

İMMUNOFLORESAN
(IF) YÖNTEMİ İLE
FASÜLYE TOHUMLARINDA
PSEUDOMONAS SYRİNGAE PV. *PHASEOLICOLA*
ARANMASI

MEHMET BURÇİN MUTLU
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
HAZİRAN 2001

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 99 10.46

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet Burçin MUTLU' nun "Immunofloresan (IF) Yöntemi ile Fasülye Tohumlarında Pseudomonas syringae pv. phaseolicola Aranması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki yüksek lisans tezi 06.08.2001 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Kıymet GÜVEN

Üye : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nalan YILMAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
08.08.2001 tarih ve 25/8.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İMMUNOFLORESAN (IF) YÖNTEMİ İLE FASÜLYE TOHUMLARINDA *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PHASEOLICOLA* ARANMASI

MEHMET BURÇİN MUTLU

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Kıymet GÜVEN

2001, 81 sayfa

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* fasülyelerde hale yanıklığı hastalığı etmeni tohumla taşınan bir bitki patojenidir. Hastalık ülkemizde ve dünyanın bir çok bölgesinde büyük oranda verim kaybına yol açan önemli bir hastalıktır. Hastalığın önlenmesi için en ideal yöntem temiz tohumluk kullanmaktır. Bu nedenle tohumlardaki patojenin deteksiyonu hastalığın kontrolü açısından son derece önemlidir.

Bu çalışmada, fasülyelerde hale yanıklığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' ya spesifik üç farklı poliklonal antiserum üretilmiştir. Bu antiserumların IF hücre boyama ve IF koloni boyama yöntemlerinde kullanılabilirliği referans kültürlerle yapılan çalışmalarla gösterilmiş, daha sonra da aynı yöntemlerle fasülye ununda bakteri deteksiyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Fasülye tohumlarında bakteri deteksiyonu için IF hücre ve IF koloni boyama yöntemlerinin spesifisite ve hızları açısından rutin testler için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: IF hücre boyama, IF koloni boyama, *Pseudomonas s. pv. phaseolicola*, Poliklonal Antiserum

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETECTION OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PHASEOLICOLA* IN
BEAN SEEDS BY IMMUNOFLUORESCENCE (IF) METHOD

MEHMET BURÇİN MUTLU

Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program

Supervisor: Assoc. Prof. Kıymet GÜVEN

2001, 81 pages

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* is a seedborne phytopathogenic bacteria that causal agent of Halo Blight disease of beans. Halo Blight is a disease which causes yield lost in our country and many region of world. Most ideal methods to prevent this disease is to use pathogen free seed. Therefore detection of pathogen in seed is most important for preventing this disease.

In this study, three different polyclonal antisera were produced against to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* which causal agent of halo blight. Availability of this antisera in the IF cell staining and IF colony staining methods were evaluated by using reference cultures. Thereafter, detection of bacterium in bean flour was determined by using the same methods.

Keywords: IF cell staining, IF colony staining, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, Polyclonal antisera

TEŞEKKÜR

Bu çalışma konusunun seçiminde bana önderlik eden ve araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve eleştirilerini esirgemeyen tez hocam Sayın Doç. Dr. Kıymet GÜVEN' e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezim boyunca bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA' ya ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi yönden desteklerini gördüğüm tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Verdikleri eğitim ve gösterdikleri anlayışla bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bakteriyel Hale Yanıklığı Hastalığı.....	5
1.1.1. Hastalık Belirtileri.....	6
1.1.2. Hastalığın Coğrafik Dağılışı.....	11
1.1.3. Hastalık Kontrolü.....	11
1.2. Patojen (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (Burkholder).....	14
1.3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> ' nın Sinonimleri.....	15
1.4. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> ' nın Konukçuları.....	15
1.5. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> ' nın Enfeksiyonu.....	16
1.6. Serolojik Terminoloji.....	17
1.6.1. Antijen.....	17
1.6.2. Antikor.....	17
1.6.3. Antijen Antikor Reaksiyonları.....	18
1.6.3.1. Aglütinasyon:.....	18
1.6.3.2. Presipitasyon.....	18
1.6.4. Adjuvantlar.....	19
1.7. Serolojik Teknikler.....	20
2. MATERYALVE YÖNTEM.....	24
2.1. Materyal.....	24
2.1.1 Deney Hayvanları.....	24
2.1.2. Kuru Fasülye Örneklerinin Toplanması.....	25

