



## Araştırma Makalesi

www.ziraat.selcuk.edu.tr/ojs  
Selçuk Üniversitesi  
Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi  
25 (2): (2011) 8-16  
ISSN:1309-0550



### **İç Anadolu Bölgesinde Fasulye Tohumlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* Bulaşıklığının Belirlenmesi<sup>1</sup>**

Dilek KENDİ<sup>2</sup>, Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ<sup>2,3</sup>

<sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, Konya/Türkiye

(Geliş Tarihi: 28.10.2010, Kabul Tarihi:26.11.2010)

#### Özet

*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, fasulyelerde haleli yanıklık hastalığına sebep olan, tohumla taşınan ve ciddi zararlara yol açan bakteriyel etmenddir. İç Anadolu Bölgesindeki 12 ilden ve ekonomik anlamda fasulye ekimi yapılan alanlardan, ekilen arazi büyüklüğü esas alınarak, tohum örnekleri toplanmıştır. Patojenin izolasyonu ve tanısında; Nutrient Agar (NA), Modified sucrose peptone (MSP), King B besi yerlerinde gelişim, levan oluşumu, 37 °C'de gelişim, oksidaz reaksiyonu, pektolitik aktivite testi, arginine dehidrolaz testi, karbon kaynaklarının kullanımı, arbutin ve jelatinin hidrolizi, nitrat indirgenmesi, H<sub>2</sub>S üretimi, tütün yaprağında (cv. White Burley) aşırı duyarlılık reaksiyonu testleri esas alınmıştır. Patojenite testlerinde, Dermason çeşidi fasulye bitkilerine yapılan 10<sup>8</sup> hücre/ml *P. s. pv. phaseolicola* süspansiyonu ile inokulasyon sonucu tipik yaprak lekeleri gözlenmiştir. Etmenin moleküler tanısı, Bio-PCR yöntemi ve phaseolotoksin geninin amplifikasyonu ile tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, toplam 175 kuru fasulye tohumu örneğinin 38'inde *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* tespit edilmiş ve İç Anadolu Bölgesinde etmenin fasulye tohumlarında bulaşıklık oranı %21,71 olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler;** fasulye, tohum, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, Bio-PCR

#### **Determination of Contamination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on Bean Seeds in Central Anatolia Region**

#### Abstract

Halo blight disease of bean caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, is a bacterial agent transmitted by seeds and causing serious damages. Seeds of dry bean were collected from 12 provinces in Central Anatolia Region and economically bean growing areas based on size the sown field. Isolation and identification of pathogen was based growth on Nutrient Agar (NA), Modified sucrose peptone (MSP), King's B, levan production, growth at 37 °C, oxidase reaction, pectolytic activity, arginine dehidrolase, utilizing of carbon sources, arbutin and gelatin hydrolysis, nitrate reduction, H<sub>2</sub>S production, hypersensitive reaction on tobacco (cv. White Burley) tests. Typical leaf symptoms were obtained on bean cultivar Dermason which was inoculated by a suspension 10<sup>8</sup> cfu/ml of *P. s. pv. phaseolicola* in the pathogenicity tests. Molecular detection of the agent was made by Bio-PCR method and amplification of phaseolotoxin gen. According to obtained data, the pathogen was detected on 38 seed samples from totally collected 175 dry bean samples and 21,71% of the seed samples was found contaminated by the pathogen in Central Anatolia Region.

**Key Words;** bean, seed, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, Bio-PCR

#### Giriş

İnsan beslenmesinde önemli yeri olan, protein kaynağı yüksek, A, B1, B2 ve C vitaminlerince zengin ve vücutta biriken asidi nötrale eden fasulye, yemeklik tane baklagiller arasında ekim alanı ve üretim bakımından dünyada ilk sırayı almaktadır (Anonim, 2008). Ülkelere göre ekim alanı ve üretim durumları dikkate alındığında Hindistan ilk sırada yer almaktadır. Kuru fasulye tarımı, gelişmekte olan ülkelerde yaygın olmasına karşın, verimi gelişmiş ülkelerde daha yüksektir. En önemli kuru fasulye ihracatçı ülkeler ise sırasıyla; ABD, Çin ve Burma'dır (Anonim,1997). Dünya kuru fasulye ekim alanı 26,9 milyon ha, üretim miktarı 18,7

milyon ton ve verimi 69,53 kg/da'dır. Ülkemizde ise ekim alanı 129.051 ha, üretimi 195 bin ton ve verimi ise 152 kg/da'dır (Anonim, 2009).

Fasulyelerde hale yanıklığı hastalığına neden olan *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burk.) Young ve ark. isimli bakteriyel etmen, serin ile orta derecede sıcak ve nemli ortamlarda ve yaralanmış bitkilerde daha fazla ortaya çıkmaktadır. Patojen, tohumda 2-3 yıl canlılığını sürdürebilmekte ve uygun epidemi koşullarında ve hassas çeşitlerin ekildiği bölgelerde %100'e varan zararlar meydana getirebilmektedir (Anonim, 1993). *P. s. pv. phaseolicola*, bodur ve çalı fasulyelerde önemli zararlar oluşturmak-

<sup>1</sup> Bu Makale Dilek KENDİ'nin Yüksek Lisans tezinden hazırlanmıştır.

