

Batı Akdeniz Bölgesi örtüaltı yetiştiriciliğinde sorun olan domateste Bakteriye Benek (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* "Okabe" Y.D.&W) hastalık etmeni izolatlarının genetik farklılıklarının moleküler yöntemlerle tespiti

Abdullah ÜNLÜ¹ Ömür BAYSAL² İlknur POLAT¹ Serap Melike SÜLÜ¹ Hatice İKTEN³
Zübeyir DEVRAN⁴ Emine GÜMRÜKÇÜ¹

¹ Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya

² Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Muğla

³ Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya

⁴ Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Antalya

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: abduallah.unlu@tarim.gov.tr

Makale Bilgisi/Article Info
Derim, 2017/34(2):122-130
doi:10.16882/derim.2017.349991

Araştırma Makalesi/Research Article
Geliş Tarihi/Received: 08.03.2016
Kabul Tarihi/Accepted: 12.12.2016



Öz

Bu çalışmanın amacı, Batı Akdeniz Bölgesi örtüaltı domates yetiştiriciliğinde önemli olan Bakteriye Benek (*Pst*) hastalık etmeninin klasik ve moleküler yöntemlerle tanılanması ve *Pst* izolatlarının genetik farklılıklarının ISSR ve SRAP markırları kullanılarak moleküler yöntemlerle belirlenmesidir. Çalışma kapsamında, Batı Akdeniz Bölgesi'nde domates yetiştiriciliğinde ortaya çıkan hastalık etmeninin (*Pst* izolatlarının) toplanması için survey çalışmaları yapılmıştır. Survey çalışması süresince güdümlü örnekleme yapılmış ve 10 tane *Pst* izolati toplanmıştır. Patojen izole edildikten sonra biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanılanmıştır. *Pst* izolatları arasındaki genetiksel farklılıklar ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) ve SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) moleküler markırlar ile belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak, patojenin bölgede iklim şartlarına bağlı olarak görüldüğü ve klasik ve moleküler olarak başarıyla tespit edilebildiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriye benek; Genetik farklılık; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Teşhis

Detection of genetic differences of isolates of Bacterial Speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* "Okabe" Y. D. & W) disease agent on tomato under protected cultivation using molecular methods in Western Mediterranean region

Abstract

The aim of this study was to diagnose bacterial speck of tomato (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) pathogen using biochemical and molecular methods and to determine genetical diversity of *Pst* isolates by using ISSR and SRAP molecular markers. In the study, survey studies were carried out in West Mediterranean Region to collect bacterial pathogen of tomato (*Pst*). 10 *Pst* isolates were collected during survey studies. After isolation, the pathogen was diagnosed with biochemical and molecular diagnostic methods. Besides, genetic diversities of *Pst* isolates were determined using ISSR and SRAP molecular markers. As a result, bacterial speck of tomato was seen depending on the climatic conditions at the region and *Pst* was successfully detected by using classical and molecular methods. ISSR and SRAP markers were successively used for analyzing genetic diversity of *Pst* isolates and these primers could be efficiently used to separate isolates of disease agent.

Keywords: Bacterial speck; Genetic diversity; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Diagnosis

1. Giriş

Solanaceae familyasında yer alan domates (*Solanum lycopersicum* L.), gerek ülkemizde gerekse dünyada en fazla yetiştirilen sebze türleri içerisinde yer almaktadır. Örtüaltı domates yetiştiriciliğinin en fazla yapıldığı il olan Antalya'da örtüaltı domates yetiştiriciliği, 114 489 da plastik serada ve 44 681 da cam serada gerçekleşmektedir ve toplam domates

üretimi yaklaşık 2 milyon ton'dur (TÜİK, 2015). Domates üretimi yapılan hemen hemen tüm ülkelerde varlığı rapor edilen (Sherf ve Macnab, 1986) hastalığın ülkemizde ilk tespiti 1970'li yılların sonlarında Ege Bölgesi'nde Saygılı (1975) ve Akdeniz Bölgesi'nde Çınar (1977) tarafından yapılmıştır. Türkiye'de domates tarımının giderek yaygınlaşması ve çok sayıda çeşidin ülkemize girmesi ile 1960'lı yıllardan itibaren domates bakteriyel benek hastalığında

bir artış görüldüğü bildirilmektedir (Öktem, 1985). Hastalığın ülkemizde 1970'li yıllardan sonra sorun haline geldiği (Aysan vd., 1995), Doğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan survey sonucunda %20 oranında ürün kaybına neden olduğu (Şahin, 2001), ayrıca Ege ve Marmara Bölgesi'nde de varlığının tespit edildiği ifade edilmektedir (Karaca ve Saygılı, 1982; Maden, 1989; Kahveci ve Gürçan, 1993; Tokgönül, 1995).

