T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞEKER PANCARINDAN İZOLE EDİLEN YUMUŞAK ÇÜRÜKLÜĞÜNE NEDEN OLAN *PECTOBACTERİUM BETAVSCULORUM*'UN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU

Belgacem HATTAB

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bitki Koruma Anabilim Dalını

Ağustos - 2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEKER PANCARINDAN İZOLE EDİLEN YUMUŞAK ÇÜRÜKLÜĞÜNE NEDEN OLAN *PECTOBACTERİUM BETAVSCULORUM'UN* BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU

Belgacem HATTAB

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Kubilay Kurtulus BASTAS

2019, 37 Sayfa

Jüri
Prof. Nuh BOYRAZ
Doç. Dr. Kubilay Kurtulus BASTAS
Dr. Öğr. Üyesi Nurgül KITIR

Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), endüstriyel ürünler arasında en önemli mahsullerden biri olarak kabul edilir. Bakteriyel yumuşak çürüklük hastalıkları oldukça tahrıpkardır ve şeker pancarında önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'de Konya ilinden 2016-2017 yetiştirme mevsimlerinde hastalıklı şeker pancarından izole edilmiş olan Pectobacterium ızolatları ile çalışmıştır. Bu izolatların tanımlanması ve karakterizasyonu için biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik ve moleküler temelli testler yapılmıştır. elde edilen izolatlar, 37° C'de, % 5 NaCl'de ve CVP ortamında gelişim göstermişlerdir. Pektolitik aktivite ve patojenite testlerinde olduğu gibi tütün yapraklarına aşırı duyarlılık testinde (HR) pozitif reaksiyon vermişlerdir. Katalaz pozitif, oksidaz negatif. İndol üretimi ve fosfataz testleri negatif reyaksyon vermişlerdir. Ek olarak izolatlar, glikoz, laktoz, maltoz, trehaloz ve α -metil glukositten asit üretimi için pozitiflik gösterirken, melibiozdan asit üretiminde negatif olmuştur. Tüm izolatların 16S-23S ITS bölgesi için Ll / G1 primerleri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; 13 adet *Pectobacterium betavsculorum* biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterize edilmiştir. İyi karakterize edilmiş patojenler konukçu - patojen etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olurdur, şeker pancarı üzerindeki bakteriyel hastalıkların mücadelesinde yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Şeker pancarı, Pectobacterium, PCR, Karakterizasyon, Yumuşak çürük.

ABSTRACT

MS THESIS

CHARACTERIZATION OF PECTOBACTERIUM BETAVASCULORUM ISOLATED FROM SUGAR BEET BY BIOCHEMICAL AND MOLECULAR METHODS

Belgacem HATTAB

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN PLANT PROTECTION

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Kubilay Kurtulus BASTAS

2019, 37 Pages

Jury
Prof. Dr. Nuh BOYRAZ
Assoc. Prof. Dr. Kubilay Kurtulus BASTAS (Advisor)
Assoc. Prof. Nurgul KITIR

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is considered to be one of the most important crops among industrial products. Bacterial soft rot diseases are highly destructive and cause significant losses in sugar beet. In this study, In Konya province (Turkey), Pectobacterium isolates that were isolated from diseased sugar beet during growing season on 2016-2017. Biochemical, physiological, morphological and molecular based tests were performed for the identification and characterization of these isolates. obtained isolates showed growth at 37 ° C, 5% NaCl and CVP medium. They reacted positively to tobacco leaves hypersensitivity test (HR) as well as pectolytic activity and pathogenicity tests. Catalase positive, oxidase negative. Indole production and phosphatase tests showed negative reaction. In addition, the isolates were positive for acid production from glucose, lactose, maltose, trehalose, and α-methyl glucoside, but were negative in acid production from meliboside. PCR analysis of all isolates were performed using L1 / G1 primers for 16S-23S ITS region. According to the results obtained; 13 Pectobacterium betavsculorum were characterized by biochemical and molecular methods. Well-characterized pathogens help to better understand host-pathogen interactions, will help in the fight against bacterial diseases on sugar beet.

Keywords: Characterization, PCR, Pectobacterium, Soft rot, Sugar beet.

ÖNSÖZ

I’m expressing my deep gratitude to my supervisor, Assoc. Prof. Dr. Kubilay Kurtulus BASTAS, for welcoming me to his research team. I’m thanking him warmly for his availability, and for his human and intellectual qualities that he has had with me throughout this thesis, I would also like to thank the members of the jury who agreed to read and review this work, Prof. Dr. Nuh BOYRAZ and Assoc. Prof. Dr. Nurgul KITIR

I’m grateful to Plant Protection Department members (Professors, Doctors and Master students) also my colleagues Aysegul GEDUK, Tibebu BELETE, Haris BUTT, Badel UYSAL Ozden SALMAN, and Inci SAHIN whose motivated me throughout this study.

This thesis work certainly would not have happened without the irreplaceable and unconditional support of all my family and especially that of my father, my mother, my brothers and my fiancee Elena. I’m indebted to their patience, understanding, love and encouragement.

Belgacem HATTAB
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

2.1. Şeker Pancarı **4**
2.2. Şeker Pancarı'nın Hastalıkları **8**
2.3. Yumuşak Çürük Bakterilerin Tanısı **14**
2.3.1. Fenotipik, Morfolojik ve Fizyolojik Çalışmalar 14
2.3.2. Genotipik Yöntemler 15

3. MATERYAL VE METOT **19**

3.1. MATERYAL **19**
3.1.1. Deneylerde kullanılan bakteri suşları 19
3.1.2. Kimyasallar 19
3.2. YÖNTEMLER **21**
3.2.1. Bakteriyel izolatların ekimi 21
3.2.2. Pektolitik aktivite 21
3.2.3. Tütün Bitkilerinde Aşırı Duyarlılık Reaksiyon (HR) 21
3.2.4. Biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik testler 21
3.2.5. Moleküler tanı testleri 24

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **26**

4.1. Araştırma Sonuçları **26**
4.1.1. *Pectobacterium* türlerinin biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik olarak tanımlanması 26
4.1.2. Moleküler Sonuçlar 32
4.2. Tartışma **33**

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **36**

5.1. Sonuçlar **36**
5.2. Öneriler **37**

KAYNAKLAR **38**

ÖZGEÇMİŞ **48**

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	baz çiftleri
CFU	Koloni Oluşturan Birim
BDT	Bağımsız Devletler Topluluğu
DNA	deoksiribonükleik asit
dNTP	2 '-deoksinükleosid-5'-trifosfat
EDTA	etilen diamin tetra-asetik asit
ve ark.	et alia (ve diğerleri)
FAOSTAT	Gıda ve Tarım Örgütü Kurumsal İstatistik Veri Tabanı
g	gram
s	saat
ha	hektar
İK (HR)	aşırı duyarlılık yanıtı
İTS	intergenik kopyalanmış boşluk bölgesi
kb	kilobaz çiftleri
KOH	Potasyum hidroksit
l	litre
M	molar
MgSO4	Magnezyum sülfat
dk	dakika
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	millimolar
NaCl	sodyum klorür
Pa	Pectobacterium atrosepticum
Pb	Pectobacterium betavsculorum
Pcb	Pectobacterium carotovorum subsp. Brasiliense
Pcc	Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
PCWDE'ler	bitki hücresi duvarı parçalayıcı enzimler
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması

sn	saniye
spp.	Türler
SRE	Yumuşak Rot Enterobacteriaceae
TAE	Tris bazı, asetik asit ve EDTA
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
micl	mikrolitre
%	yüzde
° C	santigrat derece

1. GİRİŞ

Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), dünya çapında tüketilen bitki olması yanında, ıslah araştırmalarının bir ürünü olarak da kabul edilmektedir. Ayrıca, genetik ve ıslah teknikleri ile bitki performansını arttırmak için bir model haline geldiği bildirilmektedir. Şeker pancarı bitkisi, yükselen tarımında katalizör olma rolünden dolayı tarihte de takdir edilmiştir. Avrupa'da yetiştirilen şeker pancarının, önceki küçük taneli monokültürü değiştirilerek ürün rotasyonu kavramını getirdiği kaydedilmiştir. Şeker pancarı ürün rotasyonu ile gübreleme, toprak verimliliğinin artırılması ve yabancı ot sorununun azaltılması için kullanılması yanında, işlenen şeker pancarından elde edilen pancar küspesi, pancar başı ve (kron) taç kısımlarından da hayvancılık için gıda kaynağı olduğu bilinmektedir (Harveson, 2015).

2017 yılında, Rusya Federasyonu dünyadaki ilk şeker pancarı üreticisi olmuş (küresel üretimin bir parçası olarak 51.933.913 ton, 301.015.696 ton), ardından Fransa, Almanya, ABD ve Türkiye ilk 5 şeker pancarı üreticisi olarak kaydedilmiştir (Anonim, 2019).

Amaranthaceae (eski adıyla *Chenopodiaceae*) familyasının bir cinsi olarak ele alınan şeker pancarı, halofit (tuzlu toprakta yetişebilen) olan, İsviçre pazı, yem pancarı ve kırmızı pancar gibi çeşitleri içeren faydalı bir kültür bitkisi olarak kabul edilmektedir (Elliott ve Weston, 1993; McGrath ve ark., 2011).

Şeker pancarı, (kron) taç, boyun ve kök olarak adlandırılan üç bölümden oluşmaktadır. Taç (kron) kısımdan yapraklar, köklerinden ise şekerin depolandığı kök kısmı oluşmaktadır (Singh ve Agrawal, 2007).

Şeker pancarının endüstriyel yan ürünü (pancar pekmezi), herhangi bir değişiklik yapmadan fermantasyon için kullanılabilecek serbest şeker içeridiği için biyoetanol üretiminde önemli hammadde olarak kullanılmaktadır. Çiğ pancar suyu, % 85–90 oranında fermente edilebilir şeker ve % 10–15 oranında şekersiz kuru madde içermektedir (Hinkova ve Bubnik, 2001).

Şeker pancarı, *Aphanomyces* kök çürüğü (*Aphanomyces cochlioides*), *Cercospora* yaprak lekesi (*Cercospora beticola*), *Alternaria* yaprak lekesi (*Alternaria tenuis*) gibi çok çeşitli patojenlerin neden olduğu bazı fungal hastalıklarına duyarlı olduğu kaydedilmiştir. Görülen viral hastalıklar ise Rhizomania (Pancar Nekrotik Sarı Damar Virüsü (BNYVV)), Kıvırcık Tepeli Virüsü (Pancar kıvırcık üst virüsü (BCTV), Pancar Sarıları (Pancar Sarıları Virüsü (BYV)) olarak tespit edilmiştir. Bitkinin aynı zamanda çeşitli bakterilere karşıda hassas olduğu bildirilmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (Bakteriyel yaprak leke), *Pantoea aglomeratlar* pl. *beta* (Bakteriyel cep), *Pectobacterium betavasculorum* (bakteriyel

vasküler nekroz ve çürük) ve *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (bakteriyel yumuşak çürük) gibi bakteriyel hastalıklara şeker pancarında rastlamaktadır (Draycott, 2006).

Enterobacteriaceae familyasının üyeleri olan, *Pectobacterium* ve *Dickeya* türleri, pektolitik yapıları ve daha yakın zamanda *Enterobacteriaceae* nedeniyle genel olarak yumuşak çürüklüğe sebep olan bakteriler olarak bilinmektedir (Charkowski ve ark., 2012).

Pectobacterium cinsi, dünya çapında çok çeşitli ürünlerde birçok hastalığa neden olmaktadır. *Pectobacterium* spp., kapalı tohumlular, toprak, su, böcekler, yumuşakçalar, monokotiledon ve dikotiledon bitkilerin yarısından fazlasındaki bitkilerden izole edilmiştir (Ma ve ark., 2007; Glasner ve ark., 2008). Gram negatif bakteriler, çubuk şeklinde, fakültatif anaeroblardır ve çok çeşitli bitki hücresi duvarı tahrip edici enzimler üretiklerinden dolayı, blackleg ve yumuşak çürüme gibi hastalıklara neden oldukları bilinmektedir. Yumuşak çürük *Enterobacteriacea*, 5 takım içinde 10 monokotiledon ve 11 takım içinde 16 dikotiledon bitki familyası içinde bulunan çok geniş bir konukçu yelpazesine sahip olduğu kaydedilmiştir (Ma ve ark., 2007).

P. atrosepticum, *P. wasabiae*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, çeşitli ürünlerde hastalıklara neden olmakla birlikte, *P. cacticida* ve *P. betavasculorum*, yalnızca sırasıyla kaktüslerden ve şeker pancarından izole edilmiştir (Alcorn ve ark., 1991; Gardan ve ark., 2003).

Tarlada ve serada yumuşak çürüklük *Enterobacteriacea*'ya atfedilen zararlar, mahsulün yetiştirilmesi, üretilmesi veya hasattan sonra depolanması sırasında meydana gelebilmektedir (Lee ve ark., 2012). Yumuşak çürüklük *Enterobacteriacea*'nın konukçu çeşitliliği ve büyüme sıcaklığı, iklimsel dağılımla doğru orantılı olmaktadır. Patateslerde ve pek çok sebze ve meyvede yumuşak çürümeye neden olan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) geniş bir bitki dizisini enfekte eder ve ılıman ve tropik bölgelerde bulunmaktadır. *Pectobacterium atrosepticum* (syn. *Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*)'ın ise esas olarak sıcak iklimlerde ve neredeyse sadece patateslerde sınırlı olduğu bilinmektedir (Elphinstone, 1987; Toth ve ark., 2003).

Uygun koşullar altında tohum kalitesi ve verimi etkileyerek, salgın hallerde önemli kayıplara neden olan yumuşak çürüklük hastalığı, tohum ile bulaşmakta ve şeker pancarı hastalıkları arasında en önemlilerinden biri olarak kabul edilmektedir. Türkiye'de şeker pancarı, bitki ve hayvansal üretim sektörlerinin gelişimine olan katkısı, endüstriyel girdilerin istifadesini en üst düzeye çıkarması, fiziksel yapıların iyileştirilmesi ve toprakların ekolojik dengesi ile ekilecek ürünlerin veriminin arttırılması gibi sebeplerden dolayı önemlidir. Şeker

pancarı, ayçiçeğinden 5 kat, buğdaydan 20 kat daha fazla iş olanağı sağlamakta, buğday ve ayçiçeğinden iki kat daha fazla mekanik ekime izin vermektedir. Taşımacılık sektörü için yılda 25-30 milyon ton iş hacmine yol açmaktadır. Ulusal Türkiye ekonomisine yapılan toplam ekonomik katkı yaklaşık 1,2 milyar dolar olduğu bildirilmektedir (Anonim, 2018).

Bu çalışmada amaç, patojeni biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle karakterize etme yanında, Türkiye'de Konya İli için önemini ortaya koymaktır. Bugüne kadar, nedensel ajanlar, semptomatolojik yöntemlere dayanarak belirlenemedi, çünkü bu yöntemler son derece etkilisizlerdi. Bireysel taksonun tam genom dizisine dayanan moleküler deneyler daha kolay erişilebilir hale gelinceye kadar, yumuşak çürüklük bakterileri tanımlanması ve farklılaştırılması mümkün olduğunda birkaç tamamlayıcı prob ya da yöntemin eşzamanlı kullanımına dayanan yöntemlerle tanılamaya devam edilecektir. Hastalıkla birlikte, uygun kontrol stratejilerinin geliştirilmesi öncelikle doğru tanımlamaya bağlı olduğu bildirilmektedir.

Bu amaçla devam eden araştırmada, *Pectobacterium* cinsinin türleri, tütün ve şeker pancarı bitkileri üzerinde patojenite testleri ile ve ayrıca farklı spesifik DNA oligonükleotit primerleri ile klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri kullanılarak moleküler seviyede karakterize edilmiştir.

Kontrol yöntemlerinin ve iyileştirme programlarının geliştirilmesi, *Pectobacteria*'nın neden olduğu bakteriyel yumuşak çürüklüğü hastalığının doğru ve kısa sürede tanımlanmasını kolaylaştıracaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Şeker Pancarı

Yabani deniz pancarı (*B. vulgaris* ssp. *maritima*) İngiltere, anakara Avrupa ve Kuzey Afrika kıyılarında yetişen şeker pancarının "ilk elçisi" olarak kabul edilmektedir. İlk olarak, insanlar pancarı, sebze ve bahçe bitkisi olarak kullanmışlar, ardından 17. yüzyılda, pancar tarla tarımı olarak ve Fransa ile Almanya'da hayvancılık için yem olarak kullanılmıştır (Francis, 2006).

