

Bazı Sebze ve Meyvelerde Yumuşak Çürüklük Oluşturan Pektolitik Bakterilerin Tanı ve Karakterizasyonu

Fatih DADAŞOĞLU¹, Recep KOTAN²

ÖZET: Bu çalışmada meyve ve sebzelerde yumuşak çürüklük hastalığına sebep olan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* ve *Erwinia chrysanthemi* türlerinin klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak kesin tanısının yapılması hedeflenmiştir. Bu amaçla farklı meyve ve sebzelerde yumuşak çürüklük etmeni olduğu tespit edilen izolatlar ilk olarak mikrobiyal tanı sistemi (MIS) kullanılarak tanılanmış ve 7 farklı *P. c.* subsp. *atrosepticum* izolatı ile 5 farklı *E. chrysanthemi* izolatı elde edilmiştir. Ayrıca, strainler yine BIOLOG sistemi kullanılarak da tanılanmış olup elde edilen sonuçların MIS sisteminde alınan sonuçlardan farklı olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan hypersensitive reaction (HR), patojenite ve pektolitik aktivite testleri sonucu bu strainlerin tamamının patojen olduğu belirlenmiştir. Patojen olduğu belirlenen strainlerin kesin tanı ve karakterizasyonu için çeşitli biyokimyasal ve moleküler testler (16S rDNA PCR ve spesifik PCR) yapılmıştır. 16S rDNA PCR testleri sonucunda strainlerin cins düzeyinde tanısı yapılmış olup, izolatların tamamının yaklaşık 1500 bp uzunluğunda bant verdiği tespit edilmiştir. Patojen olduğu belirlenen ve tanılanan *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* izolatlarının çilek, dut, maydanoz, lahanaya, patates, biber ve patlıcanda, *E. chrysanthemi* izolatlarının ise; 2 tanesinin soğanda, 2 tanesinin biberde ve 1 tanesinin de maydanozda yumuşak çürüklük hastalığına neden olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: MIS, Moleküler tanı, *Pectobacterium*, Yumuşak çürüklük

Identification and Characterization of Pectolytic Bacteria which is Causing Soft Rot in some Fruits and Vegetables

ABSTRACT: In this study, it is aimed to be determined make a definitive diagnosis of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* and *Erwinia chrysanthemi*, which are the agent of Soft Rot for some fruits and vegetables. For this purpose, initially microbial diagnostic systems (MIS) are defined using, causing soft rot strains in different fruits and vegetables, and 7 different strains of *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* and 5 different strains of *E. chrysanthemi* were obtained. Also identified using the system of BIOLOG and it was observed that the results are different from results obtained in the MIS system. According to hypersensitive reaction (HR), pathogenicity and pectolytic activity tests results it was determined that all of the pathogenic strains. Several biochemical and molecular tests (16S rDNA PCR and specific PCR) for the diagnosis and characterization of certain strains were made identified as pathogen. The diagnosis of bacterial species conducted using the 16S rDNA PCR and all of the strains given band of approximately 1500 bp in length was determined. *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* strains of identified as pathogen in strawberry, mulberry, parsley, cabbage, potatoes, peppers and eggplant and the strains of *E. chrysanthemi*; 2 of them in onion, 2 of them in pepper and one of them also in parsley, it has been found to cause soft rot disease.

Key words: MIS, Molecular identification, *Pectobacterium*, Soft rot

¹ Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ağrı, Türkiye

² Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Erzurum, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding Author: Fatih DADAŞOĞLU, f-dadas@hotmail.com
¹Bu çalışma Fatih DADAŞOĞLU'nun Doktora Tezinin bir bölümüdür.