<sup>3</sup>Sorumlu Yazar: [kbastas@selcuk.edu.tr](mailto:kbastas@selcuk.edu.tr)

tadır. Kuzey Amerika'da bazı fasulye çeşitlerinin hale yanıklığına karşı dayanıklı oldukları saptanmakla beraber Avrupada özellikle çalı fasulyelerinde etmenin önemli zararlara neden olduğu bildirilmiştir. Fasulye bitkilerinde %0.4 oranında bir enfeksiyon durumunda; %34 kapsül ve %12.5 ürün zararı belirlenirken, %2.6'lık enfeksiyon kaynağı bulunduğu ise, %62.5 kapsül ve %43 ürün zararı olduğu rapor edilmiştir (Smith, 1986). Bakterinin meydana getirdiği tane kayıpları %23–43 oranında değişmektedir (Schwartz, 1989). Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise Niğde, Nevşehir, Afyon, Eskişehir, Bursa yörelerinde %50 lere varan zarar tespit edilmiştir (Benlioğlu ve Özakman, 1991).

Enfekteli bitki artıkları ya da tohumlarda olumsuz koşulları geçiren bakteri, çimlenmekte olan sürgünler ve tohumlar üzerinde çoğalmakta, rüzgar, yağmur ve sulama suyu ile etrafa dağılmaktadır. Ayrıca sertifikasız tohumların kullanılması da hastalığın ortaya çıkmasında ana faktör olabilmektedir.

Dünyada bilinen hastalıkların çoğunun en önemli primer inokulum kaynakları bulaşık veya enfekteli tohumlardır ve uygun depolama koşullarında yıllarca canlılıklarını sürdürebilirler. Dolayısıyla pek çok ülkede bu hastalıkların kontrol altına alınabilmesi tohumların testlenmesi ve patojenlerden arı olanların üretimde kullanılması esasına dayandırılmaktadır.

Bu konunun önemi göz önüne alınarak yürütülen çalışmamızda, ülkemiz için önemli tarımsal ürünlerden biri olan fasulye bitkisi tohumlarıyla taşınan ve büyük zararlara sebep olan bakteriyel patojen *P. s. pv. phaseolicola*'nın, İç Anadolu Bölgesinde tanısının yapılarak, tohumlarda bulaşıklılık durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Materyal

#### Bitki materyali

Çalışmanın ana materyalini, İç Anadolu Bölgesindeki 12 ilin (Ankara, Aksaray, Çorum, Eskişehir, Kayseri, Kırşehir, Kırıkkale, Konya, Nevşehir, Niğde, Sivas, Yozgat) fasulye ekiliş alanlarından toplanan fasulye tohumları oluşturmuştur. Ayrıca aşırı duyarlılık testleri için *Nicotiana tobaccum* cv. White Burley ve patojenisite testleri için *Phaseolus vulgaris* cv. Dermason bitkileri kullanılmıştır.

#### Referans bakteri kültürleri

Etmenin tanısı için yapılan tüm testlerde, pozitif kontroller *P. s. pv. phaseolicola* PSP6 (Warwick University, İngiltere), NCPPB52 (Prof. Dr. Kıymet Güven, Anadolu Üniversitesi) ve negatif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss74) (Selçuk Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü) isimli referans kültürler kullanılmıştır.

## Metot

### Örnekleme metodu

İç Anadolu Bölgesindeki 12 ilde, ekonomik anlamda fasulye ekimi yapılan alanlardan ve ili temsil edecek miktarda fasulye tohumu örnekleri alınmıştır. Örnekleme;

100 ha ekiliş alanı için en az 3 örnek  
100–1000 ha arasında her 100 ha başına 1 örnek  
1000 ha üzeri için her 200 hektar için 1 örnek

esasına göre planlanmıştır. Uluslar arası tohum testleme birliğinin (International Seed Testing Association=ISTA) standartlarına göre alınan tohum örneklerinde, her örnek partisi 2500'er gram (yaklaşık 5000 adet tohum) fasulye tohumundan oluşmuştur. Her tohum partisi 500'er gramlık alt gruplara ayrılmıştır (Anonymous, 2007). Açıklanan örnekleme yöntemine uygun olarak toplam 175 adet fasulye tohum örneği toplanmıştır.

### *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*'nın izolasyonu

Tohum örnekleri akan musluk suyuyla yıkandıktan sonra, fungal patojenler ve bazı saprofitik mikroorganizmalarla bulaşık olabileceği düşünülen örneklere %2'lik NaOCl'de 2 dk yüzey sterilizasyonu yapılmış ve 3 kez steril saf suyla durulanmışlardır. 500'er gramlık tohum örnekleri fosfat buffer saline (PBS) içersinde 24 saat +5 °C'de bekletilmiştir (Van Vuurde ve Bovenkamp, 1989). Elde edilen bakteriyel süspansiyon 10<sup>-3</sup> oranında diluye edilerek Nutrient Agar (NA), King B (KB) ve yarı seçici Modified Sucrose Peptone (MSP) besiyerlerine yayılmıştır. Petriler 25±1°C'de 2 gün inkübatörde inkübe edilmiştir (Mohan ve Schaad, 1987; Schaad ve ark., 2001). Bakteriyel izolatlar %30'luk gliserol stok çözeltisi halinde -30 °C'de saklanmıştır.

