



## Orta Karadeniz Bölgesi'nde *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*'nin izolasyonu ve tanılanması

### Isolation and identification of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in Middle Black Sea Region of Turkey

Demet ÇELİK ERTEKİN<sup>1</sup>, Özer ÇALIŞ<sup>2</sup>, Yusuf YANAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Bölümü, 55300, Samsun

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 07070, Antalya

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 07070, Antalya

Sorumlu yazar (Corresponding author): D. Çelik Ertekin, e-posta (e-mail): demet.celikertekin@tarimorman.gov.tr

Yazar(lar) e-posta (Author e-mail): ozercalis@akdeniz.edu.tr, yusuf.yanar@gop.edu.tr

#### MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 04 Ağustos 2020  
Düzeltilme tarihi 17 Kasım 2020  
Kabul tarihi 26 Kasım 2020

#### Anahtar Kelimeler:

Hale yanıklığı  
Adi yaprak yanıklığı  
İrk  
PCR

#### ÖZ

Orta Karadeniz Bölgesi Samsun, Tokat ve Amasya ili fasulye üretim alanlarında 2013-2014 yıllarında fasulye hale yanıklığı hastalığı etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Psp*) ve adi yaprak yanıklığı hastalığı etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*)'nin belirlenmesi için surveyler yapılmıştır. Güdümlü örnekleme yöntemiyle toplam 154 fasulye tarlası gezilerek şüpheli semptom gösteren yaprak ve meyve örnekleri toplanmıştır. İzolasyon çalışmaları sonucu 72 adet saf bakteri izolatu elde edilmiştir. Patojenisite, morfolojik, biyokimyasal testler, tanıyı destekleyici LOPAT testleri ve moleküler analizler (PCR) sonucunda 30 izolat *Psp* ve 17 izolat *Xap* olarak tanılanmıştır. *Psp* izolatları 8 farklı fasulye çeşidinden oluşan ırk ayırım setindeki bitkilere inokule edilmiş ve çeşitlerin verdiği reaksiyonlara göre *Psp*'nin ırk/ırkları belirlenmiştir. Çeşit reaksiyonlarına göre *Psp* izolatlarının tamamının 1 nolu ırk olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Türkiye fasulye üretiminin % 16'sının gerçekleştiği Orta Karadeniz bölgesinde evrensel ırk ayırım seti kullanılarak *Psp* izolatlarının ırk düzeyinde ayrımı ilk kez yapılmıştır.

#### ARTICLE INFO

Received 04 August 2020  
Received in revised form 17 November 2020  
Accepted 26 November 2020

#### Keywords:

Halo blight  
Common bacterial blight  
Race  
PCR

#### ABSTRACT

In 2013-2014, surveys were conducted in order to investigate the presence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Psp*) halo blight and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (common bacterial blight) (*Xap*) in common bean production areas of Samsun, Tokat, Amasya at Middle Black Sea region. Total, 154 common bean fields were surveyed and their leaf and bean samples were collected with typically resembling symptoms using guided sampling method. Total of 72 purified bacterial isolates were obtained. All the isolates assayed in pathogenicity, morphological, biochemical tests. Further identification methods were conducted with LOPAT tests and molecular analyses (PCR), their results have revealed that 30 isolates were *Psp* and 17 isolates were *Xap*. *Psp* isolates were separately inoculated on 8 bean varieties to determine their races according to phenotypic reactions. Their reactions on 8 bean varieties were revealed that all *Psp* isolates were *Psp* race 1. This work are proved that races of *Psp* isolates using universal separation set at Middle Black Sea region in which supplies about 16 % of the total bean production in Turkey.

## 1. Giriş

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) *Leguminosae* familyasına ait bir baklagil bitkisi olup anavatanının Güney Amerika olduğu bildirilmektedir. Baklagil bitkileri gurubu içerisinde yer alan fasulyenin insan beslenmesinde önemli bir yeri vardır (Bozoğlu 1995). Dünyada üretim miktarı açısından ülkemiz Çin, Hindistan, Amerika, Meksika, Tanzanya ve Endonezya'dan sonra 800.949 ton ile yedinci sırada gelmektedir (FAO 2018).

Taze sebze, kuru dane ve konserve gibi değişik şekillerde değerlendirilen fasulye Türkiye'de en fazla Karadeniz Bölgesinde üretilmektedir. Karadeniz Bölgesi Türkiye fasulye üretiminin tazedde 111.341 dekar alandan 115.543 tonunu, kuruda 83.031 dekar alandan 122.99 tonunu karşılamaktadır. Bölge içerisinde ise 40.035 (38.643 ton taze, 1.392 ton kuru) tonluk üretim ile Tokat birinci, 24.524 (23.323 ton taze, 1201

ton kuru) tonluk üretim ile Samsun ikinci, 6.008 (5.665 ton taze, 343 ton kuru) tonluk üretim ile Amasya üçüncü sıradadır (TÜİK 2019). Bu üç il toplam bölge üretiminin yaklaşık %55'ini karşılamaktadır.

İstatistiksel veriler incelendiğinde birim alandan elde edilen verimin düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun en temel nedenleri uygulamada yapılan teknik yanlışlıklar, bölgeye adapte olmuş yüksek verimli çeşitlerin kullanılmaması, genel hastalık ve zararlıların neden olduğu kayıplardır (Balkaya ve ark. 1999). Verim düşüklüğüne etki eden faktörler arasında hastalık etmenlerinden kaynaklanan zararlar önemli bir yere sahiptir. Ülkemiz ekonomisi içinde önemli bir yere sahip olan fasulye üretimi birçok bakteriyel, fungal ve viral patojenler tarafından olumsuz etkilenmektedir (Nywall 1989).