GİRİŞ

Bitki patojeni olan *Erwinia* cinsi bakterilerin sebep olduğu hastalıkları simptomlarına göre üç ana grup altında toplamak mümkündür. *Amylovora* grubu; elma ve armut gibi yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ateş yanıklığı hastalığına sebep olur ve bilinen en önemli türü *Erwinia amylovora*'dır. *Carotovora* grubu; yumuşak çürüklük ve karabacak hastalığına sebep olan türleri içerir. Bu bakteriler hem tarlada hem de depoda birçok üründe çok önemli kayıplar oluşturmaktadır; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* ve *Dickeya chrysanthemi* tüm dünyada en çok bilinen patojenleridir. *Herbicola* grubu iki ana türü içermektedir. *Erwinia herbicola*, genellikle bitkilerin üzerinde bulunan bir epifit iken; diğer tür olan *Erwinia stewartii* ise mısırlarda Stewart'ın solgunluğu diye bilinen hastalığa sebep olmaktadır (Leliott and Dickey, 1984; Suparyono and Pataky, 1989).

Mikroorganizmaların sınıflandırılarak taksonomideki yerinin belirlenmesi tanı, tanısı yapılan organizmaların sahip oldukları özelliklerinin belirlenerek diğerleri arasındaki farklılıkların ortaya konulmasına ise karakterizasyon adı verilmektedir. Genel olarak tanı yöntemleri klasik ve moleküler yöntemler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Moleküler yöntemler; içerisinde MIS, BIOLOG, ELISA ve PCR yöntemleri mikroorganizmaların tanısında en fazla kullanılan yöntemler olmaktadır. Günümüzde moleküler yöntemler daha güvenilir ve daha hızlı sonuçlar verdiği için klasik yöntemlere göre daha fazla tercih edilmektedir. Ancak, her ne kadar moleküler yöntemler çok yaygın kullanılsa da hiçbir zaman tek başlarına yeterli sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle moleküler yöntemlerin her zaman klasik yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada; yumuşak çürüklük simptomsu görülen bazı meyve sebzelerde hastalık oluşturan bakteriyel yaş çürüklük etmenlerinin klasik (morfolojik, sitolojik ve biyokimyasal testler) ve moleküler yöntemler (MIS, BIOLOG ve 16S rDNA PCR) kullanılarak kesin tanısı ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bakterilerin İzolasyonu ve Stoklanması:

Bu çalışmada Erzincan, Iğdır, İspir Pazaryolu ve Uzundere lokasyonlarında farklı meyve ve sebzelerden alınan örneklerden izolasyonlar yapılmıştır. İzolasyonlar için standart Trypticase Soy Broth Agar (TSBA), Nutrient Agar (NA), Yeast Dextrose Carbonate Agar (YDC) besiyerleri kullanılmıştır. Hastalıklı bitki materyalleri, sebze ve meyveler musluk suyunda yıkandıktan sonra içerisinde %70'lik etil alkol bulunan bir kaptan 5 dk bekletilerek yüzeysel olarak steril edilmiş ve ardından sdH₂O'dan geçirilmiştir. Hem hastalıklı hem de sağlıklı dokuyu içeren bölgelerden, küçük parçalar kesilerek içerisinde 2 ml sdH₂O bulunan steril tüpler içerisinde 1 saat bekletildikten sonra, 5 kat seyreltilerek dilüsyonlar hazırlanmıştır. Pipetle her bir dilüsyondan 100 µl alınarak, standart besi yerlerine transfer edilmiş ve cam drigalski özesi ile yüzeye yayılmıştır. Kültürler 25°C'de inkübasyona konulmuş, gelişen her bir koloniden yeniden ekim yapılarak saf kültürler elde edilmiştir.

Saf olarak elde edilen her bir izolata ayrı bir kod numarası verilerek, izolasyonla ilgili bilgiler (izole edildiği bitki, lokasyon, tarih vs.) kaydedilmiş; tanı ve karakterizasyon işlemlerine kadar 1:1 oranında karıştırılan %30 gliserol ve Luria Bertani Broth (LB) içeren stok besiyerlerinde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

İzolatların MIS Sistemi ile Tanılanması:

Saflaştırılarak muhafaza edilen bakteri izolatlarının yağ asiti metil esterleri elde edilmiş, Mikrobial Identification Sistemi=MIS (MIDI, Inc., Newark, DE) kullanılarak tanılanmıştır (Miller, 1982).