Şeker pancarı, diğer büyük endüstriyel ürünler arasında en önemli mahsullerden biridir. *Beta vulgaris, Chenopodiaceae*'nin bir üyesi, iki yılllık ve halofit bir üründür. Dört ana tarımsal grubunu içeren oldukça değişken bir türdür: yaprak pancarları (İsviçre pazı gibi), bahçe pancarları (pancar gibi), yem pancarları (mangoldlar dahil) ve şeker pancarı (Elliott ve Weston, 1993). Bu gruplar şöyledir:

a) Yaprak Pancar Grubu (veya yeşillik pancarları): Bu grupta bulunan çeşitler, yaprak ve yapraklarının bir sebze olarak kullanıldığı Mangold, Ispanak pancarı ve Chard veya İsviçre pazısıdır.

b) Bahçe Pancar Grubu: Pancar kökü (betacyanidin'lerin varlığı nedeniyle yoğun kırmızı etli kök), en iyi bilinen örnektir, aynı zamanda bu gruptaki sarı ve pembemsi çeşitler, insan tüketimine adanmıştır.

c) Yem Pancar Grubu (Yem Pancar Grubu): Hayvancılık için yem olarak kullanılan geniş bir çeşit grubudur.

d) Şeker Pancarı Grubu: Yüksek sakaroz içeriği ve iyi ekstraksiyon özellikleri nedeniyle, bu grubun çeşitleri fermantasyon yoluyla sakaroz ve etanol üretimi için kullanılmaktadır (Lange ve ark. 1999) (Şekil 1).

On dokuzuncu yüzyılın başlarından beri şeker pancarı, çeşitlerinin geliştirilmesi ve mümkün olan en düşük ekonomik ve çevresel maliyetlerle kök ve sakaroz potansiyelini en üst düzeye çıkarması gibi amaçlarla araştırmacıların ve yetiştiricilerin dikkatini çekmektedir. Geleneksel olarak, erkek kısırlığı, monogerm tohumu, zararlı ve hastalık direnci ve daha sonra hibrid gelişimi, şeker pancarı ıslahında en üretken evrimlerden olmuştur (Richardson, 2010).



Şekil 2.1. 4 grupta sınıflandırılmış *Beta vulgaris* (a) Yaprak Pancar, (b) Bahçe Pancar, (c) Yem Pancar ve (d) Şeker Pancarı.

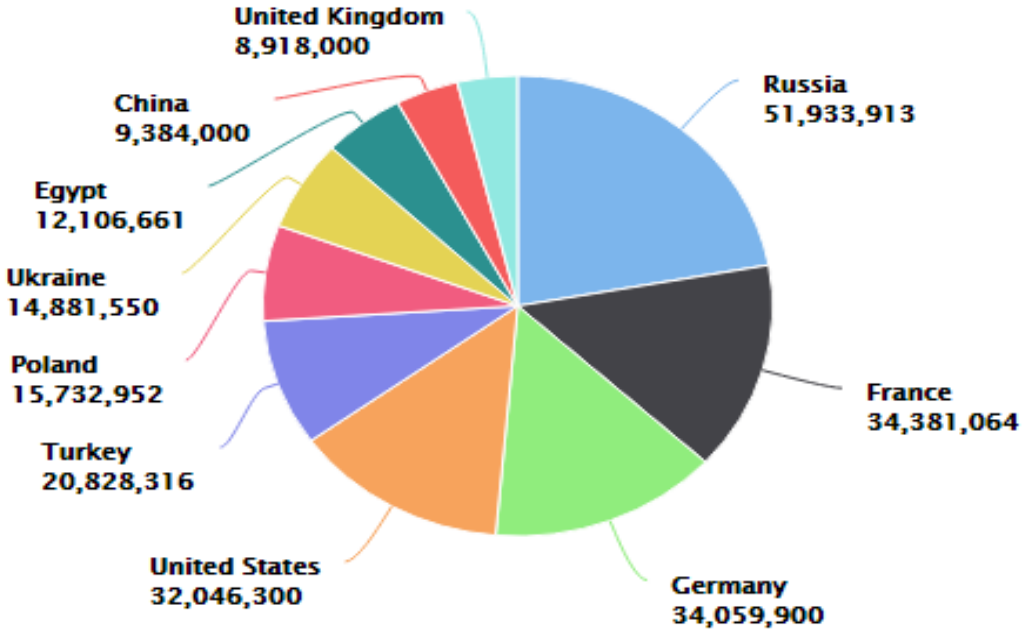
B. vulgaris çeşitlerinin coğrafi dağılımı Tablo 1'de gösterilmektedir (Mansfeld, 1986)

Tablo 2.1.1. Ekili *Beta vulgaris* formlarının dağılımı

Türler	var.	Ortak ad	Dağıtım
Beta vulgaris	*flavescens*	İsviçre pazı	Orta, batı ve güney Avrupa, Asya
Beta vulgaris	*cicla*	Ispanak pancar	Orta, batı ve güney Avrupa, Asya
Beta vulgaris	*lutea*	Sarı pancar	Orta, batı ve güney Avrupa, Asya
Beta vulgaris	*rapacea*	Yem pancarı	Avrupa; Bağımsız Devletler Topluluğu (BDT); Kuzey Amerika
Beta vulgaris	*altissima*	Şeker pancarı	Avrupa; BDT; Çin; Asya; Kuzey Amerika; Güney Amerika
Beta vulgaris	*vulgaris*	Kırmızı pancar (pancar)	Orta, batı ve güney Avrupa; Asya; Batı Hindistan

Sakarozun yanı sıra; melas, kuru kök posası ve monosodyum glutamat, bir çeşit amino asit tuzu (yiyeceklerin tadını arttırmak için kullanılan), şeker pancarından elde edilmektedir. Yüksek oranda sindirilebilir lif ve enerji içeriği nedeniyle, sükroz ekstraksiyonundan sonra elde edilen şeker pancarı hamuru, süt ve sığır yetiştiriciliği endüstrisinde bir yem takviyesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yapraklardan ve taçlardan oluşan pancarların üst kısımları, sonbaharda bir gübre olarak kullanılabilmekte ve toprağa, organik madde ve besin maddesi olarak geri gönderilmektedir (Cariolle ve Duval, 2006).

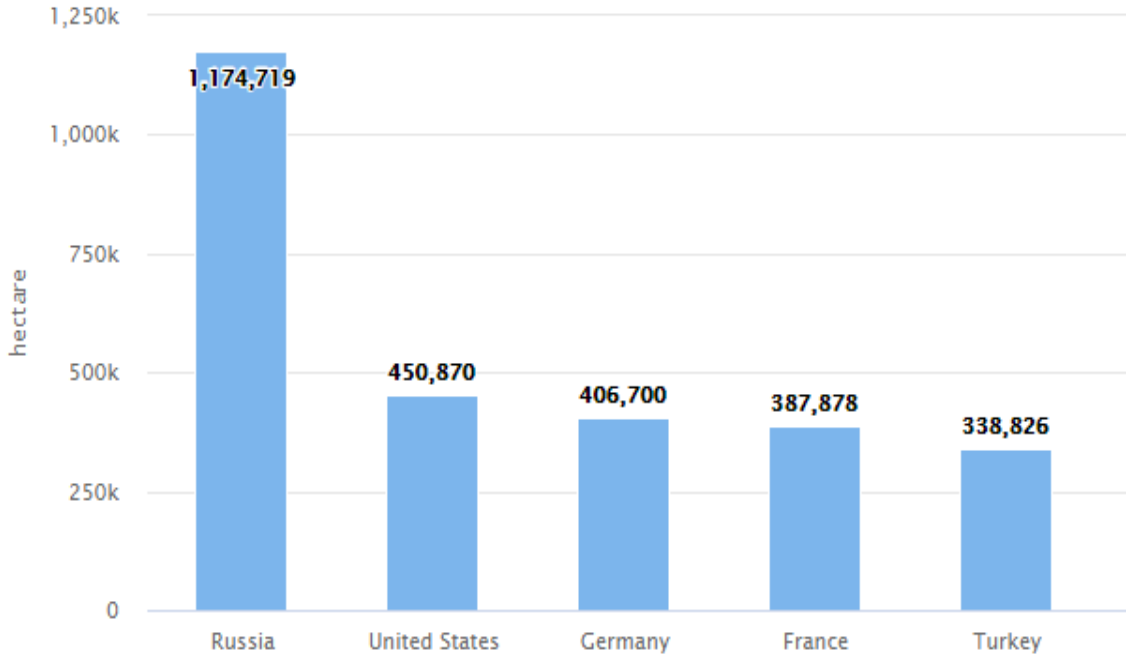
2017 yılında küresel üretim 301.015.696 ton olarak gerçekleşmiştir. Dünyada Rusya, 1.174.719 ha, Fransa 34.381.064 ton (387.878 ha), Almanya 34.059.900 ton (406.700 ha), ABD 32.046.300 ton (450.870 ha) ve Türkiye 20.828.316 (338,826 ha) olmak üzere ilk 5 şeker pancarı üreticisi ülke oldukları bildirilmektedir (Şekil 2 ve 3) (Anonymous, 2019).



Şekil 2.2. 2017 yılında Şeker pancarının üretim miktarı (Ton).

Avrupa'da sürdürülebilir şeker pancarı üretiminin gelişmesinin ana faktörleri şunlardır:

- Kazanç, 1 ton şeker pancarı ve 1 ton şeker maliyetini düşüren (düşük maliyetli üretim)
- Çevre, yetiştirme koşulları, şeker pancarı verim potansiyelinin kullanım çeşitleri
- Personel, yönetim kalitesi
- Şeker pancarı endüstrisi ile şeker pancarı yetiştiricileri arasında dürüst ve karşılıklı işbirliği (Řezbová ve ark., 2013).

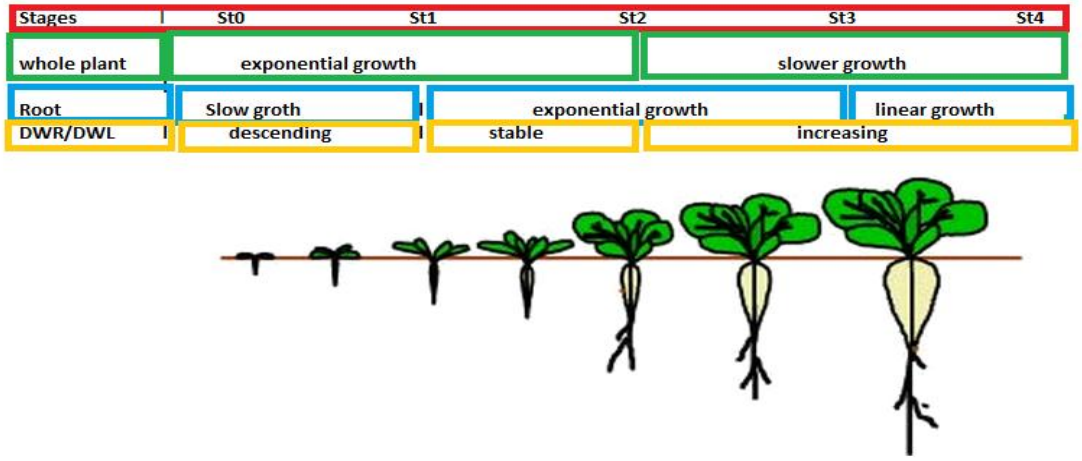


Şekil 2.3. 2017 yılında Şeker Pancarının hasat alanı (hektar)

Ilıman iklimlerde şeker pancarı, Karyofilaillerin (Caryophylalles) sırasına ait önemli bir üründür, tahmini genom büyüklüğü 714-758 megabaz olan 2n = 18 kromozomlu bir diploid (Arumuganathan ve Earle, 1991) ve diğer eudicot bitkileri ile atasal bir genom triplikasyonunu paylaşmaktadır (Dohm ve ark. 2009). Şeker pancarının avantajları daha yüksek verim, daha düşük mahsul üretim döngüsü (hızla büyüyen mahsul), çok çeşitli iklim değişikliklerine yüksek toleranslı ve düşük su ve gübre gereksiniminin olmasıdır. Şeker kamışıyla karşılaştırıldığında, şeker pancarı % 35–40 daha az gübre ve su gereksinim duymaktadır (Balat ve Balat, 2009).

Kuru biyokütle ve allometrik (biyolojik ölçeklendirme) ilişkilerinde şeker seviyelerinin dengelenmesine dayanarak (Fleury ve Caneill, 1984) vejetatif döngüsü boyunca şeker pancarı aşamalarının gösterilmesi amaçlanmaktadır. Buna göre 6 aşama: çimlenme, çıkma (St0), ilk yaprak çiftinin görünümü (St1), üssel yaprak büyümesinin sonu (St2), üssel kök büyümesinin sonu (St3) ve kuru maddeye göre şeker içeriğinin artmasının sona ermesi (St4) şeklinde tanımlanmaktadır (Şekil 4).

En etkili büyüme faktörleri, büyümenin temel aşamalarındaki sıcaklık, yağış dağılımı ve güneş ışınımının yoğunluğu (gölgelikle kesişmeyle ilişkili olarak) olarak bildirilmektedir. Şeker pancarının verim potansiyeli bu faktörlere dayanmaktadır (Kenter ve ark. 2006).



Şekil 2.4. Şeker Pancarı yaşam döngüsü

Sağlam ve mükemmel şeker pancarı bitkileri için, büyüme döngüsü boyunca toplam kuru madde miktarı, kanopinin hedeflediği radyasyon miktarıyla doğru orantılıdır (Jaggard ve Qi, 2006). Ayrıca ekim tarihi; tohum sıcaklığındaki toprak nemine ve nem oranı % 20–23, hava sıcaklığına göre 15–25 °C olan toprak sıcaklığına ve bulununan lokasyona bağlı olan çimlenme yüzdesinde, önemli bir rol oynamaktadır (Khan, 1992; Rajic, 1994) (Tablo 2).

Tablo 2.1.2 Çeşitli ortamlarda şeker pancarı fenolojisi

	Ekim Dönemi	**Ekim Yetiştiriciliği**	**Ekim maksimum kanopi örtüsü**	**Ekim başlangıcı kanopi yaşlanması**	**Ekim-olgunluk**
Akdeniz Ülkeleri	Kasım	10-14	100-130	130-160	200-250
	Şubat	16-20	80-100	100-130	150-180
Kuzey Avrupa	Mart	18-22	80-100	100-120	160-190
	Nisan	18-22	70-90	90-120	150-180
Hindistan	Ekim	8-12	40-60	60-80	120-140
ABD	Eylül	8-20	90-110	110-130	240-270
	Mart	16-20	80-100	100-120	170-190
	Haziran	7-17	70-80	80-90	130-150

2.2. Şeker Pancarı'nın Hastalıkları

Bilindiği gibi şeker pancarı için önleyici ve kontrol kriterleri zaman içinde alınmazsa, şeker pancarı verimini radikal bir şekilde azaltma ihtimali olan çok çeşitli hastalıklara sahip olduğu bilinmektedir (Gatineau ve ark. 2001). Şeker pancarında, Aphanomyces kök çürüklüğü (*Aphanomyces cochlioides*), Cercospora yaprak lekesi (*Cercospora beticola*), Alternaria yaprak lekesi (*Alternaria tenuis*) ve Fusarium Yellows (*Fusarium oxysporum* sp.

betae) gibi çok sayıda mantar hastalıkları, Rhizomania (*Pancar nekrotik sarı damar virüsü* (BNYVV), Kıvırcık Top (*Pancar kıvırcık üst virüsü* (BCTV) ve Pancar Sarıları (*Pancar Sarıları Virüsü* (BYV)) gibi bazı viral hastalıklar kaydedilmiştir (Draycott, 2006).

Düşük oksijen seviyeleri, optimum sıcaklıklar ve suya erişebilirlik gibi çevresel faktörler bakteri üremesi ve hastalık gelişimi için çok önemlidir ve bunlar enfeksiyon başlangıcında ve konukçu dokularda hastalığın gelişmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Pérombelon, 2002). Etli bitkiler (şeker pancarı, patates vb.) tarladaki veya depodaki bakteriyel hastalıklara karşı hassastır, bu tür hastalıklara sürekli olarak mevcut olan bakteriler neden olmaktadır. Onlardan bir kısmı patojen değildir, saprofitik veya yan parazitler olarak ortamda bulunurlar, diğerleri ise yaşayan dokulara saldıran, etli sebzelerde ve süs bitkilerinde geniş kapsamlı kayıplara yol açan ve yumuşak çürüklüğe neden olan nekrotrofik bakteriler olduğu bildirilmektedir (Agrios, 2006).