### Etmenin tanısı

#### Biyokimyasal testler

*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*'nın biyokimyasal tanısında, levan oluşumu, oksidaz reaksiyonu, pektolitik aktivite testi (Kovacs, 1956), arginine dihidrolase testi (Thornley, 1960), karbon kaynaklarının kullanımı, King B besi yerinde gelişim, arbutin hidrolizi, jelatin hidrolizi, nitrat indirgenmesi, H<sub>2</sub>S üretimi (Klement, 1963; Klement ve ark., 1990; Lelliott ve Stead, 1987; Mohan ve Schaad, 1987) testleri esas alınmış ve her bir izolat için testler 3'er kez tekrarlanmıştır.

#### Tütünde hipersensitif reaksiyon (HR) testi

Elde edilen *P. s. pv. phaseolicola* izolatlarının hipersensitif reaksiyon oluşturma durumları, %70–80 nispi nem ve 23–25 °C sıcaklıkta ve 16 saat ışıklı ve 8 saat karanlık ortamda yetiştirilen *Nicotiana tobaccum* cv. White Burley üzerinde denenmiştir.

Bakteriyel inokulum hazırlamak amacıyla *P. s. pv. phaseolicola* izolatları, King B besi yerinde geliştirilmişlerdir. King B besi yerinde 28 °C’ de 48 saat geliştirilen kültürlerden steril saf su ile 10<sup>8</sup> hücre/ml lik süspansiyonlar hazırlanmıştır.

Çiçeklenme döneminden önceki tütün bitkilerinin inokulasyona uygun yapraklarının (çok fazla ince damar içermeyen düzgün hatlı yapraklar) damar aralarındaki alanlara 0,46 mm çapında hipodermik enjektör yardımıyla bakteriyel süspansiyon enjekte edilmiştir. Bitki ya da yaprak yapısından kaynaklanan farklılıkları engelleyebilmek amacıyla, izolatlar farklı bitkilerin farklı yapraklarına ayrı ayrı inokule edilmiştir. Her bir yaprağa ortalama 3 farklı izolat inokule edilirken, bir izolat en az 3 farklı yaprağa inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonraki 48 saat içerisinde doku nekrozuna sebep olan izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Klement ve ark., 1966; Fahy ve Persley, 1983).

#### **Patojenisite testleri**

Stok kültürlerden King B’ye çizilmiş 48–72 saatlik *P. s. pv. phaseolicola* izolatları steril destile su ile 10<sup>8</sup> hücre yoğunluğunda (660 nm dalga boyunda 0.15 OD) hazırlanan bakteri süspansiyonu, 2 haftalık Dermason çeşidi fasulye bitkilerinin yapraklarına püskürtülmüştür. Kontrol bitkilere ise steril distile su püskürtülmüştür. İnokulasyon sonrası 24 saat süreyle bitkiler üzerine polietilen torbalar geçirilmiş, aşılama sonrası bitkiler 7–10 gün arasında 24–28 °C’de yüksek nemli koşullar altında tutularak, belirtilen izlenmiştir. Simptom gelişimi gözlenen yapraklardan re-izolasyon ve etmenin tanısı yapılmıştır. Yapılan test aynı şartlarda her izolat için 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür (Taylor, 1970; Lelliot ve Stead, 1987).

#### **Moleküler tanılama**

##### **BIO-PCR**

DNA izolasyonu yapılmaksızın, besiyerinde geliştirilen bakterinin direkt amplifiye edilmesine olanak sağlayan BIO-PCR yöntemini kullanarak *P. s. pv. phaseolicola*’nın moleküler tanısı yapılmıştır. King B besiyerinde etmenin 24-48 saat ve 23-25 °C’de inkubasyondan sonra, petrilere bakteri hücrelerini uzaklaştırmak için 3 kez steril distile su ile yıkanmış ve direkt olarak alınan bakteriyel süspansiyon, PCR protokolü içerisinde kullanılmıştır (Schaad ve ark., 1995).

##### **Phaseolotoxin geninin amplifikasyonu**

PCR çalışmalarında phaseolotoxin geninin amplifikasyonu için;

P5.1: 5’-AGCTTCTCCTCAAAACACCTGC-3’ ve P3.1: 5’-TGTTCCGAGAGGCAGTCATG-3’ spesifik primer seti kullanılmıştır. Toplam 25 µl hacimde hazırlanan PCR çözeltisinde bakteri DNA’ sı 2 µl, PCR Master Mix (0.05 ünite/ µl *Taq* DNA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP) 12.5 µl, Forward primer 2 µl,

Revers primer 2 µl, steril distile su 6.5 µl şeklinde hazırlanmıştır. Reaksiyon, thermal cycler cihazında (Eppendorph Mastercycler Personel) 94 °C’ de 2 dk inkübasyon adımıyla başlatılmış, 94 °C’ de 1 dk denatürasyon, 58 °C’ de 1 dk primer bağlama ve 72 °C’ de 2 dk amplikon sentezi olacak şekilde toplam 25 döngüye tamamlanmış ve 72°C’de 8 d inkübasyon şeklinde programlanmıştır. Amplifiye edilen phaseolotoxin gen bölgesi için 500 bp’ da tek bant oluşumu beklenilmiştir (Schaad ve ark., 1995).

Elde edilen PCR ürünleri, %1’lik agaroz jel içerisinde, 1 kb’lik moleküler marker (Fermantas 100 bp Plus DNALadder SM 1153) ile elektroporasyona tabi tutulmuş, agaroz jelde oluşan DNA bantlarının (Sambrook ve Russell, 2001), transilluminatörde (Vilber Lourmat) ve Biolab, Quantity One Imaging and Analysis PDQest 2-D Gel Analysis Software, User Guide for Version 4.1 Windows ile analiz edilmiştir.