2.1.3. Test Bakterileri.....	26
2.1.4. Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler.....	27
2.1.4.1. King's Medium B.....	27
2.1.4.2. Nutrient Broth.....	27
2.1.4.3. Minimal Medium.....	27
2.1.4.4. Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (0.01 M, pH 7.2).....	28
2.1.4.5. 0,01 M Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (pH 7.2).....	28
2.1.4.6. 0.01 M Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (pH 7.4).....	28
2.1.4.7. 17.5 mM PO ₄ ⁻ (pH 6.5).....	29
2.1.4.8. 35 mM PO ₄ ⁻ (pH 6.5).....	29
2.1.4.9. 0.5 M PO ₄ (pH 8.0).....	29
2.1.4.10 0.1 M Karbonat-Bikarbonat Tamponu (pH 9.5).....	30
2.2. YÖNTEM.....	31
2.2.1. Antijenlerin Hazırlanması.....	31
2.2.1.1. EPS (Exopolisakkarit) Ekstraksiyonu ile Antijen Hazırlanması.....	31
2.2.1.2. Glutaraldehit Fiksasyonu ile Antijen Hazırlanması.....	31
2.2.1.3. Toplam Hücre Antijenleri.....	32
2.2.2. Ön Bağışıklık Testi.....	32
2.2.3. İmmünizasyon.....	33
2.2.4. Antiserumun Ayrılması ve Saklanması.....	37
2.2.5. Antiserum Titresinin Tayini.....	37
2.2.6. İmmünoglobulin (Ig) G Fraksiyonunun Saflaştırılması.....	37
2.2.6.1. DEAE-Sephacel Kolon Uygulaması.....	38
2.2.6.2. Amonyum Sülfat Presipitasyonu.....	38
2.2.7. IgG Preparasyonunun FITC (Fluoresein izotiyosiyanat) ile Konjugasyonu.....	39
2.2.8. Konjugasyon İşleminde Sonra Bağlanmamış FITC' nin Uzaklaştırılması.....	39
2.2.9. Konjugasyonun Değerlendirilmesi ve IgG-FITC Konjugatlarının Saklanması.....	40

2.2.10. Kuru Fasülye Örneklerinin Un Haline Getirilmesi.....	40
2.2.11. Un Haline Getirilmiş Fasülye Örneklerinin IF Hücre boyama ve IF Koloni Boyama için Hazırlanması.....	40
2.2.12. IF Hücre Boyanması.....	40
2.2.13. İmmunofloresan Koloni Boyama.....	41
3. BULGULAR.....	42
3.1. Ön Bağışıklık Testi Sonuçları.....	42
3.2. Titrasyon Tayini Sonuçları.....	42
3.3. Antiserum Spesifikliğinin Tayini.....	42
3.4. DEAE-Sephacel Kolon Uygulaması.....	46
3.5. FITC-As Konjugasyonlarının Değerlendirilmesi.....	48
3.6. IF Hücre Boyama.....	48
3.7. IF Koloni Boyama.....	58
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
5. KAYNAKLAR.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	Sağlıklı Fasulyelerin Tarladaki Görünümü.....	7
1.2.	Hastalığın yapraklardaki görünümü.....	8
1.3.	Fasulye bitkisi yaprağı üzerinde suyla ıslanmış görünümü veren lekeler....	8
1.4.	Fasulye bitkisi yaprağı üzerinde suyla ıslanmış görünümü veren lekeler....	8
1.5.	Yaprak üzerindeki nekrotik alanlar.....	9
1.6.	Yaprak üzerindeki sarı renkli lekeler.....	9
2.1.	Antiserum Üretimi için Kullanılan Yeni Zelanda Cinsi Tavşan.....	24
3.1.	EPS ekstraksiyonuyla elde edilmiş antiserumun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek koyu zemin üzerinde floresan yeşil renk veren hedef bakteriler.....	49
3.2.	Glutaraldehit fiksasyonu ile elde edilmiş antiserumun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek koyu zemin üzerinde floresan yeşil renk veren hedef bakteriler.....	50
3.3.	Toplam Hücre Antiserumunun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek koyu zemin üzerinde floresan yeşil renk veren hedef bakteriler.....	51
3.4.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> N52 ile <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> 'nin 1:100 oranındaki karışık kültürünün floresan mikroskopta görüntüsü (40X objektif). (Okla gösterilen hücre FITC-As (EPS) ile boyanmış tipik bir <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> N52 hücresidir.).....	53
3.5.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> N52 ile <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> 'nin 1:100 oranındaki karışık kültürünün ışık mikroskobundaki görüntüsü (40X objektif). (Okla gösterilen hücre Şekil de gösterilmiş olan FITC-As (EPS) ile boyanmış hücredir.).....	53
3.6.	Fasulye unu örneklerinden yapılan IF hücre boyama ile hedef bakterilerin floresan mikroskopta verdikleri ışımaya (Toplam Hücre Antiserumunun FITC konjugatı ile) (Okla gösterilen hücreler).....	55
3.7.	Şekil 3.6.' da görülen alanın ışık mikroskobundaki görüntüsü (Okla gösterilen hücreler hedef bakteriye ait olan ve Şekil 3.6.' da verdikleri floresan ışımaya ile diğerlerinden ayrılan hücrelerdir).....	55

