

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mehmet KILIÇ**

**SÜS BİTKİLERİNDE YUMUŞAK ÇÜRÜKLÜK ETMENİ *Erwinia* TÜRLERİ  
VE ALTTÜRLERİNİN MOLEKÜLER TANISI**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2011**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SÜS BİTKİLERİNDE YUMUŞAK ÇÜRÜKLÜK ETMENİ *Erwinia* TÜRLERİ  
VE ALTTÜRLERİNİN MOLEKÜLER TANISI**

**Mehmet KILIÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez 13/12/2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....  
Prof. Dr. Yeşim AYSAN  
DANIŞMAN

.....  
Yrd. Doç. Dr. Mustafa MİRİK  
İKİNCİ DANIŞMAN

.....  
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
ÜYE

.....  
Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ  
ÜYE

.....  
Yrd.Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No:**

**Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL**

**Enstitü Müdürü**

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

**Proje No: ZF2009YL92**

**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

#### SÜS BİTKİLERİNDE YUMUŞAK ÇÜRÜKLÜK ETMENİ *Erwinia* TÜRLERİ VE ALTTÜRLERİNİN MOLEKÜLER TANISI

Mehmet KILIÇ

#### ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Yeşim AYSAN  
İkinci Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mustafa MİRİK  
Yıl : 2011, Sayfa: 55  
Jüri : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
: Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ  
: Yrd. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

Süs bitkileri son yıllarda ekonomik yönden üreticinin ve Türkiye'nin ekonomisine önemli katkılarda bulunmaktadır. Ülkemizde süs bitkilerine duyulan ihtiyacı karşılamak için üretim materyali ithalatı başlamış ve bunun sonucunda yeni hastalık etmenlerinin girişi önemli bir sorun haline gelmiştir. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesinde yürütülen TOVAG-106O333 nolu proje kapsamında, 8 farklı süs bitkisinden (*Primula* sp., *Kalanchoe* sp., *Diffenbachia* spp., *Cactus* sp., *Yucca aloifolia*, *Ficus elastica*, *Schefflera actinophylla*, *Senecio cruentus*) 14 adet yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* izolatı elde edilmiş ancak tür ve alttür düzeyinde tanıları yapılamamıştır. Bu yüksek lisans tezinde bu izolatların PCR yöntemi ile tür ve alt tür düzeyinde tanıları yapılmıştır. Çalışmada *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi*'ye spesifik 6 primer çifti (ADE1-ADE2, ERWFOR-CHRREV, ERWFOR-ATROREW, Y1-Y2, Y45-Y46 ve ECA1f-ECA2r) kullanılmıştır. Denenen izolatların tümünün *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Süs bitkileri, yumuşak çürüklük, *Erwinia*, PCR

## ABSTRACT

### MSc THESIS

# MOLECULAR IDENTIFICATION OF ERWINIA SPECIES AND SUBSPECIES ON ORNAMENTAL PLANTS

Mehmet KILIÇ

ÇUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Yeşim AYSAN  
Second Supervisor : Asst. Prof. Dr. Mustafa MİRİK  
Yıl : 2011, Pages: 55  
Jury : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
: Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ  
: Asst. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

In recent years, ornamental plants have economically important contributions to the grower's and Turkey's economy. In our country, production material has started to be imported for the need to ornamental plants and as a result of new fungal and bacterial diseases, input has been made to start. Cukurova University, Faculty of Agriculture, conducted under the project number TOVAG-1060333, the fourteen soft rot *Erwinia* isolates were obtained from 8 different ornamental plants (*Primula* sp., *Kalanchoe* sp., *Diffenbachia* spp., *Cactus* sp., *Yucca aloifolia*, *Ficus elastica*, *Schefflera actinophylla*, *Senecio cruentus*) but which cause the diagnosis to be made at the level of species and subspecies. This Master thesis, these isolates have been diagnosed at the level of species and subspecies by molecular methods as PCR. At the study, the specific six primer sets (ADE1-ADE2, ERWFOR-CHRREV, ERWFOR-ATROREW, Y1-Y2, Y45-Y46 ve ECA1f-ECA2r) for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* were used. All tested isolates were found to be *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

**Key Words:** Ornamental plants, soft rot, *Erwinia*, PCR

## **TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle önüme çıkan tüm zorlukları aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocalarım Sayın Prof. Dr. Yeşim AYSAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa MİRİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamdaki katkı ve ilgilerinden dolayı Arş.Gör. Sümer HORUZ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında en büyük desteğim olan sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkür ederim.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Süs Bitkilerinde Yumuşak Çürüklük Etmeni <i>Erwinia</i> Türleriyle İlgili Çalışmalar.....	7
2.2. Yumuşak Çürüklüğe Neden Olan <i>Erwinia</i> Türlerinin Moleküler Tanısıyla İlgili Çalışmalar .....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. <i>Erwinia</i> İzolatları.....	23
3.1.2. PCR Primerleri.....	24
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Bakteri İzolatlarının Besi Yerinde Çoğaltılması ve Pektolitik Aktivitelerinin Saptanması .....	26
3.2.2. <i>Erwinia</i> Türüne ait DNA'ların İzolasyonu .....	26
3.2.3. Bakteri İzolatlarının PCR Testi İle Tanısı.....	28
4. BULGULAR .....	31
5. TARTIŞMA .....	37
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	51
EKLER.....	52



<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
Çizelge 1.1. Türkiye’de süs bitkileri üretim alanları .....	1
Çizelge 1.2. Türkiye süs bitkileri ihracaatı .....	2
Çizelge 1.3. İllere göre 2008 yılında Türkiye süs bitkileri ihracatı.....	2
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri izolatları listesi.....	24
Çizelge 3.2. PCR Çalışmalarında Kullanılan Primerler .....	25
Çizelge 3.3. PCR Çalışmalarında Kullanılan Programlar .....	29
Çizelge 4.1. <i>Erwinia</i> izolatlarının farklı primer setleriyle yapılan PCR sonuçları.....	34





<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
Şekil 4.1. <i>Erwinia caratovora</i> 'nın King B Besi Yerindeki Gelişimi.....	31
Şekil 4.2. <i>Erwinia</i> İzolatlarının Patates Dilimlerinde Oluşturduğu Yumuşak Çürüklük .....	31
Şekil 4.3. İzole Edilen DNA'ların Agaroz Jeldeki Görüntüsü .....	32
Şekil 4.4. Y1 ve Y2 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR İşleminde Elde Edilen Bantlar .....	35



## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ddH <sub>2</sub> O	: Bidestile su
DNA	: Deoksiribonukleik asit
dev.	: Devir
dak.	: Dakika
GSPB	: Göttingen Sammlung Phytopathogener Bakterien
ha	: Hektar
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
PCR	: Polymerase Chain Reaction
KKTC	: Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti
min	: Minimum
mg	: Miligram
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre
bp	: Base pair
SDS	: Sodium dodecyl sulphate
ssp.	: Türler
TAE	: Tris-acetat-EDTA
T.C.	:Türkiye Cumhuriyeti
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
IMS-PCR	: Immunomagnetic separation – PCR
ERIC-PCR	: Enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR
REP-PCR	: Repetitive extragenic palindromic-PCR
ODD	: Ouchterlony double diffusion
RAPD-PCR	: Random amplified polymorphic DNA-PCR
ITS-PCR	: Intergenic transcribed spacer-PCR



## 1. GİRİŞ

Süs bitkileri son yıllarda Türkiye’de günlük yaşam içerisinde önemli bir yer almıştır. Ekonomik yönden de gerek üreticinin ve gerekse Türkiye’nin ekonomisine önemli katkılarda bulunmaktadır. Türkiye, süs bitkileri yetiştiriciliğinde uygun iklimsel ve coğrafi koşullara, pazarlanan ülkelere yakınlığa ve ucuz işgücüne sahip olması gibi nedenlerle önemli avantajlara sahiptir. Son yıllarda Türkiye’de süs bitkileri yetiştiriciliği önemli düzeylerde artış göstermektedir. Çizelge 1.1’de de görüldüğü üzere 2001 yılında 1.392 ha alanda süs bitkisi üretimi yapılırken 2005 yılına gelindiğinde 3.930 ha alanda üretim yapılmıştır. Bu değerlerde göstermektedir ki, süs bitkilerine olan ilgi dünyaya paralel olarak Türkiye’de de artmaktadır.

Çizelge 1.1. Türkiye süs bitkileri üretim alanları (ha)

Üretim Çeşidi	2001	2002	2003	2004	2005
Kesme Çiçekler	758	1.036	1.145	1.198	1.200
İç Mekan Bitkileri	38	79	57	73	167
Dış Mekan Bitkileri	584	723	918	1.193	2.337
Soğanlı-Rizomlu Bitkiler	11	19	51	54	226
<b>TOPLAM</b>	<b>1.392</b>	<b>1.858</b>	<b>2.172</b>	<b>2.519</b>	<b>3.930</b>

(Anonim, 2010)

2005 yılı verilerine göre Türkiye süs bitkileri üretiminin %59’unu dış mekan bitkileri, %31’ini kesme çiçekler, %6’sını doğal çiçek soğanları, %4’ünü ise iç mekan bitkileri oluşturmuştur. Toplam üretimin %28’i seralarda, %72’ si ise açık alanda yapılmaktadır (Anonim, 2010). Türkiye’de 28 ilde süs bitkileri üretimi yapılmaktadır. Üretimin en fazla yapıldığı iller sırasıyla Antalya, İzmir, Yalova ve İstanbul’dur. Marmara ve Ege Bölgesinde İstanbul, Yalova, İzmir ve Aydın illerinde yapılan kesme çiçek üretimi genellikle iç pazara yöneliktir. Antalya bölgesinde ise çoğunluğu seralarda olmak üzere yüksek kaliteli ve ihracata yönelik üretim yapılmaktadır.

Türkiye süs bitkileri üretimi itibariyle dünya üretiminde yaklaşık binde 7’lik bir paya sahiptir. Türkiye’den süs bitkileri ihracatı 20 yıl önce başlamıştır ve düzenli gelişim göstermektedir. İhracattaki ana ürün grupları kesme çiçekler, fideler,

fidanlar, iç ve dış mekân bitkileri, çiçek soğanları, yosun ve çelenklerdir. Son yıllarda Antalya ilinin yayla bölgesinde başlayan ihracata yönelik üretim sayesinde yıl boyu yüksek kaliteli çiçek ihracatı yapılmasına olanak sağlanmaktadır.

Türkiye'nin süs bitkileri ihracatının yıllar itibariyle gelişimi Çizelge 1.2'de de görüldüğü üzere Türkiye süs bitkileri ihracatı üretime paralel olarak, her yıl ortalama % 25 artarak; 2000 yılında 13 milyon dolar iken, 2009 yılı sonunda 50 milyon dolara ulaşmıştır (Anonim, 2010).

Çizelge 1.2. Türkiye süs bitkileri ihracatı

YILLAR	DEĞER (1.000 USD)
2000	12.956
2001	14.282
2002	22.299
2003	31.485
2004	37.748
2005	36.229
2006	40.522
2007	46.447
2008	45.524
2009	49.150

(Anonim, 2010)

Çizelge 1.3'de de görüldüğü gibi 2008 yılı istatistiklerine göre Türkiye'nin süs bitkileri ihracatının % 60'ı Antalya'dan yapılmaktadır. Antalya'dan sonra sırasıyla İstanbul (% 10), İzmir (% 8) ve Yalova (% 6) süs bitkileri ihracatında önemli iller olarak ortaya çıkmıştır. Isparta, Burdur ve Korkuteli bölgelerinde yapılan yayla üretimi nedeniyle ihracat sezonu 12 aya kadar yayılmıştır.

Çizelge 1.3. İllere göre 2008 yılında Türkiye süs bitkileri ihracatı

İLLER	İHRACAT(USD)	PAY (%)
ANTALYA	27.499.527	60
İSTANBUL	4.553.534	10
İZMİR	3.635.404	8
YALOVA	2.764.077	6
ISPARTA	65.546	0
DİĞER İLLER	6.981.586	15
TOPLAM	45.499.674	100

(Anonim, 2010)

Türk ihracatçıları, Türkiye'nin coğrafi konumu ve büyük tüketim merkezlerine yakınlığının avantajını kullanmaktadır. Türkiye'den dünya üzerinde 52 ülkeye süs bitkileri ihracatı yapılmaktadır. Kesme çiçek ihracatında en önemli pazarlarımız Hollanda, İngiltere, Almanya, Rusya, Doğu Avrupa Ülkeleri ve Balkan ülkeleridir. Canlı bitkiler ihracatında giderek önem kazanan pazarlarımız Türkmenistan, Azerbaycan, Irak ve KKTC'ye ihracatımız da artmaya devam etmektedir (Anonim, 2010).

Süs bitkilerinin ekonomideki öneminin artması ile birlikte üretim materyali ithalatı ile ülkemize çeşitli hastalık girişi de olabilmektedir. Ülkemizde süs bitkilerinde görülen hastalıklar üzerine ilk çalışmalar Öden (1991)'in bildirdiğine göre Türkmenoğlu (1953), Karel (1958), Karahan (1969) ve Gürcan (1970) tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar fungal hastalıkların ilk kayıtlarıdır. Bunlara ilaveten, Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü 1979-1984 yılları arasında yapmış olduğu araştırmalarda süs bitkilerinde sorun olan hiçbir bakteriyel hastalık etmeni saptanamamıştır. Süs bitkilerinde bakteri hastalıkları üzerine yapılan ilk detaylı araştırma Öden (1991) tarafından yapılmıştır. Araştırmacı İstanbul ve İzmir illerinde *Chrysanthemum* spp. (Krizantem) ve *Rosa* spp. (Gül)'de *Agrobacterium tumefaciens* (kök boğazı uru), *Zantedeschia aethiopica* (Kala), *Ariocarpus trigonus* (Kaktüs), *Lilium candidum* (Mis Zambak), *Saintpaulia ionantha* (Afrika menekşesi), *Dieffenbachia* sp. (Difenbahya) ve *Gerbera* L. (Gerbera)'dan elde ettiği izolatlarda yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'yı tanılamıştır (Öden, 1991). Doğu Akdeniz bölgesinde 2000'li yılların başlarında ise *Dieffenbachia* spp. (Difenbahya)'de ise *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'nın neden olduğu bir hastalık patlaması belirlenmiştir (Aysan ve Çetinkaya-Yıldız, 2002; Çetinkaya-Yıldız ve ark., 2004). Konya'da *Tulipa* spp. (Lale)'lerde soğan, yaprak ve sap çürüklüğüne neden olan *Pectobacterium* (synonim: *Erwinia) carotovorum*'un problem olduğu Boyraz ve ark., (2006) tarafından bildirilmiştir. Aysan ve ark., (2009) yürüttükleri bir proje çerçevesinde farklı süs bitkilerinde yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* türleri izole etmişler ve bunların tanılanmasında hızlı yöntemler geliştirmişlerdir.