Fasulye bitkisinde yaygın olarak görülen ekonomik öneme sahip en önemli bakteriyel hastalık etmenleri *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Psp*), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) olduğu bildirilmiştir (Goto 1992; Sigeo 1993; Hall 1994; Howard ve ark. 1994). Genel olarak bakıldığında bu hastalık etmenleri içerisinde fasulyede verimi ve üretimi en fazla etkileyen bakteriyel hastalıklar hale yanıklığı olarak bilinen *Psp* ve adi yaprak yanıklığı etmeni olarak bilinen *Xap*'dir (Taylor ve ark. 1996; Allen ve ark. 1998; Ferreira ve ark. 2003).

*Psp* ve *Xap* etmenleri fasulyede ciddi kalite ve kantite kayıplarına neden olmaktadır. Uygun koşullar altında *Psp* %43 *Xap* ise %45 oranında verimi azaltmaktadır (Schwartz 1989; Saettler 1994). Etmenlerin ülkemizde farklı bölge ve illerdeki varlığı yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (Benlioğlu ve ark. 1994; Bozkurt ve Soylu 2001; Dönmez ve ark. 2013; Baştaş ve Şahin 2017).

*Psp* dokuz farklı ırka sahip olup 8 fasulye çeşidinin yer aldığı ırk ayrım seti üzerinde test edilip reaksiyon durumlarına göre ırk ayrımları yapılabilmektedir (Fourie ve ark. 2004). Ulusal ve uluslararası farklı çalışmalarla *Psp* ırklarının varlığı ortaya konmuştur (Zaiter ve ark. 1989; Benlioğlu ve ark. 1994; Fourie 1998).

Bu çalışma ile Samsun, Tokat ve Amasya ili fasulye üretim alanlarında hale yanıklığı ve adi yaprak yanıklığı hastalığının bölge izolatları temin edilmiş, hasta bitki örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik, biyokimyasal testleri ve moleküler analizler (Touchdown Koloni PCR) ile tanıları yapılmıştır. Ayrıca hale yanıklığı etmeninin ırk düzeyinde ayrımı yapılarak bölge izolatlarının ırkı belirlenmiştir.

## 2. Materyal ve Yöntem

Çalışmanın ana materyalini Samsun, Tokat ve Amasya il ve ilçelerinde fasulye üretim alanlarındaki hastalıklı fasulye bitkilerinden elde edilen *Psp* ve *Xap* izolatları oluşturmaktadır. *Psp* ırk ayrımında ABD Tarımsal Araştırmalar Bölümü (United States Department of Agriculture Research Service: USDA-ARS)'nden temin edilmiş olan ırk ayrım setine ait tohumlar (Canadian Wonder, A52 (ZAA 54), Tendergreen, Red Mexican UI3, 1072, A53 (ZAA 55), A43 (ZAA 12), Guatemala 196-B) kullanılmıştır.

### 2.1. Sürvey çalışmaları ve etmenlerin izolasyonu

Samsun, Tokat ve Amasya illeri fasulye üretim alanlarında 2013 ve 2014 yılları üretim sezonunda sürveyler yapılarak, *Psp* ve *Xap* bakteriyel etmenleriyle bulaşık olduğu

düşünülen hastalıklı yaprak ve meyve örnekleri basit güdümlü örneklemeye metoduna göre toplanmıştır. Bakteri izolasyon işlemlerinde King B (KB) (proteose peptone 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O 1.5 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10 g, glycerol 10 g, agar 15 g, distile su 1000 ml) (King ve ark. 1954), Yeast Dekstroza Chalk Agar (YDC) (yeast-extract 10 g, glucose 20 g, CaCO<sub>3</sub> (ince toz) 20 g, agar 12 g, distile su 1000 ml) katı besi yerleri ve Nutrient Broth (NB) (nutrient broth 8 g, distile su 1000 ml) sıvı besi yeri kullanılmıştır. Besi yerine çizgi ekimi yapılan petriyeler 26°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

### 2.2. İzolatların tanısı

#### 2.2.1. Morfolojik ve biyokimyasal yöntemler

Besi yerinde gelişim morfolojik olarak incelenmiş olup *Psp* için mukoid, beyaz-krem renkte koloniler, *Xap* için sarı renk mukoid koloniler alt kültür olarak seçilmiştir. *Xap* ve bu bakteriyel etmene benzerlik gösteren *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*'ı birbirinden ayırabilmek için YDC besi yerinde ekimi yapılan izolatlardan inkübasyon sonunda pigment oluşturmayanlar *Xap* olarak seçilmiştir. Saflaştırılan izolatlar ile potasyum hidroksit testi (KOH) ile gram reaksiyon, flouresan pigment üretim testi, anaerobik gelişim ve levon oluşumu, oksidaz testi, pektolitik aktivite testi, arginine dehidrolaz aktivitesi, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu (Hypersensitive Reaction) (LOPAT Testleri) yapılmıştır (Lelliott ve Stead 1987; Klement ve ark. 1990; Schaad ve ark. 2001).