Örtüaltı sebze yetiştiriciliğinde olması gereken kültürel işlemlerin üreticiler tarafından yeterince yürütülememesi ve seraların iyi havalandırılmamasından kaynaklanan bazı hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Özellikle örtüaltı tarımının ve hazır fide sektörünün merkezi konumundaki Batı Akdeniz Bölgesinde, domatestede bakteriyel benek hastalığına sebep olan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, yetiştiriciliği kısıtlayan bakteriyel etmenlerdendir.

Pseudomonas syringae pv. *tomato*, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve DAS-ELISA gibi yöntemlerle tanımlanabilmektedir. Fakat, tanımlamada güvenilirliği arttırmak ve zamandan kazanmak amacıyla moleküler olarak tanımlama yapmak önemlidir (Zaccardelli vd., 2005). Yine, moleküler analizler genotipler arasında farklılığın var olup olmadığını belirlemek amacıyla da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Baysal vd., 2008; Soliani vd., 2010; Baysal vd., 2010; Baysal vd., 2011; Beroiz vd., 2012; Raghuwanshi vd., 2013; Polat vd., 2014) ve SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) (Devran ve Baysal, 2012; Polat vd., 2014), genetik farklılıkları belirlemek amacıyla kullanılan önemli markırlar arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* etmeninin genetik ayrımında bu 2 moleküler markırın birlikte kullanımıyla ilgili bilgi tespit edilememiştir.

Bu çalışmanın amacı, Batı Akdeniz Bölgesi'nde örtüaltı yetiştiriciliği yapılan domatestede ortaya çıkan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* etmenini klasik ve moleküler yöntemler ile tanılamak ve *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatları arasındaki genetik farklılıkları ISSR ve SRAP moleküler markırları ile ortaya koymaktır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Survey çalışması yapılan domates üretim seraları, bölge izolatları, Fransa Ulusal Bakteri Koleksiyonundan temin edilen CNBP 1323/97 kodlu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* referans kültürü, domates bitkileri, besi ortamları ve sarf malzemeleri bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Survey çalışmaları ve *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* etmeninin izolasyonu

Survey çalışmaları, Antalya ilinin Merkez, Serik, Kumluca, Finike, Demre (Kale), Kaş ilçeleri ile Muğla'nın Fethiye ilçelerindeki örtüaltı domates yetiştiriciliği yapılan bölgelerde, 2010 ve 2011 yılında yürütülmüştür. Sera içerisinde söz konusu patojenin konukçuda yarattığı tipik hastalık belirtilerini (siyah benek şeklinde nekrotik lekeler) taşıyan bitkilerden güdümlü örnekleme yöntemine göre toplanan örnek bitkiler soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmıştır. Domates bitkilerinden alınan hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içerecek şekilde 1-2 mm'lik alınan bitki parçaları, %70'lik etil alkol ile yüzeyden dezenfekte edilerek içerisinde 2 ml steril su bulunan havanlarda ezilmiştir.

2.2.2. Elde edilen izolatların tanımlanması

İzolatların koloni morfolojisine göre değerlendirilmesi: Elde edilen ekstraktan bir öze dolusu süspansiyon alınarak Nutrient Agar (NA), King B (King vd., 1954) besi yerlerine çizgi ekimi ile çizimleri yapılmıştır (Schaad vd., 2001). Koloniler, referans bakteri kültürleri ile karşılaştırmalı olarak 48-72 saat 25°C'de inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir.

Biyokimyasal testler:

a) *Potasyum hidroksit testi (KOH):* Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* re-izolatları ve referans izolatin inkübasyon sonrası kültüründen bir öze dolusu alınarak solüsyona dairesel hareketler ile karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir

sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990).

b) *Oksidaz testi*: Taze hazırlanan %1'lik N, N, N', N' – Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diclorid eriği steril filtre kağıdına damlatılarak, re-izolatlar ve referans izolatın inkübasyon sonrası kültüründen bir öze dolusu alınarak ıslak kurutma kağıdına çizilip, 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kovaks, 1956).

c) *Katalaz reaksiyonu*: 23 g L⁻¹ NA ile hazırlanan ortam 121°C'de 15 dak. otoklav edildikten sonra petrilere dökülmüştür. Re-izolatlar ve referans bakteri kültürü ile zigzag şeklinde aşılardan petrilere 25°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra üzerlerine 1 ml %3'lük Hidrojen Peroksit dökülmüştür. Bir süre sonra, katalaz aktivitesi sonucu açığa çıkan oksijen kabarcıkları pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

d) *Levan oluşumu*: Nutrient Agar besi yerine %5 oranında sakkaroz eklenerek hazırlanmış olan sakkaroz nutrient agar (SNA) besi yerine re-izolatlar ve referans izolat çizgi ekim ile aşılandıktan sonra petrilere 25°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Kalın, beyaz, konveks, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

e) *Eskulin (Aesculin)'in hidrolizi*: Bakteri kültürleri, ortama aşılandıktan sonra 28°C'de çalkalayıcıda 28 gün kadar bekletilmiştir. Besiyeri renginin siyah-kahverengi bir renk alması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sneath, 1956).

