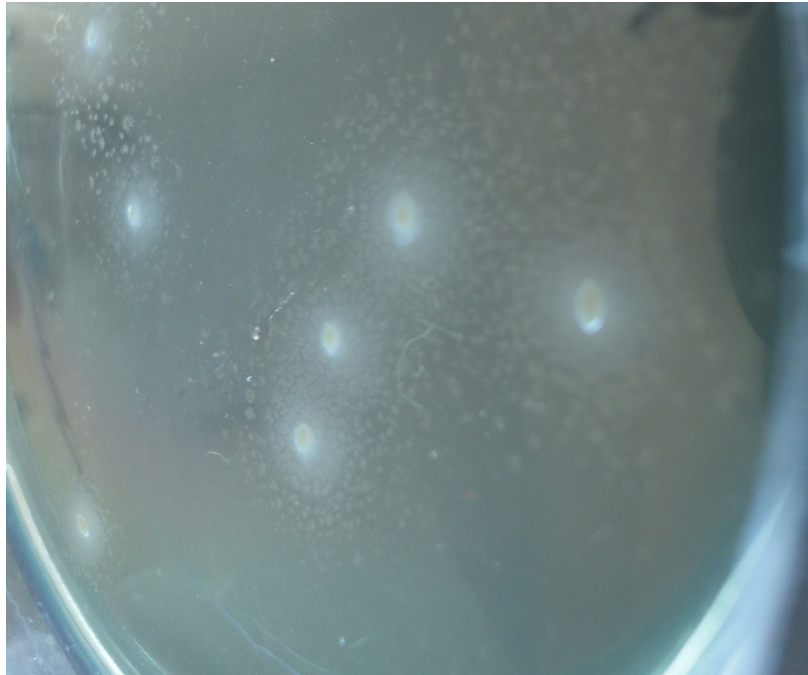
Şekil 4.6. Patojenin mEBB besi yerindeki 1-2 mm çapında ve etrafı mavi renkli hale ile çevrili olan mavimsi yeşil renkteki kolonileri



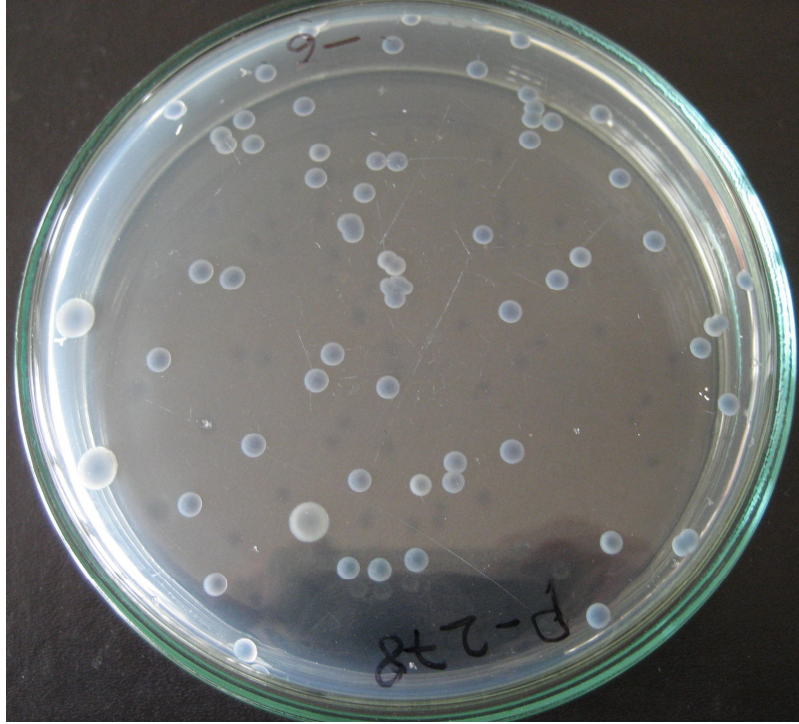
Şekil 4.7. Patojenin EBBA besi yerindeki 2-3 mm çapında ve koyu yeşil renkte dalgalı kolonileri