Bakterilerin BIOLOG sistemi ile tanılanması:

Bakteri izolatlarının BIOLOG sistemi yardımı ile metabolik enzim profillerinin belirlenmesi hem alternatif bir tanı hem de izolatların karakterizasyonunda kullanılmıştır.

Tütünde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitivity (HR)) Testi:

Saflaştırılan bakteriyel izolatlar NA besiyerine çizilerek inkübasyona bırakılmıştır. 24 s'lik kültürlerden öze ile alınarak sdH₂O içerisine aktarılan bakteriler vorteks cihazında karıştırılıp hazırlanan karışımın konsantrasyonu 10⁸ CFU/ml'ye

ayarlanmıştır. Elde edilen solüsyondan steril şırınga ile 2 cc'lik alınarak tütün (*Nicotina tabacum* L. var. Samsun) yapraklarının damarları arasına enjekte edilmiştir. Ölü doku oluşturan izolatlar HR pozitif (+), oluşturmeyenler ise HR negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. Kontrol bitkilerinde sdH₂O kullanılmıştır (Dadaşoğlu, 2007).

Patojenite Testi: Yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen verilere göre patojenite testleri için bakteri kültürlerinden alınarak TSA besi yerine ekim yapılmıştır. 24 h süreyle etüvde gelişmeye bırakılan bakterilerden 10⁸ CFU/ml konsantrasyonda solüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlar nemlendirilmiş kağıtlar içeren polietilen torbalar içerisine konulan konukçu bitkilere şırınga ile enjekte edilerek bir hafta boyunca 27-30°C sıcaklıkta takip edilmiştir.

Sera denemeleri patojenite testlerinde ise; patojenler için izole edildiği konukçu bitkiler kullanılmıştır. Kontrol olarak ise sdH₂O kullanılmıştır.

Pektolitik Aktivite Testi: Taze ve hastaliksız olan patates yumruları %5'lik sodyum hipoklorit de 10 dk bekletilerek steril edilmiştir. Steril edilen yumrular yaklaşık 5 mm dilimlenerek içerisinde steril nemli kağıtlar içeren petri kaplarına yerleştirilmiştir. 24 sa'lik bakteri kültürlerinden alınarak patates dilimlerine 1 ml enjekte edilmiş ve 26±2°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24-72 sa sonra yumuşama olup olmadığı kontrol edilerek yumuşama olması pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak sdH₂O kullanılmıştır.

Fenotipik Testler: HR, patojenite ve pektolitik aktivite test sonuçları pozitif olan izolatlar çeşitli klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır.

Bu amaçla sitolojik testlerden Gram reaksiyon testi ve hareket testi kullanılmıştır (Hugh and Leifson, 1953). Biyokimyasal testlerden; katalaz, oksidaz, floresan pigment üretimi, amilaz testi, indol üretimi, sukrozun indirgenmesi, fosfataz aktivitesi testleri yapılmıştır.

Aynı zamanda izolatların 37°C de gelişimi, 5% sodyum klorid içeren nutrient agar ortamında gelişimi ve eritromisin antibiyotiğine duyarlılık testleri de kullanılmıştır. Bunlara ilaveten laktoz, glukoz, fruktoz ve mannitol gibi karbonhidratlardan asit üretimi testleri de yapılmıştır. (Gallelli et al., 2009).

Moleküler Karakterizasyon

Bakteri hücresinden DNA ekstraksiyonu: Araştırmada kullanılan bakteri izolatlarından DNA ekstraksiyonu, Lazo et al., (1987); Ausubel et al., (1994); Khoodoo and Jaufferally-Fakim, (2004), tarafından kullanılan izolasyon metodunun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Bakteriyel izolatların 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu: Her bir izolatın saflaştırılan genomik DNA'dan, 16S rDNA gen bölgesi uygun forward ve reverse primerler kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltılmıştır. Master miksin hazırlanması, kullanılan primerler ve PCR programı Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. İzolatların tanısında kullanılan PCR metodları