f) *Arginine dihidrolaz testi*: Hazırlanan karışım tüplere konduktan sonra tüpler otoklavda steril edilmiştir. Bakteri kültürleri tüplere aşılanmış ve 27°C'de inkübe edilmiştir. Pembe-kırmızı renk pozitif, ortamın normal ten rengi olarak kalması negatif olarak kabul edilmiştir.

g) *Pektolitik aktivite testi*: Patates yumruları yüzeysel dezenfeksiyon için önce deterjanlı suda yıkanmış, daha sonra %1'lik NaOCl'da 3 dk bekletilmiş ve 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemden sonra steril bir bistüri ile patates yumrularının kabukları soyulmuştur. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petri içine kabuğu soyulmuş 1 cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu

bakteri kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25°C'de iki günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

h) *Tütünde aşırı duyarlılık (Hypersensitive Reaction-HR) testi*: Tütün (*Nicotiana tabacum* N.) bitkisinin yapraklarındaki damarlara *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* re-izolatları ve referans kültürün 10⁸ hücre ml⁻¹ yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. 24-48 saatlik bir inkübasyon sonucu inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik lekeler, pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir.

2.2.3. Patojenisite testleri

Patojenisite çalışmalarında, 7x10⁶ hücre ml⁻¹ inokulum yoğunluğu kullanılmıştır. Hazırlanan süspansiyon, kotiledon yaprakları ve ilk iki gerçek yaprağı çıkmış sağlıklı domates fidelerinin yapraklarına spreyleme ile inokule edilmiş, bitkilerin yaralanması sağlanmıştır. Patojenisite testlerinde, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* için CNBP 1323/97 kodlu referans kültür kullanılmıştır. Çalışmalarda, negatif kontrol olarak ise steril saf su kullanılmıştır. İnokule edilen bitkiler iklim odasına yerleştirilmiş, yüksek nem için 24 saat süre ile ıslak poşetler içerisinde tutulmuş ve 1 gün sonra nem çemberinden alınarak incelenmiştir. İnokulasyondan yaklaşık 1 hafta sonra yapraklardaki tipik leke oluşumlarına göre "hastalık var" ya da "hastalık yok" olarak değerlendirilip izolatların patojen olup olmadığı belirlenmiştir. Belirti gösteren bitkilerden re-izolasyonlar yapılmıştır.

2.2.4. Moleküler analizler

DNA izolasyonu, Promega DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır. Bitki dokularının fitobakteriyolojik analizi sonrasında, ekstraktın yine özel besi yerine çizilmesiyle gelişen kolonilerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Toplam olarak, 10 adet *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatının DNA izolasyonu yapılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun moleküler olarak tanılanmasında Zaccardelli vd. (2005)'nin kullanmış oldukları MM5F (5'-GAA CGA GCT GAA GGA AGA CA-3') ve MM5R (5'-CAG CCT GGT TAG TCT GGT TA-3') primerleri

kullanılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* için PCR çalışması, Zaccardelli vd. (2005)'nin çalışmalarından modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. PCR, 2.0 µl DNA (20 ng DNA), 2.0 µl dNTP (0.1 mM dNTPs), 3.0 µl MgCl₂ (2.5 mM MgCl₂), 0.2 µl Taq (0.6 U Taq DNA polymerase), 2.0 µl her bir primer (0.3 µM her bir primer), 2.0 µl (1 X) PCR buffer ve 15.0 µl ddH₂O olmak üzere toplam 28 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR protokolü, 1 döngü 94°C'de 5 dak., ardından 35 döngü olacak şekilde, 94°C'de 1 dak., 55°C'de 50 sn, 72°C'de 1 dak. ve son olarak da 1 döngü 72°C'de 5 dak. şeklinde gerçekleştirilmiştir.

PCR ürünleri %2.5'lik high resolution agarose jelde yürütülmüştür. Elektroforez sonrası UV gel görüntüleme sistemi (KODAK 200 Gel Logic) kullanımıyla bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

2.2.5. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatları arasındaki genetiksel farklılığın tespiti

İzolatlarda genetiksel farklılık olup olmadığını belirlemek için, daha önceki çalışmalarla tespit edilen ISSR (Baysal vd., 2008, 2010, 2011; Polat vd., 2014) primerleri ve SRAP (Devran ve Baysal, 2012; Polat vd., 2014) primer kombinasyonları kullanılmıştır.