#### 2.2.2. Patojenite testleri

Kontrollü koşullarda yürütülen patojenite çalışmalarında *Psp* için Canadian Wonder, *Xap* için Gina fasulye çeşitleri kullanılmıştır. Denemede fasulyenin hem bitkisi hem de meyveleri kullanılmış olup 5 tekrerrürlü olarak kurulmuştur. Yaprak inokulasyonunda King B ve YDC besi yerinde 27°C'de 48 saat geliştirilmiş olan izolatlar spektrofotometrede 600 nm 0.2 absorbans değerine (10<sup>8</sup> hücre ml<sup>-1</sup> yoğunluğuna) ayarlanmış ve 4 yapraklı fasulye fidelerine püskürtülmüştür. İnokule edilen bitkiler iklim odasında (nispi nem %70-75, sıcaklık 22-25°C) inkübasyona bırakılmıştır. Bitkilerin üzerine polietilen torba geçirilerek 24 saat sürede nem çemberine alınmıştır. Meyve inokulasyonunda %70'lik alkol ile yüzey dezenfeksiyonu yapılan fasulye meyvelerine steril kürdan ile besi yeri üzerinden alınan bakteri doğrudan inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonraki 7-10 gün boyunca semptom gelişimi günlük olarak incelenmiş ve bu süre sonrasında en virulent izolatlar seçilmiştir.

#### 2.2.3. Moleküler Analizler

##### 2.2.3.1. Touchdown koloni polimeraz zincir reaksiyonu

Saflaştırılmış ve biyokimyasal testleri ile tanısı yapılmış olan izolatların moleküler tanı çalışmasında Touch down koloni PCR metodundan faydalanılmıştır. Bunun için Geneious 7 yazılımı üzerinden (Biomatters Auckland, New Zealand) sentezlenmiş olan ve BLAST analizleri ile sadece *Psp* ve *Xap* hastalık etmenlerine %100 spesifik olduğu "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" web sitesinden onaylandıktan sonra 'Primer 3 Input version 4.0' programı kullanılarak spesifik olarak elde edilen primerler kullanılmıştır (Çizelge 1). *Psp* izolatları King B (KB), *Xap* izolatları YDC spesifik besiyerlerine çizgi ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılmış

**Çizelge 1.** Bakteriyel etmenleri belirlemek için kullanılan primerler.

**Table 1.** Primers used to determine bacterial pathogen.

Bakteriyel Etmen	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Büyükükü k (bp)
<i>Psp</i>	PspHF	GCGCTGTACACCGAAATCAT	981
	PspHR	CCAGGCTTTCAGGGTCAGTA	
<i>Xap</i>	XapMeF	ACGGTCACGCGGAACCTATAC	977
	XapMeR	TTCTGTGCGATACAGCTTGG	

besi yerleri 28°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu süreç sonunda besi yerlerinde tek koloni gelişimleri sağlanmıştır. Elde edilen tek kolonilerden touchdown koloni PCR'ı yapılmıştır.

PCR reaksiyon karışım içeriği toplam 25 µL hacminde hazırlanmıştır (dsH<sub>2</sub>O 18.3 µL, 10XPCR Buffer 2.5 µL, MgCl<sub>2</sub> 1.0 µL, dNTP 1.0 µL, PrimerF 1.0 µL, PrimerR 1.0 µL, Taq polimeraz 0.2 µL). Spesifik besi yerinde gelişen tek koloniler seçilerek steril kürdan ile doğrudan ayrı ayrı tüplerdeki PCR reaksiyon karışımına aşılanmıştır. PCR döngü işlemi Sambrook ve ark. (1989)'na göre uygun thermalcycler cihazında (Bio-Rad T100, USA) yapılmıştır. Buna göre; Touchdown koloni PCR'ı için protokol 95°C 4 dk inkübasyon adımıyla başlamış, 95°C 30 sn denaturasyon 56 °C 30 sn primer bağlama, 72°C 1.5 dk amplifikasyon sentezi olacak şekilde 24 döngüye tamamlanmış ve 72°C 10 dk. Inkübasyon şeklinde programlanmıştır. Amplifiye edilen gen bölgesinde *Psp* için 981bp, *Xap* için 977bp'da tek bant oluşumu beklenmiştir.

PCR ürünleri 1x Tris-asetate EDTA (TAE Buffer) kullanılarak %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 80V (Volt) doğru akımda 1.5-2 saat koşuturularak elektroforeze tabi tutulmuştur. Jeldeki PCR fragmentlerinin varlığı elektroforesis jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülenmiştir (Vilber Lourmat, France).

### 2.3. *Psp* İzolatlarının ırk düzeyinde ayrımının yapılması

İrk ayrım setinde yer alan fasulye çeşit/hatlara ait 4'er tohum torf dolu saksılara ekilip fideler 4 yapraklı döneme geldiğinde yaprak inokulasyonu yapılmıştır. *Psp* izolatları KB besi yeri üzerinde 27°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Gelişen bakteri kültürlerinden solüsyonlar hazırlanmış ve yapışmayı sağlamak amacıyla pastör pipet ile 5 damla Tween 20 eklenmiştir. Hazırlanan bakteri solüsyonlarının konsantrasyonu UV spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 10<sup>8</sup> hücre ml<sup>-1</sup> olarak ayarlanmış ve fidelere el pülverizatörü kullanılarak yapraklar ıslanana kadar spreyleneştir. İnokule edilen bitkiler iklim odasında (nispi nem %70-75, sıcaklık 22-25°C) inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri inokulasyonu yapılan bitkilerin üzerlerine polietilen torba geçirilerek nem çemberine alınmıştır. Üç gün sonra torbalar çıkarılmış olup bitkilerde 7-10