- 3.8. EPS ekstraksiyonu ile elde edilmiş antiserumun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek ışığa veren hedef bakteri kolonileri.....58
- 3.9. Glutaraldehit fiksasyonu ile elde edilmiş antiserumun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek ışığa veren hedef bakteri kolonileri.....59
- 3.10. Toplam hücre antiserumunun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek ışığa veren hedef bakteri kolonileri.....59
- 3.11. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ile *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*' nin 1:5 oranındaki karışık kültürüne Toplam Hücre antiserumunun FITC konjugatı ile uygulanan IF koloni boyama sonucu ışığa veren hedef bakteriye ait koloniler (Floresan mikroskoptaki görünüm).....60
- 3.12. Şekil 3.11.' de görülmekte olan sahanın ışık mikroskobu görüntüsü (Okla belirtilen koloni ışığa vermeyen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*' ye ait bir kolonidir).....60

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1.	Sığır eti ve Buğdayla Karşılaştırmalı Olarak Nohut, Mercimek, Soya fasulyesi ve Fasulye Bileşimi.....	2
1.2.	Sığır Eti ve Buğdayla Karşılaştırmalı Olarak Bazı Baklagiller İçin Amino asit Bileşimi (Amino asit bileşimi (mg/g Protein)).....	3
1.3.	Türkiye’ de 1988-1996 yılları arasında kuru fasulye ekim alanları (ha), üretimleri (ton) ve verimleri (kg/ha).....	4
2.1.	Bakteri strainleri.....	26
2.2.	EPS antiserumunun üretimi için uygulanmış olan enjeksiyon şeması.....	34
2.3.	Glutaraldehit Fiksasyonu Antiserumu Üretimi İçin Uygulanan Enjeksiyon Şeması.....	35
2.4.	Toplam Hücre Antijenleri antiserumunun üretimi için uygulanmış olan enjeksiyon şeması.....	36
3.1.	<i>P. s. pv. phaseolicola</i> NCPPB 52 (N52) bakterisine karşı üretilen EPS antiserumunun spesifikliği.....	43
3.2.	<i>P. s. pv. phaseolicola</i> NCPPB 52 (N52)’ nin glutaraldehitle fikse edilmiş hücrelerine karşı üretilen Glutaraldehit antiserumunun spesifikliği.....	44
3.3.	<i>P. s. pv. phaseolicola</i> NCPPB 52 (N52) bakterisine karşı üretilen toplam hücre antiserumunun spesifikliği.....	45
3.4.	Üç Farklı Antiserumun IF Hücre Boyama Yönteminde Karışık Kültürlerdeki Hedef Bakteriye Ait Hücreleri Detekte Edebilme Gücü.....	54
3.5.	Fasülye Unu Örneklerinde, IF mikroskopi yöntemiyle, 100 mikroskop alanında 3 farklı antiserumla tespit edilen <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> sayıları.....	56
3.6.	Fasülye Unu Örneklerinde 3 farklı antiserumla tespit edilen <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> sayıları.....	57
4.1.	Tohumla Taşınan Bakterilerin Deteksiyonunda En çok Kullanılan Serolojik Tekniklerin Bazı Önemli Özellikleri.....	66