*Erwinia* cinsi içinde yer alan bakteriler DNA:DNA hibridizasyonu ile yapılan son sistematığe göre *Pectobacterium* cinsi içerisine dahil edilmiştir (Hauben ve ark., 1998). Yapılan son değişiklikle *Erwinia* yumuşak çürüklük etmenlerinin sistematığı:

Alem	: Procaryotae
Bölüm	: Bacteria
Sınıf	: Proteobacteria
Takım	: Gammaproteobacteria
Familya	: Enterobacteriaceae
Cins	: <i>Pectobacterium</i>
Tür	: <i>Pectobacterium caratovororum</i> (Jones 1901) Waldee 1945 (AL 1980) Hauben ve ark. 1999 ( <i>Erwinia caratovora</i> (Jones) Bergey et al)

*Erwinia* cinsi bakteriler, sebep oldukları hastalıkların semptomlarına göre ayırt edilen çok sayıda türe sahiptir. Bu cins üç ana grup altında incelenir; *amylovora*, *caratovora* ve *herbicola* (Leliott ve Dickey, 1984). *Amylovora* grubu elma ve armut gibi yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ve süs çalılarında ateş yanıklığı hastalığına sebep olup, *Erwinia amylovora* ile temsil edilmektedir. *Caratovora* grubu yumuşak çürüklük hastalığına sebep olan türleri içerir. Bu bakteriler, hem tarlada hem de depoda ürüne çok önemli zararlar verirler. Pektolitik enzim üreten bu türler; *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora*, *Erwinia caratovora* subsp. *betavasculorum*, *Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia caratovora* subsp. *wasabiae*, *Erwinia caratovora* subsp. *odorifera*, *Erwinia cypripedii*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia cacticida* ve *Erwinia caratovora* subsp. *chrysanthemi*'dir. *Herbicola* grubu iki ana türü içermektedir; *Erwinia herbicola*, genellikle bitkilerin üzerinde bulunan bir epifittir. Bu gruptaki diğer tür olan *Erwinia stewartii* ise mısırlarda Stewart'ın solgunluğu diye bilinen hastalığa sebep olmaktadır (Superyona ve Pataky, 1989).

Yumuşak çürüklük *Erwinia* türleri, ürettikleri endopoligalakturonaz, pektin liyaz ve pektin metil esteraz, endoglukonaz ve proteaz enzimleri gibi pektolitik enzimler üreterek bitki dokusunu yumuşatma yeteneğine sahiptir. Yumuşak çürüklük

veya *carotovora* grubu olarak isimlendirilen pektolitik enzimler üreten bu türler fitopatolojik özellikleri bakımından diğer *Erwinia* türlerinden farklıdırlar ve konukçu bitkide yumuşak çürüklük hastalıklarına neden olurlar.

Çetinkaya-Yıldız ve Aysan (2002)'nin bildirdiğine göre, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'nin konukçu dizisi patates ve serin iklim ürünleri ile sınırlı iken, *Erwinia carotovora* subsp. *caratovora* daha ılıman ve tropikal alanlarda geniş bir yayılma gösterir. *Erwinia chrysanthemi* tropik ve subtropik ürünleri hastalandıran sıcak iklimlerin patojenidir. Geniş bir konukçu dizisinde (sebzeler, meyveler ve süs bitkileri) yumuşak çürüklük hastalığı oluştururlar. Süs bitkileri içerisinde *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'nin konukçu dizisi çoğunlukla Sardunya ve Kelebek Çiçeği ile sınırlı iken *Erwinia carotovora* subsp. *caratovora* Begonya, Süs Biberi, Sıklamen, Dalya Hibritleri, Difenbahya, Atatürk Çiçeği, Kalanchoe, Sardunya, Onbir Ay Çiçeği, Afrika Menekşesi, Kelebek Çiçeği, Yılbaşı Kaktüsünde hastalık yapar. *Erwinia chrysantemi* ise genelde sıcak bölgelerde sera içinde yetişen ürünleri ve süs bitkilerinden Begonya, Biber, Sıklamen, Dalya Hibritleri, Atatürk Çiçeği, Kalanchoe, Sardunya, Afrika Menekşesi, Krizantem, Karanfil, Difenbahya ve Agloanema türlerini hastalandırmaktadır (Perombelon ve Kelman, 1980; Daughtrey ve ark. 1995). *Erwinia* yumuşak çürüklük grubu içerisinde yer alan *Erwinia cyripedii* ise orkidelde kahverengi çürüklüğe, *Erwinia rhanpotici* sümbülde ve *Erwinia cacticidi* ise kaktüste yumuşak çürüklüğe neden olmaktadır.

*Erwinia* türü bakteriler özellikle yüzey sularında, bitki artıklarında ve topraktaki rizosfer tabakasında bulunurlar. Rutubetli, sisli ve yağmurlu bölgelerde *Erwinia* türleri oldukça etkili olmalarına rağmen kurak ve yağışsız yerlerde patojeniteleri azdır.

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bakteriyoloji laboratuvarında yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda 8 farklı süs bitkisi türünde (*Primula* sp., *Kalanchoe* sp., *Diffenbachia* spp., *Cactus* sp., *Yucca aloifolia*, *Ficus elastica*, *Schefflera actinophylla*, *Senecio cruentus*) yumuşak çürüklük hastalığı belirtilerinden 14 adet *Erwinia* izolatu elde edilmiş (Aysan ve ark., 2009) ancak tür ve alttür düzeyinde tanıları yapılamamıştır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında bu süs bitkilerinde yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* izolatlarının tür ve alt tür

düzeyinde tanılarının yapılması için farklı araştırmacılar tarafından dizayn edilen türlere özelleşmiş ADE1- ADE2 (Nassar ve ark., 1996), ERWFOR-CHRREV (Smid ve ark., 1995), ERWFOR-ATROREW (Smid ve ark., 1995), Y1 -Y2 (Darasse ve ark., 1994b), Y45 -Y46 (Frechon ve ark., 1995) ve ECA1f -ECA2r (De Boer ve ark., 1995) primer çiftleri kullanılarak PCR ile tanılanması amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2. 1. Süs Bitkilerinde Yumuşak Çürüklük Etmeni *Erwinia* Türleriyle İlgili Çalışmalar

Süs bitkilerinde başta yumuşak çürüklük olmak üzere bakteriyel etmenlerin neden olduğu hastalıkların simptomolojik olarak tanınması ve hastalık etmenlerinin epidemiyolojileri hakkında ayrıntılı bilgi veren kitaplar Amerikan Fitopatoloji Derneği tarafından hazırlanarak yayımlanmıştır (Chase, 1987; Daugtery ve ark., 1995). Bu kaynaklarda yapılan incelemeler sonucunda *Erwinia* yumuşak çürüklüklerini oluşturan bakterinin geniş bir konukçu dizisine sahip patojenlerden biri olduğu gözlemlenmiştir. Hastalık etmenlerinden dolayı önemli ürün kayıpları meydana gelmektedir.

Yumuşak çürüklük hastalığına *Erwinia* türlerinden, (1) *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye, Sinonim: *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall) Gardan et al.; (2) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Dye, Sinonim: *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* (Jones) Hauben et al.; (3) *Erwinia chrysanthemi* (Burkholder et al.), Sinonim: *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder et al.) Samson et al. neden olmaktadır (Perombelon, 2002; Saygılı ve ark., 2008).

Saygılı ve arkadaşlarının (2008) bildirdiğine göre, yumuşak çürüklük hastalık etmenlerinden *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ilk kez 1901 yılında Jones tarafından tanımlanmış ve *Bacillus carotovorus* adı verilmiştir. Diğer yumuşak çürüklük etmeni *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ise ilk kez 1902'de van Hall tarafından *Bacillus atrosepticus* olarak isimlendirilmiştir. Her iki bakteri de 1980 yılında uluslararası da kabul edilen bakteri isimlerinin yer aldığı listede *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* olarak isimlendirilmişlerdir (Skerman et al. 1980). Ancak son yıllarda bakterilerin genetik özellikleri dikkate alınarak yapılan moleküler taksonomiye dayalı sınıflandırmaya göre *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* *Pectobacterium* genusu içine, *Erwinia chrysanthemi* ise *Dickeya* genusuna dahil edilmiştir (Hauben ve ark., 1998).

Her üç patojen de gram negatif, çubuk şekilli ve çevresel kamçılı, genelde çiftler halinde, arasıra da birkaç hücreden meydana gelen zincir şeklinde bulunur, büyüklüğü 0.5-0.8 x 1.3 µm boyutlarda, kapsülü bulunmayan fakültatif anaerob bakterilerdir(Saygılı ve ark., 2008).

Perombelon ve Kelman (1980),’ın bildirdiğine göre, pektolitik enzim üretebilme yeteneğine sahip olan bu üç bakteriyi birbirlerinden ayırmada biyokimyasal testlerden yararlanılabilmektedir. Örneğin, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, 37°C’de gelişebilme, maltoz ve α-methylglucoside’den asit ve sakkorazdan indirgenmiş maddeler oluşturma yeteneğinden yoksun olma özellikleriyle *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*’dan ayrılmaktadır. Aynı şekilde *Erwinia chrysanthemi* ise diğer iki bakteriden, indol ve fosfataz üretebilme yeteneği, laktaz ve trehaloz’dan asit oluşturmama, %5 NaCl’de gelişmeme ve erythromycin’e duyarlı olma özelliklerinin bulunması nedeniyle diğerlerinden ayrılmaktadır (Bradbury, 1977a; Bradbury, 1977b). Ayrıca, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ve *Erwinia chrysanthemi* birbirinden farklı minimum ve maksimum sıcaklıklarda gelişebilme özelliğine sahip bakterilerdir. Örneğin *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 36-37°C’de gelişemezken *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* bu sıcaklıkta rahatlıkla gelişebilmektedir. Bunun yanı sıra pek çok *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* izolatı 39°C’de gelişemezken *Erwinia chrysanthemi* oldukça iyi gelişme göstermektedir (Perombelon ve Kelman, 1980).

Çok geniş bir konukçu dizisi olan yumuşak çürüklük hastalığı etmenlerinin epidemiyolojisi üzerine detaylı çalışmalar patates üzerinde yapılmıştır. Bu etmenler bulaşık patates yumruları, bitki artıkları ve toprakta yaşamını sürdürebilmektedir. Bunlardan *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* daha çok tohumluk yumrularında *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ise toprakta yaşayan bakterilerdir. Ayrıca patojen sulama sularında göl, gölet ve akarsularda yaşamını sürdürebilmektedir. Bu nedenle tarlada ilk enfeksiyonlar bulaşık yumrular veya toprak ve sulama sularından tohumluk yumrulara lentiseller veya yaralar yolu ile ilk enfeksiyonlar oluşur. Hastalıklı bitkilerden sulama suları, sıçrayan yağmur damlaları, böcek ya da toprak işleme aletleri ile hastalık diğer sağlıklı bitkilere de bulaşır (Benlioğlu, 1991).

Yumuşak çürüklük hastalıklarına neden olan bu bakterilerin süs bitkilerinde de sorun olduğunu ortaya koyan pek çok çalışma mevcuttur.

Munnecke (1960), Los Angeles, ABD yakınlarındaki seralarda 1956 yılının Mart ayında *Dieffenbachia* bitkilerinde (*Dieffenbachia picta* cultivar Rudolph Roers, *Dieffenbachia X bausei* ve *Dieffenbachia amoena*) çok şiddetli yumuşak çürüklük hastalığı belirtilerini tespit etmiştir. Hasta bitkilerde yumuşamanın toprak yüzeyine yakın veya çelik alınan yaralanmış yerler civarında olduğu belirlenmiştir. Hastalığın ilk evrelerinde bitkinin alt yapraklarında solgunluk, gövdede su emmiş lekeler ve iletim demetlerinde açık kahverengi renk değişimleri gözlenmiştir. Gövdedeki su emmiş lekeler kısa sürede yumuşamaya dönmüş ve hastalık görünümü çok hızlı ilerleyerek 2-3 gün içinde akışkan bir yumuşama sonucu tüm bitkinin çöktüğü tespit edilmiştir. Hasta gövdeden alınan doku örnekleri mikroskopik olarak incelendiğinde iletim demetlerinin ve ksilem parankima hücrelerinin bakteriyel dolu olduğu saptanmıştır. Hasta bitkilerden alınan çeliklerde de benzer belirtilerin çok hızlı ilerlediği gözlenmiştir. Hasta bitki örneklerinden yapılan izolasyonlarda elde edilen krem rengindeki bakteri izolatları *Erwinia chrysanthemi* olarak tanımlanmıştır. Hastalıkla mücadele etmek ve üretim seralarında bulunan patojen bakteriyi yok etmek için öncelikle sanitasyon (temizlik) önlemleri uygulanmıştır. Çoğaltma materyali olarak kesilen çeliklerdeki bakteriyi yok etmek için çelikler Agrimycin 100 (200 ppm dozunda streptomisin ve terramisin antibiyotikleri) içeren antibiyotik solüsyonuna 15 dakika ardından 40-60 dakika 120°F (48°C)'deki sıcak suya batırılmıştır. Çeliklerin gövdesi ne kadar kalınsa yapılan uygulamaların etkinliği o kadar az olmaktadır. Bu nedenle çelikler 1-1.5 inç (2.5-3.8 cm)'den fazla olmamalıdır. Bu hastalıkla mücadelede öncelikle sağlıklı bitkilerden çelik alınmalı, üretim alanındaki hasta bitkiler uzaklaştırılmalı, alınan çelikler 15 dakika Agri-mycin 100 ardından 40-60 dakika 120°F (48°C)'deki sıcak su içine daldırılmalıdır. Ancak bu uygulamalar da bitki içinde bulunan bakteriyi tamamen yok eden uygulamalar olamamış bu nedenle hastalıkla mücadelede yeni yöntemlerin araştırılması gerektiği vurgulanmıştır.