#### **Patojenin tohumla bulaşıklık oranlarının belirlenmesi**

Bir ildeki yüzde bulaşıklık oranı (IB), ildeki etmenle bulaşık tohum örneği sayısının (∑ ibt), ilden toplanan toplam tohum örneği sayısına (∑ its) yüzde oranlanması (1),

$$IB (\%) = \frac{\sum ibt}{\sum its} \times 100 \quad (1)$$

bölgedeki yüzde bulaşıklık oranı (BB), tüm bölgedeki illerden elde edilen toplam bulaşık örnek sayısının (∑ bbt), bölgedeki tüm illerden toplanan toplam tohum örneği sayısına (∑ bts) yüzde oranlanması (2),

$$BB (\%) = \frac{\sum bbt}{\sum bts} \times 100 \quad (2)$$

olarak hesaplanmıştır.

#### **Araştırma Bulguları**

İç Anadolu Bölgesinde ekonomik anlamda fasulye ekimi yapılan illerden fasulye tohumu örnekleri alınmıştır. Örneklerin alındığı iller, toplanan örnek sayısı ve *P. s. pv. phaseolicola* ile bulaşık tohum sayıları Tablo 1’de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, İç Anadolu Bölgesindeki 12 ilden toplam 175 adet tohum örneği elde edilmiş ve bunlardan 38 adet örneğin *P. s. pv. phaseolicola* ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Etmenin iller düzeyinde durumu incelendiğinde, en yüksek %45’ lik oranla Aksaray ve %41.37’ lik oranla Konya illerinde bulaşıklığı belirlenirken, Çorum, Eskişehir, Kırşehir ve Yozgat illerinden toplanan fasulye tohumlarında etmen tespit edilmemiştir. Buna göre İç Anadolu Bölgesinde ekimi yapılan fasulye tohumlarında *P. s. pv. phaseolicola*’nın bulaşıklık oranı %21,71 olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

#### **Morfolojik tanı**

Tohum örneklerinden farklı besi yerleri üzerine yapılan izolasyonlarda, NA, King B ve MSP besi ortamları kullanılmış, 48 saat ve 25±1 °C’deki inkübasyondan

sonra *P. s. pv. phaseolicola* izolatları, MSP besiyerinde; koloniler dairesel, kubbemsi, parlak açık sarı ve kolonilerin etrafındaki besi yeri 3. günde açık

sarıya dönmüştür. King B besi yerinde oluşan krem renkteki koloniler, ultraviyole lamba altında yeşil floresan pigment oluşturmuştur.

Tablo 1. İç Anadolu Bölgesinde fasulye tohumu toplanan 12 ilden toplanan örnek sayısı, *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* ile bulaşık örnek sayıları ve bulaşıklık oranları

Örnek Toplanan İller	İlçe- Mevki	Toplanan örnek sayısı	*Psp ile bulaşık örnek sayısı	*Psp'nin il genelinde bulaşıklık oranı (%)
Ankara	Merkez	14	4	20.00
	Kazan	6	0	
Aksaray	Kızılkaya	3	1	45.00
	Doğantarla	5	4	
	Helvadere	4	2	
	Gülağaç	4	1	
	Demirci	4	1	
Çorum	Merkez	11	0	0.00
Eskişehir	Merkez	6	0	0.00
	Sivrihisar	6	0	
Kayseri	Tomarza	12	0	13.04
	Yeşilhisar	11	3	
Kırşehir	Merkez	7	0	0.00
	Kanalaltı	6	0	
	Köyönü	3	1	
	Bahşılı	3	1	
	Sarımsalı	2	1	
	Irmak	2	0	
Konya	Çumra	15	5	41.37
	Ereğli	14	7	
Nevşehir	Merkez	4	2	22.22
	Ürgüp	5	0	
Niğde	Ulukışla	9	3	33.33
Sivas	Divriği	9	2	22.22
Yozgat	Çekerek	10	0	0.00
<b>TOPLAM</b>		<b>175</b>	<b>38</b>	
<b>İç Anadolu Bölgesinde *Psp'nin bulaşıklık oranı (%)</b>				<b>21.71</b>

\*Psp ; *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola*

### Biyokimyasal yöntemlerle tanı

Etmenle bulaşık 38 tohum örneğinden izole edilen 52 *P. s. pv. phaseolicola* izolatının tümü gram reaksiyon, arginin dihidrolaz, oksidaz, H<sub>2</sub>S oluşumu, nitrat reduksiyon, pektinaz, karbon kaynaklarının kullanımı (D-mannitol, inositol, D-sorbitol, erithritol), jelatinin, arbutin, eskulin ve nişastanın hidrolizi testlerine negatif reaksiyon gösterirken levan, katalaz, King B besiyerinde floresan pigment oluşumu ve tütünde HR testlerine pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir (Tablo 2).

### Patojenisite testi

Patojenisite testlerinde, 52 adet *P. s. pv. phaseolicola* izolatı, 2 haftalık Dermason çeşiti fasulye bitkilerine püskürtülerek inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra 7-10 gün 24-28 °C'de ve %70-80 nispi nem koşullarında, 43 izolat farklı şiddetlerde, yapraklarda

sulanmış lekeler şeklinde lezyonlara, toksin üretimine bağlı olarak lekelerin etrafında meydana gelen sarı halelere ve solgunluk semptomlarına neden olmuşlardır.