PCR metodları	Primerlerin baz dizimleri	Master miks (1 örnek için)		PCR programı	
16S rDNA PCR: (<i>Pectobacter</i> sp.,)	fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG rP2: ACGGCTACCTGTACGACTT	10 x PCR tamponu	5 µl	1. Denatürasyon a	94°C'de 4 dk
		dNTP	1 µl	2. Denatürasyon b	94°C'de 1 dk
		Primerler	0.3 µl	3. Bağlanma	58°C'de 1 dk
		Taq DNA polimeraz (5U)	0.5 µl	4. Uzama	72°C'de 3 dk
		sdH ₂ O	39.9 µl	5. Döngü (2, 3, 4)	35 tekrar
		Template DNA (50 ng/µl)	3 µl	6. Uzama	72°C'de 10 dk

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yumuşak çürüklük oluşturan bakteriyel etmenlerin bazı meyve ve sebzelerin yumru, gövde, meyve, dal ve yaprakları olmak üzere konukçularının farklı aksamalarında oluşturmuş oldukları sulu lezyonlar, çürümeler, doku yumuşaması ve solgunluklar gibi tipik semptomlara neden oldukları bilinmektedir (Aysan ve ark., 2003; Boyraz ve ark., 2006; Choi and Kim, 2013). Bu patojenlerin özellikle önemli kültür bitkilerinde meydana getirdikleri şiddetli enfeksiyonlar nedeni ile ekonomik açıdan çok büyük kayıplar meydana getirdiği ve dünya genelinde yıllık yaklaşık olarak 50-100 milyon dolar kayba neden olduğu belirtilmektedir. Bunlar içerisinde, *Pectobacterium* sp., *Pseudomonas*

sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. ve *Flavobacterium* sp. içerisinde yer alan ve dünya genelinde çok sayıda konukçuda hem yumuşak çürüklük hem de farklı hastalıkların oluşmasından sorumlu türler yer almaktadırlar (Prombelon and Kelman, 1980).

Bu çalışmada; söz konusu patojenlerden *Pectobacterium* spp. ve *Erwinia* spp.'ye ait türlerin yukarıda belirtildiği gibi çok sayıda konukçunun gövde ve meyve gibi farklı bitki organlarında yumuşak çürüklük oluşturduğu tespit edilmiştir.

MIS ve BIOLOG tanı sonuçları, HR, patojenite ve pektolitik aktivite testlerinden elde edilen sonuçlara göre yumuşak çürüklük etmeni olduğu tespit edilen izolatlara ait bilgiler Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Patojen bakterilerin MIS ve BIOLOG tanı sonucu, izolasyon bilgileri ile HR, patojenite ve pektolitik aktivite test sonuçları *

İN	MIS tanı sonucu	MBİ	BIOLOG tanı sonucu	BBİ	K	BM	L	HR	P	PA
F-121	<i>Pectobacterium caratovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	0.61	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.62	Çilek	Meyve	Pazaryolu	-	+	+
F-123	<i>Pectobacterium caratovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	0.65	<i>Vibrio vulnificus</i>	0.46	Dut	Meyve	Pazaryolu	-	+	+
F-137	<i>Pectobacterium caratovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	0.51	<i>Vibrio vulnificus</i>	0.52	Lahana	Gövde	Pazaryolu	-	+	+
F-138	<i>Pectobacterium caratovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	0.86	<i>Vibrio vulnificus</i>	0.26	Maydanoz	Gövde	Pazaryolu	-	+	+
F-140	<i>Erwinia chrysanthemi</i> biotype V	0.83	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.25	Maydanoz	Gövde	Pazaryolu	-	+	+
F-161	<i>Erwinia chrysanthemi</i> biotype V	0.81	<i>Raoultella terrigena</i>	0.22	Soğan	Gövde	İspir	-	+	+
F-172	<i>Pectobacterium caratovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	0.71	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.36	Patates	Gövde	Uzundere	-	+	+
F-215	<i>Erwinia chrysanthemi</i> biotype V	0.75	<i>Vibrio vulnificus</i>	0.50	Soğan	Gövde	Uzundere	-	+	+
F-453	<i>Pectobacterium caratovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	0.72	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.09	Biber	Meyve	İğdir	-	+	+
F-610	<i>Pectobacterium caratovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	0.69	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.50	Patlıcan	Meyve	Erzincan	-	+	+
F-663	<i>Erwinia chrysanthemi</i> biotype IV	0.55	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	0.54	Biber	Meyve	Erzincan	-	+	+
F-714	<i>Erwinia chrysanthemi</i> biotype IV	0.54	<i>Vibrio vulnificus</i>	0.53	Biber	Meyve	Uzundere	-	+	+