Şeker pancarı üzerindeki bakteriyel hastalıklar ılık sıcaklıklarda (24-28 °C) yaygın olarak görülür, bu ürün, bakteriyel vasküler nekroz ve çürümenin neden olan *P. betavasculorum*'dan ciddi şekilde etkilenebilimektedir (Zidack ve Jacobsen, 2001). Kronların ortasındaki beyaz köpük, yaprak sapları boyunca siyah çizgiler ve şiddetli kök çürüklüğünü izleyen solgunluk, yaprak belirtileri iken yumuşaktan kuruya doğru değişen kök, nekrotik vasküler demetler ise kök belirtileri olarak kaydedilmiştir (Draycott, 2006). Bilindiği üzere *P. betavasculorum, Pectobacterium* spp.'nin konukçu aralığında değildir çünkü sadece şeker pancarında görülmektedir. Ayrıca, yapay olarak aşılanan *P. Betavasculorum*'ın, konukçuları etkileyebileceğini gösteren birkaç çalışmada, kullanılan konukçuların bazılarının genetik olarak *Beta maritima, B. corolliflora* ve *B. macrocarpa* gibi şeker pancarı ile ilişkili olduğu, diğer konukçuların ise enginar, tatlı patates, kabak, turp, domates, salatalık, krizantem, ayçiçeği, havuç, patates, kavun, mısır ve patlıcan olduğu gözlemlenmiştir (Thomson ve ark., 1977; Saleh ve ark., 1996; Harveson ve ark., 2009; Nedaienia ve Fassihiani, 2011).

Pancar tüberkülozu, *Xanthomonas beticola*'dan kaynaklanmaktadır. Hastalık, köklerin veya gövdelerin üst kısmında düzensiz şekilli bir büyüme olarak ortaya çıkar ve *Rhizobium radiobacter*'ın (eski adıyla *Agrobacterium tumefaciens*) neden olduğu kök borusu hastalığıyla karıştırılabilmektedir (Moliszewska ve ark., 2016).

Pseudomonas syringae pv. *aptata*, şeker pancarı bakteriyel yaprak leke hastalığının nedensel ajanı olduğu bilinmektedir. Bakteriyel aşılama, yağmur, mekanik ve böcek yaralanmaları ile (yağmur mevsiminde) yayılmaktadır. Bakteriyel yaprak lekesi, çapı 4-7 mm arasında değişen düzensiz şekilli dairesel lekelere üretmektedir. Lekeler ten rengi ile koyu

kahverengi, merkezlerini çok koyu ile neredeyse siyah renkli sınırlara sahip olduğu bilinmektedir (Windels ve ark. 2003).

1998'den beri Soft Rot *Erwinia* iki cinse ayrılmıştır: *Pectobacterium* ve *Dickeya* (eskiden *Erwinia chrysanthemi*, Ech) (Hauben vd., 1998). Her iki cins de pektinolitik (pektik enzimleri serbest bırakma yeteneğine sahiptir) bakterilerdir ve bunlar karadok ve yumuşak çürüklük hastalıklarının sıradan ajanlarıdır (Perombelon ve Kelman, 1980; Toth ve ark., 2003). Yumuşak çürüklük ve kara bacak bakterileri steril suda 200 günden fazla hayatta kalabilmektedir (Cother ve Gilbert, 1990).

Moleküler, biyokimyasal ve konukçu aralığı farklılıklarına bağlı olarak, *Pectobacterium* cinsi çeşitli türlere ve alt türlere ayrılmıştır (Ma ve ark. 2007). Etli sebzelerin ve süs bitkilerinin yumuşak çürüklüğünde altıdan fazla cins pektoral bakteri türü bulunabilmekte; *Pectobacterium, Pseudomonas, Clostridium, Bacillus, Cytophaga* ve *Xanthomonas* (Elbanna ve ark., 2014). *Pectobacterium, Proteobacteria* filumu, *Gammaproteobacteria* sınıfı, *Enterobacteriales* takımı ve Enterobacteriaceae familyasına bağlıdır (Aremu ve Babalola, 2015). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) çok çeşitli bitkileri enfekte etmekte ve hem ılıman hem de tropik bölgelerde bulunmakta, patateslerin ve birçok meyve ile sebzenin yumuşak çürüklüğüne neden olmaktadır (Toth ve ark., 2003).

P. carotovorum subsp. *carotovorum*'un 0.5–0.7 1.2–2.2 μm'ye ulaştığı tahmin edilmektedir (Ni ve ark., 2010). Pcc, hasat sonrası kayıplar açısından ekonomik olarak önemli bir patojendir ve depolanmış meyve ve sebzelerde çürümenin yaygın bir nedeni olduğu bilinmektedir (Pérombelon, 2002). Havuç, patates, soğan, marul ve Çin lahanasını içeren geniş bir konukçu yelpazesine sahiptir ancak, *P. betavasculorum, P. atrosepticum, P. carotovorum* subsp. *odoriferum* ve *P. wasabiae*, sırasıyla şeker pancarı, patates, hindiba ve yaban turpu içeren nispeten dar bir konukçu aralığına sahip oldukları bildirilmektedir (Ma ve ark., 2007) (Tablo 3).

Ürdünün bazı bölgelerinde yapılan bir araştırmada, karnabahar, marul, patates, pazı, common mellow (Ebegümeci) , *Gladiolus* sp., lahana, domates, biber, ıspanak, tatlı kavun ve soğan gibi farklı bitkisel ürünlerden seksen yedi izolat bakteri izole edilmiştir. Yapılan çalışmalarda belirtildiğine göre tüm sebzelerde yumuşak çürüklüğün nedensel ajanının *Pectobacterium carotovorum* olduğu gözlemlenmiştir (Rajeh ve Hamed, 2000). Şeker pancarı ile ilgili *Pectobacteria* bakterileri Tablo 2.2.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2.1. Şeker pancarı ile ilgili Pectobacteria

Önerilen ad	Konuk	Kaynak
Pectobacterium betavasculorum (*Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum*)	Şeker pancarı (*Beta vulgaris*)	(Gardan ve ark. 2003)
Pectobacterium carotovorum (*Erwinia carotovora*)	Patates (*Solanum tuberosum*) Şeker pancarı (*Beta vulgaris*)	(Hauben ve ark. 1998)

Bakterilere neden olan tüm yumuşak çürüklük etmenleri ile karşılaştırıldığında Pcc en geniş konukçu aralığına sahip olduğu görülmektedir, bu nedenle hem içinde hem de çeşitli geniş konukçu aralığında ve çeşitli ortamlarda hayatta kalma kabiliyeti arttırdığı bilinmektedir (Perombelon ve Kelman, 1980).

Gecikme evresinde, yumuşak çürük *Pectobacteria*, sırasıyla toprakta, bitki yüzeylerinde ve yeraltı suyunda, bitkilerde, toprakta, endofitik olarak veya epifitik formda saprofitik olarak hayatta kalabilmektedir. Tipik olarak, bu patojenler doğal açıklıklar (örneğin lentisel ve stomalardan) veya yara alanlarından (örneğin fiziksel yaralanmalarda) girebilmekte ve vasküler dokularda kalarak, uygun çevre koşullarında (yeterli sıcaklık, oksijen varlığı ve serbest su) hücre içi boşluklarına kadar yerleşip, hastalık evrimi için uygun hale gelebilmektedir (Perombelon ve Kelman, 1980; Pérombelon ve Salmond, 1995; Parthiban ve ark., 2012). Bu süre zarfında üretilen pektik hücre dışı enzimler (ekzoenzimler) (örneğin, pektin metilesterazlar, pektat liazları, selülolitik enzimler); parankimatöz dokuların oluşumu ve toplu doku çökmesinden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Parthiban ve ark., 2012).

Çevresel faktörler, konak kökenleri, patojenlerin sinyalleri, Pectobakterilerin virülansında ve patojenitesinde önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir. Sıcaklığın enfeksiyon süreci üzerindeki etkileri, PCWDE'lerin (pektat liyaz, proteaz poliglakturonaz ve selüloz) üretimi gibi (Barras ve ark., 1994,), fitopatojenik toksinlerin üretimi (Hasegawa ve ark., 2005), harpin proteinin üretimi (Chatterjee ve ark., 2000) ve son fakat en az olmayan Quorum sensing sinyalleri gibi birkaçı sayılabilmektedir (Withers ve ark., 2001).

Yumuşak çürük Pectobakteriler dünya çapındaki dağılıma sahip patojenlerdir (Şekil 2.2.1.), çevresel faktörlerle ilgili olarak, sıcaklık uzun süredir yumuşak çürük patojenlerin epidemiyolojisi ile ilişkilendirilmiştir (Perombelon ve Kelman, 1980). Bakteriyel büyümeyi etkileyen en önemli fiziksel faktörlerden biri olarak kabul edilir (Todar, 2009). Pcc ırkları ılıman ve tropik bölgelerde birçok üründe yumuşak çürümelere neden olur ve *Dickeya dianticola*'dan çok bitki türlerinde hastalıklara neden olur (Graham, 1964).



Şekil 2.2.1 Pectobacterium betavasculorum'un küresel coğrafi dağılımı (Thomson ve ark, 1977; Saleh ve ark, 1996; Gardan ve ark, 2003; Rezaei ve Taghavi, 2010; Öztürk ve ark, 2019)

Yumuşak çürüklük bakterileri, yumuşak çürüklüğe neden olma hızları bakımından farklılaşmıştır, bu nedenle saklanan ekinleri sıvıya dönüştürmek için birkaç saat yeterlidir (Reddy, 2015). Sistematik enfeksiyona ek olarak, yumuşak çürüklük bakteri sonunda konukçu bitkinin ölümüne neden olmaktadır (Perombelon ve Kelman, 1980). Bu grup, farklı ürünleri ciddi şekilde etkileyebilmekte ve büyük hasara yol açabilmektedir. Bu nedenle, ilk on olarak sıralanan önemli bakteri patojenlerinden biri olarak sınıflandırılmaktadır (Mansfield ve ark., 2012).

Ürünün değeri ve atağın ciddiyeti ele alındığında, yumuşak çürüklük bakterilerinin neden olduğu kayıpların ekonomik önemi, oldukça önemli olabilmektedir. Bunun yanında, zararın doğru tahminleri mevcut değildir, dünya çapında yıllık olarak 50 ila 100 Milyon Dolara kadar ekonomik zarara neden olabilmektedir. Bu kayıpların büyüklüğü ülkeden ülkeye, iklim, büyüme ve depolama koşullarından göre değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (Perombelon ve Kelman, 1980). Beş Nijerya eyaletlerinde, hasat sonrası meyve çürüğü

domates hastalıklarına ilişkin yapılan bir araştırmada, şiddetli enfeksiyonlar esnasında, hasatta % 25 ve transit, depolama ve pazar tezgahlarında kalan ürünün % 34'ünün kaybına neden olabileceğini göstermiştir. Böylece, ürünün yaklaşık % 50'sinde genel bir kayıp meydana gelmektedir. Yumuşak ve kuru olmak üzere iki çeşit çürüklük tanımlanmıştır. Yumuşak çürüklüğün toplam kayıpların yaklaşık % 85'ini oluşturduğu bildirilmiştir (Fajola, 1979). Ayrıca California Keren'de (Farrar ve ark., 2009), hasat edilen patatesin % 30'unun *P. carotovora* subsp. *carotovora* tarafından etkilendiği tespit edilmiştir. Aynı şekilde, bu bakterilerin hasat sonrası hasara yol açtığı ve San Joaquin Vadisinde önemli kayıplara neden olduğu ortaya konmuştur. Bu arada, Endonezya, Malezya ve Singapur gibi ülkelerde, yüksek sıcaklık ve düşük taşıma sistemi altındaki dağıtım nedeniyle, yumuşak çürüklüğün lahanada ciddi şekilde zarar verdiği bilinmektedir (Higashio ve Yamada, 2004).

Cerkauskas ve ark., (1998), Güney Ontario eyaletindeki % 7.4'lük veya kültür crucidera sebzelerinin de, yumuşak çürüklük etmeni *Erwinia*'dan etkilendiğini, Bok Choy (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) için % 1 - 25 ve Çin ve Nappa lahanası (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) için % 75'ten daha fazla kayıp olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, Ontario'nun Niagara Bölgesi'nde (Kanada) bazı süs bitkileri (*calla lily*, *cyclamen* ve *poinsettia*), yumuşak çürüklük etmeni *Erwinia*'dan etkilenmiş ve 1 milyon dolara kadar yıllık ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Gracia-Garza ve ark. 2004).

2014-2015 yılları arasında Çin'deki Henan, Liaoning, Hebei, Shanxi ve Shandong illerinde salatalık bakteriyel yumuşak çürüklüğü gözlenmiştir. Hastalık etki alanı, çeşitli alanlarda % 15 ila % 50 olarak tahmin edilmiş, % 20 ila % 30 verim kaybına sebep olduğu görülmüştür (Meng ve ark., 2017).

Agrios'a (2006) göre, tarlada, transit ve depoda ya da pazarlama sırasında yumuşak çürüklük meydana gelebilmekte, sebze ve süs bitkilerinin etli depo dokularını da etkilemektedir. Yumuşak çürüklük, küresel ölçekte sebzelerin en tahrip edici hastalıklarından biridir, diğer tüm bakteriyel hastalıklardan daha fazla büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Hasat sonrası bakteriyel yumuşak çürüklük kayıplarının, hasat edilen mahsulün % 15-30 arasında değiştiği tahmin edilmektedir.

Pectobacterium türlerini ayırt etmek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. En sık kullanılan yöntemler biyokimyasal ve patojenite testleridir (Karnjanarat ve ark., 1987; Seo ve ark., 2002).

2.3. Yumuşak Çürük Bakterilerin Tanısı

2.3.1. Fenotipik, Morfolojik ve Fizyolojik Çalışmalar

Czajkowski ve ark. (2015) göre yumuşak çürük etmenlerinin tanısı, yarı seçici ortamlarda uygun bakteri hücrelerinin izolasyonu gibi bazı fenotipik yöntemlere dayanmaktadır. Aynı zamanda çeşitli serolojik ve biyokimyasal testlere, biyolojik deneylere ve mikroskobik testlere tabi tutmuşlardır.

Seçici ortam kullanımına dayanan yöntemler, yumuşak çürük etmenlerinin tanılanmasında oldukça başarılıdır (Pierce ve McCain, 1992). Yumuşak çürük bakterileri izole etmek için dünya çapında en çok kullanılan besi yeri CVP'dir (Crystal Violet Pectate; Hélias ve ark., 2012). CVP kullanmanın amacı, yumuşak çürüklük etmeni *Erwinia*'nın besi yerinde oluşturmuş olduğu oyuk oluşumlarına göre tanılanmaktadır. Ancak bu besi yeri *P.c.* subsp. *carotovorum, P.c.* subsp. *odorifera, P.c.* subsp. *wasabiae* ve *P.c.* subsp. *betavasculorum*'un ayrımını yapamamaktadır (Cuppels ve Kelman, 1974).

Artan sıcaklıklarda yani Pa'nın 27° C'de geliştiği, Pcc'nin gelişiminin 27 ve 33.5° C'de ve *D. chrysanthemi*'nin 27, 33.5 ve 37° C' de gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu tanımlamalar genellikle geçici olarak kabul edilir ve değişen sıcaklıklarda gelişen bazı izolatlardan dolayı, farklı sıcaklıklarda büyüme her zaman kesin sonuç vermemektedir (Pérombelon ve ark., 1987). Biyokimyasal testler, şu anda yumuşak çürük *Pectobacteria*'nın tanımlanması ve taksonomisi için kabul edilmiş bir standarttır (Verdonck ve ark., 1987).

Saleh ve ark., (1996), yumuşak çürüklük ve vasküler nekroz simptomu sergileyen beş şeker pancarı kökü ve sapından beş adet bakteriyel izolat elde etmiştir. Bakterilerin şeker pancarına inoulasyonu, yaralı kökler veya zarar görmüş yan kökler yoluyla gerçekleşmiştir ve vasküler nekroz ve yumuşak çürüklük simptomlarının oluşmasına neden olmuştur. Bakteriler biyokimyasal (arginin dihidrolaz, katalaz üretimi, patatesin parçalanması, pektat, jelatin ve kazein) ve fizyolojik özellikleri (hareketlilik testi), patojenite testleri, yağ asidi bileşimi analizi ve elektron mikroskobu ile Pb olarak tespit etmişlerdir.