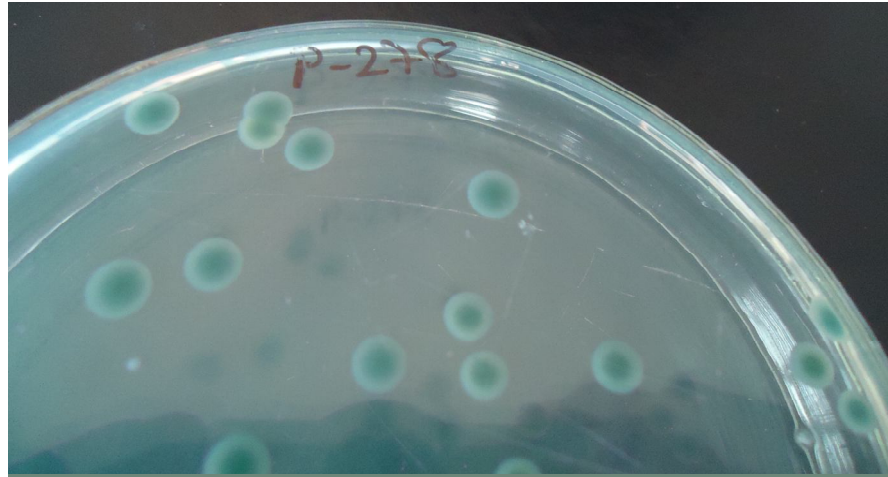
Şekil 4.8. Patojenin WFB 08 besi yerindeki 1-2 mm çapında olan lila rengindeki kolonileri



Şekil 4.9. Patojenin WFB 68 besi yerindeki 2-3 mm çapında ve merkezi sarı renkte olan haleli kolonileri



Şekil 4.10. Patojenin P-278 besi yerinde 2-3 mm çapında açık lila renkte kolonileri



Şekil 4.11. Patojenin P-278 besi yerinde yaşlandıkça rengi koyulaşan merkezi açık yeşil renkte olan haleli kolonileri

Nutrient agar ve nutrient broth yeast sucrose agar besi yerleri bakteriyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan genel besi yerleridir. Bu çalışmada P-278 besi yerindeki koloni gelişimi genel besi yerlerindeki çok yakın olmuştur. Bu besi yeri patojenin gelişimi için başarılı bulunmuştur.

Sonuç olarak karışık olmayan temiz bir popülasyondan *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin kültür gelişimi yapılacaksa genel besi yerlerinden King B ve tryticase soy agar besi yeri, yarı seçici besi yerlerinden P-278 ve EBBA veya mEBB tercih edilmelidir.

4. 2. Farklı *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Populasyonu ile Bulaştırılmış Karpuz Fidelerinde Patojenin Tespiti

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*'nin 1.44×10^8 , 1.44×10^7 , 1.44×10^6 , 1.44×10^5 , 1.44×10^4 , 1.44×10^3 , 1.44×10^2 , 1.44×10^1 hücre/ml yoğunluğundaki popülasyonu, Zeugma çeşidi karpuz fidelerine püskürtme yoluyla bulaştırıldığında yedi gün sonra kontrol dahil 45 fidede hiçbir hastalık belirtisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.2. Patojenin farklı popülasyonu ile bulaştırılmış fidelerden patojenin eldesi

Popülasyon	Besi Yeri/ Hastalık Belirtisi	King B	Tryticase soy agar	EBBA	P-278
1.44×10^8 hücre/ml	-	-	-	+	+
1.44×10^7 hücre/ml	-	-	-	+	+
1.44×10^6 hücre/ml	-	-	-	+	+
1.44×10^5 hücre/ml	-	-	-	+	+
1.44×10^4 hücre/ml	-	-	-	-	-
1.44×10^3 hücre/ml	-	-	-	-	-
1.44×10^2 hücre/ml	-	-	-	-	-
1.44×10^1 hücre/ml	-	-	-	-	-

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi patojenle bulaşık ancak hastalık belirtisi göstermeyen fidelerden yapılan izolasyonda genel besi yeri kullanıldığında patojen izole edilememiştir. Ancak yarı seçici besi yeri olan mEBB ve P-278'e yapılan izolasyonlarda patojen hastalık belirtisi göstermeyen fidelerden izole edilebilmiştir. Elde edilen bu izolatların oksidaz pozitif ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonlarının pozitif olduğu saptanmıştır. Patojene spesifik tanı kiti kullanılarak yapılan DAS-

ELISA testi ile de izolatların *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olduğu teyit edilmiştir.