* İN: İzolat no, MBİ: MIS benzerlik indeksi, BBİ: Biyolog benzerlik indeksi, K: Konukçu, BM: Bitki materyali, L: Lokasyon, HR: Aşırı duyarlık testi, P: Patojenite, PA: Pektolitik aktivite, + : Pozitif sonuç, - : Negatif sonuç

Çalışmanın başlangıcında MIS sisteminin tercih edilmesi ile elde edilen izolatların ön tanısı yapılmış böylece bu veriler dikkate alınarak çalışmanın kalan kısımlarının daha güvenli ve daha kolay planlanması sağlanmıştır. MIS sistemi kullanılarak tanısı yapılmış olan bakterilerin tamamına HR testi yapılmış ve tüm izolatların pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Yapılmış olan bazı çalışmalarda da bu bakterilerin tütünde aşırı duyarlılık testlerinde hem pozitif hem de negatif sonuç verdiği kaydedilmiştir (Gallelli

et al., 2009; Pitman et al., 2010; Mikicinski et al., 2010). Bu nedenle pozitif sonuç veren izolatların tamamına kendi konukçularında patojenite testleri yapılmıştır ve hepsinin pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Patojenler konukçuların meyve ve gövdelerinden izole edilmiş olup, yapılmış olan bir çok çalışmada da bu patojenler farklı bitkilerin meyve ve gövdelerinden elde edilmiştir (Saygılı ve ark., 2005; Maisuria and Nerurkar 2012; Van Vaerenbergh et al., 2012).

MIS sistemi kullanılarak tanılanmış olan izolatların 7 tanesinin *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* ve 5 tanesinin de *E. chrysanthemi* olduğu belirlenmiştir. MIS tanı sonucuna göre; *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* ve *E. chrysanthemi* olduğu tespit edilmiş izolatların BIOLOG tanı sonuçları ile karşılaştırıldığında bütün izolatlar arasında hem cins hem de tür düzeyinde

farklı sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir. Kotan, (2002) yapmış olduğu çalışmada da benzer şekilde MIS ve BIOLOG sonuçlarının her zaman uyum içinde olmadığını belirtmiştir.

Morfolojik ve biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlar Çizelge 3’de verilmiştir.

Çizelge 3. Morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları*

İzolat No	MIS tanı sonucu	BIOLOG tanı sonucu	Hareketlilik	Hücre Şekli	Koloni rengi	37°C’de gelişim	Katalaz	Oksidaz	KOH	Eritromisine duyarlılık	%5 NaCl’ye tolerans	Fosfat az aktivitesi	Amilaz testi	Floresan pigment üretimi	İndol üretimi	Sukrozun indirgenmesi	Karbonhidratlardan asit üretimi			
																	Glukoz	Fruktoz	Laktoz	Mannitol
F-121	<i>P. c. subsp. atrosepticum</i>	<i>P. agglomerans</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-123	<i>P. c. subsp. atrosepticum</i>	<i>V. vulnificus</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-137	<i>P. c. subsp. atrosepticum</i>	<i>V. vulnificus</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-138	<i>P. c. subsp. atrosepticum</i>	<i>V. vulnificus</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-140	<i>E. chrysanthemi</i> biotype V	<i>P. agglomerans</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-161	<i>E. chrysanthemi</i> biotype V	<i>R. terrigena</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-172	<i>P. c. subsp. atrosepticum</i>	<i>S. typhimurium</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-215	<i>E. chrysanthemi</i> biotype V	<i>V. vulnificus</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
F-453	<i>P.c. subsp. atrosepticum</i>	<i>S. typhimurium</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-610	<i>P. c. subsp. atrosepticum</i>	<i>S. typhimurium</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-663	<i>E. chrysanthemi</i> biotype IV	<i>E. nimipressuralis</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
F-714	<i>E. chrysanthemi</i> biotype IV	<i>V. vulnificus</i>	+	Ç	AS	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+