Janse ve Ruissen (1988), Hollanda'da beş farklı süs bitkisi türünden (*Aechmea fasciata*, *Aglaonema*, *Cichorium intybus*, *Dieffenbachia*, *Kalanchoe*

*blossfeldiana*, *Philodendron erubescens* ve *Scindapsus pictus*) ve patatesten izole ettikleri 41 farklı *Erwinia chrysanthemi* izolatını fizyolojik, biyokimyasal, serolojik ve patojenite testlerini kullanarak karakterize etmişlerdir. Yedi biovara sahip olan *Erwinia chrysanthemi*'nin Hollanda izolatlarının biovar 2, 3, 5 ve 7'ye ait olduğunu belirlemişlerdir. Patates izolatlarının çoğu ve *Kalanchoe* izolatları biovar 7 olarak tespit edilirken, geriye kalan patates izolatları ve *Cichorium intybus* izolatları biovar 5 olarak tespit edilmiştir. *Dieffenbachia* izolatları biovar 2 ve *Aechmea*, *Aglaonema*, *Philodendron* ile *Scindapsus* izolatları biovar 3 olarak saptanmıştır. Yedi farklı antiserum kullanılarak yapılan serolojik karşılaştırmalarda biovar ve orijinal konukçusu arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir. Tüm izolatların mısır ve patatesi hastalandırma yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. *Erwinia chrysanthemi* izolatları karakterize edilirken konukçusuna göre ayırım yaparak pathovar düzeyinde bir sınıflandırmanın mümkün olmadığını sonucuna varılmıştır.

Bogatko ve Sobiczewski (1989), Polonya'nın Varşova şehri yakınında ticari üretimi yapılan sümbül alanlarından yumuşak çürüklük belirtisi gösteren sümbül soğanlarını toplanmışlar ve hastalığa neden olan etmeni *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* olarak tanılamışlardır. Polonya'da ilk defa 1988 yılında ortaya çıkan bu hastalığın, kimyasal mücadelesinde bakır ve streptomisin etkisiyle ülkede kullanılan sümbül çeşitlerinin bu hastalığa duyarlılığını araştırmışlardır. Bakırlı preparatlar hastalık şiddetini azaltsa da tamamen hastalığı önleyemezken streptomisin uygulaması hastalık gelişimini tamamen engellemiştir. Hastalığa reaksiyonu testlenen 10 sümbül çeşidinden yedisi bu hastalığa çok duyarlıyken üç çeşit (Grow Princess, Lady Derby, Scarlet Pimpernel) daha dayanıklı sümbül çeşitleri olarak tespit edilmiştir.

Berger ve ark. (1994), Almanya'da iris rizomlarında yumuşak çürüklüğe neden olan etmenin *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* olduğunu ve hastaliksız üretim materyali eldesinde doku kültürü yönteminin bile etkisiz kalabileceğini belirtmişlerdir. Bulaşık üretim materyalinden patojenin dezenfeksiyonunda alkol, sodyum hipoklorit, kalsiyum hipoklorit ve merkürük klorit kullanımına dayalı bir yöntem geliştirmişlerdir.

Balestra ve Impiglia (1996), Suriye'nin kuzeyinde Halep yakınlarındaki Al Bab köyünde seralarda yetiştirilen *Dieffenbachia maculata* bitkilerinde çok şiddetli gövde çürüklüğü belirtilerinin varlığını saptamışlardır. İlk defa 1990 yılında gözlenen, ardından 1993 yılında yeniden ortaya çıkan bu hastalıktan dolayı üretiminin yaklaşık olarak %50'sinin etkilendiğini belirtmişlerdir. Hasta bitki örneklerinden izole ettikleri bakteriyi geleneksel yöntemlerle (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve patojenite testleri) *Erwinia chrysanthemi* olarak tanılamışlardır. Yedi pathovarı (pv. *chrysanthemi*, pv. *dianthicola*, pv. *dieffenbachiae*, pv. *paradisiaca*, pv. *parthenii*, pv. *philodendri* ve pv. *zuae*) bulunan *Erwinia chrysanthemi*'nin patojenite, fenotipik ve serolojik özellikler yönünden pathovarlar aralarındaki ilişkisinin halen belirsiz olduğunu vurgulamışlardır. Bu hastalığa neden olan patojenin, yurt dışından getirilen üretim materyalleri aracılığıyla Suriye'ye bulaştığını düşünmüşlerdir. Üretim alanında yapılan hatalar ve kimyasal mücadelenin yapılmamasının zararı arttırdığını belirtmişlerdir. Suriye'de ilk defa varlığı rapor edilen bu hastalığın mücadelesinde öncelikle ülkeye giren üretim materyalinin hastaliksız olduğunun testlenmesi gerektiği, ayrıca üretim alanındaki hasta bitkilerin uzaklaştırılması, hasta bitkilerden çelik alınmaması, üretimde steril toprak ve kimyasal olarak bakırlı preparatların kullanılması gerektiği belirtilmiştir.

Wright (1998), Yeni Zelanda'da yazın çiçek açan kala zambaklarında (*Zantedeschia* spp.) 1994-1998 yılları arasında tarlada yetişen bitkilerde zayıf bir sürgün gelişiminin olduğunu, yaprakların sarardığını, ilerleyen dönemlerde gövdelerin kahverengileştiğini ve yanıklık belirtilerinin bulunduğunu belirtmiştir. Ayrıca depodaki yumrulara su emmiş lekelerin varlığından söz etmiştir. Uygun iklim koşullarında yumrulardaki lekelerin hızla büyüdüğü, tüm yumruyu yumuşatarak çürüttüğü ve yumrunun peynir gibi dağıldığını belirlemiştir. Bu belirtilere neden olan hastalık etmenini *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones 1901) Bergey et al. 1923 olarak tanılamıştır. Kışın çiçek açan kala zambaklarının her ne kadar hastalığa tolerant olduğu bilinse de yazın çiçek açan çeşitlerde bu hastalığın ekonomik olarak zarar verdiği belirtilmiştir.

Mansvelt ve Carstens (1999), Güney Afrika'da çeşitli süs bitkisi üreticilerinden alınan yumuşak çürüklük belirtisi gösteren beyaz çiçekli kala zambak



(*Zantedeschia oculata* ve *Zantedeschia elliottiana*) örneklerinde *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'nın neden olduğu bir hastalık patlaması belirlenmiş ve bu bitkilerde yaklaşık olarak %25 ürün kaybı tespit edilmiştir.

Chen ve Lin (2000), Tayvan'da yetiştirilen çiçekli kala zambak (*Zantedeschia* sp.)'da *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'nın neden olduğu yumuşak çürüklük hastalığının bu süs bitkisinin üretimini sınırlayan en önemli faktörlerden biri olduğunu ve bu hastalığın hem yumruda çürüklüğe hem de yeşil aksamda lekelerle neden olduğunu belirtmişlerdir. Hastalığın mücadelesinde ülkede yetiştirilen çiçekli kala zambak çeşitlerinin bu etmene duyarlılık düzeyini, bu bitkinin yetiştirileceği saksı toprağı içeriğini ve hastalık şiddetini azaltacak kimyasal uygulamaları araştırmışlardır. Tayvan'da yetiştirilen çiçekli kala zambak çeşitlerinden 26'sının bu hastalığa duyarlılığı incelendiğinde sadece "Pink Opal" çeşidinin tarla şartlarında %2.5 hastalık şiddetine sahip olan en dayanıklı çeşit olduğu belirlenmiştir. Diğer üç çeşitte (Dominque, Inspiration ve Pasific Pink çeşitleri) ise %20'den az oranda hastalık şiddeti gözlenirken, 12 çeşitte %20-50 arasında ve geriye kalan 10 çeşitte ise %50'den fazla hastalık şiddeti belirlenmiştir. Saksıda yetiştirilen bu süs bitkisinde üretim toprağı olarak yer fıstığı küspesi, vermikulit ve perlit karışımı kullanıldığında yumru çürüklüğünün en az olduğu tespit edilmiştir. Hastalık mücadelesinde sekiz bakterisit ve 12 mikrobiyal pestisit'in yumru çürüklüğü ve yaprak lekesine etkisi testlenmiştir. Yumru çürüklüğünü ve yaprak lekelerini azaltmak için %12.5'lik streptomisin, %10'luk streptomisin+tetrasiklin, %40'lık oxine bakır+bakır hidroksit karışımının dikim öncesi yumruya ve yaprak oluştuktan sonra yeşil aksama püskürtülmesini önermişlerdir.

Snijder ve van Tuyl (2002), *Araceae* familyasından süs bitkisi olan kala zambak türlerinin (*Zantedeschia* spp.) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'ya karşı duyarlılık düzeylerini araştırmışlar ve *Zantedeschia aethiopica*'nın yumuşak çürüklük hastalığına dayanıklı bir tür olduğunu belirtmişlerdir.

Norman ve ark. (2003), ABD'nin Florida eyaletinde yaşanan su sıkıntısı nedeniyle belediyeler tarımsal sulamalarda kullanılmak üzere yağmur göletleri, geri dönüşümlü sulama suyu ve geri dönüşümlü kanalizasyon suyu kullanımını tavsiye etmiştir. Ancak bu suların kullanıldığı üretim alanlarında yumuşak çürüklük

hastalığının sorun olabileceğine dikkat çekmişlerdir. Florida'daki sulama sularından 1 yıl boyunca örnekler toplamış ve bu sulardan izole edilen bakteriyel türlerin %99'unun *Diffenbachia* bitkisi üzerinde patojen olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu sulama sularının %98'inde *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve %2'sinde ise *Erwinia chrysanthemi*'ye rastlamışlardır. Bu suları kullanan süs bitkileri üretim yerlerinde ve fideliklerdeki *Erwinia* popülasyonlarının moleküler karakterizasyonunu BOX-, ERIC- ve REP-PCR ile yaparak *Erwinia chrysanthemi* ve *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* etmenlerini tanılamışlardır.

Gracia-Garza ve ark. (2004), Kanada'nın Ontario eyaletinin Niagara bölgesinde yetiştirilen süs bitkileri (kala zambak, sklamen ve poinsettia) üretiminde *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'nın neden olduğu yumuşak çürüklükten dolayı meydana gelen ekonomik kayıpların yıllık bir milyon amerikan dolarından fazla olduğunu bildirmiştir. Özellikle beyaz çiçekli kala zambak türlerinin (*Zantedeschia* spp.) bu etmene karşı en duyarlı süs bitkisi olduğu ve meydana gelen parasal kayıpların yarısının bu türde oluştuğu vurgulanmıştır.

Lee ve ark. (2006), Tayvan'da beyaz çiçekli kala zambak türü olan *Zantedeschia aethiopica*'dan izole ettikleri *Erwinia* cinsine ait bakteri izolatlarını moleküler düzeyde bir karakterizasyon çalışması yaparak *Erwinia chrysanthemi* olarak tanılamışlardır.

Chao ve ark. (2006), Tayvan'ın güney kısmında saksılı süs bitkisi olarak yetiştirilen Sithiporn çeşidi *Aglaonema* türlerinin (*Aglaonema marantifolium* ve *Aglaonema rotundum*) yapraklarında yumuşak çürüklük belirtilerine neden olan etmeni, patojenite, biyokimyasal ve moleküler test sonuçlarına göre *Erwinia chrysanthemi* olarak tanılamışlardır. Üretim yapılan fidelikteki bitkilerin %50'sinin bu hastalıktan dolayı etkilendiği ve pazarlanamaz duruma geldiğini rapor etmişlerdir.

İsmail ve ark. (2006), Mısır'da *Yucca aloifolia*'da gövde çürüklüğüne neden olan etmeni biyokimyasal testler ve farklı konukçulardaki patojenite testlerine göre *Erwinia chrysanthemi* olarak tanılamışlardır.

Ülkemizde bakteriyel etmenlerin süs bitkilerinde oluşturduğu hastalıklar üzerine ilk detaylı araştırma olarak Öden tarafından yapılan doktora çalışması dikkat çekmektedir (Öden, 1991). Araştırmacı İstanbul ve İzmir illerinde yaptığı

incelemelerde krizantem (kasımpatı) (*Chrysanthemum* spp.) ve güllerde (*Rosa* spp.) kök boğazı uruna neden olan *Agrobacterium tumefaciens*'i, *Schlangenlcrant palustris* (Kala), *Ariocarpus trigonus* (Kaktüs), *Lilium candidum* (Zambak), *Sainipaulia ionatha* (Afrika Menekşesi), *Dieffenbachia* sp. (Difenbahya) ve *Gerbera* L. da (Gerbera) yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia carotovora*'yı tanılamıştır (Öden, 1991).

Akdeniz bölgesinde 2000'li yılların başlarında ise Gül'lerde *Agrobacterium tumefaciens*'in (Aysan ve Şahin, 2003) ve Difenbahya'larda ise *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'nın (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2002; Çetinkaya- Yıldız ve ark., 2004) neden olduğu bir hastalık patlaması rapor edilmiştir.