Sekiz tane pektolitik *Pectobacterium*, yumuşak çürümüş taç emperyal (Fritillaria imperialis) ampullerinden izole edildi ve İran'ın bazı eyaletlerinden (Kermanshah ve İsfahan) toplanan saplardan kaynaklanıyor. Fenotipik testlere göre sonuçlar; gram negatif, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde, peritrik kamçılıdır. Etmen oksidaz testine negatif sonuç verirken katalaz ve patateste pektolize oluşum testine pozitif reaksiyon vermektedir (Mahmoudi ve ark. 2007).

İran'da *Erwinia*'nın ilk izolasyonu çürümüş yumrulardan olmuştur. İklimim ılıman olması nedeniyle *Pectobacterium atrosepticum* ve *P. carotovorum* subsp. *carotovurum*, patates gibi önemli mahsullerin üretimini etkilemektedir (Hedjarood, 1967).

Daha önce yapılan çalışmalarda, yumuşak çürüklüğün neden olan bakterilerileri (*Pectobacterium* spp. ve *Dickeya* spp.) tespit etmek amacıyla, genellikle biyokimyasal testler kullanılmıştır. Biyokimyasal testlerin zahmetli olması ve zaman alması nedeniyle bu teşhis yöntemlerinin yerini daha hızlı ve güvenilirliği yüksek olan serolojik ve moleküler yöntemler almıştır (Czajkowski ve ark., 2015). Patogenez sürecinde, pek çok kimyasal madde, pektin, trehalozun fermente edilmesi, mannitol, sorbitol, galaktoz, sitrat kullanımı, H_2S üretimi, indol üretimi vb. uygulamalar *Pectobacterium* türlerinin teşhisinde kullanılır, bu nedenle *Pectobacterium carotovora* alt türlerinin tespiti için kullanılmaktadır (Aneja, 2003)).

2.3.2. Genotipik Yöntemler

Darrasse ve ark., (1994), farklı konukçulardan, özellikle de patateslerden izole edilen pektolitik enzimler üreten 5 alt türü ayırmak için PCR-RFLP (kısıtlama parçası uzunluğu polimorfizmi) yöntemini kullanmışlardır. Pcc'ye özgü PCR yöntemi, üretilen enzimlerin sekansına ve bu enzimleri kodlayan *pel* genlerinin sekansına dayanarak geliştirilmiştir. Y1 ve Y2 olarak adlandırılan *pel* genlerini kodlayan bu primerler, PCR'de çoğaltıldığında 434 bp bant elde etmişlerdir. Bu primer çifti, Pa, Pw ve Po'yi tespit etmek için kullanılırken, Pb için kullanılamamaktadır.

Hélias ve ark., (1998) yumuşak çürüklüğe neden olan 140 izolatı (92 adet Pcc, 5 adet Pb, 6 adet Po, 32 adet Pa ve 5 adet Pw), Tunus, Réunion Fransa, ABD, Fas, Arjantin, Almanya, Cezayir, Meksika, Japonya, Kongo, İspanya ve Hollanda gibi farklı coğrafi bölgelerden ve çeşitli konukçulardan (Patates, Domates, İris, Marul, Siklamen, Kereviz, Philodendron, Karnabahar, Ayçiçeği, Arum, Primula, Biber, Enginar, Şeker Pancarı, Witloof hindiba, Sümbül, Yaban turpu, Pırasa) izole etmişlerdir. Elde edilen izolatları Yl ve Y2 primerleri kullanılarak PCR testine tabi tutmuşlardır.

Kang ve ark., (2003), EXPCCR ve EXPCCF primerlerini kullanarak çeşitli konukçulardan ve coğrafi bölgelerden elde edilen bakteri izolatlarınının tanısı için PCR temelli bir yöntem geliştirmişlerdir. 550 bp'lik bant elde ederek Pcc'yi tespit etmişlerdir.

Mahmoudi ve ark., (2007), İran'ın bazı eyaletlerindeki (Kermanshah ve Isfahan) *Fritillaria imperialis* bitkisinin taç yapraklar, soğan ve gövdesinden sekiz pectolitik *Pectobacterium* izolatı elde edilmiştir. Bu çalışmada, EXPCCF / EXPCCR ve INPCCR /

INPCCF primerleri kullanılmış ve sırasıyla 550 bp ve 450 bp'lik bant oluşturmuşlardır. Bu sonuçlar, bu konukçu bitkiden Pcc'nin tespitini ve tanısını doğrulamıştır.

Fassihiani ve Nedaeinia (2008), İran'ın Fars eyaletindeki şeker pancarı bitkilerinden yumuşak çürüklüğe neden olan otuz adet Pc (*Pectobacterium carotovorum*) fenotipik olarak ve bütün hücreli protein elektroforez paternleri ile karakterize etmişlerdir. Fizyolojik ve biyokimyasal testler ve protein profillerinin sonuçlarına dayanarak izolatların heterojen olduğunu ve elde edilen izolatların % 27'sinin *Pectobacterium betavasculorum* (Pb) olduğunu belirlemişlerdir.

Pitman ve ark., (2008) Yeni Zelanda'da, 89 pektolitik *Enterobacteria* izolatlarını patateslerden izole etmişlerdir. Türler ve alt türlere özgü PCR primerleri (*P. atrosepticum*'u tanımlamak için ECA1f ve ECA2r) kullanılmıştır. Pcc, Pcb ve Dickeya strainleri arasında ayrım yapmak için spesifik PCR testi Y1 / Y2 (*Pel* geni), BR1f / L1r ve indC-F1 / indC-R3 primerleri kullanılarak yapılmıştır. 89 izolattın 73'ünde 434 bp'lik bant elde edilmiştir.

İsrail, Kazakistan, Polonya ve Hollanda'da ticari olarak ekili bitkilerden (Monokotlar ve Dikotlar) Kırk yedi Pcc izolatı 16S rRNA çeşitli genetik (dizi kümelemesi, intergenik kopyalanmış spacer-PCR (ITS-PCR) bantlama modeli ve çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP)) analizlerle belirlenmiştir. Sonuçlar, Pcc izolatlarının konukçu patojen interaksiyonu arasındaki etkileşimde bir evrimsel uzmanlaşma eğilimini ortaya çıkardığını göstermiştir (Yishay ve ark., 2008).

2001 yaz sezonunda, Sele vadisindeki enginarlardan (Campania, güney İtalya) 24 *Pectobacterium* izolatı elde edilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Y1 ve Y2 (*P. carotovorum* için spesifik) ve Y45 ve Y46 (*P. atrosepticum* için spesifik) gibi primerlerle gerçekleştirilmiştir. 24 izolatın 20'si, pektat-liyazı kodlayan *Pel* geni amplifiye eden 434 bp'lik bant oluşturarak ve *Pectobacterium carotovorum* olarak tespit edilmiştir. kalan izolatlar ise (4 izolat) Pel gen üzerinde PCR-RFLP'ye tabi tutulmuştur. 3'ü Pcc ve 1'i Po olarak tanılanmıştır (Gallelli ve ark., 2009).

2006-2007 yıllarında, Pcc'yi standart PCR analizleriyle tanımlamak amacıyla, İran Fars Eyaletinden biber, patates, şeker pancarı, lahana, havuç, soğan ve marul gibi enfekte olmuş bitkilerden 42 izolat elde edilmiştir. EXPCCR (5'-CCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG-3') ve EXPCCF (5'-AACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3') primerlerini kullanarak bütün izolatlardan beklenen 550 bp'lik bant elde etmişlerdir (Rezaei ve Taghavi, 2010).

Zhu ve ark., (2010), Otuz iki *P. carotovorum* ssp, Çin lahanası ve diğer sebzelerden izole etmişlerdir. Bu izolatlar, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testlerin yanı sıra 16S

rDNA dizi analizine tabi tutulmuştur. 11 izolat Pco olarak sınıflandırılmış ve 21 izolat Pcc olarak belirlenmiştir.

Terta ve ark., (2012), Fas'ın çeşitli bölgelerinden, patates yumrularından 22 *P. carotovorum* izolatı toplamışlardır. Pektat-liyazı kodlayan 434-bp DNA fragmanını elde etmek için Y1 ve Y2 primerlerini kullanmışlardır.

Nazerian ve ark., (2013), Pahang eyaletindeki (Malezya) seralardan ve tarlalardaki marullardan (*Lactuca sativa* var. Romana) dokuz adet *P. carotovorum* izolatı elde etmişlerdir. Tüm izolatlar, Y1 ve Y2 primerleri kullanılarak Pcc olarak belirlenmiştir.

Faquihi ve ark., (2015), 2012 ve 2013 yılları arasında Fas'ın farklı bölgelerinden toplanan patateste yumuşak çürüklüğe neden olan Pcc etmeninden 30 izolat elde edilmiştir, LPGA üzerinde 24 saat boyunca 27° C'de geliştirilmiş ve gram boyama, katalaz, oksidaz, hareketlilik, glukoz fermantasyonu, redüktaz ve pektinolitik aktivite testine tabi tutulmuştur. Buna ek olarak, Tütün aşırı duyarlılık testi ve Patates yumuşak çürüklüğü testi (doku maceration) gibi patojenite testlerine tabi tutulmuştur. Toplam genomik DNA'nın PCR amplifikasyonu, Pcc'nin tespiti için EXPCCF / EXPCCR, INPCCR / INPCCF ve Y1 / Y2 primerleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Y1 / Y2 primerleri 434 bp, EXPCCF / EXPCCR primerleri 550 bp ve bcPC / INPCCF primerleri 400 bp'lik bant oluşturmuştur.

Dadaşoğlu ve Kotan, (2017), çeşitli konukçulardan (ikisi patatesden, diğeri ikisi soğan ve biberden) elde edilen dört farklı Pcc strainin tanısı ve karakterizasyonu için bazı biyokimyasal ve moleküler analizlere (16S rDNA ve spesifik PCR) yapmışlardır. Tüm izolatların cins düzeyinde tanılanması, 16S rDNA PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra spesifik PCR testleriyle, bu dört izolat analiz edilmiş ve Y1-Y2 primerleriyle 434 bp'lik bant oluşturmuştur.

Abu-Obeid ve ark., (2017), çürük patates yumruları örneklerinden 131 izolat elde ederek, besi yerinde 24 saat 27° C'de geliştirmişlerdir. Elde edilen İzolatlar biyokimyasal ve fizyolojik testlere (oksidaz, katalaz patates yumuşak çürüğü, oksidatif fermentat, 37º C'de gelişim, sodyum klorür toleransı, sukrozdan indirgen maddeler, üreaz üretimi ve karbonhidratlardan asit üretimi) tabi tutulmuştur. EXPCCR / EXPCCF primerleri kullanılark PCR ile tanısı yapılmıştır. Primer seti, toplam genomik DNA'dan tek tek 550 bp'lik bir fragmanı amplifiye etmiştir ve 67 adet Pcc izolatı elde edilmiştir. Nested PCR'da INPCCR / INPCCF primer seti, ilk PCR amplifikasyonunun PCR ürününden 400 bp'lik fragmanı amplifiye etmiştir. Bu primerlerin kullanımı, biyokimyasal olarak Pcc olarak tanımlanan bütün izolatların tespiti için güvenilir değildir. Çürüklüğe neden olan farklı patojenleri PCR amplifikasyonu ile tespit edip sekanslamışlardır.

2015 yılında Türkiye'de Samsun, Amasya, Çorum ve Yozgat illerinden toplanan patates bitkilerinden 26 pektinolitik strain izole edilmiştir. 26 izolattan 16'sı Multiplex PCR ve türlere özgü PCR ile test edilmiş ve bir adet izolat Pcb , dört adet izolat Pa, beş adet izolat Pcc ve altı adet izolat *P. parmentieri* olarak tanılanmıştır (Öztürk ve ark., 2018).

Kenya Cumhuriyeti'nde (Nakuru ilçesinde Molo ve Mau Narok bölgeleri) yumuşak çürüklük simptomu gösteren patates yumrularından elde edilen 71 izolat, CVP besiyerinde pozitif sonuçlar vermiştir. 16S rDNA amplifikasyonuyla 36 izolatın tamamı 1500bp'lik bir bant oluşturmuştur. BIOLOG mikrobiyal tanıma sisteminin kullanımı sonucu: 9 *Pseudomonas fluorescens* A, 7 *Pseudomonas fluorescens* B verirken, 20 bakteriyel izolat Pcc olarak tespit edilmiştir. Pcc olarak tespit edilen 20 izolat, pektat liaz kodlayıcı Pel genini amplifiye eden Yl / Y2 primerleri kullanılarak 434bp'lik bir bant elde edilmiş ve PCR ile bu sonuçlar desteklenmiştir (Muturi ve ark., 2018).

Smith ve Bartz (1990), yumru ve meyvelerde yumuşak çürüklüğe neden otuz yedi *Pectobacterium* strainin saldırganlığının strainler arasında belirgin farklılıklar gösterdiğini, fakat bir konukçudaki nispi saldırganlık, her zaman diğer konukçudaki patojenite ile ilişkili olmadığını belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deneylerde kullanılan bakteri suşları

Bakteriyel izolatlar, BASTAS Laboratuarından 1.5 ml Eppendorf tüplerinde donmuş halde bulunan, Konya ilinde gerçekleştirilen TÜBİTAK (No: 115O562) projesi ile elde edilmiştir. Referans izolatlar Bozok Üniversitesi'nden (Türkiye) Dok. Öğr. Üye. Murat ÖZTÜRK' ten temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar

3.1.2.1. Besiyerleri

- **CVP medium** (Schaad et al., 2001)

• 1NNaOH	4.5 ml
• 10% $CaCl_2$'$2H_2O$	3.0 ml
• $NaNO_3$	1.0 g
• Agar	1.5 g
• Sodium polypectate	10 g
• SDS	0.5 ml
• 0.075% crystal violet	1.0 ml

Bir erlene 300 ml kaynamış saf su konularak sıcak bloklu manyetik karıştırıcıya yerleştirilmiştir., NaOH, $CaCl_2 2H_2O$, $NaNO_3$ ve agar eklenmiş ve 15 saniye boyunca yüksek hızla karıştırılmıştır. Ardından yavaş yavaş sodyum poliptat eklenmiştir. Daha sonra 200 ml kaynamış distile su eklenmiş ve tekrar 15 saniye karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyon 2 litrelik bir şişeye dökülmüş ve SDS ve kristal menekşe eklenmiştir. Elde edilen çözelti karıştırıldıktan sonra 25 dakika boyunca 120 °C'de otoklavlanmıştır. Steril koşullarda, besiyeri biraz soğuyunca petrilere dökülmüştür.

- **King B Besiyeri (KB)**(King et al., 1954)

	(g / L)
• Proteose Peptone	20.0
• Glycerol	0.01
• K_2HPO_4	1.5
• $MgSO_4.7H_2O$	1.5

- Agar agar 15.0

Malzemeler damıtılmış su içinde eritilmiş ve 20 dakika boyunca 120 ° C'de otoklavlanmıştır.

➢ **Nutrient agar (NA)** (Lelliott and Stead, 1987)

- Nutrient agar (Merck) 13 g/L

Nutrient agar steril damıtılmış su içinde eritilmiş ve 20 dakika boyunca 120 °C'de otoklavlanmıştır.

3.1.2.2. Tamponlar / Çözeltiler

➢ **Potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi (% 3)**

Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler arasında ayrım yapabilmek için, 100 g steril distile su içinde 3 g KOH eritilmiştir. Bu çözelti gram pozitif ve gram negatif bakterileri birbirinden ayırmak amacıyla kullanılmaktadır (Fahy ve Hayward, 1983).

➢ **Oksidaz testi çözeltisi**

- Tetra metil-p-fenilanamin dihidroklorür 1 g
- Damıtılmış su 100ml

Bu test, bir organizmanın sitokrom oksidaz enzimine sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılmaktadır. Taze olarak hazırlanmalı ve derin dondurucuda karanlık bir şişede muhafaza edilmelidir (Harley ve Prescott, 2002).

➢ **Indole testi çözeltisi**

1 g L-triptofan ve 10 g tripton, 1 L damıtılmış su (dH20) ile karıştırılmıştır. Sonra, pH 7.4'e ayarlanmıştır. Elde edilen solusyon, 5 ml'lik tüplere dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Ardından 48 saat 26-28 °C'de inkübe edilmiştir (Perombelon ve Van Der Wolf, 2002).

➢ **Tris-EDTA (10mM Tris, 1mM EDTA, pH:8) buffer**

0.3 g Tris-HCl ve 0.093 g EDTA saf suda çözülmüş ve pH-8'e ayarlanmıştır. Son hacim 250 ml'ye tamamlanarak otoklavda sterilize edilmiştir. Bu tampon, genomik DNA'nın izolasyonu için PCR analizlerinde kullanılmaktadır (Wilson, 2001).