*AS: Açık sarı, Ç: Çubuk, + : Pozitif sonuç, -: Negatif sonuç

Yapılan morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları incelendiğinde bütün izolatların hareketli ve çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir. Genel olarak izolatların belirtilen bu morfolojik özellikler bakımından literatürlerde belirtilen özellikler ile örtüştüğü

görülmüştür (Brenner et al., 2007). İzolatların tamamı Gram negatif olup 37 °C’de gelişme göstermişlerdir. Zaten *Pectobacterium* türlerinin optimum gelişme sıcaklıklarının 25-30°C, maksimum gelişme sıcaklıklarının ise 40°C olduğu kaydedilmiş olup bizim

sonuçlarımızla paralellik göstermektedir (Brenner et al., 2007). Bütün izolatların katalaz test sonuçları pozitif iken oksidaz test sonuçları ise negatif olarak belirlenmiştir.

Potasyum hidroksil testleri sonucuna göre, türlerin tamamının KOH pozitif (+) ve bu nedenle Gram özelliği bakımından Gram negatif (-) sonuç verdiği tespit edilmiştir. Eritromisine karşı duyarlılık test sonuçlarına göre; F-138, F-161, F-172, F-215, F-610 ve F-714 izolatları negatif sonuç vermiş olup diğer izolatlar pozitif sonuç vermiştir. Bu türlerin bazılarının genelde % 5 NaCl'ye toleranslı oldukları ama bu konsantrasyonda gelişme gösteremeyen duyarlı türlerin varlığı da tespit edilmiştir (Ngadze et al., 2012). Aynı şekilde sukrozun indirgenmesi test sonuçlarına göre; F-138, F-140, F-215 ve F-714 izolatları negatif sonuç vermişken diğer izolatlar pozitif sonuç vermiş olup, bu şekilde farklı sonuçların bulunduğu çalışmalara rastlanmaktadır (Gallelli et al., 2009; Van Der Merwe, 2009). %5'lik NaCl besisi ortamında patojen bakterilerin gelişip gelişmemesi açısından yapılan test sonuçlarına göre; bütün izolatların geliştiği belirlenmiştir. Yapılan amilaz testleri sonucunda tüm patojenler negatif sonuç vermişken, fosfataz testleri sonucunda ise bütün izolatlar pozitif sonuç vermiştir. Bu türlerle ilgili yapılan fosfataz testinde genellikle pozitif sonuçlar elde edilmişken nadir de olsa bazı türlerde negatif sonuçların olabileceği de kaydedilmiştir (Palacio-Bielsa et al., 2010; Tavasoli et al., 2011; Sarris et al., 2011). Bu çalışmada ise; türlerin tamamı fosfataz testinde pozitif sonuç vermiş olup; bu açıdan literatürlere göre yakın sonuçların elde edildiği düşünülmektedir. Bu türlerin karbohidratlardan asit üretimini belirlemek için; sukroz, mannitol, glukoz, fruktoz, laktoz, mellibioz ve sorbitol gibi çok sayıda farklı karbohidratlardan yararlanılmıştır (Dickey, 1978; Sarris et al., 2011; Rahman et al., 2012; Maisuria and Nerurkar, 2012). Bu çalışma kapsamında ise; glukoz, fruktoz, laktoz ve mannitol olmak üzere 4 farklı karbohidrat kullanılmıştır. İzolatların tamamı glukoz ve laktozdan asit üretiminde negatif sonuç vermiş olup, fruktoz ve mannitolden asit üretiminde pozitif sonuç vermiştir.