ISSR-PCR reaksiyon ve amplifikasyon koşulları: PCR reaksiyonu; 1.0 µl DNA (20 ng DNA), 1.0 µl dNTP (0.1 mM dNTPs), 1.5 µl MgCl₂ (2.5 mM MgCl₂), 0.2 µl Taq (0.6 U Taq DNA polymerase), 2.0 µl primer (0.3 µM), 1.5 µl (1 X) PCR buffer ve 7.8 µl ddH₂O olmak üzere toplam 15 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR protokolü, 1 döngü 94°C'de 5 dak., ardından 35 döngü olacak şekilde, 94°C'de 1 dak., 45-55°C'de 45 sn, 72°C'de 2 dak. ve son olarak da 1 döngü 72°C'de 5 dak. şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, 17 ISSR primeri kullanılmıştır. Primerlerin baz dizilimleri Çizelge 3'de verilmiştir.

SRAP-PCR reaksiyon ve amplifikasyon koşulları: PCR reaksiyonu; 1.0 µl DNA (20 ng DNA), 1.5 µl dNTP (0.1 mM dNTPs), 1.5 µl MgCl₂ (2.5 mM MgCl₂), 0.2 µl Taq (0.6 U Taq DNA polymerase), 2.0 µl her bir primer (0.3 µM her bir primer), 1.5 µl (1 X)PCR buffer ve 5.3 µl

ddH₂O olmak üzere toplam 15 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR protokolü, 1 döngü 94°C'de 2 dak., ardından 5 döngü, 94°C'de 1 dak., 35°C'de 1 dak., 72°C'de 1 dak., 35 döngü 94°C'de 1 dak, 50°C'de 1 dak, 72°C'de 1 dak. ve son olarak da 1 döngü 72°C'de 10 dak. şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, 12 SRAP primeri kombinasyonu kullanılmıştır. Primerlerin baz dizilimleri Çizelge 5'de verilmiştir. Tüm PCR ürünleri, %2.5'lik high resolution agarose jelde yürütülmüştür. Elde edilen bantların baz büyüklüklerini belirlemek amacıyla 100 bp Ladder DNA kullanılmıştır. Jel, ethidium bromide ile boyanarak, UV görüntüleme sisteminde (Kodak Gel Logic 200) görüntülenmiştir. Verilerin analizi, bant varlığı durumunda (1), yokluğu durumunda (0) değerleri verilerek skor edilmiştir. Markır verileri NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System, NTSYS-pc version 2.1 Exeter Software, Setauket, USA, Rohlf 1993) bilgisayar paket programında analiz edilmiştir. Benzerlik indeksleri Dice (1945)'e göre hesaplanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Survey çalışmaları

Survey çalışmaları ve patojen izolasyonu kapsamında elde edilen 10 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatları ve elde edildikleri lokasyon bilgileri Çizelge 1'de verilmiştir.

3.2. Elde edilen izolatların tanınması

3.2.1. İzolatların koloni morfolojisine göre değerlendirilmesi

NA ve King B besi yerine çizilen izolatların gelişen kolonileri, referans bakteri kültürü ile karşılaştırmalı olarak 48-72 saat 25°C'de inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir. İzolatların koloni gelişimlerine göre yapılan değerlendirme sonucunda 10 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* olarak tanılanmıştır.

3.2.2. Biyokimyasal testler

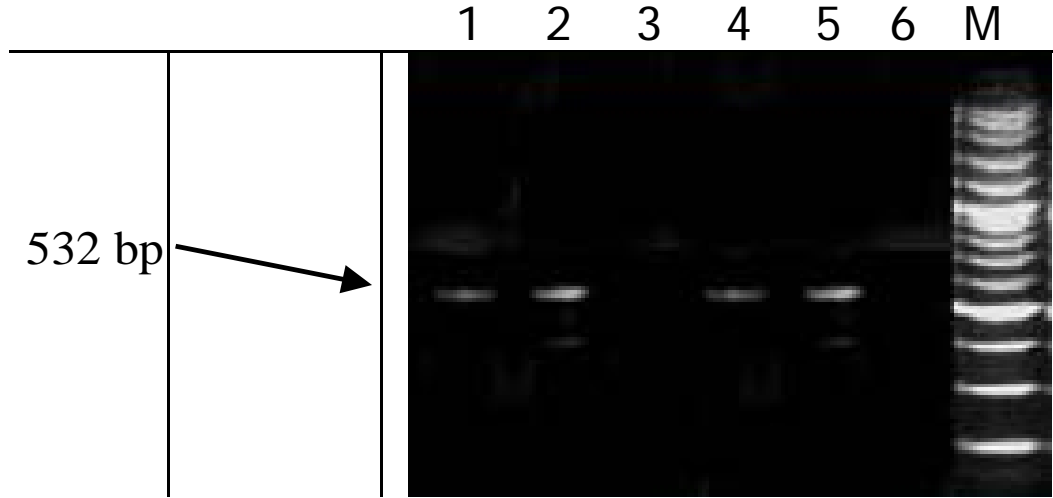
İzolatların koloni gelişimlerine yönelik yapılan ve genus ayırımında kullanılan bir dizi biyokimyasal test; Potasyum Hidroksit testi (KOH), Oksidaz Testi, Katalaz Reaksiyonu.