- **10xTBE (Tris base-Boric acid-EDTA) buffer (pH: 8)**

500 g steril distile su içerisinde 40 g 0.5 M EDTA'ya 55 g borik asit ve 108 g Tris eklenmiş, karışımın pH'ı 8'e ayarlanmıştır. Toplam hacim steril damıtılmış su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Bakteriyel izolatların ekimi

İzolatlar, seçici ortam olan Crystal Violet Pectate (CVP) üzerinde tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Schaad ve ark., 2001). Petriler 28 °C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. pectolitik boşluğu (delik) oluşumu açısından pozitif olarak sonuç alınann izolatlar saflaştırılmıştır.

3.2.2. Pektolitik aktivite

Bu test patates yumruları (*Solanum tuberosum*) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Patates yumruları, % 70 etil alkol ile sterilize edilmiş, steril damıtılmış suyla durulanmış ve çapraz biçimde 10 mm kalınlıkta dilimler halinde kesilmiştir. Daha sonra bu dilimler Whatman filtre kağıdı tabakası içeren petri kabına yerleştirilmiştir.

Patates dilimlerine iğne yardımıyla delikler açılarak 50 ul bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. Kağıt 5 ml steril su ile nemlendirilmiştir. Inoküle edilen dilimler, (Togashi, 1988) ve (Nabhan ve ark., 2006) 2 ila 3 gün 27-30 °C'de inkübe edilmiştir. Deney iki kez tekrarlanmıştır. 24-72 saat sonra gözlemlenen bozulmalarda kötü koku oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. Tütün Bitkilerinde Aşırı Duyarlılık Reaksiyon (HR)

HR, *Nicotiana tabacum* var. *benthamiana* tütün çeşidi kullanılark testlenmiştir. Bakteriyel süspansiyon (10^8 CFU / ml^{-1}), steril damıtılmış su içinde hazırlanmış ve 3cc'lik plastik enjektörlerle tütün bitkilerinin yapraklarına enjekte edilmiştir. Kontrol olarak sterilize distile su kullanılmıştır. Sırayla, her izolar için üç uygulama yapılmıştır. Tütün bitkileri, 24-48 saat boyunca 20-28 °C'de bir büyüme kabininde tutulmuştur.

3.2.4. Biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik testler

Tüm biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik testler Schaad ve ark. (2001)'a göre yapılmıştır.

3.2.4.1. Gram reaksiyonu

Potasyum hidroksit (KOH) gram negatif bakterilerin hücre duvarlarının ince peptidoglikan katmanını eritirken gram pozitif hücre duvarlarını etkilememektedir. Temiz bir

lam üzerine bir damla % 3 KOH uygulanmış, 24-48 saatlik bakteri kolonilerinden plastik bir kürdan kullanılarak aktarılmış ve dikkatli bir şekilde karıştırılmıştır. Bakteriyel çözeltinin viskoz olup olmadığını ve bir mukoid ip oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla kürdan yukarı doğru kaldırılmıştır.

3.2.4.2. 37 °C'de Gelişim

İzolatlar, nutrient Agara ekilmiş ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Gelişim, petride krem rengi koloniler ile ayırt edilmiştir.

3.2.4.3. % 5 NaCl'de gelisme

% 5 NaCl içeren NA hazırlanmıştır. Bu besiyerine 24-48 saat boyunca 26±2 °C'de geliştirilen bakteriler eklenmiştir. Bakteri gelişimi günlük olarak gözlenmiştir.

3.2.4.4. Oksidaz testi

Bir filtre kağıdı parçasına iki damla oksidaz çözeltisi (% 1 tetra metil-p-fenilendiamin dihidroklorürün hazırlanan çözeltisi) damlatılmıştır. Steril plastik kürdanlar ile alınan bakteriler filtre kağıdına sürülmüştür. Bakteriyel izolatlar aşağıdakilere göre sınıflandırılmıştır: 1) 30 saniye içinde görülen mor renk ise test pozitif, 2) renk değişimi yoksa test negatif olarak değerlendirilir.

3.2.4.5. KB ortamındaki Floresan Pigmenti

İzolatlar, King B'ye ekilmiş ve 24-48 saat 26-28 °C'de inkübe edildikten daha sonra petriler floresan pigmentini gözlemlemek için uzun dalga ultraviolet ışığa (UV) maruz bırakılmıştır.

3.2.4.6. Katalaz testi

Kuru bir mikroskop lamının yüzeyine bir damla % 3 H_20_2 (hidrojen peroksit) damlatılmıştır. Ardından sterilize kürdan yardımıyla alınan bakteri kolonisi ile karıştırılmıştır. Katalaz testi, oksijen kabarcıklarının oluşumu açısından değerlendirilerek kabarcık oluşumu negatif olarak kabul edilmiştir.

3.2.4.7 İndol üretimi

İndol test çözeltisini içeren 5 ml'lik tüplerin inkübasyonundan sonra, her tüpe 1 ml Kovac çözeltisi eklenmiştir. Tüpün üst kısmında kırmızı-pembe renkte bir halka oluştuğunda sonuçlar pozitif, sarı-kahverengi renk oluşumu ise negatif olarak kabul edilmiştir.

3.2.4.8. Seçici besiyerinde pektat bozulması

Sodyum poliptat'ı parçalayabilen bakterilerin pektolitik aktivitesi, 48 saatlik bakteri kültürlerinin CVP ortamında aşılanması ve petrilerin 27 °C'de 5 gün boyunca inkübe edilmesiyle değerlendirilmiştir.

3.2.4.9. Fosfataz aktivitesi

Fenolftalein difosfat sodyum tuzu, son konsantrasyonu % 0.5 olan nütrient broth ortamına ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltiden her tüpe 5 ml olacak şekilde aktarılmış ve 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiştir. 24-48 saatlik bakteriyel kültürler saf biçimde alınmış ve tüpe inoküle edilmiştir ve 2 gün boyunca 26 ± 2 ° C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra her tüp % 40'lık NaOH çözeltisinden damlatılmıştır ve tüplerde parlak pembe renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.10. Eritromisine Duyarlılık

3 ml NA içeren tüpler otoklavlanmış ve 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra bu tüplere 100 ul bakteri süspansiyonu ilave edilmiştir. Elde edilen karışım, petri kaplarına (katılaşmış NA ortamı) dökülmüştür. 15 ug eritromisin (ticari olarak temin edilebilir) içeren diskler petri kabının yüzeyine sabitlenmiş ve 48 saat 26±2 °C'de inkübe edilmiştir. Disklerin çevresinde oluşan inhibisyon bölgelerine göre eritromisine duyarlılık teyit edilmiştir.

3.2.4.11. Sakkarozdan maddelerin indirgenmesi

10 g Bacto-pepton ve 17 g agar 800 ml damıtılmış su içinde çözülmüş ve otoklavlanmıştır. Daha sonra 200 ml steril edilmiş sakkaroz çözeltisi (200 ml damıtılmış su içinde 40 g sakaroz) eklenmiştir. Elde edilen karışım petri kaplarına dökülmüştür. Sükroz ortamına NA'da 48 saat geliştirilen bakteri kültürlerinden öze yardımıyla alınarak aşılanmış ve 48 saat boyunca 27 °C'de inkübe edilmiştir. Her petriye, 10 ml Benedict çözeltisi konularak ve 60 °C'de 30 - 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Mavi arka planda kolonilerin etrafında turuncu renk oluşumu pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.2.4.12. α -metil-glukozit kullanımı

2 ml a-metil-glukozit ortamı içeren tüplere bakteriyel izolatlar aşılanarak 27 ila 24 saat boyunca 27 °C'de inkübe edilmiştir. Şekerin kullanımından dolayı ortamın asitleşmesi sonucu görünen sarı renk pozitif olarak kabul edilmiştir. Renk değişiminin olmaması ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Helias, 1999).

3.2.4.13. Karbonhidratlardan asit üretimi

Bromcresol purple (10-30 mg / L) hazırlanan % 1'lik pepton broth çözeltisi ile karıştırılmış ve indikatör olarak kullanılmıştır. Test edilecek olan karbonhidratlar (laktoz, maltoz, trehaloz ve Mannitol) son konsantrasyon % 1'lik olacak şekilde eklenmiş, pH-7.0'a ayarlanmış, filtre sterilize edilmiş ve steril test tüplerine dağıtılmıştır. Tüpler, taze gelişen bir kültürden (48 saat eski) alınan koloniler ile aşılanmış ve 23-27 ° C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Asit üretimi (Pozitif sonuç), sarı renk değişimi olarak gözlemlenmiştir.

3.2.5. Moleküler tanı testleri

Biyokimyasal testlerle belirlenen izolatlar PCR yöntemiyle teşhis edilmiştir.

3.2.5.1. DNA izolasyonu

Bakteriyel DNA izolasyonu De Boer ve Ward (1995)'ın metoduna göre yapılmıştır. Bu yönteme göre;

1) Bakteriyel izolatlar, 9ml Nutrient broth besiyerine aşılanarak 24 saat inkübe edilmiştir.

2) Bakteriyel süspansiyon 1 ml'lik steril Eppendorf tüplerde 20 dakika boyunca 14,000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

3) Pelet alınarak süpernatant atılmıştır. Hücrenin parçalanması için (pelet üzerinde) 100µ % 1 SDS TAE tamponu ilave edilip vortekslenmiştir, daha sonra tüpler 3 saat boyunca 50 ° C'de su banyosunda inkübe edilmiştir.

4) Süspansiyonun yarısı kadar 7.5 M Amonyum asetat eklenmiş ve 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.

5) Kalan DNA (yaklaşık 130 µl) yeni bir Eppendorf tüpe aktarılarak aynı hacimde (yaklaşık 130 µl) soğutulmuş izopropanol ile karıştırılmıştır. Tüpler derin dondurucuda 45 dakika boyunca muhafaza edilmiştir.

6) Ardından 10 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlenerek pelet atılmıştır.

7) Eppendorf tüplere 100µl soğutulmuş % 70'lik alkol eklenerek DNA'nın yıkama işlemi yapılmış ve 10 dakika santrifüj edilmiştir.

8) Daha sonra alkol dökülüp laminar kabinde 1 saat bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Ardından tüplere 40 µl steril saf su (ddH20) ilave edilip vortekslenmiştir.

9) Daha sonra DNA'lar %1'lik hazırlanan agaroz jelde yürütülerek izolasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Hazırlanan agaroz jel yarım saat 80 V elektrik verilerek yürütülmüştür. UV ışık altında bantların görülebilmesi için etidyum bromür (0.5 µg /

ml) ile 10 dakika bekletilerek boyama yapılmıştır. Jel üzerinde oluşan bantlar transiliminatörde incelenmiştir.

3.2.5.2. PCR analizlerinde kullanılan çözeltiler

PCR reaksiyonu toplam 25 µl hacminde gerçekleştirilmiştir:

• PCR Master Mix *		12.5 µl
• Primer1 (forward)		2.0 µl
• Primer2 (reverse)		2.0 µl
• Genomik DNA		2.0 µl
• Damıtılmış su		6.5 µl
Toplam hacim	=	25 µl

*PCR Master Mix (0.05 unity/ µl Taq DNA, 4 mM MgCl2, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM, dGTP ve 0.4 mM dTTP)(ThermoFisher Sciencetific PCR master mix (2X)).

Çizelge 3.2.5.2.1. *Pectobacterium betavasculorum* için kullanılan ITS PCR primerleri

Primer	Patojen	PCR ürünü (bp)	Kaynak
L1(5'CAAGGCATCCACCGT3') **G1(5'GAAGTCGTAACAAGG3')**	Pb	540 ve 575 620 ve 720	Toth et al., (2011)

Çizelge 3.2.5.2.2. İzolatların PCR yöntemi ile tanılanmasında L1 ve G1 primerleri için Thermal cyclerda programlanan PCR protokolü

Kullanılan primer	PCR programı		
L1 / G1	**1.** İlk Denatürasyon	94°C - 5 dk	
	2. Denatürasyon	94°C –1 dk	28 döngü
	3. Bağlanma sıcaklığı	55° C –2 dk	
	4. Uzama	72° C –2 dk	
	5. Son uzama	72°C - 7 dk	
	6. Bekleme	4°C - Sonsuz	

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Sonuçları

Bu çalışmada; daha önceki çalışmalarda Konya ili şeker pancarı ekim alanlarında izole edilen bakteriyel etmenlerde oluşan kültür koleksiyonundan alınan *Pectobacterium betavsaculorum* türlerini tanılanması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Pektolitik aktiviteye sahip bu bakteriler, şeker pancarında sorun oluşturan önemli bir patojen haline geldiğinden, bu patojenin biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik, genetik ve fenotipik özelliklerinin doğru bir şekilde tanılanması şarttır. *P. carotovorum*'un neden olduğu belirtiler, diğer yumuşak çürüklük bakterilerin neden olduğu belirtilere benzemektedir, bu nedenle yumuşak çürüklük bakterileri için spesifik ve hızlı bir teşhis yönteminin geliştirilmesi dikkat çekici ve önemlidir. Biyokimyasal testler, bazı fitopatojen bakteri türlerinin tanısında ve belirlenmesinde klasik bir yaklaşımdır. Bu nedenle bakterilerin belirli metabolik özellikleri (oksidaz, katalaz, pektinaz... vb.) göz önünde bulundurularak doğru bir tanılama yapmak mümkündür.

4.1.1. *Pectobacterium betavsculorum'un* biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik olarak tanımlanması

Elde edilen bakteri izolatları, standart teknikler (patojenisite testleri, koloni morfolojisi ve biyokimyasal testleri) kullanılarak *Pectobacterium betavsculorum* olarak tanılanmıştır. Fitopatojen olarak değerlendirilmiş olan bakteriler NA'da 37° C'de inkübe edilerek, bu sıcaklıktaki bakteri gelişiminin pozitif olduğu görulmüştür

Bakteri kolonisi % 3 KOH'de hızlı ve sirküler şekilde karıştırılarak mukoid iplik oluşturan tüm izolatlar, Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1.).

Parankimatik dokuların (pektolitik aktivite) maserasyonu ve infiltrasyonundan sorumlu hücre duvarının yapısını bozan enzimleri üretebilme yeteneğine sahip izolatlar 27° C'de 48 saat inkübe edildiğinde, patates dilimlerinde pis kokulu, sulu bir çürüklüğe sebep olmuştur.

% 5 NaCl içeren NA ortamında gelişebilme kabiliyetine sahip olan bu bakterilerin tuza toleranslı oldukları belirlenmiştir. Kontrol gruplarında ise böyle bir gelişime rastlanmamıştır.

Genellikle oksidaz testinde 10 saniye içinde gözlemlenen mor renk gelişimi, pozitif bir reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz izolatlarda ise buna benzer bir reaksiyon görülmemiştir (mor renk oluşmamıştır) (Çizelge 4.1).

Katalaz testi açısından değerlendirilen izolatlar, hidrojen peroksitten (H_2O_2) oksijenin salınmasını katalize eden katalaz enziminin varlığından dolayı, lam yüzeyinde kabarcık oluşumu göstermiştir (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.).

Bu türler indol üretim testi bakımından değerlendirildiğinde ise triptofanı indole dönüştürememelerinden dolayı tüplerin sarı renk aldığı gözlemlenerek sonuçlar negatif olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).

İzolatlar eritromisine duyarsız (disklerin etrafında inhibisyon bölgesi oluşmamıştır) olduğundan sonuç negatif olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).

İzolatlara sakkarozdan maddelerin indirgenmesi testi uygulanarak, mavi bir arka planda koloni etrafında turuncu bir zon oluşumu görülmediğinden sonuç negatif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.2).

α-metil-glukozit testine, karbonhidratlardan asit üreten Pb izolatlarımız pozitif reaksiyon gösterdiğinden, laktoz, maltoz ve trehaloz testlerine pozitif, sorbitol ve malonat testlerine ise negatif reaksiyon göstermiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2).