Sonuç olarak, hastalık belirtisi göstermeyen fidelerden *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*' nin izolasyonunda genel besi yeri kullanmak yerine P-278 ve mEBB gibi yarı seçici besi yeri tercih edilmelidir.

4. 3. Ticari Fideliklerin Ziyareti ve Alınan Örneklerin Testlenmesi

Adana ve Mersin ilindeki ticari fideliklere yapılan ziyaretlerde toplanan ve hastalık belirtisi göstermeyen karpuz fidelerinden *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* izole edilememiştir. Buna karşın hastalık belirtisi gösteren karpuz fidelerinden 10 adet *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'ye koloni morfolojisi benzeyen izolat P-278 ve mEBB besi yerlerinde gelişim göstermiştir. İzolatların tümünün oksidaz pozitif ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturduğu belirlenmiştir. Patojene spesifik tanı kiti kullanılarak yapılan DAS-ELISA testi ile de izolatların *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olduğu teyit edilmiştir.

Sonuç olarak, hastalık belirtisi gösteren veya göstermeyen karpuz fidelerinden *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* izolasyonunda yarı seçici besi yeri olan P-278 ve mEBB kullanılmalıdır.

4. 4. Bakteri İzolatlarının Tanısı

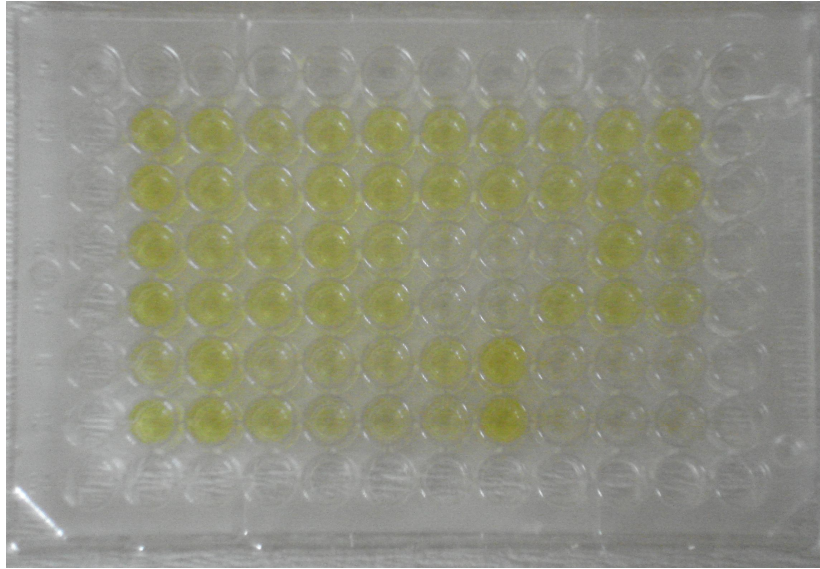
Hastalık belirtisi göstermeyen karpuz fidelerinden patojenin izolasyonu ve ticari fideliklere yapılan ziyaretlerde hastalık belirtisi gösteren bitkilerden elde edilen 26 adet izolatın tümü oksidaz pozitif reaksiyon göstermiştir. Bu izolatların 24 tanesi tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmuştur (Şekil 4.12). Yapılan DAS-ELISA testinde 405 nm absorbans değerinde yapılan okumalarda negatif kontrol ortalama olarak 0.541 değerinde iken testlenen izolatlar 1.299-3.311 arasında değerler oluşturmuşlardır (Çizelge 4.3). Testlenen 26 izolatın 24'ü DAS-ELISA testine göre *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* olarak tanılanmıştır (Şekil 4.13).