Konya'nın Çumra ilçesinde, 15-20 dekarlık alanda yıllık 1.200.000-1.500.000 adet 22 çeşide ait tohumluk lale (*Tulipa* spp.) soğanı üretimi yapılmaktadır. Bu üretim alanında 2002 ve 2003 yıllarında tohumluk lale soğanlarında yumuşak çürüklük ve yaprak lekeli belirtileri tespit edilmiştir. Gander çeşidinin her iki yılda da tarlada hastalıktan en çok etkilenen çeşit olduğu belirlenmiş ve yapılan izolasyonlarda 30 bakteri izolatu elde edilmiştir. Depolarda yapılan incelemelerde ise Salmon Parrot çeşidinin en fazla etkilenen çeşit olduğu belirlenirken depo döneminde yapılan izolasyonlarda 117 bakteri izolatu elde edilmiştir. Tüm izolatlar patojenite, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre *Pectobacterium* (synonim *Erwinia*) *carotovorum*'un olarak Boyraz ve ark. (2006), tarafından tanılanmıştır.

Aysan ve ark. (2009), TÜBİTAK destekli bir araştırma projesinde Hatay, Adana, Mersin, Antalya, Muğla, Manisa, İzmir, Bursa, Yalova, İstanbul ve Tekirdağ illerinde süs bitkileri üretim alanlarından hasta bitki örnekleri toplamış ve bakteriyel etmenlerin izolasyonu ile tanısını yapmışlardır. Saksılı süs bitkilerinden (*Primula* sp., *Kalanchoe* sp., *Dieffenbachia* spp., *Cactus* sp., *Anthrrium* sp, *Yucca aloifolia*, *Ficus elastica*, *Hibiscus rosasinensis*, *Schefflera actinophylla* ve *Senecio cruentus*) yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* izolatları; *Anthurium andraeanum*'dan *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*; *Hibiscus rosa-sinensis*'den tür düzeyinde tanılamayan bir *Xanthomonas* sp., *Begonia* spp.'den *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*; *Pelargonium peltatum*'dan *Xanthomonas axonopodis* pv.

*pelargonii*; *Hedera helix*'den *Xanthomonas axonopodis* pv. *hederae*; *Schefflera actinophylla*'dan *Pseudomonas cichorii*; *Ficus benjamina*, *Euonymus japonica* ve *Rosa* sp.'den *Agrobacterium tumefaciens* ve *Nerium oleander*, *Jasminium officinale*, *Myrtus communis* ve *Fontonesia phillyreoides*'den *Pseudomonas savastanoi* izole edilmiştir. İzolatların tanısında klasik yöntemler, BIOLOG, MIDI, ELISA, ImmunoStrip ve türe spesifik PCR kullanırken izolatların genotipik olarak farklılıklarını belirlerken BOX-PCR yöntemini kullanmışlardır. Bu projeye, ülkemizde yetiştirilen veya ithal gelip satışı yapılan süs bitkilerindeki bakteriyel hastalıkların son durumu ortaya konmuştur. En yaygın hastalık görünümünün örtü altında yetiştirilen saksılı bitkilerde yumuşak çürüklük belirtileri olduğu vurgulanmış ve bu etmenlerin *Diffenbachia* türlerinden hızlı tanısında seçici besi yeri olan CVP'ye izolasyon ve türe spesifik PCR yöntemini kombine ederek kullanımını önermişlerdir. Bu proje çerçevesinde çeşitli süs bitkilerinden elde edilen *Erwinia* izolatları bu yüksek lisans tez çalışmasında kullanılmıştır.

## 2. 2. Yumuşak Çürüklüğe Neden Olan *Erwinia* Türlerinin Moleküler Tanısıyla İlgili Çalışmalar

Darrasse ve ark. (1994a), Fransa'da patateslerde karabacak hastalığına neden olan *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'nın toprakta, bitki dokusunda ve özellikle tohumlukta varlığının erken dönemde ve kısa sürede saptanmasının önemi belirtmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda moleküler tanıda kullanılacak bu patojene spesifik DNA propları geliştirmeye çalışmışlardır. 87 adeti *Erwinia carotovora* izolatu olan 130 mikroorganizmayla yaptıkları çalışmada, yaklaşık 180 ile 400 bp büyüklüğünde bant oluşturan 6 DNA parçasını izole etmiş, klonlamış ve dizilimini belirlemişlerdir. Bunlar içerisinde yer alan bir probun *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'ya spesifik olduğu belirlenmiştir. Patenti alınan bu DNA parçasının *Escherichia coli*'nin *putP* genleriyle homolog olduğu ve tanıda umut veren probun detaylı çalışılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Darrasse ve ark. (1994b), *Erwinia* türleri tarafından üretilen pektolitik enzimlerin, patates başta olmak üzere farklı konukçularda yumuşak çürüklük

belirtisine neden olduğunu ve bu enzimleri kodlayan *pel* genlerinin dizilimini kullanarak *Erwinia carotovora*'ya spesifik bir PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Y1 ve Y2 isimleri verilen *pel* genlerini kodlayan bu bölge, PCR'da çoğaltıldığında 434 bp'lık bant oluşturmuştur. Bu primer çifti *Erwinia carotovora*'nın *atroseptica*, *carotovora*, *wasabiae* ve *odorifera* alt türünü tanıırken *betavascolorum* alt türünü tanınamamıştır. Pektolitik enzim üreten 5 alt türün ayrımında ise PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)'den faydalanmışlardır.

Smid ve ark. (1995), patates yumrularında latent halde bulunabilen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ve *Erwinia chrysanthemi* popülasyonunu saptamak için geleneksel yöntemlerin yeterli olmadığını vurgulamışlar ve türe spesifik PCR'ı kullanarak daha kısa sürede bakteriyel patojenleri saptamışlardır. Bu amaçla türe spesifik primerler dizayn etmişlerdir. Tüm yumuşak çürüklük patojenleri için kullanılacak dizilime ERWFOR, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'ya spesifik primer dizilimine ATROREW ve *Erwinia chrysanthemi*'ye spesifik primer dizilimine de CHRREV adını vermişlerdir. Örneklerden *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'yı tanıırken ERWFOR ve ATROREW primer çifti kullanıldığında 389 bp'lık bant elde edilirken, *Erwinia chrysanthemi*'yi tanıırken ERWFOR ve CHRREV primer çifti kullanıldığında 450 bp'lık bant elde edilmiştir.

De Boer ve ark. (1995), patatesteki karabacak hastalığına neden olan *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'nın hastalık belirtisi göstermeyen tohumluk patateslerde latent olarak bulunmasının hastalık epidemiyolojisinde çok önemli bir role sahip olduğunu belirtmişlerdir. Tohumluk yumrularındaki bu patojenin varlığını belirlemek için sadece bu türe spesifik olan, ECA1f ve ECA2r olarak adlandırılan bir PCR primer seti dizayn etmişler ve 690 bp büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir. Bu primer seti diğer *Erwinia* türlerini tanımazken sadece *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'yı tanıyarak türe spesifik olduğu kanıtlanmıştır. Düşük popülasyondaki bakteri yoğunluğu ELISA ile saptanamazken bu primer seti kullanılarak yapılan PCR çalışmalarında patojen saptanabilmiştir. ELISA'nın duyarlılığı  $10^5$  hücre/ml iken bu primerlerle yapılan PCR'in duyarlılığının  $3 \times 10^2$  hücre/ml olduğu belirlenmiştir.

Helias ve ark. (1998), ABD, Almanya, Arjantin, Cezayir, Fas, Fransa, Hollanda, İspanya, Japonya, Kongo, Meksika ve Tunus'tan elde edilen 140 adet

yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* izolatının karakterizasyonunda, Y1 ve Y2 primerlerini kullanarak PCR’da 434 bp’lık bantlar elde etmişlerdir. Bu primerler *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum* hariç *Erwinia carotovora*’nın tüm alt türlerini tanımlamıştır. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*’nın patates yumrusu, yeşil aksam, toprak ve sulama suyunda varlığını saptarken DAS-ELISA, PCR ve IMS-PCR (immunomagnetic separation-PCR)’ı kullanmışlardır.

Frechon ve ark. (1998), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*’nın patatestte saptanmasında Probelia firması tarafından ticari hale getirilen PCR’a dayalı bir tanı kitini 4 ülkeden 5 farklı laboratuarda ayrı ayrı testlemişlerdir. PCR çalışmalarında Frechon ve ark. (1995) tarafından dizayn edilen ve Sanofi Diagnostics Pasteur firması tarafından patenti alınan Y45 ve Y46 primer çiftini kullanmışlardır. Saf kültürde patojenin saptanabilme limiti  $1.3 \times 10^2$  ile  $1.5 \times 10^3$  hücre/ml arasındayken, suni olarak bulaştırılmış patates yumrularında patojenin saptanabilme limitinin  $1.0 \times 10^1$  ile  $6.2 \times 10^3$  arasında olduğu belirlenmiştir.

Toth ve ark. (1999a), sekiz Batı Avrupa ülkesinden izole edilen 60 adet *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* izolatının fenotipik ayrımında BIOLOG testini ve moleküler tiplendirmesinde ise PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)-PCR, RAPD (random amplified polymorphic DNA)-PCR, ODD (ouchterlony double diffusion) ve faj tiplendirme testlerini kullanmışlardır. Serolojik bir test olan ODD’ye göre *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* izolatları arasında büyük oranda farklılıklar gözlenmiştir. İzolatların moleküler tiplendirmesinde PCR-RFLP, ERIC-PCR ve RAPD-PCR’a göre izolatlar arasında çok fazla ayrım yapılamamıştır. Ancak faj tiplendirme testlerinin izolatlar arası farklılığı belirlemede oldukça başarılı olduğu saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda patateslerde karabacak hastalığının epidemiyolojisinde faj testlerinin kullanılabileceği belirtilmiştir.

Toth ve ark. (1999b), tohumla taşınan patojenler olarak bilinen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ve *Erwinia chrysanthemi*’nin hızlı ve güvenilir tanısında bu etmenlerin 16S rRNA bölgesini kodlayan SR3F ve SR1cR adlı primer dizilimini kullanarak 16S-PCR’a dayalı bir yöntem geliştirmişlerdir. Farklı yerlerden elde edilen 65 izolat testlendiğinde 119

bp'lık bantın varlığı tespit edilmiştir. Patojenin saptanabilme limitinin *in vitro* şartlarda sıvı kültürde  $2.0 \times 10^2$  ile  $3.4 \times 10^3$  hücre/ml arasındayken mini bitkilerde bu miktar  $2.3 \times 10^2$  ile  $1.9 \times 10^4$  hücre/ml olarak saptanmıştır. Doku kültürüyle üretilmiş mini yumru ve mini bitkilerde bile bu patojenlerin yaşamaya devam etmelerinden dolayı, üretim materyallerinde bu üç etmenin latent enfeksiyonlarını saptayacak duyarlılıkta olduğu belirtilmiştir.

Hyman ve ark. (2000), patetes yumrularında ciddi oranda zarara neden olan *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'nın tespiti için PCR dayalı bir tanı yöntemi geliştirmişlerdir. PCR, seçici besi yeri olarak CVP'ye ekim ve immunofloresan mikroskopi tekniklerini karşılaştırdıklarında PCR'm oldukça duyarlı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Kang ve ark. (2003), Kore'de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* tanılanması için dizayn ettikleri EXPCCR ve EXPCCF adlı primerleri kullanarak PCR'a dayalı hassas bir yöntem geliştirmişlerdir. 24 primer içinden seçtikleri bu primer seti kullanıldığında *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatları 550 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur.

Norman ve ark. (2003), ABD'nin Florida eyaletinde geri dönüşümlü sulama suyu kullanan süs bitkileri üretim yerlerinden ve fideliklerden izole ettikleri yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* izolatlarının tür düzeyindeki tanısını yaparken spesifik PCR yanında izolatlar arasındaki genetik ayırımı BOX-PCR, ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intragenic consensus) ve REP-PCR (repetitive extragenic palindromic)'ı kullanmışlardır. İzole ettikleri bakterilerin 52 adetini *Erwinia chrysanthemi* ve 137 adetini *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* olarak belirlemişlerdir.

Yishay ve ark. (2008), monokotiledonlu (*Curcuma* spp., *Hippeastrum* spp., *Hosta* spp., *Lilium* spp., *Ornithogalum dubium*, *Schismatoglottis* spp., *Spathiphyllum* spp., *Zantedeschia aestivalis*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zantedeschia albomaculata*, *Zantedeschia elliottiana*, *Zantedeschia rehmanii*) ve dikotiledonlu (*Aconitum* spp., *Brassica oleracea*, *Capsicum annum*, *Cucumis melo*, *Cyclamen* spp., *Solanum esculentum*, *Solanum tuberosum*) sebze ve süs bitki türlerinden izole edilen *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatlarının genotipik

karakterizasyonunda 16S rRNA dizilimi ve ITS-PCR (intergenic transcribed spacer-PCR) yöntemini kullanmışlardır. İzolatların patojenitesi ve konukçusu arasındaki ilişki genotipik olarak değerlendirildiğinde bu türün taksonomisinin yeniden detaylı olarak araştırılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Laurila ve ark. (2008), Finlandiya’da patates bitkilerinden ve bu bitkilerin sulamasında kullanılan nehir sularından izole ettikleri *Pectobacterium* ve *Dickeya* izolatlarını türe spesifik PCR testleriyle tanılamışlardır. Bitkilerden elde edilen izolatların çoğu *Pectobacterium atrosepticum* olarak tanılanırken, nehir sularından elde edilen izolatların çoğunun *Dickeya* spp. olduğu belirlenmiştir. *Dickeya* izolatlarının filogenetik analizlerinde 16S-23S rDNA analizlerini kullandıklarında izolatların 3 gruba ayrıldığını saptamışlardır. Bu çalışmayla *Dickeya* türlerinin sadece sıcak ülkelerde sorun olmadığı aynı zamanda Finlandiya gibi soğuk kuzey Avrupa ülkelerinde problem olduğu ortaya konmuştur.