gün boyunca günlük olarak semptom gelişimi incelenmiştir. Meyve inokulasyonunda steril petripler içerisindeki KB besi yerinde geliştirilen iki günlük bakteri kültürlerinden kürdan ile alınan bakteri kolonileri meyveler üzerine batırılarak aktarılmıştır. *Psp*'nin farklı izolatlarının uygulandığı noktalar arasında 0.5 cm boşluk bırakılmıştır. Bu şekilde inokule edilen meyveler tabanında ıslak kurutma kağıtları bulunan şeffaf plastik kaplar içerisinde 22°C sıcaklık ve 12 gece/gün fotoperiyotta inkübe edilmiştir. İnokulasyondan 10-15 gün sonra sonuçlar ırk ayrım setine göre değerlendirilmiş ve *Psp* izolatlarının ırk düzeyinde ayrımı yapılmıştır. (Çizelge 2).

### 3. Bulgular ve Tartışma

Samsun, Tokat ve Amasya ili merkez ve ilçelerinde fasulye üretim alanlarında, hale yanıklığı ve adı yaprak yanıklığı hastalığının bölgedeki varlığının tespiti için 2013-2014 yılı üretim sezonu boyunca survey çalışmaları yapılmıştır. Survey çalışmalarında Samsun iline bağlı Çarşamba'da 54, Bafra'da 20 ve Terme'de 16, Tokat ili merkez'de 10, Erbaa'da 30 ve Pazar'da 15 ve Amasya ili merkez'de 9 olmak üzere toplam 154 fasulye tarlasında survey gerçekleştirilmiştir. Survey çalışmaları güdümlü örnekleme metoduna göre yapılmış olup toplamda 90 adet şüpheli fasulye yaprak ve meyve örneği toplanmıştır (Çizelge 3).

Şüpheli bitki numuneleri incelendiğinde yapraklarda sarı-yeşil zonla çevrili kahverengi lekeler ve su emmiş hafif çökük koyu kırmızı-kahve renkte lekeler, meyvede ise toplu iğne başı şeklinde akıntı görülen su emmiş lekelerin olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak survey yapılan alanlar incelendiğinde hastalık belirtilerinin sıkı fasulyeden ziyade yer tipi fasulyelerde yaygınlık gösterdiği ve problem olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun yer fasulyesinde daha nemli bir ortam oluşması ve böylece bakterilerin daha iyi gelişmesini tetiklenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Çizelge 3.** Survey çalışmalarının yürütüldüğü il/ilçe, gezilen tarla ve toplanan örnek sayıları.

**Table 3.** Location of collected samples, number of surveyed fields and number 10 of samples collected from each location.

Örnek Toplanan İller	İlçe	Survey Yapılan Tarla Sayısı	Toplanan Örnek Sayısı
Samsun	Çarşamba	54	36
	Bafra	20	11
	Terme	16	6
Tokat	Merkez	10	7
	Erbaa	30	25
	Pazar	15	5
Amasya	Merkez	9	5

**Çizelge 2.** İrk ayrım setindeki çeşit/hatların farklı *Psp* ırklarına vermiş oldukları reaksiyonlar (R: Dayanıklı, S: Hassas) (Fourie ve ark. 2004).

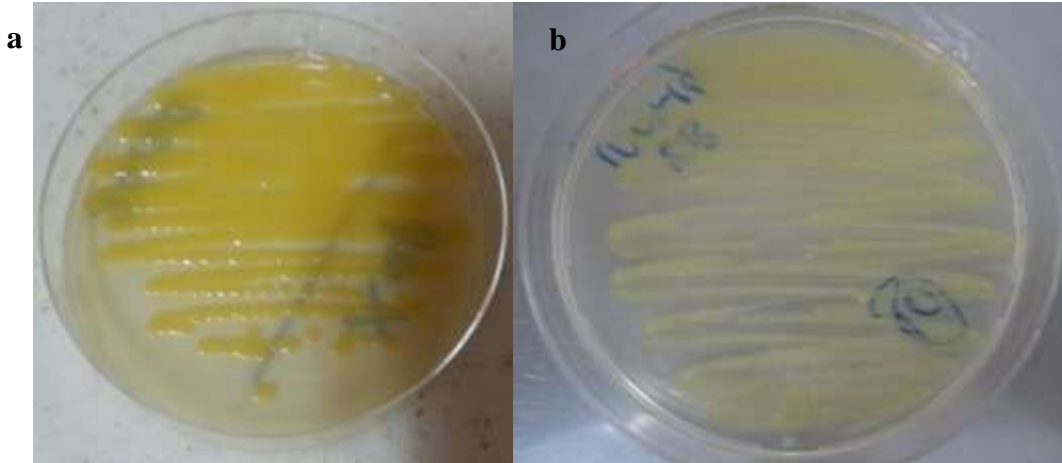
**Table 2.** Reactions of variety/lines in differential set to *Psp* races (R: Resistant, S: Sensitive) (Fourie ve ark. 2004).