### Tütünde hipersensitif reaksiyon (HR) testi

Elde edilen 52 adet *P. s. pv. phaseolicola* izolatının tamamı doku nekrozuna sebep olmuştur.

### *P. s. pv. phaseolicola* izolatlarının BIO-PCR ile tanınması

*P. s. pv. phaseolicola*'nın tanısında spesifik P5.1-P3.1 primer seti kullanılmıştır. Elde edilen tüm izolatların, phaseolotoxin gen bölgesi amplifikasyonunda, 500 bp büyüklüğünde tek bant oluşturduğu belirlenmiştir. Bio-PCR yöntemiyle, 52 izolatın tamamı *P. s. pv. phaseolicola* olarak tanınmıştır.

### Tartışma

Birçok ülkede, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *P. s. pv. phaseolicola*, *P. s. pv. syringae* ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*'in ekonomik kayıplara neden olan önemli fasulye patojen-

ni bakteriyel etmenler oldukları rapor edilmiştir (Webster ve ark., 1983; Saettler, 1984; Rosas ve Young, 1992; Coyne ve ark., 1994; Hall, 1994; Howard ve ark., 1994; Agrios, 1997; Ranalli ve Parisi, 1998; Calzolari, 1999).

Tablo 2. *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*'nın pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırmalı tanısında kullanılan biyokimsal ve fizyolojik testler

Test	Referans İzolatlar (pozitif kontrol)		Elde Edilen <i>P. s. pv. phaseolicola</i> izolatları	<i>P. s. pv. syringae</i> (negatif kontrol) PSS74
	<i>P. s. pv. phaseolicola</i> PSP6	NCPPB52		
Gram reaksiyon	-	-	-	-
King B besiyerinde floresan pigment oluşumu	+	+	+	+
Levan oluşumu	+	+	+	+
Arginin dihidrolaz	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-
Pektinaz	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S oluşumu	-	-	-	-
Jelatinin hidrolizi	-	-	-	+
Arbutin hidrolizi	-	-	-	+
Eskulin hidrolizi	-	-	-	+
Nişastanın hidrolizi	-	-	-	-
Nitrat redüksiyon	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+
Karbon kaynaklarının kullanımı				
D-Mannitol	-	-	-	+
İnositol	-	-	-	+
D-Sorbitol	-	-	-	+
Erithritol	-	-	-	+
Tütünde HR	+	+	+	+

Türkiye'nin farklı bölgelerinde (İç Anadolu, Karadeniz, Ege ve Marmara bölgeleri) fasulye hastalıklarını belirlemek için çeşitli çalışmalar yürütülmüş ve fasulye bitkisinde *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *P. s. pv. phaseolicola*, *P. s. pv. syringae* ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*'in patojen oldukları saptanmıştır (Sönmezalp, 1966; Benlioğlu ve Özakman, 1991; Demir ve Gündoğdu, 1994; Kahveci ve Maden, 1994; Ertuğrul ve Güven, 1998; Bozkurt ve Soylu, 2001; Dönmez, 2004).

Faurie (1998), Güney Afrikada fasulye üretim alanlarından 1128 bakteriyel izolat elde etmiş ve bunların 967'sinin *P. s. pv. phaseolicola* olduğunu tespit etmiştir.

*P. s. pv. phaseolicola*, bitkilerin baktalarında kırmızımsı-kahverengi görünümü hafifçe içe doğru çökük lekeler oluşturmaktadır. Bu lekeli alanlardan bakteriler gelişmekte olan tohumlara geçmekte ve tohumlarda da renk değişimlerine neden olmaktadır. Erken enfeksiyonlar fasulye tohumlarında çürümelere yol açarken, geç evredeki enfeksiyonlar ise tohumlarda yama ha-

linde sarı lekeler şeklinde belirti ortaya koymaktadır (Neergaard, 1988). Goto (1992), *P. s. pv. phaseolicola*'nın % 50 oranında semptom sergilemeyen fasulye tohumlarıyla taşındığını saptamıştır. Çalışmamızda, İç Anadolu bölgesinden toplanan fasulye tohumlarının başta renk değişikliği olmak üzere makroskopik semptom göstermedikleri tespit edilmiştir.

Demir ve Gündoğdu (1994), Ege Bölgesinde yemeklik baklagillerde görülen bakteriyel hastalıkların tespiti ve mücadelesi için yaptıkları çalışmalarda, 8 survey alanında arazi koşullarında *P. s. pv. phaseolicola*'nın hastalık şiddetini %0,5-21,2 oranında belirlemişlerdir. Çalışmamızda İç Anadolu Bölgesinde ekimi yapılan fasulye tohumlarının, etmenle bulaşıklık oranı %21,71 olarak bulunmuştur.