Patojen bakterilerin indol üretimi testleri sonucunda bütün izolatlar negatif sonuç vermiştir. Bilindiği gibi *Pectobacter* ve *Erwinia* cinsi bütün

dünyada yumuşak çürüklük denince akla ilk gelen patojen gruplarını oluşturmaktadır. Bu nedenle yapılmış olan bu çalışmada da bu patojenler ile ilgili hemen hemen tüm çalışmalarda yararlanılmış olan morfolojik ve biyokimyasal testlerden en önemlileri olduğu düşünülen testlere yer verilmeye çalışılmıştır.

Sonuç olarak; daha önce bu cinse ait türler ile ilgili yapılmış olan birçok çalışmada da kullanılan aynı morfolojik ve biyokimyasal testlerden elde edilmiş sonuçlar incelendiğinde bu çalışmada belirlenen sonuçlar ile büyük oranda benzerlik olduğu tespit edilmiştir (Aysan ve ark., 2005; Boyraz ve ark., 2006; Van Der Merwe, 2009; Maisuria and Nerurkar, 2012).

Mikroorganizmaların tanısında yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemlerden birisi olan PCR yöntemi; bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir (Schochetman and Jones, 1988; Arda, 1995).

Çalışmada 16S rDNA-PCR metodunda universal primerler olan fD1 ve rP2 kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; bu cinslere ait izolatların yaklaşık 1500 bp uzunluğunda bant verdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Pectobacter* ve *Erwinia* cinslerine ait strainlerin 16S rDNA-PCR sonucunda yaklaşık 1500 bp uzunluğunda bantlar verdiği bildirilmiştir (Kang et al., 2003; Rattanasuk and Ketudat-Cairns, 2009; Santana et al., 2012).

Tüm bu sonuçlara göre; 7 farklı *P. caratovororum* subsp. *atrosepticum* ve 5 farklı *E. chrysanthemi* izolatlarının yapılan HR, patojenite ve pektolitik aktivite test sonuçlarına göre bazı meyve ve sebzelerde yumuşak çürüklük etmeni olduğu belirlenmiştir. Patojen olduğu belirlenen bu strainlerin MIS, BIOLOG, PCR (16S rDNA-PCR) ve bazı biyokimyasal testler ile kesin tanı ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Yapmış olduğumuz literatür taramasında ülkemizde bu izolatların bazı konukçularında yumuşak çürüklük etmeni olduğu ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