Çeşitler/Hatlar	İrklar								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Canadian Wonder	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A 52 (ZAA 54)	S	S	S	S	R	S	S	S	S
Tendergreen	S	S	R	R	S	S	S	S	S
Red Mexican UI 3	R	S	S	S	R	S	R	S	R
1072	S	R	S	R	R	S	R	S	S
A53 (ZAA 55)	S	S	R	R	R	S	S	S	S
A43 (ZAA 12)	S	R	R	R	R	S	R	R	R
Guatemala 196-B	R	S	R	R	R	S	R	S	R

Yapılan bu çalışmada, hastalıklı bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar ve saflaştırma çalışmaları sonucu 2013 yılında 38 ve 2014 yılında 42 adet bakteri izolatu elde edilmiştir (Şekil 1). Bu izolatlara KOH ile Gram reaksiyon, 360 nm dalga boyuna sahip UV ışığı altında flourosan pigment üretimi ve aneorobik gelişim testi uygulanmıştır. Gram negatif, 360 nm UV ışığında flourosan pigment oluşturan ve anaerobik gelişim göstermeyen izolatlar *Psp* ve gram reaksiyon testi negatif, flourosan pigment üretmeyen ve anaerobik gelişim göstermeyen izolatlar *Xap* olarak gruplandırılmıştır. Ayrıca tüm izoatlara uygulanan LOPAT testleri sonucunda Levan pozitif, oksidaz negatif, pektolitik aktivite negatif, arginine negatif ve tütünde HR pozitif sonuç veren 30 izolat *Pseudomonas savastanoi* olarak gruplandırılmıştır. *Xap* ve *Psp* biyokimyasal özellikleri yapılan diğer farklı çalışmalarla da ortaya koyulmuştur. (Wortmann ve Allen 1994, Güven ve ark. 2004; Popovic ve ark. 2010).

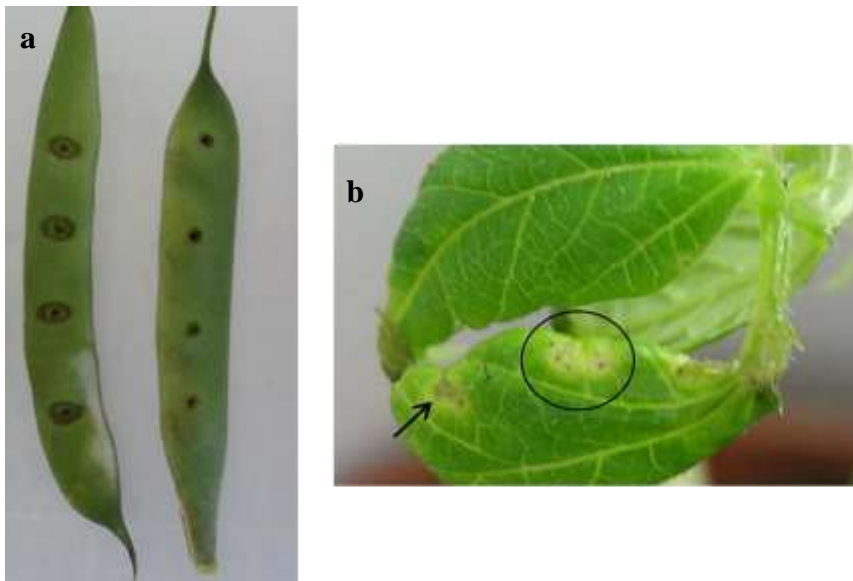
Bu çalışma ile bölgede fasulye üretim alanlarında sadece *Psp* ve *Xap* etmenleri tespit edilmiş diğer etmenlere rastlanılmamıştır. Baştaş ve Şahin (2017), yapmış oldukları çalışmada fasulyede ekonomik olarak öneme sahip ve tohumla

taşınan *Xap*, *Psp*, *Pss* ve *Cff* etmenlerinin var olduğunu ancak en fazla rastlanan ve sorun oluşturan etmenlerin *Psp* ve *Xap* olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin tür teşhisi çalışmalarında birçok biyokimyasal ve moleküler teknikler yeterli olsa da *Xanthomonas* ve *Pseudomonas* türlerinin patovarlık düzeyini belirlemek için patojenisite testi büyük önem arz etmektedir (Popovic ve ark. 2010). Patojenisite testinde ilk semptomlar inokulasyondan 7-10 gün sonra görülmeye başlanmıştır. Yaprakta *Psp* izolatları sulanmış lekeler şeklinde lezyonlar ve toksin üretimine bağlı olarak lekelerin etrafında sarı haleler ve *Xap* izolatları ise yaprak kenarlarında etrafı sarı hale ile çevrili kahverengi yanıklıklar şeklinde belirti oluşturmuştur. Meyve inokulasyonunda ise inokulasyon noktasında ıslaklık ve zamanla dokuda çökme gözlemlenmiştir (Şekil 2). Benzer şekilde Saygılı ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada *Psp* belirtilerinin başlangıçta yaprakta küçük ıslak lekeler şeklinde başlayıp bu kısımların zamanla kuruyarak küçük 3-6 mm çapında nekrotik lekelerle dönüştüğü ve lekelerin etrafının bakteriyel toksin tarafından neden olunan yeşilimsi sarı bir hale ile kuşatıldığı bu kapsamda nispeten küçük leke etrafında



Şekil 1. a) YDC besi yerinde gelişen sarı renkte *Xap* kolonileri b) King B besi yerinde gelişen krem renkte *Psp* kolonileri.

Figure 1. a) Yellow colored *Xap* colonies growing on YDC medium b) Cream colored *Psp* colonies growing in King B medium.



Şekil 2. a) İnokulasyondan 7 gün sonra meyvede *Xap* belirtileri b) İnokulasyondan 10 gün sonra yaprakta *Psp* belirtileri.