Fasulye tohumlarından bakteriyel patojenlerin izolasyonu için, Taylor (1970), kuru tohumların bir el değirmeninde öğütülerek toz haline getirilmesi ya da Van Vuurde ve ark. (1983), tohumların uzun süre düşük sıcaklıkta suda bekletilmesi yöntemlerini kul-

lanmışlardır. *P. s. pv. phaseolicola* için hiçbir seçici ekstraksiyon solüsyonu olmadığı için suda bekletme işleminin düşük sıcaklıkta yapılması önerilmektedir. Ancak her örneğin öğütülmesi sonrasındaki sterilizasyonun yeterli olmamasından, uzun süreli suda bekletme test sonuçlarında yüksek saprofitik bulaşmadan dolayı yanlış sonuç verme riski taşımaktadır. Bu sebepten dolayı Saettler (1989) tohum sağlığı testlerinde tohumları akan musluk suyunda yıkadıktan sonra %2'lik NaOCl'de 6 dk tutmuş ve saf su ile durulmuşlardır. Araştırmamızda bu yöntem, güvenilirliğinden dolayı tercih edilmiştir. Sands ve ark. (1980) ve Mohan ve Schaad (1987), ekstraksiyon için tohumları fosfat buffer salin'de bekletmişlerdir. Çalışmamızda da fosfat buffer saline kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Günümüzde mikroorganizmaların tanısında her ne kadar moleküler tekniklerin kullanılması hızla yaygınlaşsa da klasik tanı teknikleri birçok araştırmacı için hala güncelliğini korumaktadır. *P. s. pv. phaseolicola*'nın tanılanması amacıyla birçok araştırmacı tarafından biyokimyasal ve fizyolojik testler önerilmektedir (Kovaacs, 1956; Dye, 1968; Schwartz ve Galvez, 1980; Fahy ve Persley, 1983; Lelliot ve Stead, 1987; Saettler, 1989; Klement ve ark., 1990; Goto, 1992; Hall, 1994; Howard ve ark., 1994; Narayanasamy, 1997; Schaad, 2001; Rico ve ark., 2006). Çalışmamızda elde edilen 52 adet izolatin tamamının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları daha önce saptanan bulguları destekler bulunmuştur.

Demir ve Gündoğdu (1994), Güven ve ark., (2004), Dönmez (2004) patojenisite testlerinde, sera koşullarında yetiştirilen 10 günlük fasulye bitkilerinin yapraklarına *P. s. pv. phaseolicola* süspansiyonu püskürterek yaptıkları inokulasyonla, çalışmamızdan elde edilen bulgulara paralel olarak, yapraklarda sulanmış lekeler şeklinde ortaya çıkan lezyonlar, toksin üretimine bağlı olarak meydana gelen sarı haleler ve solgunluk semptomları gözlemlenmiştir.

*P. s. pv. phaseolicola*'nın patojenisite testleri için Red Kidney fasulye çeşidi önerilmektedir (Rudolph ve Mendgen, 1985), ancak çalışmamız sırasında bu çeşit elde edilememiştir. Bu sebeple denemelerimizde Dermason çeşidi fasulye bitkileri kullanılmış, *P. s. pv. phaseolicola* izolatlarımız bu çeşit üzerinde farklı şiddetlerde patojenisiteye sahip olmuşlardır. Bu bulguların, izolatların farklı virülensliklere sahip oluşu ya da çeşide ait özelliklerden kaynaklanan bir durum olup olmadığı sonraki araştırmalarda incelenmelidir.

Tohumlarda ve bitkinin diğer kısımlarında, örneğin; hastalık bulgusu olmayan yapraklar, yaşayan bakteriyel patojenlerin saptanması çoğu zaman zor olmaktadır çünkü hedef organizma popülasyonu diğer bakterilerin miktarına göre genellikle azdır. Klasik izolasyon yöntemleri çok duyarlı olabilir ancak örneklerde çok az miktarda patojen ve yüksek sayıda diğer bakteriler bulunuyorsa başarısızdır (Schaad, 1989). PCR tekno-

lojisindeki yeniliklerle yüksek oranda başka mikroorganizmaların varlığında az miktardaki hedef mikroorganizmanın saptanmasında ciddi ilerleme kaydedilmiştir. Doğadan alınan bitki örneklerinde sıklıkla karşılaşılan, PCR inhibitörleri ve az miktarlarda örnek gerekliliğinden ortaya çıkan düşük duyarlılık, PCR yöntemini sınırlayıcı etkenden birkaçıdır (Rossen ve ark., 1992; Prosen ve ark., 1993; Weller ve ark., 2000).

Schaad ve ark. (1995), fasulye tohumlarında *P. s. pv. phaseolicola*'nın belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarda klasik PCR metodu yerine uygulamış oldukları BIO-PCR metodunun, tohum üzerindeki ölü hücrelerin varlığından kaynaklanan pozitif sonuçları önlemesi, tohum ekstraktlarında bulunan potansiyel PCR engelleyici maddelerin varlığının elemine edilmesi, hastalık etmeninin belirlenmesinde hassasiyetin artışı ve amplifikasyon için DNA'nın ön ekstraksiyonuna ihtiyaç olmayışı gibi bazı önemli ve üstün özelliklerinden bahsetmişlerdir. BIO-PCR'ın duyarlılığı klasik PCR yönteminden 10-100 kat arası fazlalık göstermektedir. Fasulye tohumu sertifikasyonunda patojenin ömrü hakkında yeterli bilgiye sahip olunmadığı durumda, BIO-PCR ile canlı bakteri hücrelerinin varlığını belirlemek ayrıca önemli olmaktadır (Schaad ve ark., 1995; Schaad ve Frederick, 2002).