Çizelge 1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatları ve alındıkları lokasyonlar

İzolat numarası	İzolat adı	Lokasyonu
1	1b	Korkuteli
2	428	Kumluca
3	429	Kumluca
4	Korkuteli-1	Korkuteli
5	2	Demre
6	12	Kumluca
7	1	Kumluca
8	519	Kaş
9	Kocayatak-1	Kocayatak
10	Demre-1	Demre

Çizelge 2. Biyokimyasal test sonuçları

Biyokimyasal testler	Pst izolatları	CNBP 1323/97 kodlu Pst kültürü
KOH	Gram -	Gram -
Oksidaz oluşumu	-	-
Katalaz reaksiyonu	+	+
Levan oluşumu	+	+
Eskulin hidrolizi	+	+
Arginine dihidrolaz	-	-
Pektolitik aktivite	-	-
Tütün HR	+	+

Şekil 1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya ait PCR analiz sonuçlarının jelde görüntüsü (M:100 bp DNA ladder, 3 ve 4: su, 1: 1nolu izolat, 2: 2 nolu izolat, 5: 3 nolu izolat, 6: 4 nolu izolat)

Levan Oluşumu, Esculin (Aesculin)'in Hidrolizi, Arginine Dihidrolaz Testi, Pektolitik Aktivite Testi, Tütünde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction-HR) Testi tüm izolatlarımıza uygulanmış ve sonuçlar, izolatların *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya ait olduğunu göstermiştir. Tanı testleri sonucunda, 10 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* olarak tanımlanmıştır. Biyokimyasal test sonuçları, Çizelge 2'de verilmiştir.

3.4. Moleküler analizler

3.4.1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun moleküler tanımlanması

Pseudomonas syringae pv. *tomato* izolatlarının belirlenmesi amacıyla, Zaccardelli vd. (2005)'nin kullanmış oldukları MM5F ve MM5R primeri kullanılmış ve 532 bp'lik bant elde edilmiştir. Şekil 1'de, 4 adet *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatlarına ait PCR ürünü sonucu elde edilen bantlar görülmektedir. Bu çalışmalar neticesinde, PCR testi ile 10 izolat *P.s.* pv. *tomato* olarak tanımlanmıştır.

3.5. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatları arasındaki genetiksel farklılığın tespiti

Pseudomonas syringae pv. *tomato* izolatlarının genetik farklılıklarını belirlemede ISSR ve SRAP primerleri kullanılmıştır. Çizelge 3'de görüldüğü gibi kullanılan 17 ISSR primerinden 9 tanesi amplifikasyon oluşturmamıştır. Bununla birlikte, 809 primerinden en fazla polimorfik bant elde edilirken, 889 primerinden monomorfik

bant elde edilmiştir. Ayrıca, primerlerin annealing dereceleri de Çizelge 3'de verilmiştir. SRAP primer kombinasyonlarının annealing dereceleri metotta belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4'de görüldüğü gibi kullanılan 12 SRAP primeri kombinasyonundan 3 tanesi amplifikasyon oluşturmamıştır. Bununla birlikte, em10-me4 primer kombinasyonundan en fazla polimorfik bant elde edilirken, em10-me4 primer kombinasyonundan monomorfik bant elde edilmiştir.

Çizelge 3. ISSR primerlerinin Tm (°C) dereceleri ve polimorfizm durumları

Locus	Baz dizilimi	Annealing (°C)	TAS	PAS
809	GAGGAGAGAGAGAGAGG	55	12	8
812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	55	na	-
813	CTCTCTCTCTCTCTT	55	na	-
825	ACACACACACACACT	50	na	-
826	ACACACACACACACC	45	na	-
827	ACACACACACACACG	50	7	1
829	TGTGTGTGTGTGTGC	50	na	-
834	AGAGAGAGAGAGAGCTT	50	6	1
835	AGAGAGAGAGAGAGCTC	55	na	-
889	AGTCGTAGTACACACACAC	45	7	0
731	CCCACACCAC	45	7	1
112	AGAGGGCACA	45	8	3
890	VHV(GT)7	55	na	-
880	GGAGAGGAGAGAGA	55	9	5
887	DVD TCT CTC TCT TC	50	na	-
888	BDB (CA)7	50	na	-
885	BHB (GA)7	50	7	2

V: A, C, G; B: G, C, T; H: A, C, T; D: A, G, T; na: amplifikasyon oluşmamıştır. TAS: Toplam allel sayısı, PAS: Polimorfik allel sayısı