Çizelge 4.3. Ticari fideliklerin ziyaretinde hastalık belirtisi gösteren bitkilerden elde edilen izolatların tanı testlerinin sonuçları

İzolat Adı	Elde edildiği besi yeri	ELISA		Oksidaz	Tütünde HR
		Değer	Sonuç		
AF 8a	WFB 68	3.311	+	+	+
AF 8c	TSA	3.217	+	+	+
AF 8e	mEBB	2.115	+	+	+
AF 8c	mEBB	3.238	+	+	+
AF 8ç	mEBB	3.274	+	+	+
AF 8ç	TSA	3.193	+	+	+
AF 4b	TSA	2.905	+	+	+
AF 8b	TSA	2.7075	+	+	+
AF 8d	TSA	3.035	+	+	+
AF 7a	King B	3.234	+	+	+
AF 8b	PYDAC	3.308	+	+	+
AF 8b	King B	2.905	+	+	+
AF 8a	King B	2,906	+	+	+
AF 4b	King B	3.224	+	+	+
AF 7a	mEBB	2.625	+	+	+
AF 8a	mEBB	0.598	-	+	-
AF 8b	mEBB	0.613	-	+	-
AF 8d	P-278	1.718	+	+	+
AF 8b	P-278	3.221	+	+	+
AF 8c	P-278	1.780	+	+	+
AF 4b	P-278	2.485	+	+	+
AF 4c	King B	3.288	+	+	+
AF 8d	mEBB	1.685	+	+	+
AF 8b	WFB 68	1.321	+	+	+
AF 8a	WFB 68	1.299	+	+	+
AF 8d	P-278	1.731	+	+	+
Taşçı-1	Referans	3.240	+	+	+
PBS	Neg. Kontrol	0.653	-		
Karpuz yaprağı	Neg. Kontrol	0.541	-		



Şekil 4.12. Ticari fideleklerden elde edilen izolatların tütünde HR testinin pozitif görünümü



Şekil 4.13. Ticari fideleklerden elde edilen izolatların ELISA testi sonucu

5. TARTIŞMA

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*'nin neden olduğu karpuz bakteriyel meyve leke hastalığı ülkemiz dahil karpuz yetiştiriciliği yapan pek çok ülkenin önemli sorunlarından biridir (Demir, 1996; Assis ve ark., 1999; Takashi ve ark., 2000; Martin ve Horlock, 2002;; Burdman ve ark., 2004; Wallcott ve ark., 2004; Ren ve ark., 2006; Harighi, 2007; Palkovics ve ark., 2008; Holeva ve ark., 2009).

2009 yılında Doğu Akdeniz Bölgesinde Adana ve Osmaniye illerinde karpuz üretim alanlarında, 2010 yılında ise karpuz ve kavunlarda büyük bir hastalık patlaması yaşanmıştır (Aysan ve ark., 2011; Horuz ve ark., 2011).

Karpuzda meyve lekesine neden olan bakteriyel etmen tohum kaynaklıdır. İlk inokulum kaynağı bulaşık tohumlardır. Bitki bakteri hastalıklarıyla mücadelede ilk adım hastaliksız üretim materyali kullanmaktır. Dünyada aktif olan tohum ticaretiyle hastalık etmeni temiz üretim alanlarına bulaşabilmektedir. Patojen bakteri üretim alanına bir kez bulaştıktan sonra kültürel işlemler esnasında açılan yaralardan tüm üretim alanına dağılabilmektedir. Özellikle bitkiler ıslakken yapılan kültürel işlemler bu patojeni kolayca yayabilmektedir. Üretim sezonu sonunda patojen bakteri toprakta, bitki artıklarında, civardaki konukçu veya konukçu olmayan bitkilerde yaşamaya devam etmektedir (Latin, 1996). Üreticilerimizin aynı tarlada her yıl aynı ürünü yetiştirme tercihlerinden dolayı da inokulum bir sonraki üretim sezonuna popülasyonunu artırarak yayılmaya devam etmektedir. Böylece patojen bakteri, bir kez bir alana giriş yaptıktan sonra iklim koşulları da patojenin gelişimini desteklerse her yıl hastalık ortaya çıkabilmektedir. Bu şekilde her yıl artış gösteren bakteri inokulumuyla mücadele etmek son derece zordur (Tireng Karut, 2011).