Schaad ve ark. (1995), Rico ve ark. (2006), *P. s. pv. phaseolicola*'nın BIO-PCR ve multipleks PCR ile tanılanmasında P5.1-P3.1 primerlerini kullanmışlar, çalışmamızda da Schaad ve ark., (1995)'nin önerdiği bu primerler ile 52 adet *P. s. pv. phaseolicola* izolatımızda da beklenen spesifik bantlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar moleküler metodların her birinin tanı için kendi başına yeterli olduğunu göstermiştir. Ancak tanı ve karakterizasyonda birden fazla metodun bir arada kullanılmasının sonuçların güvenilirliğini artırdığı ve bir metotla tespit edilemeyen özelliğin değerini belirlenmesini sağladığı görülmüştür.

### Sonuç ve Öneriler

Bitkisel üretimde verimliliğin artırılması, fiziksel, ekonomik ve teknik yönlerden üretim ortamının iyileştirilmesi, kaliteli ve sağlıklı tohum kullanımı ile gerçekleştirilmektedir.

Dünyada yemeklik dane baklagiller arasında üretim bakımından ilk sırayı alan fasulye, ülkemizde İç Anadolu Bölgesinde en fazla üretim alanına sahiptir. Fasulye tohumlarıyla taşınan ve uygun epidemiyolojik koşullarda, büyük ekonomik kayıplara neden olabilen bakteriyel patojen *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola*'nın, bu bölgedeki %21.71'lik bulaşıklılık oranı dikkat çekici bulunmuştur. Patojenin, uzun yıllar tohumda canlılığını koruyabildiği ve farklı üretim alanlarına tohumla yayılabildiği göz önüne alındığında, hastalıkla bulaşık tarlalardan elde edilen tohumların, tohumluk olarak kullanılmaması, hastalık için uygun şartlara sahip olmayan bölgelerde tohumluk üretiminin yapılması, hastalığa tolerant çeşitlerin üre-

timine hassasiyet gösterilmesi hastalık çıkışının azaltılmasında etkili olabilecektir.

#### Kaynaklar

- Agrios, M. G., 1997. Plant Pathology. Academic Press, Inc., USA, 635p.
- Anonim, 1993. Eskişehir Yemeklik Dane Baklagil Grubu, Kuru Fasulye Islahı ve Yetiştirme Teknikleri Semineri, Eskişehir.
- Anonim, 1997. Akdeniz İhracatçılar Birliği Genel Sekreterliği Baklagil Raporu (Türkiye ve Dünya), 38.
- Anonim, 2008. <http://www.ktae.gov.tr>
- Anonim, 2009. <http://www.tuik.gov.tr>
- Anonymous, 2007. Proposal for A New Method for Detecting *Pseudomonas savastanoi* Pv. *Phaseolicola* on Bean Seeds. ISTA Method Validation Reports. ISTA Basserdorf, CH-Switzerland, 66p.
- Benlioğlu, K. and M. Özakman, 1991. Evaluation of Two Serological Methods for the Identification of Halo Blight Pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) of Beans. *J. Turk Phyto.*, 23, 75-84.
- Bozkurt, İ. A. ve S. Soylu, 2001. Farklı Fasulye Çeşitlerinin Fasulye Hale Yanıklığı Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Irklarına Karşı Gösterdiği Reaksiyonların Belirlenmesi. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, Te-kirdağ, 506-515.
- Calzolari, A., 1999. Halo and Common Spot of Beans. *Review of Plant Pathology*, 77, p416.
- Coyne, D. P., D. S. Nuland and D. T. Lindgren, 1994. The Effect of Populations *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Bean Reproductive Tissues on Seed Infection of Resistant and Susceptible Bean Genotypes. *European J Plant Pathology*, 103 (2), 175-181.
- Demir, G. and M. Gündoğdu, 1994. Bacterial Diseases of Food Legumes in Aegean Region of Türkiye and Effectivity of Some Seed Treatments Against Bean Halo Blight. *J. Turk. Phytopath.*, 23, 57-66.
- Dönmez, M. F., 2004. Erzurum ve Erzincan İllerinde Fasulye Bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) Görülen Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Tanılanması ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ye Karşı Çeşitli Fasulye Genotip / Varyetelerinin Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 297s.
- Dye, D. W., 1968. A Taxonomic Study of The Genus *Erwinia*. I. The 'amylovora' group. *New Zealand J. Sci.* 11: 590-607.
- Ertuğrul, D. and K. Güven, 1998. Serological Properties of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Isolates Collected from Eskişehir. *Tr. Journal of Biology*. 22, 189-195.
- Fahy, P. C. and A. C. Persley, 1983. Media and Methods for Isolation and Diagnostic Tests. A Diagnostic Guide. Academic Press, Australia, 393p.
- Faurie, D., 1998. Characterization of Halo Blight Races on Dry Beans in South Africa. *Plant Disease*, 82 (3), 307-310.
- Goto, M., 1992. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. Academic Press, USA, 635p.
- Güven K., J. B. Jones, M. T. Momol and E. R. Dickstein, 2004. Phenotypic and Genetic Diversity Among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Phytopathology* 152, 658-666.
- Hall, R., 1994. Compendium of Bean Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 73p.
- Howard, R. J., J. A. Garland and W. L. Seaman, 1994. Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada. The Canadian Phytopathological Society, Canada, p554.
- Kahveci, E. and S. Maden, 1994. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by Bacteriophages. *J. Turk Phytopath.*, 23, 79-85.
- Klement, Z., 1963. Rapid Detection of the Pathogenicity of Phytopathogenic *Pseudomonads*. *Nature* 199: 299-300.
- Klement, Z., G. L. Farkas and L. Lourekovich, 1966. Hypersensitive Reaction Induced by Phytopathogenic Bacteria in Tobacco Leaf. *Phytopathology*, 54, 474-477.
- Klement, Z., K. Rudolph and D. C. Sands, 1990. Methods in Phyto bacteriology, Akademia Kiado, Budapest, 568p.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanus* by Oxidase Reaction. *Nature*, London, 170-173.
- Lelliot, R. A. and D. E. Stead, 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases Plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK., 199p.
- Mohan, S. K. and N. W. Schaad, 1987. An Improved Agar Plating Assay for Detection *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Contaminated Bean Seed. *Phytopathology* 77: 1390-1395.
- Narayanamy, P., 1997. Plant Pathogen Detection and Disease Diagnosis. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 331p.