Çizelge 4. SRAP primer kombinasyonlarının polimorfizm durumları

Primer kombinasyonu	Baz dizilimi	TAS	PAS
em10-me4	GACTGCGTACGAATTCATTGAGTCCAAACCGGACC	8	5
em10-me9	GACTGCGTACGAATTCATTGAGTCCAAACCGGAGG	9	0
em7-me9	GACTGCGTACGAATTCATTGAGTCCAAACCGGAGG	8	4
em7-me8	GACTGCGTACGAATTCATTGAGTCCAAACCGGACT	9	5
em4-me12	GACTGCGTACGAATTTGATGAGTCCAAACCGGAGA	7	4
em11-me1	GACTGCGTACGAATTCTATGAGTCCAAACCGGATA	na	-
em10-me11	GACTGCGTACGAATTCATTGAGTCCAAACCGGAAC	9	3
em4-me11	GACTGCGTACGAATTTGATGAGTCCAAACCGGAAC	10	4
em4-me4	GACTGCGTACGAATTTGATGAGTCCAAACCGGACC	10	4
em4-me8	GACTGCGTACGAATTTGATGAGTCCAAACCGGACT	na	-
em11-me12	GACTGCGTACGAATTCTATGAGTCCAAACCGGAGA	9	4
em11-me9	GACTGCGTACGAATTCTATGAGTCCAAACCGGAGG	na	-

na: amplifikasyon oluşmamıştır. TAS: Toplam allel sayısı, PAS: Polimorfik allel sayısı

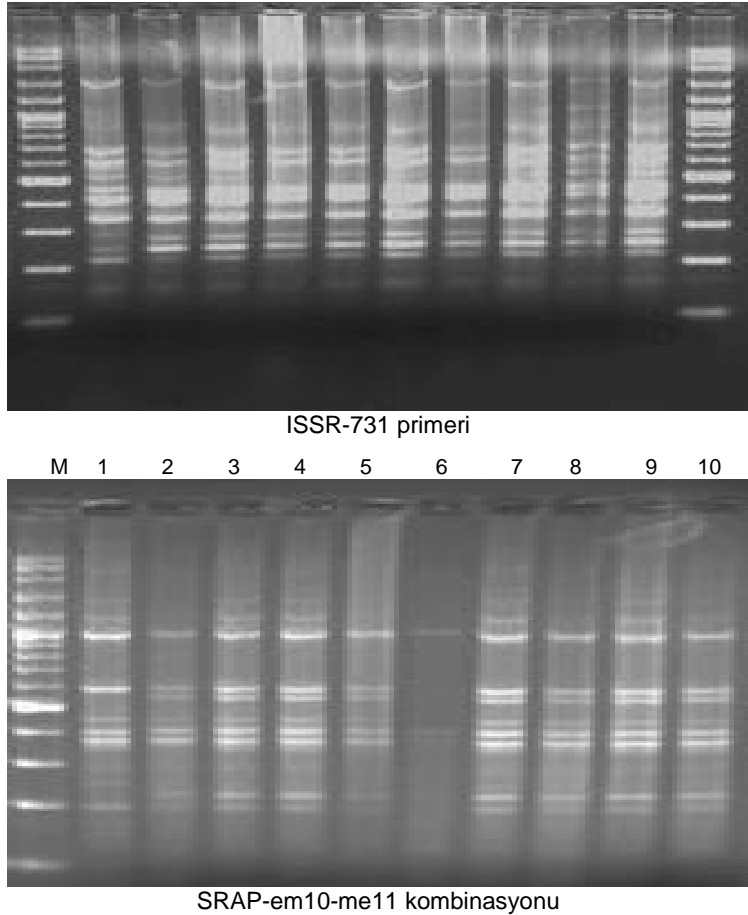
Çizelge 3 ve 4 incelendiğinde, ISSR primeri ve SRAP primer kombinasyonlarından amplifikasyon oluşturmayanların (na) da fazla olduğu görülmektedir. Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalarda yeni primer ve primer kombinasyonlarının belirlenmesi uygundur. Ayrıca, daha fazla primer ve primer kombinasyonlarının kullanılması da önerilebilir. *P. syringae* pv. *tomato* izolatlarının genetik farklılıklarını belirlemek için kullanılan ISSR-731 primeri ve SRAP primerlerinden em10-me11 kombinasyonuna ait PCR ürününün jelde elde edilen görüntüleri Şekil 3'de verilmiştir.

Pseudomonas syringae pv. *tomato* izolatlarının genetik ayrımında ISSR ve SRAP markır sistemini birlikte kullanılarak elde edilen dendrogram Şekil 4'de verilmiştir. Şekil 4'den de görüldüğü gibi, Kocayatak-1 diğer izolatlardan en uzak olanıdır. Bununla birlikte, 428 ve 1b izolatları birbirine en yakın izolatlar olarak belirlenmiştir. Bu durum, Şekil 5'de