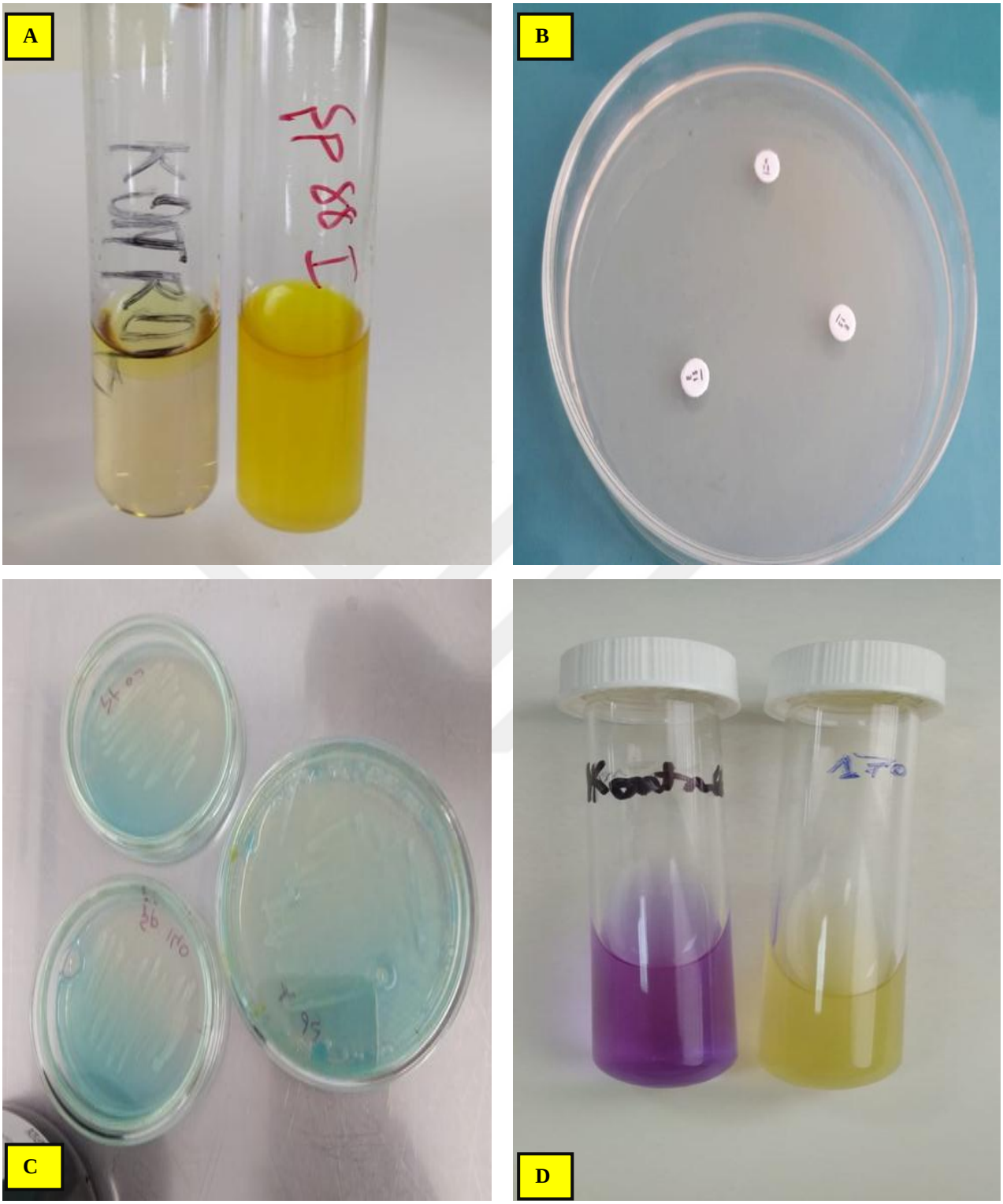
Tütünde HR testi uygulanarak enfeksiyon noktasında bitki hücrelerinin öldüğü kısımlarda (infiltarasyon noktaları) doku nekrozları görülmüştür (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3).

KB'de 360 nm'de UV ışığı altında inkübe edilen izolatlarda floresan pigmenti görülmediğinden sonuç negatif olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3).

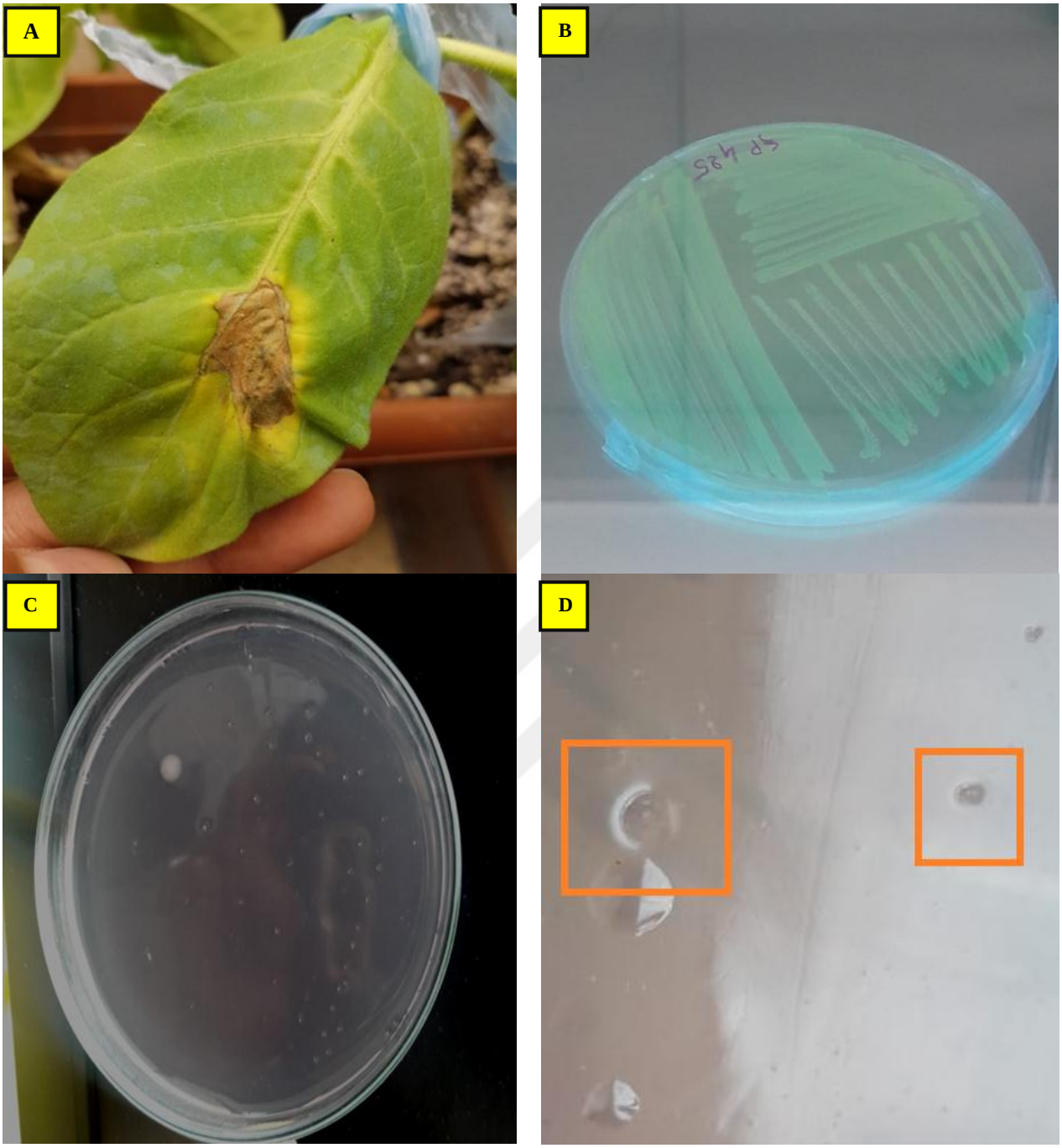
Seçici besi ortamlarından biri olan kristal viyolet pektat besi yerinde (Crystal Violet Pectat), pektat bozunması derin çöküklerin oluşumu ile karakterize edilerek izolatlarımız pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testler
A) 37 °C' de 48 saat inkübasyondan sonra NA ortamında *Pectobacterium betavsculorum* gelişimi; **B)** Potasyum Hidroksit testi bakımından pozitif reaksiyon (izolat n ° 88); **C)** Patates dilimlerinde 48 saatlik inkübasyondan sonra meydana gelen çürüklük ve **D)** Katalaz testinde kabarcık oluşumu (pozitif sonuç).



Şekil 4.2. Biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testlerin sonuçları (devam)
A) İndol üretim testi (Sarı renklenme = negatif reaksiyon); **B)** Eritromisin n°11 izolatının negatif reaksiyon (aynı plaka üzerinde 3 tekrar); **C)** Sakkarozdan maddelerin indirgenmesi pozitif reaksiyon ve **D)** Laktozdan elde edilen asit üretimi sonucu oluşan pozitif reaksiyon.



Şekil 4.3. Biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testlerin sonuçları (devam)
A) *Nicotiana tabacum* var. *benthamiana* tütün çeşidinde HR oluşumu; **B)** Ultraviyole ışığı (UV) altında KB ortamında floresan olmayan pigmentasyon; **C)** CVP ortamında (a) boşluk oluşumu ve **D)** CVP ortamında (b) meydana gelen çukurluklar.

Çizelge 4.1. Biyokimyasal testlere *Pectobacterium betavasculorum*'nin verdiği reaksiyonlar

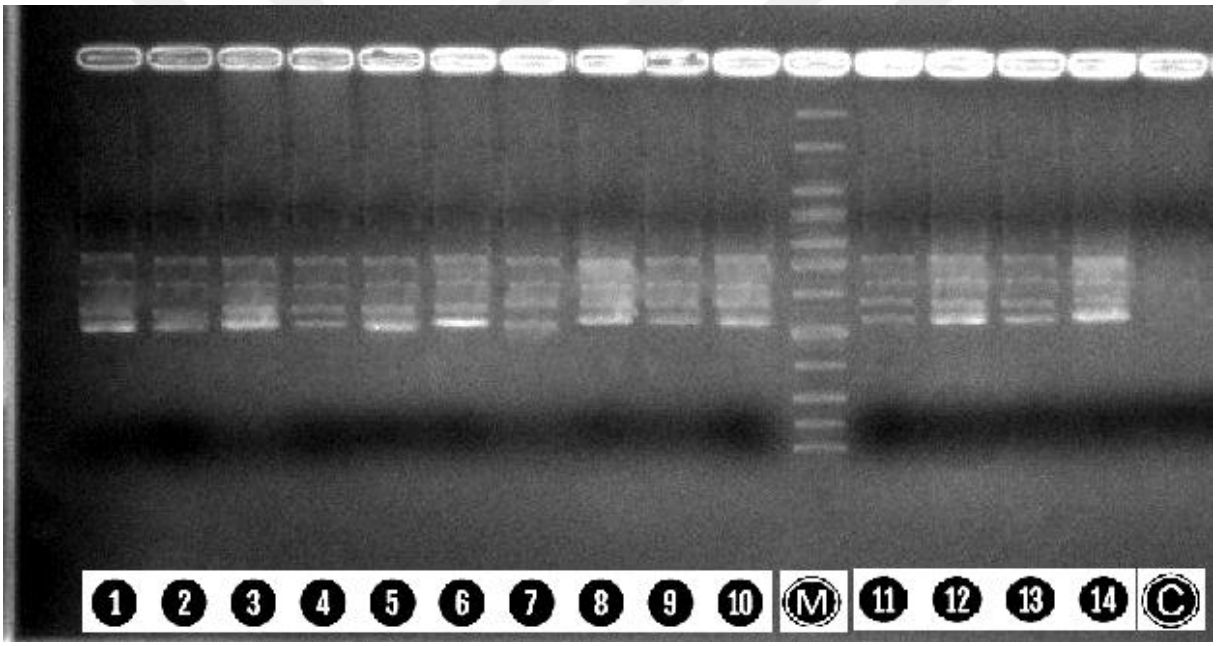
Testler	**Pb* (Reference)**	**Pb***	**Reaksiyon Oranı (%)**
Gram reaksiyon	-	-	**100**
CVP'de çukur oluşumu	+	+	**100**
Pectolitik aktivite	+	+	**100**
37°C'de bakteri gelişimi	+	+	**100**
5% NaCl'de bakteri gelişimi	+	+	**100**
Oksidaz Üretimi	-	-	**100**
Katalaz testi	+	+	**100**
Eritromisin'e duyarlılık	-	-	**100**
α-metil-glukozit kullanımı	+	+	**100**
KB'de Floresan pigmentasyon	-	-	**100**
Sakkarozdan maddelerin indirgenmesi	+	+	**100**
İndole oluşumu	-	-	**100**
Fosfotaz oluşumu	-	-	**100**
Laktozdan asit üretimi	+	+	**100**
Maltozdan asit üretimi	+	+	**100**
Trehaloz'dan asit üretimi	+	+	**100**
Sorbitol'den asit oluşumu	-	-	**100**
Malonate'den asit oluşumu	-	-	**100**

Pb* : *Pectobacterium betavasculorum*

4.1.2. Moleküler Sonuçlar

Tüm izolatlar ITS PCR analizine göre karakterize edilmiştir; 16S-23S rRNA ITS bölgesinin PCR amplifikasyonu, evrensel primer Ll (5′-CAAGGCATCCACCGT-3 ′) ve G1 (5′-GAAGTCGTAACAAGG-3 ′) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece *Pectobacterium betavasculorum*'un 16S-23S rRNA genini amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünü, etidyum bromür (0.5 ug / ml) içeren % 2 agaroz jel hazırlanarak elektroforetik analiz yapılmış ve 295 nm UV ışığı ile görüntülendiğinde, yaklaşık 540 ve 575 bp'de iki spesifik bant ve 620 ve 720 bp'de iki soluk bant elde edilmiştir.

Moleküler ağırlık belirteci olarak DNA 100 bp'lik ladder (parça büyüklüğünü belirlemek için) kullanılırken, referans olarak Murat ÖZTÜRK'ten (Bozok Üniversitesi) elde edilen *P.betavasculorum* kullanılmıştır.



Şekil 4.1.2. Pectobacterium betavasculorum yapılan ITS PCR sonuçları, 1; Reference isolate, 2; Sp11, 3; Sp154, 4; Sp88, 5; Sp85, 6; Sp109, 7; Sp155, 8; Sp111, 9; Sp12, 10; Sp21, 11; Sp122, 12; Sp458, 13; Sp435, 14; Sp170, **(M)** 100 bp DNA Markörü (SimplyDNA), kontrol olarak kullanılan **(C)** su'dur.

4.2. Tartışma

Uluslararası düzeyde bitki bakteriyologları tarafından yapılan bir ankette bilimsel ve ekonomik açıdan önemli ilk 10 fitopatojen bakteri belirlenmiştir: (1) *Pseudomonas syringae* patovarları; (2) *Ralstonia solanacearum*; (3) *Agrobacterium tumefaciens*; (4) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; (5) *Xanthomonas campestris* patovarları; (6) *Xanthomonas axonopodis* patovarları; (7) *Erwinia amylovora*; (8) *Xylella fastidiosa*; (9) *Dickeya* (*dadantii* ve *solani*); (10) *Pectobacterium carotovorum* (ve *Pectobacterium atrosepticum*) (Mansfield ve ark., 2012).

Kwon ve ark. (1997), 16 Erwinia türünün 16S rRNA genlerinin dizilerini karşılaştırmak amacıyla bir analizi uygulamışlar ve *Erwinia* türlerinin tanımlanabilir dört filogenetik gruba (clade) ayrılabileceğini göstermiştir. *E. chrysanthemi*, 3. Clade (III) 'e dahil edilmiştir ve *E. carotovora* (*carotovora, betavasculorum* ve *wasabiae*) ise bir grup olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, tüm *Erwinia* cinsi üyeleri, *Pectobacterium* cinsine dahil edilmiş ve *P. carotovorum* beş alt kategoriye ayrılmıştır: *carotovorum, betavasculorum, atrosepticum, wasabiae* ve *odoriferum* (Hauben ve ark, 1998). Son zamanlarda ise *Pectobacterium'*un alt türlerinin yeni bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır (Duarte ve ark. 2004; Van der Merwe ve ark. 2010).

Taksonomik olarak, *P. betavasculorum*, Bakteria alemi, Proteobacteria şubesi, Gamma Proteobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı ve Enterobacteriaceae ailesine aittir (Bull vd., 2010).

Pectobacterium'un gelişme sıcaklığı yazarlara ve kaynaklara göre değişebilir. Dickey'in (1979) yapmış olduğu bir çalışmada: 322 Dch ırkı, 16 Pca ırkı ve 77 Pcc ırkı çeşitli konukçulardan izole edilmiştir ve birçok Dch ırkı ve sadece 2 Pcc ırkı 39° C'de çoğalırken, tüm Pcc ırkları ve 2 Pca ırkı 36° C'de gelişmiştir. Ayrıca Perombelon ve Kelman (1980), Pcc'nin 6 ila 42° C sıcaklıkları arasında gelişirken, Pca'nın 3 ila 35 °C sıcaklık aralıklarında geliştiğini, Dch türlerinin ise 45° C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişebildiğini bildirmişlerdir. Birkaç yıl sonra Hyman ve ark., (1998), Pcc ve Dch'in gelişim sıcaklığının 37° C olduğunu açıklamışlar. Pb ırkları için Goto ve Matsumoto (1987), Pb'nin 36° C'de geliştiğini ancak 40° C'de gelişim gösteremediğini belirtmişlerdir. Elde ettiğimiz izolatlar, Pb İran izolatlarının 37° C'de geliştiğini bildiren Fassihiani ve Nedaeinia (2008); Rezaei ve Taghavi (2010) literatürlerindeki bilgilere benzer şekilde gelişim göstermiştir.