Gallelli ve ark. (2009), İtalya’nın güney kısmında yer alan Sele vadisinde yetiştirilen enginar bitkilerinde 2001 yılının Temmuz-Eylül ayları arasında yapraklarda ve sapta kahverengilik, özde yumuşama ve sonuçta enginar başlarının sapa bağlandığı kısımdan devrilmesi şeklindeki belirtileri ilk defa gözlemişlerdir. Pektolitik enzim üretme yeteneğindeki 24 bakteri izolatının *Pectobacterium* cinsine ait olduğu belirlenmiş ve *Pectobacterium carotovorum*’a spesifik olan *pel* genlerini kodlayan Y1 ile Y2, *Pectobacterium atrosepticum*’a spesifik olan Y45 ile Y46 primer setleriyle türe spesifik PCR yapmışlardır. Dört izolat hariç 20 izolat 434 bp’lik bant oluşturarak *Pectobacterium carotovorum* olarak tanılanmıştır. Hiçbir izolat *Pectobacterium atrosepticum*’a spesifik olan Y45 ile Y46 primer setiyle yapılan PCR’da pozitif sonuç vermemiştir. PCR-RFLP çalışmalarında dört izolatın üçünün *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* birinin ise *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* olduğu belirlenmiştir.

Slawiak ve ark. (2009), yumuşak çürüklük belirtisi gösteren patateslerden 1979 ve 1994 yılları arasında Avrupa’nın çeşitli ülkelerinden (Almanya, Fransa, Finlandiya, Hollanda, İngiltere, İspanya, Polonya) izole ettikleri ve Peru, Tayvan, İsrail ve Avustralya’da getirilen toplam 65 adet *Dickeya* (sinonim *Pectobacterium* ve *Erwinia*) cinsine ait bakteri izolatının tür düzeyinde tanısını moleküler testlerle



yapmışlardır. Altı farklı türü bulunan *Dickeya* (*D. chrysanthemi*, *D. paradisiaca*, *D. dadantii*, *D. diantocola*, *D. diffenbachiae*, *D. zae*) izolatlarının ayırımında REP-PCR, 16S rDNA ve *dnaX* dizi analizlerini kullanmışlardır. Avrupa ve İsrail izolatları çoğunlukla *D. diantocola* iken sadece iki Alman izolatu *D. diffenbachiae* ve *D. dadantii* olarak tanılanmıştır. Peru izolatları *D. dadantii*, Avustralya izolatları *D. zae*, Tayvan izolatları *D. chrysanthemi* olarak saptanmıştır.

Diallo ve ark. (2009), patatestede önemli zararlar yapan bakteriyel patojenlerden olan *Pectobacterium atrosepticum* ve *Dickeya* türlerinin tarladaki zararını azaltmanın en etkili yolunun hastalısız üretim materyali kullanımıyla olacağını belirtmişlerdir. Bu nedenle Fransa'da kullanılan tohumluk patateslerin bu etmenler açısından dikkatlice testlenmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Tohumluk patateslerde *Pectobacterium atrosepticum* ve *Dickeya chrysanthemi*'nin varlığını moleküler testlerle belirlerken tek bir PCR tüpünde her iki patojeni de belirleyebilecek multiplex-PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada Frechon ve ark. (1995) tarafından dizayn edilen Y45 ile Y46, Nassar ve ark. (1996) tarafından geliştirilen ADE1 ile ADE2 ve çalışmalarını kapsamında kendilerinin dizayn ettiği Ech 1/1' primer çiftlerini kullanmışlardır. Tek bir PCR ve tek bir jel ile her iki patojenin varlığında jelde 420 ve 600 bp'lik bantlar oluşmuştur. Geliştirilen bu yöntemle her iki patojen kısa sürede ve daha az kimyasal kullanılarak başarıyla tanılanabilmiştir.

Rezaei ve Taghavi (2010), İran'da 2005-2006 yılları arasında yumuşak çürüklük belirtisi gösteren patates, havuç, biber, soğan, şekerpancarı, şalgam, marul ve lahana bitkilerinden izole ettikleri pektolitik enzim üreten 42 adet bakterinin fenotipik ve genotipik karakterizasyonunu yapmışlardır. EXPCCR ve EXPCCF primerleri kullanılarak yapılan türe spesifik PCR testleriyle 20 izolat 550bp'lik bant üreterek *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (sinonim *Erwinia carotovora*. subsp. *carotovora*) olarak tanılanmıştır. Ayrıca BOX-PCR, ERIC-PCR ve REP-PCR ile yapılan tür ve alt tür düzeyinde ayırımında, 6 izolat *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, 4 izolat *Pectobacterium betavasculorum* ve geriye kalan 6 izolat da *Dickeya chrysanthemi* (sinonim *Pectobacterium chrysanthemi*, *Erwinia chrysanthemi*) olarak tanılanmıştır. Yumuşak çürüklüğe neden olan

bakterilerin tür ve alt tür düzeyinde ayrımında REP-PCR'ın başarıyla kullanılabileceğini göstermişlerdir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3. 1. 1. *Erwinia* İzolatları

Çalışmada, TOVAG 106O333 nolu proje çerçevesinde 8 farklı süs bitkisi türünden (*Primula* sp., *Kalanchoe* sp., *Diffenbachia* spp., *Cactus* sp., *Yucca aloifolia*, *Ficus elastica*, *Schefflera actinophylla*, *Senecio cruentus*) izole edilen 14 adet *Erwinia* izolatı kullanılmıştır. Karşılaştırma kültürü olarak Dr. Mavridis'den (Georg-August Univ., Göttingen, Almanya) temin edilen GSPB 415 (*Erwinia chrysanthemi*), GSBP 1405 (*Erwinia carotovora* subsp. *caratovora*) ve GSBP 2131 (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) kodlu referans izolatlar kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi izolatlara yeniden kod verilerek çalışmada toplam 17 izolat kullanılmıştır.

Çizelge 3.1.Çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının listesi

	İzolat Adı	Yeni Verilen Kodlar	İzole Edildiği Süs Bitkisi	Kaynak
1	Primula 1	MK-1	<i>Primula</i> sp.	TOVAG 106O333 nolu proje
2	Primula 2	MK-2	<i>Primula</i> sp	TOVAG 106O333 nolu proje
3	Kalonchea 1	MK-3	<i>Kalonchea</i> sp.	TOVAG 106O333 nolu proje
4	Kalonchea 2a	MK-4	<i>Kalonchea</i> sp.	TOVAG 106O333 nolu proje
5	Kalonchea 2b	MK-5	<i>Kalonchea</i> sp.	TOVAG 106O333 nolu proje
6	Diffen-Antalya 1	MK-6	<i>Diffenbachia super tropic</i>	TOVAG 106O333 nolu proje
7	Diffenbachia 1	MK-7	<i>Diffenbachia amoena</i>	TOVAG 106O333 nolu proje
8	Kaktüs-Antalya 1	MK-8	<i>Cactus</i> sp.	TOVAG 106O333 nolu proje
9	Kaktüs-Antalya 2	MK-9	<i>Cactus</i> sp.	TOVAG 106O333 nolu proje
10	Kaktüs	MK-10	<i>Cactus</i> sp.	TOVAG 106O333 nolu proje
11	Yucca	MK-11	<i>Yucca aloifolia</i>	TOVAG 106O333 nolu proje
12	Ficus	MK-12	<i>Ficus elastica</i>	TOVAG 106O333 nolu proje
13	Schefflera	MK-13	<i>Schefflera actinophylla</i>	TOVAG 106O333 nolu proje
14	Sinenererya	MK-14	<i>Senecio cruentus</i>	TOVAG 106O333 nolu proje
15	GSPB 415	-		Dr. Mavridis
16	GSBP 1405	-		Dr. Mavridis
17	GSBP 2131	-		Dr. Mavridis

### 3. 1. 2. PCR Primerleri

Çizelge 3.2.'de görüldüğü gibi, *Erwinia chrysanthemi* için Nassar ve ark., (1996) tarafından geliştirilmiş olan pektolitik enzim üreten bakterilerin *pel* genlerini kodlayan ADE1 ve ADE2 kodlu primer çifti ile Smid ve ark., (1995) tarafından dizayn edilen metalloproteaz gen bölgesini kodlayan ERWFOR ve CHRREV adlı

primer çifti kullanılmıştır. *Erwinia carotovora*'ya spesifik olan Darrasse ve ark., (1994) tarafından geliştirilen ve pektolitik enzim üreten bakterilerin *pel* genlerini kodlayan Y1 ve Y2 isimli primer çifti kullanılmıştır. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* için Frechon ve ark., (1995) tarafından dizayn edilen Y45 ve Y46 adlı, Smid ve ark., (1995) tarafından geliştirilen ERWFOR ve ATROREW adlı primer çiftleri ile De Boer ve ark., (1995) tarafından geliştirilen ECA1f ve ECA2r kodlu primerler PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. PCR çalışmasında kullanılan primerler

Patojen	Primer	PCR ürünü (bp)/ primerin etki ettiği gen	Literatür
Echr	ADE1 (5'-GAT CAG AAA GCC CGC AGC CAG AT-3') ADE2 (5'-CTG TGG CCG ATC AGG ATG GTT TTG TCG TGC-3')	420 pel gen	Nassar ve ark., 1996
Echr	ERWFOR (5'-ACG CAT GAA ATC GGC CAT GC-3') CHRREV (5'-AGT GCT GCC GTA CAG CAC GT-3')	450 metalloprotease gen	Smid ve ark., 1995
Ecc	Y1 (5'-TTA CCG GAC GCC GAG CTG TGG CGT-3') Y2 (5'-CAG GAA GAT GTC GTT ATC GCG AGT-3')	434 pel gen	Darrasse ve ark., 1994
Eca	Y45 (5'-TCA CCG GAC GCC GAA CTG TGG CGT-3') Y46 (5'-TCG CCA ACG TTC AGC AGA ACA AGT-3')	438 pel gen	Frechon ve ark., 1995
Eca	ERWFOR (5'-ACG CAT GAA ATC GGC CAT GC-3') ATROREW (5'-ATC GAT ATT TGA TTG TC-3')	389 metalloprotease gen	Smid ve ark., 1995
Eca	ECA1f (5'-CGG CAT CAT AAA AAC ACG-3') ECA2r (5'-GCA CAC TTC ATC CAG CGA-3')	690 unknown chromosomal	De Boer ve ark., 1995

### 3. 2. YÖNTEM

#### 3. 2. 1. Bakteri İzolatlarının Besi Yerinde Çoğaltılması ve Pektolitik Aktivitelerinin Saptanması

Çalışmada kullanılacak süs bitkilerinden izole edilen 14 adet *Erwinia* izolatı (MK-1, MK-2, MK-3, MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-10, MK-11, MK-12, MK-13, MK-14) ve 3 referans izolat (GSPB 415, GSBP 1405 ve GSBP 2131) olmak üzere toplam 17 izolat King B besiyerine üç çizgi yöntemiyle çizilerek 48 saatlik kültürlerin koloni morfolojileri incelenmiştir. Katı besiyerinde gelişen 17 izolatın 48 saatlik kültürü kullanılarak izolatların patates dilimlerindeki pektolitik aktiviteleri Lelliott ve Stead (1987)'ye göre belirlenmiştir.

Pektolitik aktivite: Patates yumruları yüzeysel dezenfeksiyon için önce deterjanlı suda fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra %1'lik NaOCI'da (hypo marka %48'lik ticari solusyon) 3 dakika bekletilmiştir. NaOCI'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemden sonra steril bir bisturi ile patates yumrularının kabukları soyulmuştur. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petri içine kabuğu soyulmuş bir cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu bakteri kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25°C'de iki günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

#### 3. 2. 2. *Erwinia* Türüne ait DNA'ların İzolasyonu

Elde edilen bakteri izolatlarının ve referans izolatların DNA'sı De Boer ve Ward (1995)'a göre izole edilmiştir. Bu yöntemde izlenen prosedür aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

Bakteri izolatları 9 mL Nutrient broth sıvı besiyerine (litrede 13 g Nutrient Broth) aşılacak şekilde 200 dev./dak. dönen çalkalayıcıda gece boyu 27±1°C'de geliştirilmiştir. Bakteri süspansiyonundan 1mL steril ependorf tüpüne alınıp tüplerin ağırlıkları dengelenerek 14.000 dev/dak.'da 20 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti

alınarak süpernatant atılmıştır. Çökelti üzerine hücre parçalanmasını sağlamak üzere %1'lik SDS+TAE bufferdan (10 ml 10xTAE bufferı 90 mL su, 1 g Sodium dodecyl sulphate ) 100µL eklenmiş ve tüp karıştırıcısında karıştırılmıştır. Tüpler 50°C'deki su banyosunda 3 saat bekletilmiştir. 50 µL 7.5M Amonyum asetat (57.75 g Amonium acetate, 100 ml distile su) eklenmiştir. 14.000 dev/dak.'da 10 dakika santrifüj yapılarak amonyum asetat artıklarının altta toplanması sağlanmış ve üstte kalan DNA kesik bir pipet ucu ile alınıp (yaklaşık 130µL) yeni bir ependorf tüpüne aktarılmıştır. Buna eşit miktarda (yaklaşık 130µL) derin dondurucuda soğutulmuş isopropanol eklenmiştir. Tüpler derin dondurucuda 45dak. bekletilmiştir. 10.000 dev/dak.'da 10 dakika santrifüj yapılarak pellet alınmıştır. Soğutulmuş %70'lik alkolden 100µl ependorf tüplerine eklenip 10.000 dev/dak.'da 10 dakika santrifüj yapılarak alkolle yıkama yapılmıştır. Ependorf tüpler ters çevrilerek alkol dökülüp steril kabinde bir saat kurumaya bırakılmıştır. Ependorf tüpler içerisine 50 µl bidistile su (ddH<sub>2</sub>O) konularak tüp karıştırıcısında karıştırılmıştır. İzole edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen bakteri DNA'sının Agarose jel elektroforezine yönelik çalışmalar Sambrook ve ark, (1989)'a göre yapılmıştır. Bunun için 0.9g agarose 90mL 1XTAE (0.24 g Tris-HCl, 0.074 g EDTA, 200 mL distile su) tamponuna konularak mikrodalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulan solüsyon, tarağın yerleştirildiği jel tepsisine dökülmüş ve agaroz jelin donmasından sonra jel tankı içerisine jeli örtünceye kadar 1XTBE buffer (litrede 107.89 g Tris, 55.0 g Borik asit, 7.44 g Na<sub>2</sub> EDTA, pH:8.0) konulmuştur. Daha sonra örnek koymak için kullanılan tarak dikkatlice çekilerek çıkarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan agaroz jel çukurlarına 3µL loading buffer (30.0 mg Bromophenol blue, 4.25 mL 5xTBE, her ikisi karıştırıldıktan sonra 5.75 ml Gliserin eklenmiştir) ve 12µL PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımı ile dikkatlice yüklenmiştir. Elektroforez tankında agaroz jeldeki örnek hücrelerin bulunduğu yer güç kaynağının negatif (-) kutbuna denk gelecek şekilde yerleştirilip PCR ürünleri 70V elektrik akımında yaklaşık 1 saat süre ile yürütülmüştür. Bantların görülmesi için ethidium bromür ile (10 mg/mL) 10 dak. boyama yapıp bunu takiben 15 dak. saf su ile jel yıkanarak transliminatörde bantlar inceliş fotoğraflanmıştır.