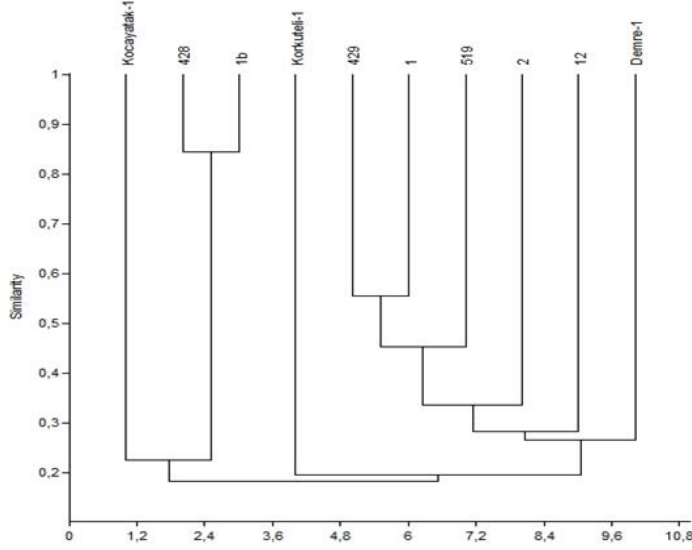
verilen PCA dağılımında da görülmektedir.

4. Sonuç

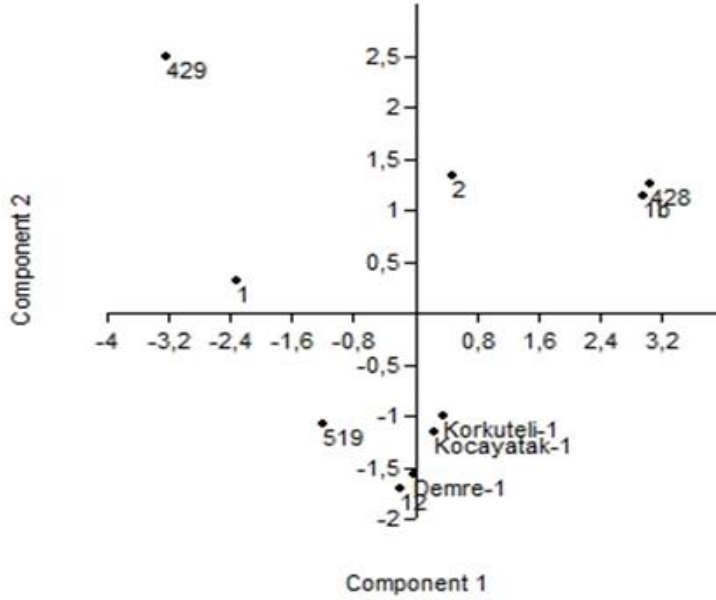
ISSR markırlar, *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* (Baysal vd., 2010), *Pseudoperonospora cubensis* (Polat vd., 2014) ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* (Raghuwanshi vd., 2013) izolatlarının genetik farklılığının tespitinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yine, *Beauveria* spp. izolatların genetik farklılıklarını belirlemede kullanılmış ve önemli markır sistemi olarak belirlenmiştir (Wangs vd., 2005). ISSR, aynı türün içerisinde genetik farklılığı diğer markırlardan daha iyi ortaya koymaktadır (Baysal vd., 2011). Brezilya'da fasulyede fungal etmen olan *Pseudocercospora griseola* izolatlarının genetik ayrımında ISSR primerlerinden başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Abadio vd., 2012).



Şekil 3. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatında ISSR ve SRAP primerlerinden elde edilen amplifikasyonun sonucunun jelde görüntüsü (M:100 bp DNA ladder, 1-10: izolat numaraları)



Şekil 4. ISSR ve SRAP markırlarıyla 10 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatının oluşturduğu dendrogram



Şekil 5. ISSR ve SRAP markırlarıyla 10 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatının oluşturduğu PCA dağılımı

SRAP markırları da yine izolatlar arasındaki genetik farklılığın belirlenmesinde kullanılacak markırlar arasında yer almaktadır (Devran ve Baysal, 2012; Polat vd., 2014). Sonuç olarak; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatlarının genetik farklılıklarının belirlenmesinde ISSR ve SRAP markırlarının birlikte kullanımına dair bir literatüre rastlanmamıştır. Bu nedenle, çalışma bu anlamda bir ilki oluşturmuştur.

Kaynakça

Abadio, A.K.R., Lima, S.S., Santana, M.F., Salomão, T.M.F., Sartorato, A., Mizubuti, E.S.G., Araújo,

E.F., & de Queiroz, M.V. (2012). Genetic diversity analysis of isolates of the fungal bean pathogen *Pseudocercospora griseola* from central and southern Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 11(2):1272-1279.

Aysan, Y.N., Erkiş, A., Çınar, Ö., & Abak, K. (1995). Domates bakteriyel kara leke hastalığına karşı dayanıklı çeşit ile toprak solarizasyonunun hastalık gelişimi ve verim üzerine etkileri, VII. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 26-29 Eylül, Adana, s:418-422.