Dickey'e (1978) göre, pektolitik bakteriler, elektronların taşınmasını katalize eden sitokrom, oksidaz enziminden yoksun ve mor renk üretmek için bir redoks boya-tetra-metil-p-

phenylen-diamin içermediğinden oksidaz negatiftir ancak indol testi ve diğer bazı testlerde bu durum değişebilmektedir Çoğu *Pectobacterium* spp.'de indol testine negatif sonuçlar vermektedir. Bu bakteriler triptofanı indole parçalayan triptofanaz enziminden yoksundurlar. Triptofandan indol üretimi, *P. carotovorum* ve *D. chrysanthemi* (Yahiaoui - Zaidi ve ark., 2003) alt türleri arasındaki birçok farklılaşma kriterinden biri olarak kabul edilmektedir. Buna ek olarak, Pc türleri trehalozdan asit üretir (pozitif sonuç), bu aynı zamanda Y1-Y2 primerleri tarafından tanımlanabilen Pc türlerinin karakteristik bir özelliğidir (Hélias ve ark, 1998).

Patates dilimlerine inokulasyon testinde, izolatların pektolitik aktivitesinin olduğunu ve yumuşak çürüklük simptomlarının her zaman 48 saat içinde ortaya çıktığı belirtilmiştir. Ayrıca, Smith ve Bartz (1990), yumru ve meyvelerde yumuşak çürüklüğe neden olan otuz yedi *Pectobacterium* ırkının saldırganlığının, bu ırklar arasında belirgin farklılıklar gösterdiğini, ancak bir konukçudaki nispi saldırganlığın, diğer konukçudaki patojenisite ile her zaman ilişkili olmadığını bildirmiştir.

Pectobacterium betavasculorum izolatları üzerindeki biyokimyasal analizlerimizin sonuçları, pigment, indol ve fosfataz üretilmemesi şeklindedir (Çizelge 4.1.). Tüm biyokimyasal testlerde Referans bakteri (Pb) ile benzerlik görülmüştür. Ayrıca elde edilen izolatlar eritromisine dirençli değildir. Bunlara ek olarak, *Pectobacterium betavasculorum*'un izolatları sakkarozdan maddelerin indirgenmesi ve α-metil glukositlerden asit üretimi meydana getirmiştir. Bu sonuçlar Thomson ve ark. (1981), Saleh ve ark. (1996) ve Rezaei ve Taghavi (2010) çalışmalarını destekler niteliktedir. Ayrıca birçok bakteri türü bitki dokularında hastalık oluşturan enzimler üretme potansiyeline sahiptir; ancak canlı bitki dokularındaki yumuşak çürüklükten yalnızca birkaçı sorumludur (Perombelon ve Kelman, 1980). Patogenezde yumuşak çürüklük bakterilerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Pektolitik enzimler, konukçu hücre duvarlarındaki pektini parçalamaktır. Bu nedenle patojenik olduğu tespit edilen tüm izolatlarda pektolitik aktivite testi yapılmıştır ve bütün türlerin pozitif olduğu belirlenmiştir. Patates dilimlerinde yapılan testler de birçok pektolitik aktivite testine benzer olarak pozitif reaksiyon vermiştir (Fassihiani ve Nedaeinia, 2008; Rezaei ve Taghavi, 2010; Ngadze ve diğerleri, 2012).

Ayrıca yapılan biyokimyasal tanımlamanın bazı durumlarda yetersiz olduğu da belirtilmektedir. Bu patojenleri ayrıntılı karakterizasyonu için ek biyokimyasal testlerin yanı sıra, moleküler ve serolojik yöntemler kullanılması önemlidir. Türlere özgü primerler, ITS-PCR ve PCR-RFLP gibi moleküler teşhis yöntemleri, biyokimyasal ve fizyolojik özellikler kullanılarak çözülemeyen SRE izolatları çözmek için başarıyla kullanılmıştır (Toth ve ark., 2001).

Modern moleküler biyoloji teknikler, dört temel yönteme dayanmaktadır: enzimler (polimerazlar ve restriksiyon enzimleri), spesifik probların hibridizasyonu, jel elektroforezi ve dizileme. Bu yöntemlerin geliştirilmesi ve uygun primer seçimi patojen tanılaması ve karakterizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.

Bu ilerlemelerle birlikte, *Pectobacterium* türlerinin daha güvenilir bir şekilde teşhis edilmesi için multipleks PCR, geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı PCR kullanılmıştır (Czajkowski ve ark., 2015). Bunlara ek olarak, DNA dizileme, bütün izolatları türlere ve alt türlere göre tanımlamak ve sınıflandırmak için biyokimyasal karakterizasyonu destekleyici olarak kabul edilmiştir. Daha önceki bazı çalışmalarda, pel geni (pektat liyazı kodlayan gen) ve taksona özgü bölgeler (16 S-23 S intergenik dizileri ya da 16 S rRNA gibi) gibi virülenlikle ilgili genler, yumuşak çürüklük etmenleri arasındaki farklılıkları belirlemektedir (Duarte ve diğerleri, 2004; Wu ve diğerleri, 2011). Toth ve diğ. (2001), yumuşak çürüklük patojenlerinin, 16S – 23S rRNA intergenik transkripsiyonlu aralayıcı (ITS) ile tanımlanabileceğini bildirmişlerdir. Birkaç yumuşak çürüklük bakterisi arasındaki filogenetik ilişkileri incelemek amacıyla, içsel kopyalanmış iç kısım ayırıcı (ITS) dizisi, mikrobiyolojik toplulukları içinde çok kullanılan bir DNA bölgesidir.

Diğer birçok bitki patojeni bakteri için, 16S ve 23S rRNA genleri, mikrobiyal filogeniyi ortaya çıkarmak için yaygın olarak moleküler zamanlayıcılar olarak kullanılır ve dolayısıyla taksonomik düşünceler üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Gutell ve ark., 1994). rRNA genleri, türler veya cinsler arasında oldukça hassas tespitler yapan hedef bölgeler olarak kullanılmıştır (Louws et al. 1999). Öte yandan, 16S-23S rRNA intergenik aralayıcı (IGS) bölgelerindeki dizi polimorfizmleri, birbirine çok yakın akraba bakterileri ayırt etmek için kullanabilmektedir (Chun ve ark., 1999).

Tüm izolatların 16S ve 23S rRNA'sını büyütmek için evrensel primerler L1 / Gl'i kullanarak, bantlanma desenleri 540 ve 575 bp'de bant gösterirken, 620 ve 720 bp'de iki zayıf bant daha görülmektedir. Referans izolatı daha önce tarif edildiği gibi izolatlarımızla benzer boyutlarda bantlanma göstermiştir. Toth ve arkadaşları (2001) yumuşak çürüklük patojenlerinin 16S-23 S rRNA intergenik transkribe spacer (ITS) ile tanımlanabileceğini rapor etmiştir. Ayrıca Amdan ve ark. (2015) aynı primerleri (L1 / G1) Fas'taki patates çeşitlerinden izole edilen *P. carotovorum*'un tanımlanması ve tür içi çeşitliliğin araştırılması için ITS-PCR analizinde de kullanmıştır.

Pectobacterium betavasculorum'un tanılanması, morfolojik özellikler, biyokimyasal ve fenotipik testlerin yanı sıra ITS-PCR'nin bir kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

2016 - 2017 yılları arasında Konya ilinden toplanan enfekte şeker pancarından yumuşak çürük bakteri izole edilmiştir. BASTAS Laboratuarından bu izolatlar elde edilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan 13 adet Pectobacterium izolatlar yumuşak çürüklük hastalığı belirtileri görülen şeker pancarı bitkilerinden toplanmıştır. Fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tanı teknikleri (L1 / G1 primeri yardımıyla ve PCR ile amplifiye edilmişlerdir) kullanılarak ve referans bakteri ile karşılaştırıldığında bu izolatların yumuşak çürüklük hastalığına neden olan *Pectobacterium betavasculorum* olduğu tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, literatür verileriyle (Perombelon ve Kelman, (1980); Thomson ve ark. (1981); Saleh ve ark. (1996); (Toth ve ark., 2001) ve Rezaei ve Taghavi (2010)) uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Bu fitopatojen bakteriler, şeker pancarında vasküler nekrozun yanı sıra yumruda yumuşak çürüklüğe neden olmaktadır. Ayrıca ayçiçeği, patates ve enginardan da izole edilmişler (Thomson ve ark, 1981; Gardan ve ark, 2003).

Türkiye ve dünyadaki yumuşak çürüklük bakterilerinin farklı yöntemlerle karakterizasyonu, bu patojenin özelliklerinin daha iyi anlaşılması açısında önemlidir ve gelecek çalışmalara da önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

5.2. Öneriler

Bu patojeni karakterize etmek için bilimsel araştırma ve epidemiyolojik çalışmaların iyi anlaşılması için şunlar hedeflenmelidir:

• Enfeksiyon kaynağı (toprak, alternatif konukçular, taban suyu, yabancı otlar, zararlılar ve nematodlar)

• Yayılma ve hastalığın evrim mekanizmaları.

• Patojenisite, patojenin hayatta kalabilme kabiliyetine ve virülens mekanizlarına bağlı olmasının yanı sıra çevresel faktörlerle de yakından ilişkilidir. Meydana gelen iklim değişikliği nedeniyle bazı bakteri türlerinin nesli tehdit altına girmekte ve bu nedenle de patojenler iklime uyum sağlamaya çalışırken genotipik olarak evrilmektedirler.

Çiftçiler eğitilmesine, dayanıklılık ıslahına (dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi), sağlıklı tohumların kullanılmasına (yerel tohumlar olması daha iyi), kültürel önlemlere (ekipmanın dezenfeksiyonu, rotasyon, hastalıklı bitki artıklarının tarladan kaldırılması vb.) dayanan etkili kontrol ve yönetim stratejileri geliştirilmesine önem verilmelidir (Pérombelon ve Hyman, 1992).

Yumuşak çürüklük patojenlerini tanımlamak ve ayırt etmek için gen dizileme ve bakteriyel genomların düzenlemesi gibi yeni moleküler teknikler ve teknolojiler önerilmektedir. Bu yöntemler hızlı ve güvenilirdir.

Yetiştiriciler için çeşit seçimi şeker pancarı üretiminin verimini ve kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Kullanılacak çeşitlerin belirlenmesinde; ekili tarlanın iklim ve toprak yapısına uyum, hastalıklara ve yabancı otlara direnç, yüksek miktarda kök ve şeker verimi, çimlenme ve tarla üretimi gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca çeşit seçiminde çeşitlerin sağlıklı, güvenilir ve ucuz olması da önemli bir husustur. Ayrıca toprak hazırlığı, bitki vejetasyon aşamasına göre gübreleme, sulama (doz, zaman ve tarz), dona karşı koruma ürünleri, yabacı otlar ve fungal hastalıklar gibi bazı kültürel uygulamalara da dikkatle uyulmalıdır.

KAYNAKLAR

Abu-Obeid, I., Khlaif, H., Salem, N., 2017, Detection and identification of bacterial soft rot of potato *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using specific PCR primers in Jordan. African Journal of Agricultural Research, 12, 39, 2910-8.

Agrios, G., 2006, Bacterial soft rots 5th Edn Academic Press San Diego.

Alcorn, S., Orum, T., Steigerwalt, A. G., Foster, J. L., Fogleman, J. C., Brenner, D. J., 1991, Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 41, 2, 197-212.

Amdan, M., Faquihi, H., Terta, M., Ennaji, M., AitMhand, R., 2015, Molecular analysis of genetic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Morocco by PCR amplification of the 16S-23S intergenic spacer region. British Biotechnology Journal, 7, 102-10.

Aneja, K., 2003, Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology New Age International Ltd. Publishers, New Delhi, India.

Anonymous, 2018, Şeker Pancarının Önemi (Turkish) [online], Ereğli Pancar Kooperatifi, Date of access, 20 January 2018. Access address, http://ereglipancar.com.tr/Kooperatif/Sayfa/2042.

Anonymous, 2019, Sugar beet production quantity (tons) - for all countries [online], Date of access, 4 January 2019. Access address, http://www.factfish.com/statistic/sugar%20beet%2C%20production%20quantity.

Aremu, B. R., Babalola, O. O., 2015, Classification and taxonomy of vegetable macergens. Frontiers in microbiology, 6, 1361.

Arumuganathan, K., Earle, E., 1991, Nuclear DNA content of some important plant species. Plant molecular biology reporter, 9, 3, 208-18.

Balat, M., Balat, H., 2009, Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Applied energy, 86, 11, 2273-82.

Barras, F., van Gijsegem, F., Chatterjee, A. K., 1994, Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot Erwinia. Annual review of phytopathology, 32, 1, 201-34.

Bull, C. T., De Boer, S., Denny, T., Firrao, G., Saux, M. F.-L., Saddler, G., Scortichini, M., Stead, D., Takikawa, Y., 2010, Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. Journal of plant pathology, 551-92.

Cariolle, M., Duval, R., 2006, Nutrition-Nitrogen. Sugar beet, 169-84.

Cerkauskas, R., Stobbs, L., Lowery, D., Van Driel, L., Liu, W., VanSchagen, J., 1998, Diseases, pests, and abiotic problems associated with oriental cruciferous vegetables in southern Ontario in 1993-1994. Canadian journal of plant pathology, 20, 1, 87-94.

Charkowski, A., Blanco, C., Condemine, G., Expert, D., Franza, T., Hayes, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Solanilla, E. L., Low, D., Moleleki, L., 2012, The role of secretion systems and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity. Annual review of phytopathology, 50, 425-49.

Chatterjee, A. K., Dumenyo, C. K., Liu, Y., Chatterjee, A., 2000, Erwinia: genetics of pathogenicity factors. Encyclopedia of microbiology, 2, 236-60.

Chun, J., Huq, A., Colwell, R. R., 1999, Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of Vibrio cholerae and Vibrio mimicus. Appl. Environ. Microbiol., 65, 5, 2202-8.

Cother, E., Gilbert, R., 1990, Presence of *Erwinia chrysanthemi* in two major river systems and their alpine sources in Australia. Journal of Applied Bacteriology, 69, 5, 729-38.

Cuppels, D., Kelman, A., 1974, Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. Phytopathology, 64, 4, 468-75.

Czajkowski, R., Pérombelon, M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., Van Der Wolf, J., Sledz, W., 2015, Detection, identification and differentiation of Pectobacterium and Dickeya species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. Annals of Applied Biology, 166, 1, 18-38.

Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J. M., Sledz, W., 2015, Detection, identification and differentiation of Pectobacterium and Dickeya species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. Annals of Applied Biology, 166, 1, 18-38.

Dadaşoğlu, F., Kotan, R., 2017, Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. J Anim Plant Sci, 27, 647-54.

Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., Bertheau, Y., 1994, PCR and restriction fragment length polymorphism of a pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. Appl. Environ. Microbiol., 60, 5, 1437-43.

De Boer, S., Ward, L., 1995, PCR detection of Erwinia carotovora subsp. atroseptica associated with potato tissue. Phytopathology, 85, 8, 854-8.

Dickey, R. S., 1979, Erwinia chrysanthemi: a comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other Erwinia species. Phytopathology, 69, 4, 324.

Dohm, J. C., Lange, C., Reinhardt, R., Himmelbauer, H., 2009, Haplotype divergence in Beta vulgaris and microsynteny with sequenced plant genomes. The Plant Journal, 57, 1, 14-26.

Draycott, A. P., 2006. Sugar beet, Wiley Online Library, p.

Duarte, V., De Boer, S. H., Ward, L. J., de Oliveira, A. M. R., 2004, Characterization of atypical Erwinia carotovora strains causing blackleg of potato in Brazil. Journal of Applied Microbiology, 96, 3, 535-45.

Elbanna, K., Elnaggar, S., Bakeer, A., 2014, Characterization of B acillus altitudinis as a New Causative Agent of Bacterial Soft Rot. Journal of Phytopathology, 162, 11-12, 712-22.