### 3. 2. 3. Bakteri İzolatlarının PCR Testi İle Tanısı

Çalışmanın bu kısmında farklı primer dizilimleri kullanılmıştır. PCR çoğaltmalarında 6.5 µL distile su, 12.5µL PCR Master Mix (Promega, M7502), 2.0 µL primer1, 2.0 µL primer2 ve 2.0 µL genomik DNA olmak üzere toplam 25.0 µL içerik kullanılmıştır. Thermal cycler aletine (PCR aleti) örnekler koyularak Çizelge 3.3.'de görüldüğü gibi amplifikasyonlar uygun literatüre göre programlanmıştır.

ADE1 ve ADE2 primerlerinin kullanıldığı amplifikasyonlar 94 °C'de 4 dakika 1 döngü, 94°C'de 1 dakika, 67°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika (34 döngü) ve son döngü 72°C'de 5 dakika olacak şekilde programlanmıştır (Nassar ve ark., 1996).

ERWFOR ve CHRREV primerlerinin kullanıldığı amplifikasyonlar 94 °C'de 4 dakika 1 döngü, 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika (30 döngü), 94°C'de 1 dakika 1 döngü, 55°C'de 1 dakika 1 döngü ve son döngü 72°C'de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır (Smid ve ark., 1995).

Y1 ve Y2 primerlerinin kullanıldığı amplifikasyonlar 94 °C'de 5 dakika 1 döngü, 94°C'de 30 saniye, 65°C'de 30 saniye, 72°C'de 45 saniye (35 döngü) ve son döngü 72°C'de 5 dakika olacak şekilde programlanmıştır (Darrasse ve ark., 1994b).

Y45 ve Y46 primerlerinin kullanıldığı amplifikasyonlar 94 °C'de 5 dakika 1 döngü, 94°C'de 30 saniye, 65°C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye (40 döngü) ve son döngü 72°C'de 5 dakika olacak şekilde programlanmıştır (Frechon ve ark., 1995).

ERWFOR ve ATROREW primerlerinin kullanıldığı amplifikasyonlar 94 °C'de 4 dakika 1 döngü, 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika (30 döngü), 94°C'de 1 dakika 1 döngü, 55°C'de 1 dakika 1 döngü ve son döngü 72°C'de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır (Smid ve ark., 1995).

ECA1f ve ECA2r primerlerinin kullanıldığı amplifikasyonlar 95 °C'de 5 dakika 1 döngü, 94°C'de 30 saniye, 62°C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye (30 döngü) ve son döngü 72°C'de 8 dakika olacak şekilde programlanmıştır (De Boer ve ark., 1995).

DNA çoğaltımı ile elde edilen PCR ürünleri %1.2'lik agaroz jele yüklenerek 70 mA akım uygulanıp ethidium bromür boyaması sonucu bantlar transliminatörde

incelenerek fotoğraflanmıştır (Sambrook ve ark., 1989). Oluşan bantların tekrarlanabilir bantlar olduğunu göstermek için çalışma 3 kez tekrarlanmıştır.

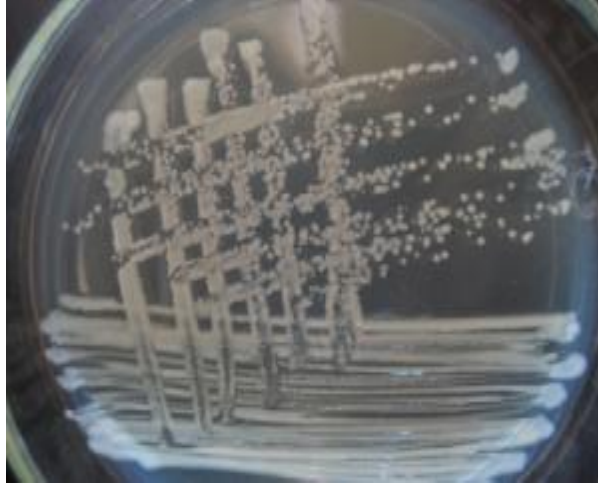
Çizelge 3.3. PCR Çalışmasında Kullanılan Programlar

<b>Echr (ADE1- ADE2)( Nassar ve ark., 1996)</b>			
Program adımları	Sıcaklık ( <sup>0</sup> C)	Süre	
1 İlk denatürasyon	94	4 dak.	
2 Denatürasyon	94	1 dak.	
3 Primer bağlanması	67	1 dak.	
4 Uzama	72	1 dak.	
Döngü sayısı	34		
5 Son uzama	72	5 dak.	
6 Beklemede	4	Süresiz	
<b>Echr (ERWFOR-CHRREV )(Smid ve ark., 1995)</b>			
Program adımları	Sıcaklık ( <sup>0</sup> C)	Süre	
1 İlk denatürasyon	94	4 dak.	
2 Denatürasyon	94	1 dak.	
3 Primer bağlanması	55	1 dak.	
4 Uzama	72	2 dak.	
Döngü sayısı	30		
5 Son uzama	94	1 dak.	
	55	1 dak.	
	72	10 dak.	
6 Beklemede	4	Süresiz	
<b>Ecc (Y1-Y2)(Darrasse ve ark., 1994b)</b>			
Program adımları	Sıcaklık ( <sup>0</sup> C)	Süre	
1 İlk denatürasyon	94	5 dak.	
2 Denatürasyon	94	30 sn.	
3 Primer bağlanması	65	30 sn.	
4 Uzama	72	45 sn.	
Döngü sayısı	35		
5 Son uzama	72	5 dak.	
6 Beklemede	4	Süresiz	
<b>Eca (Y45-Y46) (Frechon ve ark., 1995)</b>			
Program adımları	Sıcaklık ( <sup>0</sup> C)	Süre	
1 İlk denatürasyon	94	5 dak.	
2 Denatürasyon	94	30 sn.	
3 Primer bağlanması	65	45 sn.	
4 Uzama	72	45 sn.	
Döngü sayısı	40		
5 Son Uzama	72	5 dak.	
6 Beklemede	4	Süresiz	
<b>Eca(ERWFOR-ATROREW) (Smid ve ark., 1995)</b>			

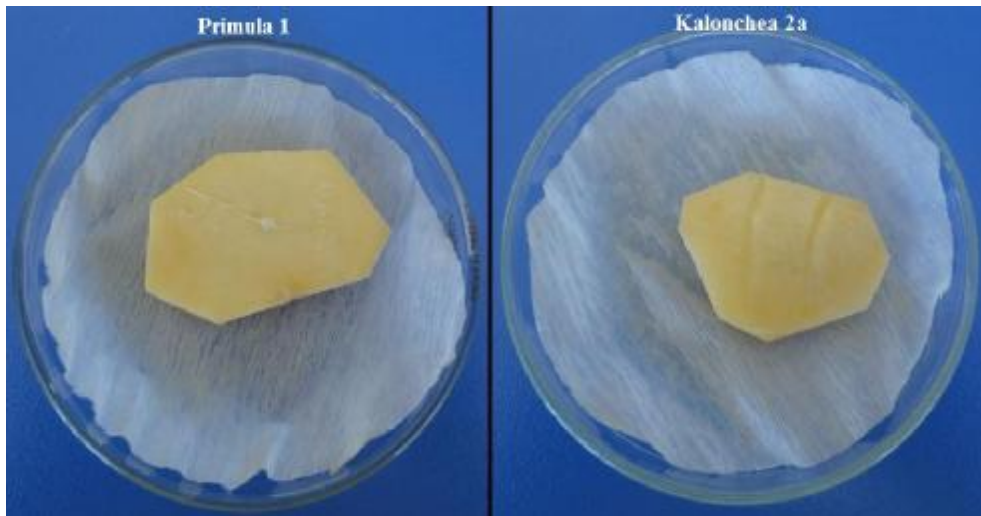
<u>Program adımları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>
1 İlk denatürasyon	94	4 dak.
2 Denatürasyon	94	1 dak.
3 Primer bağlanması	55	1 dak.
4 Uzama	72	2 dak.
Döngü sayısı	30	
5 Son Uzama	94	1 dak.
	55	1 dak.
	72	10 dak.
6 Beklemede	4	Süresiz
<b>Eca (ECA1f-ECA2r) (De Boer ve ark., 1995)</b>		
<u>Program adımları</u>	<u>Sıcaklık (°C)</u>	<u>Süre</u>
1 İlk denatürasyon	95	5 dak.
2 Denatürasyon	94	30 sn.
3 Primer bağlanması	62	45 sn.
4 Uzama	72	45 sn.
Döngü sayısı	30	
5 Son Uzama	72	8 dak.
6 Beklemede	4	Süresiz

**4. BULGULAR**

Çalışmada kullanılan 14 adet *Erwinia* izolatı (MK-1, MK-2, MK-3, MK-4, MK-5, MK-6, MK-7, MK-8, MK-9, MK-10, MK-11, MK-12, MK-13, MK-14) ve üç referans izolat (GSPB 415, GSBP 1405 ve GSBP 2131) King B besi yerinde non floresan tipte, krem renkte ve yuvarlak koloniler şeklinde gelişim göstermişlerdir (Şekil 4.1.) Ayrıca Şekil 4.2.'de görüldüğü gibi test edilen izolatların tümü patates dilimlerinde çürümeye neden olarak pektolitik aktivitelerinin pozitif olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.1. *Erwinia caratovora*'nın King B Besi Yerindeki Görünümü



Şekil 4.2. *Erwinia* İzolatlarının Patates Dilimlerinde Oluşturduğu Yumuşak Çürüklük

Çalışmada kullanılan 17 izolatin DNA izolasyonları başarıyla yapılmış ve elde edilen bantlar agaroz jelde görülerek fotoğraflanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İzole Edilen DNA'ların Agaroz Jeldeki Görüntüsü

- 1.Sıra: Çukur1-3: MK1, Çukur4-6: MK2, Çukur7-9: MK3, Çukur10-12: MK4, Çukur13-15: MK5, Çukur16:MK6  
 2.Sıra: Çukur1-2: MK6, Çukur3-5: MK7, Çukur6-8: MK8, Çukur9-11: MK9, Çukur12-14: MK10, Çukur15-17:MK11, Çukur18-20: MK12  
 3.Sıra: Çukur1-3: MK13, Çukur4-6: MK14, Çukur7-9: GSPB 1405, Çukur10-12: GSPB 2131, Çukur13-15: GSPB 415, Çukur16-18:MK1

*Erwinia chrysanthemi* için spesifik olan Nassar ve ark., (1996) tarafından geliştirilmiş olan pektolitik enzim üreten bakterilerin *pel* genlerini kodlayan ADE1 ve ADE2 kodlu primer çifti ile Smid ve ark., (1995) tarafından dizayn edilen metalloproteaz gen bölgesini kodlayan ERWFOR ve CHRREV adlı primer çifti ile süs bitkilerinden izole edilen 14 bakteri izolatin DNA'ları kullanılarak yapılan PCR testlerinde herhangi bir bant elde edilememiştir (Çizelge 4.1). Referans izolat olan GSPB 415 kodlu *Erwinia chrysanthemi* izolatı ADE1 ve ADE2 kodlu primer çifti ile yapılan PCR'da 420 bp'lık, ERWFOR ve CHRREV adlı primer çifti ile yapılan PCR'da 450 bp'lık bant gözlenmiştir. Sadece *Erwinia chrysanthemi*'yi tanıyan bu primerlerle yapılan PCR çalışmalarına göre test edilen 14 *Erwinia* izolatının *Erwinia chrysanthemi* olmadığı belirlenmiştir.