Figure 2. a) *Xap* symptoms observed on capsule 7 days after inoculation b) *Psp* symptoms observed on leaves 10 days after inoculation.

gelişen geniş hale oluşumu ile *Xap* belirtilerinden ayırt edildiği ayrıca meyve üzerindeki ıslaklıkların küçük toplu iğne başı büyüklüğünde ıslaklık şeklinde başladığı geç dönemlerde bu alanların kahverengileşerek içe doğru çökmüş nekrotik doku halini aldığı bildirilmektedir.

Saflaştırılan bakteriyel izolatların Touch down koloni PCR ile moleküler tanısı yapılmıştır. Patojene spesifik *PspH* ve *XapMeR* primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR çalışması sonucunda %1'lik agaroz jel üzerinde *Psp* için 981 bp, *Xap* için 977bp büyüklüğünde bant oluşumu saptanmış ve sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3).

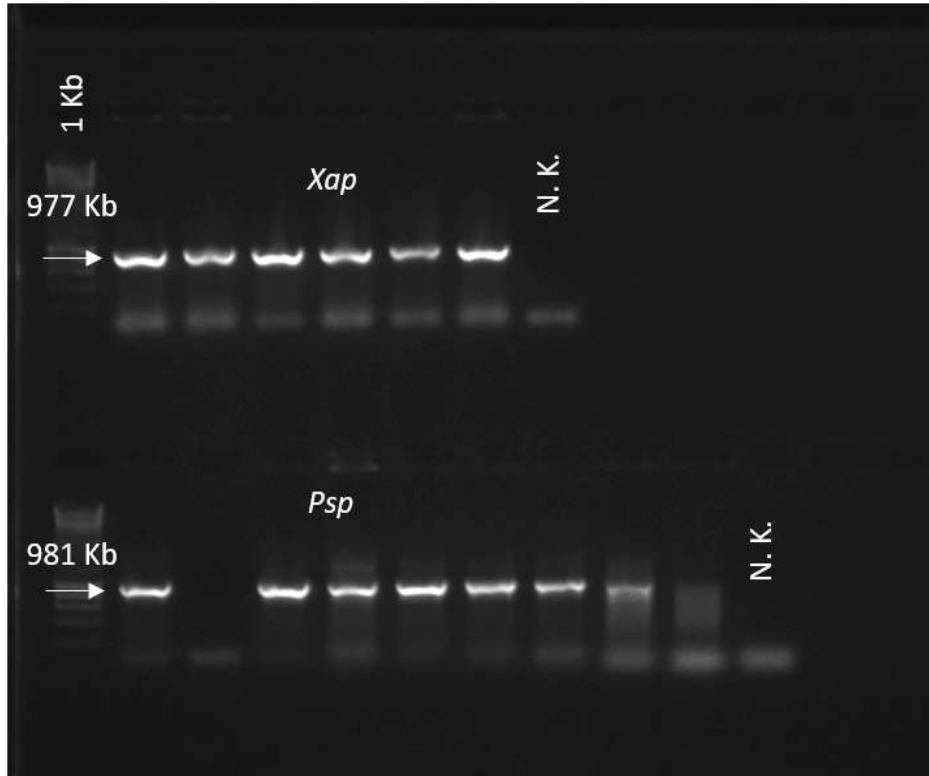
Yapılan morfolojik, biyokimyasal testler, LOPAT testleri ve moleküler analizler sonucunda 30 izolatın *Psp* ve 17 izolatın *Xap* olarak tanımlanmıştır. İller düzeyinde *Psp* ve *Xap* Amasya ilinde tespit edilmemiş olup Samsun ve Tokat ilinde varlıkları yapılan analizler ile onaylanmıştır. *Psp*'nin en fazla Samsun ili Çarşamba ilçesinde *Xap*'nin ise Tokat ili Erbaa ilçesinde daha yaygın olduğu görülmektedir (Çizelge 4).

Morfolojik incelemeler, biyokimyasal testler ve moleküler çalışmalar sonucu *Psp* olarak belirlenen izolatlarda ırk ayırım çalışmaları yapılmıştır. KB besi yerinde geliştirilmiş olan 2 günlük bakteri kültürleri ile inokule edilen yaprak ve meyve örneklerindeki belirtiler incelenerek kaydedilmiştir (Şekil 4, Şekil 5). Yapraklarda inokulasyondan sonraki 5. günde, meyvelerde ise inokulasyondan sonraki 7. günde belirtiler görülmüştür.

İrk ayırım setinde yer alan çeşitlerin yaprak ve meyve inokulasyonunu takiben yapılan incelemeler sonucunda tüm