- Neergaard, P., 1988. Seed Pathology. MacMillian Press, Hong Kong, 1191p.
- Prosen D., E. Hatziloukas, N. W. Schaad and N. J. Panopoulos, 1993. Specific Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in Bean Seed by Polymerase Chain Reaction-Based Amplification of a Phaseolotoxin Gene Region. *Phytopathology* 83, 965–70.
- Ranalli, P. and B. Parisi, 1998. Viral and Bacterial Disease of French Beans. Review of Plant Pathology, 77, p416.
- Rico, A., M. Erdozain, A. Ortiz-Barredo, J. I. Ruiz de Galarreta and J. Murillo, 2006. Detection by Multiplex-PCR and Characterization of Nontoxicogenic Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Different Places in Spain. *Spanish J Agricultural Research* 4(3), 261-267
- Rosas, J. C. and Young R. A., 1992. Response to Selection for Resistance to Common Bacterial Blight in Beans. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, Vol 35, 86–87.
- Rossen L., P. Norskov and K. H. Rasmussen, 1992. Inhibition of PCR by Components of Food Samples, Microbial Diagnostic Assays And DNA-Extraction Solutions. International Journal of Food Microbiology 17, 37–45.
- Rudolph, K. and K. Mendgen, 1985. Multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* " in Planta" 11. Characterization of Susceptible and Resistant Reactions by Light and Electron Microscopy Compared with Bacterial Countings. *Phytopathologische Zeitschrift* 113, 200-212.
- Saettler, A. W., 1984. The Michigan Bean Seed Testing Program for the Detection of Internally-Borne Blight Bacteria. Report of the Bean Improvement Cooperative, Vol 27, 49-50.
- Saettler, A. W., 1989. Common Bacterial Blight in Bean Production Problems in the Tropics (eds. H. F. Schwartz, M. A. Pastor-Corrales) Centro International De Agriculture Tropical, Chapter 11, 261–319.
- Sands, D. C., M. N. Schroth, and D. C. Hildebrand, 1980. Pseudomonas. pages 36–44, In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. (ed. N. W. Schaad), American Phytopathological Society, St. Paul, Mn., USA, 72p.
- Sambrook, J. and D. Russell, 2001. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition). CSHL Press, 2344p.
- Schaad, N. W., H. Azad, R. C. Peet, and N. J. Panopoulos, 1989. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by a DNA Hybridization Probe. *Phytopathology* 79, 903–907.
- Schaad, N. W., S. Cheong, S. Tamaki, E. Hatziloukas, and N. J. Panopoulos, 1995. A Combined Biological and Enzymatic Amplification (BIO-PCR) Technique to Detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean Seed Extracts. *Phytopathology*, 85, 243–248.
- Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third edition) American Phytopathological Society Press, St Paul, USA, 373p
- Schaad N. W. and R. D. Frederick, 2002. Real-Time PCR and its Application for Plant Disease Diagnosis. *Canadian J Plant Pathology* 24 (3), 250–258.
- Schwartz, H. F., 1989. Bean Production Problems in The Tropics, C.I.A.T, Colombia, 285-301.
- Smith, I. M., Dunez, J., Lelliott, R. A., Philips, D. H. and Archer, S. A., 1986. European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publication, London, 583p.
- Sönmezalp, Ş., 1966. Fasulyelerde Önemli İki Bakteri Hastalığı (*Corynebacterium flaccumfaciens* ve *Xanthomonas phaseoli*). *Bitki Koruma Bülteni*, Cilt: 6, No:3, 103–110.
- Taylor, J. D., 1970. The Quantitative Estimation of The Infection of Bean Seed With *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson. *Ann. Appl. Biol.* 66: 29–36.
- Thornley, M. J., 1960. The Differentiation of *Pseudomonas* from other Gram Negative Bacteria on The Basis of Arginine Metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 1: 37–52.
- Van Vuurde, J. W. L., A. A. J. M. Franken, Y. Birnbaum, and G. Jochems, 1983. Characteristic of Immunofluorescence Microscopy and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as potential Routine Tests for the Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Bean Seed, *Seed Sci. and Technol.*, 11, 547-559.
- Van Vuurde, J.W.L. and G. W. Van den Bovenkamp, 1989. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean. In Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material (eds. A.W. Saettler, N.W. Schaad and D.A. Roth). The American Phytopathological Society Press, p30-40.



Webster, D. M., J. D. Atkin, and J. E. Cross, 1983. Bacterial Blight of Snap Beans and Their Control. *Plant Dis.* 67: 935–939.

Weller S. A., J. G. Elphinstone, N. C. Smith, N. Boonham and D. E. Stead, 2000. Detection of

*Ralstonia Solanacearum* Strains With a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (Taqman) Assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2853–2858.