- Arda M, 1995. Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara, 432s.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, 1994. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York. 2.0.1–2.14.8
- Aysan Y, Karatas A, Cinar O, 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Protection*, 22 :6, 807-811.
- Boyras N, Bastas KK, Maden S, Yasar A, 2006. Bacterial leaf and peduncle soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* on Tulips in Konya, Turkey. *Phytoparasitica*, 34:3, 272-280.
- Brenner JD, Kieg NR, Garrity MG, 2007. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed p, 721-733.
- Choi O, Kim J, 2013. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Soft Rot on Paprika in Korea. *Journal of Phytopathology*, 161:2, 125-132.
- Dadaşoğlu F, 2007. Isolation and identification of bacterial strains with insecticidal activities against greenhouse and field pest. Atatürk University, Graduate School of Natural and Applied Science Institute, Department of Plant Protection, Master Thesis, 93 p.
- Dickey RS, Kelman A, 1988. *Erwinia*: "Carotovora" or soft rot group. In: Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria. p. Schaad, N.W. 2 ed. St. Paul: APS. pp. 44-59.
- 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.
- Hugh R, Leifson E, 1953. The taxonomic significance of fermentative vs. Oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bact.* 66: 24.
- Kang HW, Kwon SW, Go SJ, 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant pathol* 52: 127-133.
- Khoodoo MHR, Juafeerally-Fakim Y. 2004. RAPD-PCR fingerprinting and Southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains isolated from different aroid hosts and locations, *Plant Dis.* 88: 980–988.
- Kotan R, 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen patojen ve saprofitik bakteriyel organizmaların klasik ve moleküler metodlar ile tanısı ve biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 217s.
- Lazo GR, Gabriel DW, 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 77: 448-453.
- Lelliott RA, Dickey RS, 1984. Genus VII. *Erwinia*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, USA. pp. 469-476.
- Maisuria VB, Nerurkar AS, 2012. Characterisation and differantiation of soft rot causing *Pectobacterium carotovorum* of Indian origin. *Eur. J. Plant Pathol.* 136:1, 87-102.
- Mikicinski A, Sobiczewski P, Sulikowska M, Pulawska J, Treder J, 2010. Pectolytic bacteria associated with soft rot of calla lily (*Zantedeschia* spp.) tubers. *Journal of Phytopathology* 158: 201-209.
- Miller LT, 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol*, 16: 584-586
- Miller I, Berger T, 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. HewlettPackard Gas Chromatography Application Note, HewlettPackard Co., Alto, CA, 228-238.
- Ngadze E, Brady CL, Coutinho TA, Van Der Waals JE, 2012. Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, 134:533–549.
- Palacio-Bielsa J, Cambra MA, Lopez MM, 2006. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. *Annals of Applied Biology*. 148: 157-164.
- Perombelon MCM, Kelman A, 1980. Ecology of the Soft Rot *Erwinias*. *Ann. Rev. Phytopathol*, 18: 361-387.
- Pitman AR, Harrow SA, Visnovsky SB, 2010. Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *Eur J Plant Pathol.* 126: 423–435.
- Rahman MM, Eaquab Ali M, Khan AA, Hashim U, Akanda AM, Hakim MA, 2012. Characterization and identification of soft rot bacterial pathogens in Bangladeshi potatoes. *African Journal of Microbiology Research*, 6:7, 1437-1445.
- Rattanasuk S, Ketudat-Cairns M, 2009. *Chryseobacterium indologenes*, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin. *J. of Sci and Tech.* 31:4, 395-399
- Santana MA, Rodriguez M, Matehus J, Faks J, Bocsanczy A, Gerstl A, Romay G, Montilla J, Fernande CE, Moreno Zambrano N, Marval D, 2012. A New Bacterial Disease of Cassava in Venezuela Caused by *Enterobacter cloacae*. *International Journal of Agriculture Biology*, 14:2, 183-189.
- Sarris PF, Trantas E, Pagoulitou M, Stavrou D, Ververidis F, Goumas DE, 2011. First report of potato blackleg caused by biovar 3 *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Greece. *New Disease Reports*, 24, 21.
- Saygılı H, Aysan Y, Sahin F, Mirik M, Üstün N, 2005. Phenotypic characterization of tomato pith necrosis pathogens in Turkey. APS Annual Meeting, July 30-August 3, Austin, Texas, USA.
- Schochetman G, Ou CY, Jones WK, 1988. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*;158: 1154-7.
- Suparyono Pataky, JK, 1989. Influence of host resistance and growth stage at the time of inoculation on Stewart's wilt and Goss' wilt development and sweetcorn hybrid yield. *Plant Disease*, 73: 339-345.
- Tavasoli E, Marafat AR, Hassazadah N, 2011. Identity and genetic diversity of pectobacterium spp., causal agents of potato soft rot in Zanjan, Iran. *Africa journal of plant science*, 5:6, 329-336.
- Van Der Merwe JJ, Coutinho TA, Korsten L, Van Der Waals JE, 2010. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *Eur J Plant Pathol* 126: 175– 185.
- Van Vaerenbergh J, Baeyen S, De Vos P, Maes M, 2012. Sequence Diversity in the *Dickeya fliC* Gene: Phylogeny of the *Dickeya* Genus and TaqMan® PCR for '*D. solani*', New Biovar 3 Variant on Potato in Europe. *PLoS ONE* 7:5, e 35738.