Bu hastalık sadece tarlada değil, aynı zamanda ticari fideliklerin de önemli sorunlarından biridir. Karpuz tohumlarında yaşamını sürdürebilen *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* tohumun çimlenmesi esnasında popülasyonunu artırır ve kotiledon yaprakların alt kısmındaki su emmiş lekeler nedeniyle ardından bakteri gerçek yapraklara geçerek yaşamını devam ettirir (Mirik ve Aysan, 2008). İnokulum sağlıklı fidelere hava yoluyla veya sulama suyu sıçratmasıyla bulaşarak fidelikte çok sayıda fidenin imha edilmesine neden olabilir. Hastalıklı tohumdan gelişen fideler

uygun iklim koşulunu bulamazlarsa belirti göstermeksizin epifitik olarak fidelerde yaşamaya devam ederler. Önceleri bakteri yaprakta belirti oluşturmadan bulunur. Bu fideler pazarlanıp üretim alanına dikildiğinde uygun iklim koşulları oluştuğunda hastalık ortaya çıkabilir ve uygun iklim şartlarında ürünü pazarlanamaz hale getirebilir.

Bu hastalıkla mücadeleye tohum aşamasında başlanmalı ve hastaliksız fide kullanımı ilk adım olmalıdır. Tohumluk üretimi hastalığın olmadığı yerlerde yapılmalı ve bu tarlalarda sık sık kontroller yapılarak tarlada hastalığın görülmediğinden emin olunmalıdır. Hastalıklı alanlardan tohum elde edilmişse bunlar kullanılmamalı derhal imha edilmelidir. Çünkü bulaşık tohumlardaki inokulumu yok etmek için sıcak su uygulamaları bile yetersiz kalmaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda hastalığın ülkemizde yayılmasını önlemek için ithal edilen tohumların karantina kuruluşlarınca dikkatle testlenmesinin önemi ortaya çıkmaktadır. Karpuz üretiminde aşılı fide kullanımındaki artış da göz önüne alındığında, sadece karpuz tohumları değil, aynı zamanda anaç olarak kullanılan kabakgil tohumları da bu etmen yönünden testlenmelidir. Halen ISTA veya EPPO tarafından kabakgil tohumlarından *Aac*'in aranması konusunda hazırlanmış bir test protokolü bulunmamaktadır. Bu nedenle patojenin gelişimi için en uygun olan, tohum ve fidelerdeki epifitik bulaşmaları saptamada kullanılacak genel ve yarı seçici besi yerlerinin tespiti bu yüksek lisans tezinde araştırılmıştır. Denemeye alınan beş adet genel besi yeri (Nutrient Agar, King B, Yeast Extract Calcium Carbonate Agar, Tryticase Soy Agar ve Nutrient Broth Yeast Sucrose Agar) ve yedi adet yarı seçici besi yerleri (WFB 08, WFB 44, WFB 68, EBBA, mEBB, PYDAC ve P-278) arasında başarılı olanlar belirlenmiştir. Sonuç olarak karışık olmayan temiz bir popülasyondan *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* izolasyonu yapılacaksa genel besi yerlerinden King B ve tryticase soy agar besi yeri, yarı seçici besi yerlerinden P-278 ve EBBA veya mEBB tercih edilmelidir. Hastalık belirtisi gösteren veya göstermeyen karpuz fidelerinden *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* izolasyonunda yarı seçici besi yeri olan P-278 ve mEBB kullanımı tercih edilebilir. P-278 ve mEBB besi yerleri tohum testleyen laboratuvarlar, karantina kuruluşları ve bu konuda çalışma yapacak araştırmacılar tarafından öncelikle tercih edilebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* adlı bakteriyel etmenin neden olduğu karpuz bakteriyel meyve leke hastalığı, dünya çapında karpuz ve kavun üretimini kısıtlayan en önemli bakteriyel hastalıklardan biridir. Bu hastalığa karşı yeterli ve etkili bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle, hastalıksız üretim materyali (tohum ve fide) kullanımı bir zorunluluktur. Bu yüksek lisans tezinde, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin farklı populasyonunun beş adet genel besi yeri (Nutrient Agar, King B, Yeast Extract Calcium Carbonate Agar, Tryticase Soy Agar ve Nutrient Broth Yeast Sucrose Agar) ve yedi adet yarı seçici besi yerinde (WFB 08, WFB 44, WFB 68, EBBA, mEBB, PYDAC ve P-278) gelişimi araştırılmıştır. Ayrıca *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin farklı populasyonu ile bulaştırılmış tohumlarda ve fidelerde patojen tespit çalışmalarında en uygun besi yeri tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Patojenin ml'de 144 adet bakteri hücrelerinin yer aldığı populasyonu, ortalama King B besi yerinde 62, tryticase soy agar besi yerinde 39, PYDAC besi yerinde 27, nutrient broth yeast sucrose agar besi yerinde 24, P-278 besi yerinde 23, nutrient agar ve EBBA besi yerinde 22, WFB 68 besi yerinde 21 ve yeast extract calcium carbonate agar besi yerinde 15 adet bakteri kolonisi geliştirmiştir. Bu populasyon WFB 08 ve WFB 44 besi yerinde gelişim göstermemiştir. Karışık olmayan temiz bir populasyondan *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* geliştirilecekse genel besi yerlerinden King B ve tryticase soy agar besi yeri, yarı seçici besi yerlerinden P-278 ve EBBA veya mEBB tercih edilmelidir.