*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* için spesifik olan Frechon ve ark., (1995) tarafından geliştirilmiş olan pektolitik enzim üreten bakterilerin *pel* genlerini

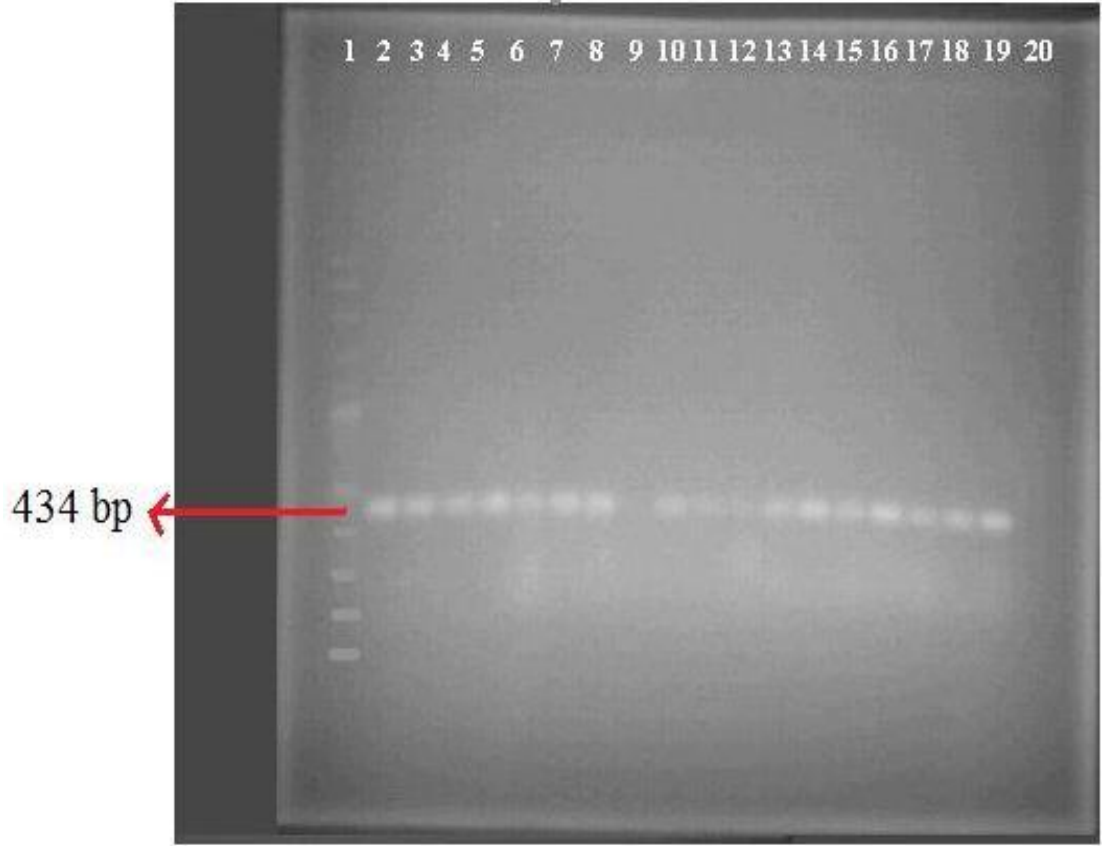
kodlayan Y45 ve Y46 kodlu primer çifti, Smid ve ark., (1995) tarafından dizayn edilen metalloproteaz gen bölgesini kodlayan ERWFOR ve ATROREW adlı primer çifti ile De Boer ve ark., (1995) tarafından geliştirilmiş olan bilinmeyen kromozomal bir bölgeyi kodlayan ECA1f ve ECA2r kodlu primer çiftiyle süs bitkilerinden izole edilen 14 bakteri izolatın DNA'ları kullanılarak yapılan PCR testlerinde herhangi bir bant elde edilememiştir (Çizelge 4.1). Referans izolat olan GSPB 2131 kodlu *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* izolatı Y45 ve Y46 kodlu primer çifti ile yapılan PCR'da 438 bp'lık, ERWFOR ve ATROREW adlı primer çifti ile yapılan PCR'da 389 bp'lık ve ECA1f ve ECA2r kodlu primer çiftiyle yapılan PCR'da 690 bp'lık bantlar gözlenmiştir. Sadece *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'yı tanıyan bu primerlerle yapılan PCR çalışmalarına göre testlediğimiz 14 *Erwinia* izolatının *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* olmadığı saptanmıştır.

*Erwinia carotovora* için spesifik olan Darasse ve ark., (1994b) tarafından geliştirilmiş olan pektolitik enzim üreten bakterilerin *pel* genlerini kodlayan Y1 (5'-TTA CCG GAC GCC GAG CTG TGG CGT-3') ve Y2 (5'-CAG GAA GAT GTC GTT ATC GCG AGT-3') kodlu primer çiftiyle, süs bitkilerinden izole edilen 14 bakteri izolatının ve GSBP 1405 kodlu *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* izolatın DNA'ları kullanılarak yapılan PCR testlerinde 434 bp'lık bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.4.) (Çizelge 4.1). Sadece *Erwinia carotovora*'yı tanıyan bu primerle yapılan PCR çalışmalarına göre testlediğimiz 14 *Erwinia* izolatının *Erwinia carotovora* olduğu belirlenmiştir. Oluşan bantların tekrarlanabilir bantlar olduğunu belirlemek için çalışma 3 kez tekrarlanmış ve bu bantlar 3 kez gözlenmiştir. Tüm çalışmada kullanılan izolatlarımız tekrarlanabilir bantlar verdikleri için süs bitkilerinden elde edilen izolatların *Erwinia carotovora* olduğu moleküler düzeyde kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.1. *Erwinia* izolatlarının farklı primer setleriyle yapılan PCR sonuçları

İzolatlar	<i>Erwinia chrysanthemi</i>		<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>		
	ADE1/ ADE2	ERWFOR/ CHRREV	Y1/ Y2	Y45/ Y46	ERWFOR/ ATRORE W	ECA1f/ ECA2r
MK-1	-	-	+	-	-	-
MK-2	-	-	+	-	-	-
MK-3	-	-	+	-	-	-
MK-4	-	-	+	-	-	-
MK-5	-	-	+	-	-	-
MK-6	-	-	+	-	-	-
MK-7	-	-	+	-	-	-
MK-8	-	-	+	-	-	-
MK-9	-	-	+	-	-	-
MK-10	-	-	+	-	-	-
MK-11	-	-	+	-	-	-
MK-12	-	-	+	-	-	-
MK-13	-	-	+	-	-	-
MK-14	-	-	+	-	-	-
GSPB 415	+	+	-	-	-	-
GSBP 1405	-	-	+	-	-	-
GSBP 2131	-	-	-	+	+	+

-: PCR testi negatif, +: PCR testi pozitif



Şekil 4.4.Y1 ve Y2 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR İşleminde Oluşan Bantlar; Çukur 1: 100 bp marker; Çukur 2: GSPB 1405; Çukur 3: MK-1; Çukur 4: MK-2; Çukur 5: MK-3; Çukur 6: MK-4; Çukur 7: MK-5; Çukur 8: MK-6; Çukur 9: Negatif kontrol; Çukur 10: MK-7; Çukur 11: MK-8; Çukur 12: MK-9; Çukur 13: MK-10; Çukur 14: MK-11; Çukur 15: MK-12; Çukur 16: MK-13, Çukur 17: MK-14; Çukur 18: MK-1; Çukur 19: MK-2, Çukur 20: GSPB 2131





## 5. TARTIŞMA

Apartmanlar arasındaki yaşamda büyük parkların öneminin artması, bahçeli evlerde, sitelerde yaşam modelinin gelişmesiyle birlikte süs bitki tür ve çeşitleri ithal edilmeye başlanmıştır. Bunun yanında uygun iklim koşullarımız nedeniyle saksılı süs bitkilerinin anaçları yurt dışından getirilerek ülkemizde üretilip yurt dışına satışı yapılmaktadır. Adana, Mersin ve Antalya’da kışın hava sıcaklığının sera üretimleri için uygun olması nedeniyle, örtü altında yetiştirilen saksılı süs bitkileri pek çok Avrupa ülkesine ihraç edilmektedir. Bu şekilde yapılan üretimler hem ülkemize döviz getirmekte hem de yeni tarımsal iş alanları oluşturmaktadır. Bu üretim materyali (fide, tohum, çelik, anaç bitki vb) değişimi sonucu yeni çeşitler ülkemize girmesi yanında ülkemizde olmayan hastalıkları da kendi üretimimize bulaşabilmektedir (Aysan ve ark., 2009).

Bu yüksek lisans tezinde, örtü altında yetiştirilen saksılı süs bitkilerinden *Primula* sp., *Kalanchoe* sp., *Diffenbachia* spp. (*Diffenbachia super tropic*, *Diffenbachia amoena*), *Cactus* sp., *Yucca aloifolia*, *Ficus elastica*, *Schefflera actinophylla* ve *Senecio cruentus*’da yumuşak çürüklük hastalığına neden olan patojen bakterinin moleküler testler kullanılarak tanısı yapılmıştır. Yumuşak çürüklük hastalığına *Erwinia* türlerinden, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi* neden olmaktadır (Perombelon, 2002; Saygılı ve ark., 2008). Çalışmamızda *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*’ya spesifik 3 primer seti, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*’ya spesifik tek primer seti ve *Erwinia chrysanthemi*’ye spesifik 2 primer seti kullanılmıştır. Tüm PCR çalışmalarında referans kültürler (GSBP 2131, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*; GSBP 1405, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve GSPB 415, *Erwinia chrysanthemi*) de kullanılmıştır. Darasse ve ark., (1994) tarafından geliştirilen ve pektolitik enzim üreten bakterilerin *pel* genlerini kodlayan *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*’ya spesifik Y1 ve Y2 isimli primer çifti kullanıldığında referans izolat olan GSBP 1405 ile 14 adet süs bitkisi izolatının tümünün PCR’da 434bp’lık bant oluşturarak pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Süs bitkilerinden elde edilen 14 izolatın *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* olduğu

ortaya moleküler düzeyde ortaya konmuştur. Sadece bir tek bu patojen bakteri türünün süs bitkilerinde hastalık oluşturduğu belirlenmiştir. Yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* tür ve alttürlerinin tanısının, PCR testlerinde üç farklı primer setinin kullanımıyla gerçekleştirilebileceği bu çalışmayla ortaya konmuştur.

Benzer şekilde, Öden (1991) İzmir ve İstanbul'da yetiştirilen *Dieffenbachia* bitkilerinde, Berger ve ark., (1994) Almanya'da iris rizomlarında, Wright (1998) Yeni Zelanda'da yazın çiçek açan kala zambaklarında (*Zantedeschia* spp.), Mansvelt ve ark. (1999) Güney Afrika'da beyaz çiçekli kala zambak türlerinde (*Zantedeschia oculata* ve *Zantedeschia elliottiana*), Chen ve Lin (2001) Tayvan'da yetiştirilen çiçekli kala zambakta (*Zantedeschia* sp.), Gracia-Garza ve ark., (2004) Kanada'nın Ontario eyaletinde yetiştirilen kala zambak, sklamen ve poinsettia'da, Boyraz ve ark., (2006) Konya'nın Çumra ilçesinde, yetiştirilen lale (*Tulipa* spp.) soğanlarında bakteriyel çürüklüğe neden olan etmeni *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* olarak tanılamışlardır.

Munnecke (1960) Los Angeles, ABD'de yetiştirilen *Dieffenbachia* bitkilerinde (*Dieffenbachia picta* cultivar Rudolph Roers, *Dieffenbachia X bausei* ve *Dieffenbachia amoena*), Janse ve Ruissen (1988) Hollanda'da beş farklı süs bitkisi türünde (*Aechmea fasciata*, *Aglaonema*, *Cichorium intybus*, *Dieffenbachia*, *Kalanchoe blossfeldiana*, *Philodendron erubescens* ve *Scindapsus pictus*), Balestra ve Impiglia (1996) Halep, Suriye'de yetiştirilen *Dieffenbachia maculata*'da, Lee ve ark., (2006) Tayvan'da yetiştirilen *Zantedeschia aethiopica*'da, Chao ve ark., (2006) Tayvan'da *Aglaonema* türlerinde (*Aglaonema marantifolium* ve *Aglaonema rotundum*), İsmail ve ark., (2006) Mısır'da yetiştirilen *Yucca aloifolia*'da bakteriyel çürüklüğe neden olan etmeni *Erwinia chrysanthemi* olarak tanılamışlardır.

Norman ve ark., (2003) Florida, ABD'de yetiştirilen *Dieffenbachia* bitkilerinde bakteriyel çürüklüğe neden olan etmenleri *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi* olarak tanılamışlardır.

Bogatko ve Sobiczewski (1989) Varşova, Polonya'da ticari üretimi yapılan sümbül alanlarından yumuşak çürüklük etmeni olarak *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'yı tanılamışlardır.

Daha önce farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi yumuşak çürüklük hastalığına üç *Erwinia* türü neden olmaktadır. İklim koşulları bir bölgedeki dominant türün hangisi olacağına etki eden en önemli faktördür. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serin iklimlerde, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* daha ılıman koşullarda, *Erwinia chrysanthemi* ise sıcak iklime sahip tropik ve subtropik bölgelere yayılım göstermektedir (Perombelon ve Kelman, 1980).

Aysan ve ark., (2009) yumuşak çürüklük hastalığının ilk önce Difenbahya tür ve çeşitlerinde ortaya çıktığını ardından diğer türlere kültürel işlemler esnasında bulaştığını bildirmişlerdir. Çoğaltma materyali olarak kullanılan çeliklerin alındığı anaç bitkileri incelendiklerinde bir işletmede *Diffenbachia* sp.'da *Erwinia carotovora* bulaşıklığını belirlemişlerdir. Anaç olarak kullanılan bitkilerin belirli aralıklarda hastalık yönünden test edilmesinin faydalı olacağını önemle vurgulamışlardır.

Sonuç olarak, çoğaltma materyali belirli aralıklarda hastalık yönünden incelenerek sağlıklı olduğu kanıtlanmalıdır. Bu testlemelerde seçici besi yerine ekim ve PCR gibi moleküler yöntemler entegre edilerek kullanıldığında güvenilir ve hızlı sonuçlar elde edilebilir. Çeşitli süs bitkilerinde yumuşak çürüklük hastalığına neden olan *Erwinia* türlerinin saptanmasında çalışmamızda kullandığımız PCR primerleri kullanılarak tür ve alt tür düzeyinde tanı yapılabileceği gösterilmiştir.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi*'nin neden olduğu yumuşak çürüklük hastalığı, dünya çapında süs bitkileri üretimini kısıtlayan en önemli bakteriyel hastalıklardan biridir. Bu yüksek lisans tezinde, örtü altında yetiştirilen saksılı süs bitkilerinden *Primula* sp., *Kalanchoe* sp., *Diffenbachia* spp., *Cactus* sp., *Yucca aloifolia*, *Ficus elastica*, *Schefflera actinophylla* ve *Senecio cruentus*'dan izole edilen yumuşak çürüklük hastalığına neden olan patojen bakterinin moleküler testler kullanılarak tanısı yapılmış ve *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* olduğu ortaya moleküler düzeyde ortaya konmuştur. PCR testlerinde üç farklı primer setinin kullanımıyla yumuşak çürüklüğe neden olan *Erwinia* tür ve alttürlerinin tanısının yapılabileceği belirlenmiştir.