izolatlara karşı Canadian Wonder, A52, Tendergreen, 1072, A53, A43 hassas bulunurken Red Mexican ve Guatemala'nın dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. Yaprak inokulasyonunda hassas olan çeşitlerde solgunluk ve kuruma görülürken, meyve inokulasyonunda inokulasyon noktasında tipik ıslaklık belirtileri görülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde tanı çalışması tamamlanmış 30 *Psp* izolatın tamamının 1 nolu ırk olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Fourie (1998) tarafından yapılan bir çalışmada *Psp*'nin sahip olduğu ırklar içerisinde 1 nolu ırkın hemen hemen tüm lokasyonlarda görülürken diğer ırklarının nadir görüldüğü bildirilmektedir. Benlioğlu ve ark. (1994) ise Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplamış oldukları fasulye tohumlarından izole ettikleri *Psp* izolatlarının ırk düzeyinde ayırımını ırk ayırım setini kullanarak yapmışlar ve tüm izolatların 1 nolu ırk olduğu ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi'nde fasulye üretiminin yoğun olarak yapıldığı Samsun, Tokat ve Amasya illerinde fasulye hale yanıklığı hastalığı (*Psp*) ve adi yaprak yanıklığı hastalığı (*Xap*)'nın varlığı belirlenmiştir, Bölgeden toplanan hastalıklı fasulye bitkilerinden izole edilen *Psp* ve *Xap* izolatlarının morfolojik, biyokimyasal özellikleri belirlenmiş olup, moleküler (PCR) analizler ile tanısı yapılmıştır. Türkiye fasulye üretiminin yaklaşık %55'inin yapıldığı Samsun, Tokat ve Amasya illerinden izole edilen *Psp* izolatlarının ırk düzeyinde ayırımı ilk kez bu çalışma ile yapılmıştır. Evrensel ırk ayırım seti kullanılarak yapılan fasulye yaprak ve meyve inokulasyonu çalışmaları sonucunda skala okumaları yapılmış ve bölgede *Psp* 1 nolu ırkın var olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. Touch down koloni PCR çalışması sonucu jel üzerinde oluşan bantlar (N.K: Negatif Kontrol).

Figure 3. Bands formed on the gel as a result of Touch down colony PCR study (N.K: Negative Control).

**Çizelge 4.** Bakteriyel izolatların elde edildiği yer ve pozitif izolat sayısı.

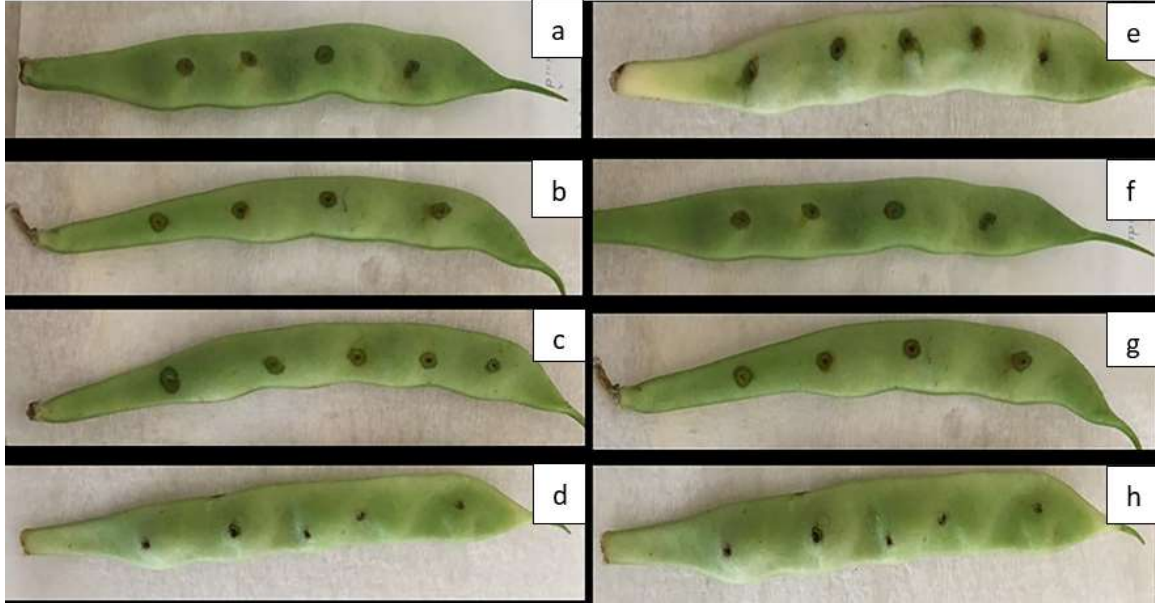
**Table 4.** Location where the bacterial isolates obtained and number of positive isolates.

Örneğin Alındığı İl	İlçe	Mevkii	<i>Psp</i> Pozitif Örnek Sayısı	<i>Xap</i> Pozitif Örnek Sayısı	
Samsun	Bafra	Ağıllar	4		
		Çarşamba	2		
	Terme	Bölmeçayır	Damlataş	6	2
			Karabahçe	2	
		Kızılot		1	
		Kirazbucağı	1		
		Merkez	1		
		Yenikaracalı		1	
		Yeniköseli	1		
		Karakiraz	1		
Merkez	1	4			
Çay	2				
Tokat	Merkez	Büyükbağlar	1		
		Küçükbağlar	1		
	Erbaa	Aşağıçandır	3		
		Çalkara	1	4	
		Hacıpazarı		1	
	Kızılçubuk		1	1	
		Yukarıçandır	1	1	
	Pazar	Üzümlören		1	4
				2	



**Şekil 4.** *Psp* izolatlarının yaprak inokulasyondan 20 gün sonra ırk ayırım setindeki çeşitlerde oluşan reaksiyonları (a; Canadian Wonder (S), b; A52 (S), c; Tendergreen (S), d; Red Mexican (R), e; 1072 (S), f; ZAA 55 (S), g; ZAA 12 (S), h; Guatemala (R)). R: Dayanıklı, S: Hassas.

**Figure 4.** Reactions of *Psp* isolates in the varieties of differential set 20 days after leaves inoculation. (a; Canadian Wonder (S), b; A52 (S), c; Tendergreen (S), d; Red Mexican (R), e; 1072 (S), f; ZAA 55 (S), g; ZAA 12 (S), h; Guatemala (R)) R: Resistance, S: Sensitive.