Çalışmada farklı *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* populasyonu ile bulaştırılmış karpuz tohumlarında patojenin tespitinde besi yeri olarak genel besi yerlerinin kullanımının uygun olmadığı buna karşın yarı seçici besi yerlerinden P-278 ve mEBB kullanımı sonucu gayet başarılı şekilde patojenin yakalanabildiği ortaya konmuştur. Farklı *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* populasyonu ile bulaştırılmış karpuz fidelerinde ve ticari fideliklerden alınan karpuz fidelerinde patojenin tespitinde benzer şekilde besi yeri olarak P-278 ve mEBB kullanımı önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- ANONİM, 2010a. www.wikipedia.com, Erişim Tarihi 21.12.2009;
- ANONİM, 2010b. Sabah Gazetesi; 17.07.2004 www.sabah.com.tr, Erişim Tarihi 21.12.2009.
- ANONİM, 2010c. <http://www.saglikssiteniz.com/karpuzun-faydalari-ve-iyi-geldigi-hastaliklar.html>, Erişim Tarihi 21.12.2009.
- ANONİM, 2010d. <http://www.kackartv.com.tr/?I=Haber&ID=22160>, Erişim Tarihi 23.12.2009.
- ANONİM, 2010e. <http://www.aksariyer.com/haber/20090605/Karpuzun-faydalari.php>, Erişim Tarihi 28.12.2009.
- ANONİM, 2010f. <http://www.kackartv.com.tr/?I=Haber&ID=22160>, Erişim Tarihi 23.12.2009.
- ASSIS, S. M. P., MARIANO, R. L. R., SILVA-HANLIN, D. M. W., and DUART, V., 1999. Bacterial Fruit Blotch Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Melon, in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Fitopatol. Bras.*, 191.
- AYSAN, Y., HORUZ, S., ÇETİNKAYA YILDIZ, R., MİRİK, M ve SAYGILI, H., 2011. Karpuz Üretim Alanlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin Yayılmasında Tohum Kökenli Bulaşmaların Önemi. IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran 2011, Samsun (baskıda).
- BABADOOST, M., and PATAKY, N., 2002. First Report of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Illinois. *Plant Disease*, 86(4):443.
- BAHAR, O., EFRAT M., HADAR E., DUTTA B., WALLCOTT R. R., and BURDMAN S., 2008. New Subspecies-specific Polymerase Chain Reaction-based Assay for the Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Pathology*, 57: 754-763.
- BUGBEE, W.M., GUDMESTAD, N.C., SECOR, G.A. and NOLTE, P., 1987. Sugar Beet as a Symptomless Host for *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology*, 77:765-770.