Süs bitkilerinin genellikle çelikle çoğaltıldığı göz önüne alındığında çoğaltma materyallerinin belirli aralıklarda hastalık yönünden incelenerek sağlıklı olduğu kanıtlanmalıdır. Bu testlemelerde seçici besi yerine ekim ve PCR gibi moleküler yöntemler birlikte kullanıldığında güvenilir ve hızlı sonuçlar elde edilmektedir. Yumuşak çürüklük hastalığına neden olan *Erwinia* türlerinin üretim materyalinde varlığının saptanmasında çalışmamızda kullandığımız PCR primerleri kullanılarak tür ve alttür düzeyinde tanısı yapılabilir. Sonuç olarak üretim alanında hastalık etmeni ne kadar kısa sürede tanılarırsa o kadar hızlı bir şekilde hastalık etmeniyle mücadele işlemlerine başlanabilir. Bu şekilde hastalıkların vereceği ekonomik kayıplar en aza indirilebilir.



## KAYNAKLAR

- ANONİM, 2010. Türkiye Süs Bitkileri Sektör Raporu, <http://www.aib.org.tr/duyuru/susbitkirapor>. (2010) pp: 1-9.
- AYSAN, Y. ve SAHİN, F., 2003a. An outbreak of crown gall disease on rose caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. *Plant Pathology*, 52:780.
- AYSAN, Y., MİRİK, M., ÇETİNKAYA-YILDIZ, R., 2009. Süs Bitkilerinde Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Tanısı, Fenotipik, Genotipik Karakterizasyonu ve Önemli Bakteriyel Etmenlerin Hızlı Tanı Yöntemlerinin Geliştirilmesi, TÜBİTAK TOVAG-106O333 nolu proje raporu, 129s.
- BALESTRA, G. M., IMPIGLIA, A., 1996. Occurrence of *Erwinia chrysanthemi* on *Dieffenbachia maculata* in Syria. *Phytopathologia Mediterranea*, 35:127-128.
- BERGER, F., WAITES, W. M., LEIFERT, C., 1994. An improved surface disinfection method for shoot explants from Iris rhizomes infected with bacterial soft rot (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*). *Journal of Horticultural Science*, 69(3):491-494.
- BOGATKO, J., SOBICZEWSKI, P., 1989. Bacterial soft rot of hyacinths and trials of its control. *Proc 7<sup>th</sup> Int. Conf. Plant. Path. Bach.Budapest, Hungary*, (1989) pp:801-805.
- BOYRAZ, N., BASTAS, K. K., MADEN, S., A. YASAR, 2006. Bacterial leaf and peduncle soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum*, on tulips, in Konya, Turkey. *Phytopathology*, 34(3):272-280.
- BENLİOĞLU, K., 1991. Bolu, Nevşehir ve Niğde illerindeki patates üretim alanlarında *Erwinia* spp.'nin yaygınlık oranları, tanıtılması ve inokulum kaynakları üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü-Doktora Tezi, İzmir, 122s.
- CHAO, Y. C., FENG, C. T., HO, W. C., 2006. First report of aglaonema bacterial blight caused by *Erwinia chrysanthemi* in Taiwan. *Plant disease*, 90(10):1358.
- CHASE, A.R., 1987. *Compendium of ornamental foliage plant diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 92s .



- CHASE, A.R., 1997. Foliage plant disease diagnosis and control. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota 97:73395:20.
- CHEN, C.W., LIN, C.Y., 2000. Control of *Erwinia* soft rot disease of calla lily. *Plant Pathology*, 9(3):107-114.
- ÇETİNKAYA-YILDIZ, R., AYSAN, Y., 2002. Ss bitkilerinde önemli bakteriyel hastalıklar. II. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi. Antalya, (2002) pp:310-315.
- CETINKAYA-YILDIZ, R., MIRIK, M., AYSAN, Y., KSEK, M., SAHİN, F., 2004. An outbreak of bacterial stem rot of *Dieffenbachia amoena* caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Plant Disease*, 88: 310.
- ÇETİNKAYA-YILDIZ, R., AYSAN, Y., ÇINAR, ., 2001. Doğu Akdeniz Bölgesi domates seralarında gvde nekrozu etmenlerinden olan *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* ve *Erwinia chrysanthemi*'nin yaşamlarını srdrdkleri potansiyel kaynaklar Türkiye IX Fitopatoloji Kongresi 3-8 Eylül 2001 Tekirdağ.
- DARRASSE, A., PRIOU, S., KOTOUJANSKY, A., BERTHEAU, Y., 1994a. Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:298-306.
- DARRASSE, A., PRIOU, S., KOTOUJANSKY, A., BERTHEAU, Y., 1994b. PCR and restriction length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:1437-1443.
- DAUGHTREY, M.L., WICK, R.L., PETERSON, J.L., 1995. Diseases caused by soft rot *Erwinia* spp. *Compendium of flowering potted plant diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp:49-51.
- DE BOER, S. H., WARD, L. J., 1995. PCR Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, 85:854-858.

- DIALLO, S., LATOUR, X., GROBOILLOT, A., SMADJA, B., COPIN, P., ORANGE, N., FEUILLOLEY, M.G.J., CHEVALIER, S., 2009. Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *European Journal of Plant Pathology*, 125:349-354.
- FRECHON, D., EXBRAYAT, P., GALLET, O., GUILLOT, E., LE CLERC, V., PAYET, N., and BERTHEAU, Y., 1995. Sequences nucléotidiques pour la détection des *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Institut National de la Recherche Agronomique, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Sanofi Diagnostics Pasteur. Brevet 95:12-803.
- FRECHON, D., EXBRAYAT, P., HELIAS, V., HYMAN, L.J., JOUAN, B., LLOP, P., LOPEZ, M.M., PAYET, P., PEROMBELON, M.C.M., TOTH, I.K., BECKHOVEN, J.R.C.M.V., 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*, 41:163-173.
- GALLELLI, A., GALLI, M., DE SIMONE, D., ZACCARDELLI, M., LORETI, S., 2009. Phenotypic and genetic variability of *Pectobacterium carotovorum* isolated from artichoke in the Sele valley. *Journal of Plant Pathology*, 91(3):757-761.
- GRACIA-GARZA, J.A., BLOM T.J., BROWN W., ROBERTS D.P., SCHNEIDER K., FREISEN, M., GOMBERT, D., 2003. Increased incidence of *Erwinia* soft-rot on calla lilies in the presence of phosphorous. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 293–298.
- HAUBEN L., MOORE E.R.B., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT, J., VERDONCK, L., SWINGS, J., 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic Applied Microbiology*, 21:384–97.

- HELIAS, V., LE ROUX, A. C., BERTHEAU, Y., ANDRIVON, D., GAUTHIER, J.P., JOUAN, B., 1998. Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European Journal of Plant Pathology*, 104:685-699.
- HYMAN, L. J., BIRCH, P. R. J., DELLAGI, A., AVROVA, A. O., TOTH, I. K., 2000. A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Letters in Applied Microbiology*, 30:330-335.
- ISMAIL, M. I., ABO ELNAGA, H. I. G., AHMED, N. G., 2006. Bacterial stem rot disease of *Yucca aloifolia* in Egypt. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 37(2): 221-233.
- JANSE, J.D., RUISSEN, M.A., 1988. Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several host in the Netherlands. *Phytopathology*, 78:800-808.
- KANG, H. W., KWON, S. W., GO, S. J., 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology*, 52:127-133.
- LAURILA, J., AHOLA, V., LEHTINEN, A., JOUTSJOKI, T., HANNUKKALA, A., RAHKONEN, A., PIRHONEN, M., 2008. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, 122:213-225.
- LEE, Y.A., CHEN, K. P., HSU, Y.W., 2006. Characterization of *Erwinia chrysanthemi*, the soft-rot pathogen of white-flowered calla lily, based on pathogenicity and PCR-RFLP and PFGE analyses. *Plant Pathology*, 55:530-536.
- LELIOTT, R.A., DICKEY, R.S., 1984. Genus VII *Erwinia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 1*. Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds), Baltimore: Williams and Wilkins, 469-476.

- LELLIOT, R.A., STEAD, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 216s.
- MANSVELT, E. L., CARSTENS, E., 1999. Outbreak of *Erwinia carotovora* on *Zantedischia* spp. in South Africa, *Plant Disease*, 83(10):966.
- MUNNECKE, D.E., 1960. Bacterial stem rot of *Dieffenbachia*. *Phytopathology*, 50:696-700.
- NASSAR, A., DARRASE, A., LEMATTRE, M., KOTOUJANSKY, A., DERVIN, C., VELED, 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*, 62:2228-2235.
- NORMAN, D. J., YUEN, J. M. F., RESENDIZ, R., BOSWELL, J., 2003. Characterization of *Erwinia* populations from nursery retention ponds and lakes infected ornamental plants in Florida, *Plant Disease*, 87(2):193-196.
- ÖDEN, S., 1991. İzmir ve İstanbul illerinde önemli süs bitkilerinde görülen bakteriyel hastalıklar ve etmenlerin saptanması üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı – Doktora Tezi, İzmir, 88s.
- PEROMBELON, M. C. M., and KELMAN, A., 1980. Ecology of the soft rot *erwinias*. *Annual Review of Phytopathology*, 18:361-387.
- PEROMBELON, M. C. M., 2002. Potato diseases caused by soft rot *erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* 51:1-12.
- REZAEI, R., TAGHAVI, S.M., 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of Iranian soft rot bacterial isolates from different hosts. *Phytopathological. Mediterranea*, 49:194–204.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., USA.
- SAYGILI, H., ŞAHİN, F., AYSAN, Y., 2008. *Bitki Bakteri Hastalıkları*. Meta Basım Matbaacılık İşlemleri, İzmir, 317s.

- SKERMAN, V.B.D., McGOVAN, V., SNEATH, P.H.A., 1980. Approved list of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30:225-420.
- SLAWIAK, M., van BECKHOVEN, J. R. C. M., SPEKSNIJDER, A.G.C.L., CZAJKOWSKI, R., GRABE, G., 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*, 125:245–261.
- SMID, E. J., JANSEN, A. H. J., GORRIS, L. G. M., 1995. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 44:1058-1069.
- SNIJDER, R.C., VAN TUYL, J.M., 2002. Evaluation of tests to determine resistance of *Zantedeschia* spp. (Araceae) to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *European Journal of Plant Pathology*, 108:565-571.
- SUPERYONO, PATAKY, J.K., 1989. Influence of host resistance and growth stage at the time of inoculation on Stewart's wilt and Grover's wilt development and sweet corn hybrid yield. *Plant Disease*, 73:339-345.
- TOTH, K., BERTHEAU, Y., HYMAN, L.J., LAPLAZE, L., LOPEZ, M.M., MCNICOL, J., NIEPOLD, F., PERSSON, P., SALMOND, G.P.C., SLETTEN, A., van der WOLF, J.M., PEROMBELON, M.C.M., 1999a. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Applied Microbiology* 87: 770–781.
- TOTH, K., HYMAN, L.J., and WOOD, J.R., 1999b. A one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *Journal of Applied Microbiology*, 87:158-166.
- WRIGHT, P.J., 1998. A soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26(4):331-334.

YISHAY, M., BURDMAN, S., VALVERDE, A., LUZZATTO, T., OPHIR, R., YEDIDIA, I., 2008. Differential pathogenicity and genetic diversity among *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* isolates from monocot and dicot hosts support early genomic divergence within this taxon. *Environmental Microbiology*, 10(10):2746–2759.



## **ÖZGEÇMİŞ**

12.02.1982 tarihinde Gaziantep'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep'te tamamladı. 2000 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nden 2004 yılında mezun oldu ve aynı yıl Mersin'in Tarsus ilçesinde Fen ve Teknoloji Öğretmeni olarak göreve başladı. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Biyoteknoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.



## **EKLER**



## **EK 1**

### **Nutrient Agar (NA) Besi Yeri (Lelliot ve Stead, 1987)**

Nutrient Agar	13.0 g
Distile Su	1000.0 mL

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

### **Nutrient Broth Sıvı Besi Yeri (Lelliot ve Stead 1987)**

Nutrient broth	8.0 g
Distile Su	1000.0 mL

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

## **EK 2**

### **PCR Çalışmasında Kullanılan Solüsyonlar**

#### **%1'lik Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)**

10.0 mL 10xTAE bufferı 90.0 mL su ile karıştırılır ve behere koyulur. Süspansiyon bulunan beher; içerisinde sıcak su bulunan başka bir beher içerisine yerleştirilir ve 1 g Sodium dodecyl sulphate eklenir. Çalkalayıcıda SDS'nin iyice çözülmesi sağlanır.

#### **7.5 M Amonium Acetate**

57.75 g Amonium acetate 100.0 mL su içerisinde çözülmüştür.

#### **%1 Agarose Jel**

1xTAE buffer içerisine 1.0 g agarose eklenir ve mikrodalgada ısıtılarak eritilir.

#### **TAE buffer (10mM Tris. 1mm EDTA. pH:8)**

Tris-HCl 0.24 g

EDTA 0.074 g

Distile Su 200.0 mL

#### **TBE buffer**

Tris 107.89 g

Borik asit 55.0 g

Na<sub>2</sub> EDTA 7.44 g

Distile su 1000.0 mL

pH: 8.0

#### **6.5x Loading Buffer**

Bromophenol blue 30.0 mg

5xTBE 4.25 mL

Her ikisi karıştırıldıktan sonra 5.75 mL Gliserin eklenerek +4<sup>0</sup>C'de saklanır.