Şekil 5. Psp izolatlarının meyve inokulasyonundan 7 gün sonra ırk ayırım setindeki çeşitlerde oluşan reaksiyonları (a; Canadian Wonder (S), b; A52 (S), c; Tendergreen (S), d; Red Mexican (R), e; 1072 (S), f; ZAA 55 (S), g; ZAA 12 (S), h; Guatemala (R). R: Dayanıkl, S: Hassas.

Figure 5. Reactions of Psp isolates in the varieties of differential set 7 days after fruit inoculation (a; Canadian Wonder (S), b; A52 (S), c; Tendergreen (S), d; Red Mexican (R), e; 1072 (S), f; ZAA 55 (S), g; ZAA 12 (S), h; Guatemala (R). R: Resistance, S: Sensitive.

## Teşekkür

Bu çalışma, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM-BS-12/09-03/02-06 nolu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynakça

- Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M (1998) Crop evapotranspiration guidelines for computing crop water requirements. FAO irrigation and drainage paper 56. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Balkaya A, Yanmaz R, Bozoğlu H, Gülümser A (1999) Samsun ilinin taze fasulye yetiştiriciliği yönünden durumunun belirlenmesi. Karadeniz Bölgesi Tarım Sempozyumu, Samsun, Cilt 1, pp. 51-62.
- Baştaş KK, Şahin F (2017) Evaluation of seed borne bacterial pathogens on common bean cultivars grown in central Anatolia region Turkey. European Journal of Plant Pathology 147(2): 239-253.
- Benlioğlu K, Özakman M, Önceler Z (1994) Bacterial blights of beans in Türkiye and resistance to halo blight and common blight. 9<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası-Aydın, pp. 574-550.
- Bozkurt IA, Soylu S (2001) Farklı fasulye çeşitlerinin fasulye hale yanıklığı etmeni *P.s. pv. phaseolicola* ırklarına karşı gösterdiği reaksiyonların belirlenmesi. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, Tekirdağ, pp. 506-514.
- Bozoğlu H (1995) Kuru Fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) Bazı Tarımsal Özelliklerin GenotipxÇevre İnteraksiyonu ve Kalıtım Derecelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Dönmez MF, Şahin F, Elkoca E (2013) Identification of bean genotypes from Turkey resistance to common bacterial blight and halo blight diseases. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus 12(4): 139-151.
- FAO (2018) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical database.
- Ferreira CF, Pereira MG, Santos AS, Rodrigues R, Bressan-Smith R.E, PioViana A, Daher RF (2003) Resistance to common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. recombinant inbred lines under

natural infection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, Euphytica 134: 43-46.

- Fourie D (1998) Characterization of halo blight races on dry bean in South Africa. Plant Disease 82(3): 307-310.
- Fourie D, Miklas P, Ariyaranthe H (2004) Genes conditioning halo blight resistance to races 1,7 and 9 Occur in A Tight Cluster. The XL VII Report of The Bean Improvement Cooperation March 2004: 103-104.
- Goto M (1992) Fundamentals of bacterial plant pathology. Academic Press, California, Inc., pp. 635.
- Güven K, Jones JB, Momol MT, Dickstein ER (2004) Phenotypic and genetic diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Journal of Phytopathology 152: 638-666.
- Hall R (1994) Compendium of bean diseases. APS Pres, St, Paul, Minnesota, pp. 73.
- Howard RJ, Garland JA, Seaman WL (1994) Diseases and pests of vegetable crops in Canada. The Canadian Phytopathological Society, Canada, pp. 554.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresin. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44: 301-307.
- Klement Z, Rudolph K, Sands DC (1990) Methods in phytobacteriology, Akademia Kiado, Budapest, pp. 568.
- Lelliott RA, Stead DE (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Nywall RF (1989) Field crop diseases handbook 2<sup>nd</sup> edn. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 817.
- Popovic T, Balaz J, Nikolic Z, Starovic M, Gavrilovic V, Aleksic G, Zivkovic S (2010) Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. African Journal of Agricultural Research 5(19): 2730-2736.
- Saettler AW (1994) Bacterial brown spot, halo blight and common bacterial blight in compendium of bean diseases (Hall, R., Edt). APS Pres, The American Phytopathological Society, pp. 73.
- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, cold spring harbor laboratory press, New York.

- Saygılı H, Şahin F, Aysan Y (2008) Bitki bakteri hastalıkları. Meta Basım, İzmir, s. 317.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.
- Schwartz HF (1989) Bean production problems in the tropics, The International Center for Tropical Agriculture., Columbia, pp. 285-301.
- Sigee DC (1993) Bacterial plant pathology cell and molecular aspect. Cambridge University. Pres, pp. 325.
- Taylor JD, Teverson DM, Davis JHC (1996) Sources of resistance to *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* races in *Phaseolus vulgaris*. Plant Pathology 45: 479-485.
- TÜİK (2019) Tarımsal Yapı. T. C. Başkanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, biruni.tuik.gov.tr. 10 Temmuz 2020
- Wortmann CS, Allen DJ (1994) African bean production environments their definition, characteristics and constraints. Network on bean research in Africa, Occasional paper series No.11.
- Zaiter HZ, Coyne DP, Vidaver AK, Steadman JR (1989) Differential reaction of tepary bean lines to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. American Society for Horticultural Science 24(1): 134-137.