- BURDMAN, S., KOTS, N., and KRIZTMAN, G., 2004. Characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Strains Isolated from Watermelon and Melon Fields in Israel. *Phytopathology*, 94(6):12 Supplement.
- DEMİR, G., 1996. A New Bacterial Disease of Watermelon in Turkiye: Bacterial Fruit Blotch of Watermelon (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Williams et al.). *Journal of Turkish Phytopathology*, 25(2) Issue: ½ 43-49.
- FAO, 2008. FAOSTAT Agriculture. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, Erişim Tarihi 07.05.2011.
- GITAITIS, R. D. ,1993. Development of A Seedbome Assay for Watermelon Fruit Blotch. Pages 9-18 In: J. W. Sheppard, ed., Proceedings 1st Ista Plaant Disease Committee Symposium on Seed Health Testing. Ottawa, Canada, August 9-11.
- GRONDEAU, C., MANCEAU, C. and SAMSON R., 2007. A Semiselective Medium for the Isolation of *Acidovorax valerianellae* from Soil and Plant Debris. *Plant Pathology*, 56:302-310.
- HA Y., FESSEHAIE A., LING K. S., WETCHER W. P., KEINATH A. P., and WALLCOTT R. R.; 2009. Simultaneous Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in Cucurbit Seedlots Using Magnetic Capture Hybridization and Real-Time Polymrase Chain Reaction. *Phytopathology*, 99 (6):666-678.
- HARIGHI, B. , 2007. Bacterial Leaf Spot of Christ's Thorn, A New Disease Caused by *Acidovirax avenae* subsp. *citrulli* in Iran. *Journal of Plant Pathology* 89(2):283-285.
- HOLEVA M.C., C. D. KARAFLA C.D., GLYNOS P.E. and ALIVIZATOS A.S., 2009. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Newly Reported to Cause Bacterial Fruit Blotch of Watermelon in Greece. www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/ndr.php?id=020013.

- HOPKINS, D.L. 1989. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon: A New Disease in the Eastern USA. 74-7 In: Proc. Cucurbitaceae'89: Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm. C. E. Thomas, Ed. U. S. Vegetable Laboratory, Charleston, SC.
- HORUZ, S., ÇETİNKAYA YILDIZ, R., MİRİK, M ve AYSAN, Y., 2011. Çukurova Bölgesi'nde *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin Yeni Bir Konukçusu: Kavun (*Cucumis melo*). IV. Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş (baskıda).
- KING, E. O., WARD, M. K., and RANEY D. E., 1954. To Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Flueorescein. J. Clin. Med. 44:301-307.
- LANGSTON D. B. , WALCOTT JR., R. D. ,GITAITIS R. D. , and F. H. SANDERS, JR., 1999. First Report of a Fruit Rot of Pumpkin Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. Plant Disease, 83(2):199.
- LATIN, R. X. , and RANE, K.K, 1990 Bacterial Fruit Blotch of Watermelon in Indiana. Plant Disease, 74:331.
- LATIN, R. X. , 1996. Bacterial Fruit Blotch. In: Compendium of Cucurbit Diseases (Edts. T. A. ZITTER, D.L. HOPKINS AND C. E. THOMAS). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- LATIN R. X. and HOPKINS D. L., 1995. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon: The Hypohetical Exam Question Becomes Reality. American Phytopathological Society. Plant Disease, 79(8):761-765.
- LELLIOT, R. A. and STEAD, D. E., 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases Plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Uk.
- MARTIN, H. L. and, HORLOCK, C. M., 2002. First Report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a Pathogen of Gramma in Australia. Plant Disease, 88(12): 1406.
- MİRİK, M. ve AYSAN, Y., 2008. Karpuz Bakteriyel Meyve Leke Hastalığı, Bacterial Fruit Blotch of Watermelon, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. In: Bitki Bakteri Hastalıkları (Editörler: H. Saygılı, F. Şahin Ve Y. Aysan. Meta Basım, İzmir.).