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

As	: Antiserum
DPI	: Dilüsyon plating identifikasyon
ELISA	: Enzim Bağlı İmmün Deney (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
EPS	: Ekzopolisakkarit
FITC	: Floresanizotiyosiyanat (Fluoresceinisothiocyanat)
FITC-As	: FITC ile konjuge edilmiş antiserum
IF	: Immunofloresan
IFAS	: İndirekt Floresan Antikor Boyama
IFC	: Immunofloresan koloni boyama
ISIF	: Immunosorbent immunofloresan
ODD	: Ouchterlony Duple Diffüzyon
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

1. GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris*), köken olarak, bir “Yeni Dünya” mahsulüdür; fakat günümüzde tüm büyük kıtasal alanlarda geniş çapta yetiştirilmektedir. Üretim alanları 52° kuzeyden 32° güney enlemine, Amerika ve Avrupa kıtalarında deniz seviyesinden 3000 metreyi aşkın yüksekliğe kadar uzanmaktadır [1].

Dünya çapında 12 milyon hektar alan üzerinde yetiştirilmekte ve Latin Amerika ve Afrika’daki 500 milyon insan için en önemli besin olmayı sürdürmektedir. Fasulye, dünyanın bu iki bölgesindeki son derece fakir birçok insan için en önemli kalori ve protein kaynağıdır [2].

Doğan her canlı yaşamını ve hayatiyetini devam ettirebilmek için yeterli derecede besin almak zorundadır. Dünya Sağlık Örgütü’nün önerilerine göre yetişkin bir insanın kilo başına 0,43 gr proteine gereksinimi vardır. Bu değer çocuklarda, hamile kadınlarda ve ağır işlerde çalışan işçilerde daha fazladır [3].

Dünyada tarım yapılan alanların sınırlı olması ve bu alanlarda üretilen besin miktarı, artan nüfusu beslemede yetersiz kalmaktadır. Yapılan hesaplara göre dünyada insan varlığının protein gereksinmesini karşılamak olanağı giderek azalmaktadır. Buna bağlı olarak dünyada var olan protein açığı hızla büyümektedir. Bu sorun dengeli beslenmenin en önemli unsuru olan proteini arttırmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu durum, yılda ortalama %2,7 nüfus artışı olan ülkemiz için, bugün olmasa bile önümüzdeki yıllarda dengesiz ve yetersiz beslenmeye neden olabilecektir. Kuru fasulye, protein kaynağı olarak hem tüketim hem de üretim açısından ülkemizin önemli bir yemeklik tane baklagil bitkisidir. Tanelerinde %22-30 arasında protein içermektedir [4].

Protein kalitesini belirleyen amino asit bileşimleri açısından kuru fasulye sığır eti ile de eşdeğer düzeydedir (Çizelge 1.1-Çizelge 1.2) [5].

Çizelge 1.1. Sığır eti ve Buğdayla Karşılaştırmalı Olarak Nohut, Mercimek, Soya fasulyesi ve Fasulye Bileşimi [5].

Her 100gr için							
BESİN		NOHUT	MERCİMEK	SOYA FAS.	KURU FAS.	SİĞİR ETİ	BUĞDAY SERT
BESİN ENERJİSİ	K.cal	364	338	416	333	287	332
SU	gr	11.5	11.2	8.5	11.3	57.9	13
PROTEİN	gr	19.3	28.1	36.5	23.4	17.5	12.7
YAĞ	gr	6	1	19.9	0.9	23.6	2.5
HAM LİF	gr	4.1	5.2	5	6	0	1.8
DİYET LİF	gr	6.4	11.2	12.5	9.7	0	8.5
KALSİYUM	mg	105	51	277	240	7	37
DEMİR	mg	6.2	9	15.7	10.4	1.9	4.3
ÇİNKO	mg	3.4	3.6	4.9	3.7	3.5	2.7
C VİTAMİNİ	mg	4	6.2	6	0	0	0
TİMIN	mg	0.5	0.5	0.9	0.4	0.1	0.7
RİBOFLOVİN	mg	0.2	0.2	0.9	0.2	0.2	0.1
NIASİN(NE)	mg	0.5	2.6	1.6	0.5	3	4.4
VİT. B6	mg	0.5	0.5	0.4	0.3	0.5	0.5
VİT. B12	ug	0	0	0	0	2.8	0
VİT. A RE	ug	7	4	2	0	0	0
FOLİK ASİT	ug	557	433	375	388	6	52

Çizelge 1.2. Sığır Eti ve Buğdayla Karşılaştırmalı Olarak Bazı Baklagiller İçin Amino asit Bileşimi (Amino asit bileşimi (mg/g Protein)) [5].