Baysal, Ö., İkten, H., Çalışkan, M., & Zeller, W. (2008). An efficient method in genetical discrimination of biological control agents by molecular ISSR and RAPD markers. *2nd International Symposium on Biological Control of*

- Bacterial Plant Disease*, Orlando, Florida, USA, p:27.
- Baysal, Ö., Siragusa, M., Gümrükcü, E., Zengin, S., Carimi, F., Carimi, F., Sajeve, M., & Teixeira da Silva, J.A. (2010). Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* virulence by ISSR and RAPD markers on eggplant. *Biochemical Genetics*, 48(5-6):524-37.
- Baysal, Ö., Mercati, F., İkten, H., Çetinkaya, R., Aysan, Y., Carimi, F., & Teixeira da Silva, J.A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75(3):113-119.
- Beroiz, B., Ortego, F., Callejas, C., Hernandez-Crespo, P., Castañera, P., & Ochando, M.D. (2012). Genetic structure of Spanish populations of *Ceratitis capitata* revealed by RAPD and ISSR markers: implications for resistance management. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10(3):815-825.
- Çınar, Ö. (1977). Doğu Akdeniz Bölgesi domateslerinde görülen bakteriyel kara leke hastalığı etmeni (*Pseudomonas tomato* Okabe)'nin biyokimyasal yöntemlerle tanımı. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı*, 8(4):288-296.
- Devran, Z., & Baysal, Ö. (2012). Genetic characterization of *Meloidogyne incognita* isolates from Turkey using sequence-related amplified polymorphism (SRAP). *Biologia*, 67(3):535-539.
- Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3):297-302.
- Kahveci, E., & Gürcan, A. (1993). Antalya ilinde domateslerdeki bakteriyel hastalık etmenlerinin tespiti. *Bitki Koruma Bülteni*, 33(3-4):147-151.
- Karaca, İ., & Saygılı, H. (1982). Batı Anadolu'nun bazı illerinde domates ve biberlerde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri, belirtileri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar. III. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 12-15 Ekim 1982, Adana, s:182-192.
- King, E.D., Ward, M.K., & Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2):301-307
- Kovaks, N., (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178:703.
- Lelliot, R.A., & Stead, D.E. (1987). Media and Methods. In: *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Oxford London Edinburgh, 216 p.
- Maden, S. (1989). Bitki Bakteri Hastalıkları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:1161, 213 s.
- Öktem, Y.E. (1985). Studies on determination of susceptibility of tomato varieties against *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. IV. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 8-11 Ekim 1995, İzmir, s:79-106.
- Polat, İ., Baysal, Ö., Mercati, F., Kitner, M., Cohen, Y., Lebeda, A., & Carimi, F. (2014). Characterization of *Pseudoperonospora cubensis* isolates from Europe and Asia using ISSR and SRAP molecular markers. *European Journal of Plant Pathology*, 139(3):641-653.
- Raghuwanshi, K.S., Hujare, B.A., Chimote, V.P., & Borkar, S.G. (2013). Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* isolates from Western Maharashtra and their sensitivity to chemical treatments. *The Bioscan*, 8(3):845-850.
- Soliani, C., Rondan-Dueñas, J., Chiappero, M.B., Martínez, M., García, E., & Garcenal, C.N. (2010). Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* from Uruguay and northeastern Argentina inferred from ISSR-PCR. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(3):316-323.
- Sands, D.C. (1990). Physiological Criteria-Determinative Tests. In: *Methods in Phytobacteriology*, Klement, Z., K. Rudolph and D.C. Sands (Eds.). Akademiai Kiado, Budapest, pp: 133-143.
- Saygılı, H. (1975). Investigation on new bacterial disease of tomatoes in Ege. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 4(2):83-88.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St. Paul, MN USA, 373 p.
- Sherf, A.F., & MacNab, A.A. (1986). Bacterial Speck. In: *Vegetable Diseases and Their Control*. A Wiley-Interscience Publication, New York, USA, p:599-614.
- Sneath, P.H.A. (1956). Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *Journal of General Microbiology*, 15:70-98.
- Şahin, F. (2001) Severe outbreak of bacterial speck, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on field-grown tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. *Plant Pathology*, 50(6):799-799.
- Tokgönül, S. (1995). Akdeniz Bölgesinde örtü altında yetiştirilen domateslerde sorun olan bakteriyel hastalıklar. VII. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 26-29 Eylül 1995, Adana, s:402-406.
- TÜİK (2015). Bitkisel Üretim İstatistikleri. www.tuik.gov.tr (Erişim tarihi: 13.02.2016)
- Wangs, S., Miao, X., Zhao, W., Huang, B., Fan, M., Li, Z., & Huang Y. (2005). Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). *Mycological Research*, 109(12):1364-1372.
- Zaccardelli M., Spasiano A., Bazzi C., & Merighi M. (2005). Identification and *in planta* detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZPst*. *European Journal of Plant Pathology*, 111(1):85-90.