- MİRİK M., AYSAN Y., ve ŞAHİN F.; 2006. Occurrence of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Plant Disease*, 90(6):829.
- MUNOZ M., and MONTERROSO, D., 2002. Identification of *Acidovorax avenae citrulli* in Watermelon Seeds in Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 66; 101 – 104.
- PALKOVICS, L., PETROCZY, M., KERTESZ, B. and 2008. First Report of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Hungry. *Plant Disease*, 92(5):834-835.
- PARK, Y.H, LEE Y.J., CHOI Y.W., SON B.G. and KANG J.S., 2008. Evaluation of PCR Primers Used in the Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Causing Bacterial Fruit Blotch (BFB) in Cucurbits. *Hort Environ. Biotechnol*, 49(5):325-331.
- RANDHAWA, P. S., PANNU S.S., and SCHAAD N.W., 2001. Improved Bio-PCR Test for Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Watermelon and Cantaloupe Seeds. *Aps/Msa/Son Joint Meeting*, August, 25-29.
- REN, Y. Z., LI, H. , LI, G. Y., and WANG, Q. Y., 2006. First Report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Infecting Edible Seed Watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) in China. *Plant Dis.*, 90:1112.
- SCHAAD, N. W., Jones, J.B., and Lacy, G. H., 2001. Gram Negative Bacteria, *Acidovorax*. In *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition)* Edts:Schaad, N. W., Jones, J.B., and Chun, W.. APS Press. St. Paul, Minnesota. P:121-125.
- SOMADI G. C., JONES J. B., HOPKINS D. L., STALL R. E., KUCHARAK T. A., HODGE N. C., and WATTERSON J. C., 1991. Occurance of a Bacterial Watermelon Fruit Blotch in Florida. *Plant Disease*, October 1991, 1053-1056.
- TAKASHI S., SHIGEMIKATO K., ABIKO T., and AKIRA K., 2000. Occurrence of Watermelon Bacterial Fruit Blotch in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 66(3):223-231.

- TİRENG KARUT Ş., 2011. Organik Tarımda Domates Bakteriyeel Solgunluk Hastalığı Etmenine (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) Karşı Kullanılabilecek Tohum Uygulamaları. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 75 sayfa.
- TUIK, 2010. Tarım. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. Erişim Tarihi 03.06.2011
- TUIK, 2010. Tarım. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> Erişim Tarihi 03.06.2011
- TZENG, K.C. and HSU, S.T., 2007. Bacterial Diseases of Cucurbits in Taiwan. Symposium of International Workshop on the Cucurbit Diseases and Resistance Breeding, 43-48.
- WALL, G. C., SANTOS, V. M., CRUZ. F. J. and NELSON, D. A. 1990. Outbreak of Watermelon Fruit Blotch in the Mariana Islans. Plant Diseases, 74:80.
- WALCOTT, R. R. and GITAITIS, R. D., 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* In Watermelon Seed Using Immunomagnetic Separation and The Polymerase Chain Reaction. Plant Dis.84: 470-474.
- WALCOTT, R.R., FESSEHAIE, A., and CASTRO, A.C., 2004. Differences in Pathogenicity Between Two Genetically Distinct Groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on Cucurbit Hosts. Journal of Phytopathology, 152: 277–285.
- WALLCOTT, R. R., LANGSTON, D. B., JR., SANDERS F. H., JR. and GITAITIS R. D., 1999. Investating Intraspecific Variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Using DNA Fingerprinting and Whole Cell Faatty Acid Analysis. The American Phytopathological Society 2000, 90(2):191-196.
- WILLIEMS, A, M. OOR, S. THIELEMANS, M. GIMS, K. KERSTERS, and J. DE. LEY., 1992. Transfer of Several Phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. Int. J. Syst. Bacteriol., 42:107-119.

- XIAO W., LE Z., FU-SHOU X., LI-HAN Z and GUAN-LIAN X., 2007. Immuno-capture PCR Method for Detecting *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from Watermelon. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology 4(2):173-179.
- ZHAO, T., FENG, J., SECHLER, A., RANDHAWA, P., LI, J. and SCHAAD, N.W., 2009. An Improved Assay for Detection of *Acidovorax citrulli* in Watermelon and Melon Seed. Seed Sci. & Technol., 37:337-349.

ÖZGEÇMİŞ

1986'da Mersin ilinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Mersin'de tamamladı. 2004'te Çukurova Üniversitesi Ziraat Mühendisliği bölümüne yerleşti. Lisans eğitimini 2008'de tamamladı. Aynı yıl ÇÜ Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilimdalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda yüksek lisans çalışmasına başlamıştır. 2011 yılında yüksek lisans tezini tamamlamış ve Mayıs 2011 tarihinde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Denizli ili Güney ilçesi Tarım İlçe Müdürlüğü'ne Ziraat Mühendisi olarak atanmıştır.