Elliott, M., Weston, G., 1993. Biology and physiology of the sugar-beet plant. In: The sugar beet crop. Eds: Springer, p. 37-66.

Elphinstone, J. G., 1987. Soft rot and blackleg of potato, International Potato Center, p.

Fahy, P., Hayward, A., 1983, Media and methods for isolation and diagnostic tests.

Fajola, A., 1979, The post-harvest fruit rots of tomato (Lycopersicum esculentum) in Nigeria. Food/Nahrung, 23, 2, 105-9.

Faquihi, H., Terta, M., Amdan, M., Achbani, E. H., Ennaji, M. M., Mhand, R. A., 2015, Phenotypic and genotypic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* causing soft rot disease of potatoes in Morocco. European journal of plant pathology, 143, 4, 801-11.

Farrar, J., Nunez, J., Davis, R., 2009, Losses due to lenticel rot are an increasing concern for Kern County potato growers. California agriculture, 63, 3, 127-30.

Fassihiani, A., Nedaeinia, R., 2008, Characterization of Iranian *Pectobacterium carotovorum* Strains from Sugar Beet by Phenotypic Tests and Whole-cell Proteins Profile. Journal of phytopathology, 156, 5, 281-6.

Fleury, A., Caneill, J., 1984, Croissance et développe-ment de la betterave sucrière. Analyse de l'hétérogénéité du peuplement. Physiologie de la Plante Entière. INRA Agronomie, Paris, 201-12.

Francis, S. A., 2006, Development of sugar beet. Sugar beet, 9-29.

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, 757-61.

Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., Samson, R., 2003, Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: Pectobacterium atrosepticum sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 53, 2, 381-91.

Gatineau, F., Larrue, J., Clair, D., Lorton, F., Richard-Molard, M., Boudon-Padieu, E., 2001, A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus Pentastiridius (Hemiptera: Cixiidae). European Journal of Plant Pathology, 107, 3, 263-71.

Glasner, J., Marquez-Villavicencio, M., Kim, H.-S., Jahn, C., Ma, B., Biehl, B., Rissman, A., Mole, B., Yi, X., Yang, C.-H., 2008, Niche-specificity and the variable fraction of the Pectobacterium pan-genome. Molecular plant-microbe interactions, 21, 12, 1549-60.

Goto, M., Matsumoto, K., 1987, Erwinia carotovora subsp. wasabiae subsp. nov. Isolated from Diseased Rhizomes and Fibrous Roots of Japanese Horseradish (Eutrema wasabi Maxim.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 37, 2, 130-5.

Gracia-Garza, J., Blom, T., Brown, W., Roberts, D., Schneider, K., Freisen, M., Gombert, D., 2004, Increased incidence of Erwinia soft-rot on calla lilies in the presence of phosphorous. European journal of plant pathology, 110, 3, 293-8.

Gutell, R. R., Larsen, N., Woese, C. R., 1994, Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 58, 1, 10-26.

Harley, J., Prescott, L., 2002, Bacterial morphology and staining. Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Edition, The McGraw-Hill Companies, New York, 31-6.

Harveson, R. M., 2015, History of Sugarbeets. University of Nebraska-Lincoln http://unlcms. unl. edu/ianr/extension/cropwatch/history-sugarbeets.

Harveson, R. M., Hanson, L. E., Hein, G. L., 2009. Compendium of beet diseases and pests. Ed. 2, American Phytopathological Society (APS Press), p.

Hasegawa, H., Chatterjee, A., Cui, Y., Chatterjee, A., 2005, Elevated temperature enhances virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain EC153 to plants and stimulates production of the quorum sensing signal, N-acyl homoserine lactone, and extracellular proteins. Appl. Environ. Microbiol., 71, 8, 4655-63.

Hauben, L., Moore, E. R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J., 1998, Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Systematic and applied microbiology, 21, 3, 384-97.

Hedjarood, G., 1967, Soft rot of cyclamen in Iran. Iran. J. Plant Pathol, 4, 19-23.

Helias, V., 1999. Mise au point d'outils de caracterisation et de detection *d'erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* agent de la jambe noire et de la pourriture molle de pomme de terre. Application a l'etude de la transmission de la bacterie, via la plante, du tubercule mere vers les tubercules fils en cours de culture, Rennes, Agrocampus Ouest.

Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J., Andrivon, D., 2012, Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of Pectobacterium and Dickeya. Plant pathology, 61, 2, 339-45.

Hélias, V., Le Roux, A.-C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J.-P., Jouan, B., 1998, Characterisation 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, 7, 685-99.

Higashio, H., Yamada, M., 2004, Control of soft rot after harvest of cabbage in Indonesia. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ, 38, 3, 175-8.

Hinkova, A., Bubnik, Z., 2001, Sugar beet as a raw material for bioethanol production. Czech journal of food sciences, 19, 6, 224-34.

Jaggard, K. W., Qi, A., 2006, Agronomy. Sugar Beet, 134-68.

Kang, H., Kwon, S., Go, S., 2003, PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. Plant Pathology, 52, 2, 127-33.

Karnjanarat, S., Tsuchiya, K., Matsuyama, N., Wakimoto, S., 1987, Physiological, biochemical and pathological differentiation among strains of *Erwinia carotovora* isolated from Japan and Thailand. Japanese Journal of Phytopathology, 53, 4, 460-9.

Kenter, C., Hoffmann, C. M., Märländer, B., 2006, Effects of weather variables on sugar beet yield development (Beta vulgaris L.). European Journal of Agronomy, 24, 1, 62-9.

Khan, A. A., 1992, Preplant physiological seed conditioning. Horticultural reviews, 13, 1, 131-81.

King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E., 1954, Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. Translational Research, 44, 2, 301-7.

Kwon, S.-W., Go, S.-J., Kang, H.-W., Ryu, J.-C., Jo, J.-K., 1997, Phylogenetic analysis of Erwinia species based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 47, 4, 1061-7.

Lange, W., Brandenburg, W. A., De bock, T. S., 1999, Taxonomy and cultonomy of beet (Beta vulgaris L.). Botanical journal of the Linnean Society, 130, 1, 81-96.

Lee, J.-H., Shin, H., Ji, S., Malhotra, S., Kumar, M., Ryu, S., Heu, S., (2012). Complete genome sequence of phytopathogenic *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* bacteriophage PP1, Am Soc Microbiol.

Lelliott, R. A., Stead, D. E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants, Blackwell Scientific Publications, p.

Louws, F., Rademaker, J., De Bruijn, F., 1999, The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. Annual review of phytopathology, 37, 1, 81-125.

Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H.-S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., 2007, Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera Pectobacterium and Dickeya. Phytopathology, 97, 9, 1150-63.

Mahmoudi, E., Soleimani, M. J., Taghavi, M., 2007, Detection of bacterial soft-rot of crown imperial caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using specific PCR primers. Phytopathologia Mediterranea, 46, 2, 168-76.

Mansfeld, R., 1986, Rudolf Mansfelds Verzeichnis landwirtschaftlicher und g@: artnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen).

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., 2012, Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molecular plant pathology, 13, 6, 614-29.

McGrath, J. M., Panella, L., Frese, L., 2011, 1.1 Basic Botany of the Species. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Industrial Crops, 1.

Meng, X., Chai, A., Shi, Y., Xie, X., Ma, Z., Li, B., 2017, Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. Plant disease, 101, 2, 279-87.

Moliszewska, E., Nabrdalik, M., Piszczek, J., 2016, Tubercle disease (*Xanthomonas beticola*) and other gall-malformed diseases of sugar beet roots: a review. Journal of Plant Diseases and Protection, 123, 5, 197-203.

Muturi, P., Yu, J., Li, J., Jiang, M., Maina, A., Kariuki, S., Mwaura, F., Wei, H., 2018, Isolation and characterization of pectolytic bacterial pathogens infecting potatoes in Nakuru County, Kenya. Journal of applied microbiology, 124, 6, 1580-8.

Nabhan, S., Al-Chaabi, S., Abu-Ghorrah, M. Evaluation of pathogenicity of different Erwinia isolates causal agents of potato soft rot and blackleg, and assessment of susceptibility of some potato cultivars under laboratory conditions. The Ninth Arab Congress of Plant Protection, 19-23.

Nazerian, E., Sijam, K., Ahmad, Z. A. M., Vadamalai, G., 2013, Characterization of *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* as a new disease on Lettuce in Malaysia. Australasian plant disease notes, 8, 1, 105-7.

Nedaienia, R., Fassihiani, A., 2011, Host range and distribution of Pectobacterium betavasculorum the causal agent of bacterial vascular necrosis and root rot of sugarbeet in fars province. Iran. J. Plant Pathol, 47, 47-8.

Ngadze, E., Brady, C. L., Coutinho, T. A., Van der Waals, J. E., 2012, Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe. European Journal of Plant Pathology, 134, 3, 533-49.

Ni, L., Guo, L., Custers, J., Zhang, L., 2010, Characterization of calla lily soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Zt0505: Bacterial growth and pectate lyase activity under different conditions. Journal of Plant Pathology, 421-8.

Ozturk, M., Aksoy, H., Potrykus, M., Lojkowska, E., 2018, Genotypic and phenotypic variability of Pectobacterium strains causing blackleg and soft rot on potato in Turkey. European journal of plant pathology, 152, 1, 143-55.

Ozturk, M., Eroglu, Z., Soylu, S., 2019, First report of *Pectobacterium betavasculorum* associated with bacterial vascular necrosis and root rot disease of sugar beet in Turkey. New Disease Reports, 39, 20-.

Parthiban, V., Prakasam, V., Prabakar, K., 2012, Enzymatic changes in carrot roots induced by *Erwinia carotovora* var. *carotovora.* International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3, 2.

Pérombelon, M., 2002, Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant pathology, 51, 1, 1-12.

Pérombelon, M., Hyman, L., 1986, A rapid method for identifying and quantifying soft rot erwinias directly from plant material based on their temperature tolerances and sensitivity to erythromycin. Journal of Applied Bacteriology, 60, 1, 61-6.

Pérombelon, M., Hyman, L., 1992, Control of potato blackleg: production of healthy seed. Aspects of Applied Biology, 33, 77-84.

Pérombelon, M., Lumb, V., Hyman, L., 1987, A rapid method to identify and quantify soft rot erwinias on seed potato tubers 1. EPPO Bulletin, 17, 1, 25-35.

Pérombelon, M., Salmond, G., 1995. Bacterial soft rots. In: Prokaryotes. Eds: Elsevier, p. 1-20.

Perombelon, M., Van Der Wolf, J., 2002, Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum)* on potatoes: a laboratory manual. Dundee, Scotland: Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 10.

Perombelon, M. C., Kelman, A., 1980, Ecology of the soft rot erwinias. Annual review of phytopathology, 18, 1, 361-87.

Pierce, L., McCain, A., 1992, Selective medium for isolation of pectolytic Erwinia sp. Plant disease (USA).

Pitman, A. R., Wright, P. J., Galbraith, M. D., Harrow, S. A., 2008, Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. Australasian Plant Pathology, 37, 6, 559-68.

Rajeh, O., Hamed, K., 2000, Soft rot disease of vegetables in Jordan: host range, reaction of some potato cultivars to the infection and effect of planting date. Dirasat. Agricultural Sciences, 27, 2, 149-57.

Rajic, M., 1994, Effect of sowing time, fertilization method and irrigation method on the energy of germination and germination ability of sugar beet seed. Selekcija i semenarstvo.

Reddy, P. P., 2015. Plant protection in tropical root and tuber crops, Springer, p.

Rezaei, R., Taghavi, S. M., 2010, Phenotypic and genotypic characteristics of Iranian soft rot bacterial isolates from different hosts. Phytopathologia Mediterranea, 49, 2, 194-204.

Řezbová, H., Belová, A., Škubna, O., 2013, Sugar beet production in the European Union and their future trends. Agris on-line Papers in Economics and Informatics, 5, 665-2016-44967, 165.

Richardson, K., 2010, Traditional Breeding in Sugar Beet. Sugar Tech, 12, 3-4, 181-6.

Saleh, O., Huang, P. Y., Huang, J. S., 1996, Bacterial vascular necrosis and root rot disease of sugar beet in Egypt. Journal of Phytopathology, 144, 5, 225-30.

Samson, R., Legendre, J., Christen, R., 2005, Fischer Le Saux M., Achouak W., Gardan L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and Brenneria paradisiacal to the genus Dickeya gen. nov. as *Dickeya chrisanthemi* comb. nov. and Dickeya paradisiacal comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., and *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov., and *Dickeya zeae* sp. nov. International Journal of Systematic Evolution and Microbiology.

Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W., 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. Ed. 3, American Phytopathological Society (APS Press), p.

Seo, S., Furuya, N., Lim, C., Takanami, Y., Tsuchiya, K., 2002, Phenotypic and genetic diversity of Erwinia carotovora ssp. carotovora strains from Asia. Journal of Phytopathology, 150, 3, 120-7.

Singh, R., Agrawal, M., 2007, Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. Chemosphere, 67, 11, 2229-40.

Smith, C., Bartz, J., 1990, Variation in the pathogenicity and aggressiveness of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. Plant Disease, 74, 7, 505-9.

Terta, M., Azelmat, S., M'hand, R. A., Achbani, E. H., Barakate, M., Bouteau, F., Ennaji, M. M., 2012, Molecular typing of *Pectobacterium carotovorum* isolated from potato tuber soft rot in Morocco. Annals of microbiology, 62, 4, 1411-7.

Thomson, S., Hildebrand, D., Schroth, M., 1981, Identification and Nutritional Differentiation of the Erwinia Sugar Beet Pathogen from Members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi.* Phytopathology, 71, 10, 1037-42.

Thomson, S., Schroth, M., Hills, F., Whitney, E., Hildebrand, D., 1977, Bacterial vascular necrosis and rot of sugarbeet: general description and etiology. Phytopathology, 67, 10, 1183-9.

Todar, K., 2009, Todar's online textbook of bacteriology. 2008. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Dept. of Bacterology.

Togashi, J., 1988, Identification of the organisms causing soft-rot disease in vegetables in the fields of the Tsuruoka District. Bulletin of the Yamagata University (Agricultural Science), 10, 3, 473-8.

Toth, I., Avrova, A., Hyman, L., 2001, Rapid identification and differentiation of the soft rot erwinias by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. Appl. Environ. Microbiol., 67, 9, 4070-6.

Toth, I., Van Der Wolf, J., Saddler, G., LOjkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsror, L., Elphinstone, J., 2011, Dickeya species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant pathology, 60, 3, 385-99.

Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., Birch, P. R., 2003, Soft rot erwiniae: from genes to genomes. Molecular plant pathology, 4, 1, 17-30.

van der Merwe, J. J., Coutinho, T. A., Korsten, L., van der Waals, J. E., 2010, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. European Journal of Plant Pathology, 126, 2, 175-85.

Verdonck, L., Mergaert, J., Rijckaert, C., Swings, J., Kersters, K., De Ley, J., 1987, Genus Erwinia: numerical analysis of phenotypic features. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 37, 1, 4-18.

Wilson, K., 2001, Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocols in molecular biology, 56, 1, 2.4. 1-2.4. 5.

Windels, C. E., Bradley, C. A., Khan, M. F., 2003, Comparison of Cercospora and Bacterial Leaf Spots on Sugarbeet.

Withers, H., Swift, S., Williams, P., 2001, Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. Current opinion in microbiology, 4, 2, 186-93.

Wu, J., Diao, Y., Gu, Y., Hu, Z., 2011, Molecular detection of Pectobacterium species causing soft rot of Amorphophallus konjac. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27, 3, 613-8.

Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B., Andrivon, D., 2003, Biochemical and molecular diversity among Erwinia isolates from potato in Algeria. Plant pathology, 52, 1, 28-40.

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, 2746-59.

Zhu, L., Xie, H., Chen, S., Ma, R., 2010, Rapid isolation, identification and phylogenetic analysis of *Pectobacterium carotovorum* ssp. Journal of plant pathology, 479-83.

Zidack, N. K., Jacobsen, B. J., 2001, First Report and Virulence Evaluation of *Erwinia carotovora subsp. betavasculorum* on Sugarbeet in Montana. Plant health progress, 2, 1, 6.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Belgacem HATTAB
Uyruğu : Tunisian
Doğum Yeri ve Tarihi : TATAOUINE (TUNISIA) – 27/11/1990
Telefon : +905395625437
e-mail : gsoma3200@yahoo.fr

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Lycée Mixte de TATAOUINE	2010
Üniversite	:	Higher School of Agriculture of KEF, Boulifa, EL-KEF	2013
Yüksek Lisans	:	Selçuk University, Selçuklu, KONYA	2019

YABANCI DİLLER: Arapça (Anadil) - Fransızca - İngilizce - Türkçe