	NOHUT	MERCİMEK	SOYA	FASULYE	SİĞİR ETİ	BUĞDAY
Triptofan	10	9	14	12	12	8
Threonine	37	36	39	42	40	29
İsoleucine	43	43	45	44	48	40
Leucine	71	72	75	80	84	76
Lysine	67	70	61	69	84	30
Toplam SAA	27	21	26	26	37	40
Toplam AAA	79	76	82	82	80	89
Valin	42	50	46	28	50	50
Arginin	94	77	71	62	66	56
Histidin	28	28	25	28	29	27
Alanin	43	42	43	42	64	37
Aspartik asit	118	111	115	121	88	50
Glutamik asit	175	155	177	152	144	300
Glisin	42	41	42	39	71	40
Prolin	41	42	54	42	54	94
Serin	50	46	53	54	38	48
Protein G/100 G	19.3	28.1	33.0	21.9	17.5	12.7

İnsan beslenmesinde iyi bir protein kaynağı olan kuru fasulye, bir baklagil bitkisi olmanın avantajıyla, kök nodüllerindeki azot bakterileri yardımıyla; havanın serbest azotunu faydalanılabilir azot haline dönüştürerek topraktaki azot miktarını zenginleştirir ve çok önemli bir ekim nöbeti bitkisidir. Ayrıca sap ve samanın proteince zengin olması kaba yem olarak hayvan beslenmesindeki önemini arttırır.

Türk mutfağının vazgeçilmez bir ürünü olan kuru fasulye yetiştiriciliği Türkiye'nin değişik bölgelerinde, çoğunlukla aile işletmeciliği şeklinde yapılmaktadır. Son yıllarda, aile işletmeciliği şeklinde yapılan kuru fasulye tarımı yavaş yavaş tarla tarımı içinde yerini almaya başlamıştır [6].

Fasulye gerek taze ve gerekse kuru olarak ülkemizin her yöresinde yetiştirilen önemli tarımsal ürünlerimizden olup iç tüketimin yanı sıra, yaklaşık 30 bin tona varan ihracatla 19 milyon dolar döviz girdisi sağlamaktadır [7].

1988-1996 yılları arasında Türkiye'de kuru fasulye üretimi ve verimi aşağıdaki çizelgede (Çizelge1.3) ifade edilmektedir [8].

Çizelge 1.3. Türkiye' de 1988-1996 yılları arasında kuru fasulye ekim alanları (ha), üretimleri (ton) ve verimleri (kg/ha) [9].

YILLAR	EKİLİŞ (ha)	ÜRETİM (ton)	VERİM (kg/ha)
1988	176.000	211.000	1199
1989	178.000	193.000	1084
1990	171.000	210.000	1228
1991	178.000	214.000	1204
1992	168.000	200.000	1196
1993	162.000	200.000	1235
1994	163.000	180.000	1104
1995	170.000	225.000	1324
1996	172.500	230.000	1333

1997 yılında 175.000 hektar ekim alanından 235.000 ton ürün elde edilmiş ve verim 1343 kg/hektar olmuş, 1998 yılında 171.000 hektar ekim alanından 262.000 ton ürün ve 1415 kg/hektar verim elde edilmiştir [9].

İklim olayları ve doğal afetler dışında verimi etkileyen faktörler şu ana başlıklar altında toplanabilir:

- Islah edilmiş çeşitlerin yeni devreye girmesi ve henüz yayılmaması
- Yetiştirme tekniklerinin eksik uygulanması
- Hastalık ve zararlılarla yeterince mücadele yapılmaması

Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan bölgelerde ekonomik yönden en büyük zararı bakterilerin neden olduğu hastalıklar yapar. Bunların başlıcaları *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder)’ nin neden olduğu Yaprak Hale Lekesi=Bakteriyel Yağ Lekesi Hastalığı, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*’ nin neden olduğu Kahverengi Leke Hastalığı, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var *fuscans*’ in neden olduğu Fuscans Yanıklığı Hastalığı ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*’ in neden olduğu Bakteriyel Solgunluk Hastalığıdır [10].

Bakteriyel hale yanıklığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bazı yıllar yetiştirme bölgelerinde büyük ürün kayıplarına neden olmaktadır. 1989-1991 yılları arasında Ankara Ziraî Mücadele Enstitüsü ve Eskişehir Geçit Kuşağı Araştırma Enstitüsü tarafından yapılan çalışmalarda Niğde, Nevşehir, Afyon, Eskişehir, Bursa yörelerinde %50'lere varan zararı tespit edilmiştir [11].

1.1. Bakteriyel Hale Yanıklığı Hastalığı

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (Burkholder) isimli bakteri tarafından oluşturulan hastalık genellikle yazları serin geçen bölgelerde görülür. 20-23 °C hastalığın gelişmesi için en uygun sıcaklıktır. Bunun yanında nispi nemin de yüksek olması gerekmektedir.

Hastalık değişik ülkelerde değişik isimlerle anılır.Ülkemizde “Halo Blight (Hale yanıklığı)”, “Tache Grasse (Yağlı leke)” veya “Yağ Lekesi Hastalığı” olarak bilinmektedir [5].

Tohumla taşınabilen bu hastalık uygun epidemi koşullarında ve hassas çeşitlerin ekildiği bölgelerde %100'e varan hasarlar meydana getirebilmektedir [6].

Enfekte olmuş tohumlar enfekte olmuş fideleri verirler (birincil enfekte ediciler) fakat bunlar genellikle üründe bulunan fidelerin toplam miktarına göre azdır. Bu birincil enfektörlerden hastalığın sonraki yayılışı yağmur sularıyla, genellikle rüzgarın egemen olduğu yöndedir. Amerika’ da bir birincil enfeksiyon kaynağından 26 metre kadar uzakta yeni enfeksiyonlar kaydedilmiştir [12]. 16. 000’ de 1 enfekte olmuş bir bitki uygun epidemi koşullarında ürünün tamamının kaybı için yeterlidir [13]. Bu bakterinin meydana getirdiği tane kayıpları Michigan’ daki araştırma tarlalarında % 23-43 oranında değişmektedir. Kesin rakamlar olmamasına karşın, verimde meydana gelen ürün kayıpları ortalama %10 ile % 50 arasında değişmektedir [12].

1.1.1. Hastalık Belirtileri

Hale yanıklığı hastalığı belirtileri 24-28 °C’ de 6 ila 10 gün içinde ortaya çıkmaktadır. Fakat yüksek sıcaklıklarda, belirtilerin ortaya çıkışı 2-3 gün kadar gecikir [12].

Hastalık fasulye bitkisinin yaprak ve meyvelerinde görülür. İlk hastalık belirtileri enfeksiyondan 5-6 gün sonra 3’ lü fasulye yapraklarında noktacıklar şeklinde oluşur. Fasulye yapraklarında küçük köşeli, solgun yeşilimsi renkli, sulu lekeler şeklinde(Şekil 1.4.) görülmektedir [14]. Şekil 1.1’ de sağlıklı fasülyelerin tarladaki görünümü, Şekil 1.2’ de ise hastalığın yapraklardaki görünümü verilmiştir.



Şekil 1.1. Sağlıklı Fasulyelerin Tarladaki Görünümü

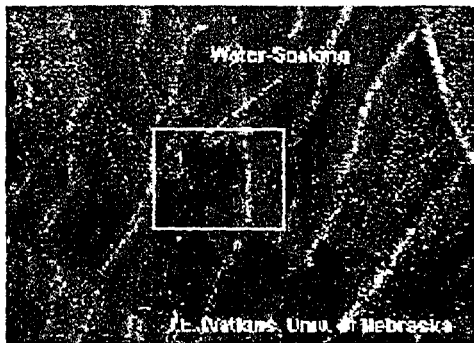


Şekil 1.2. Hastalığın yapraklardaki görünümü

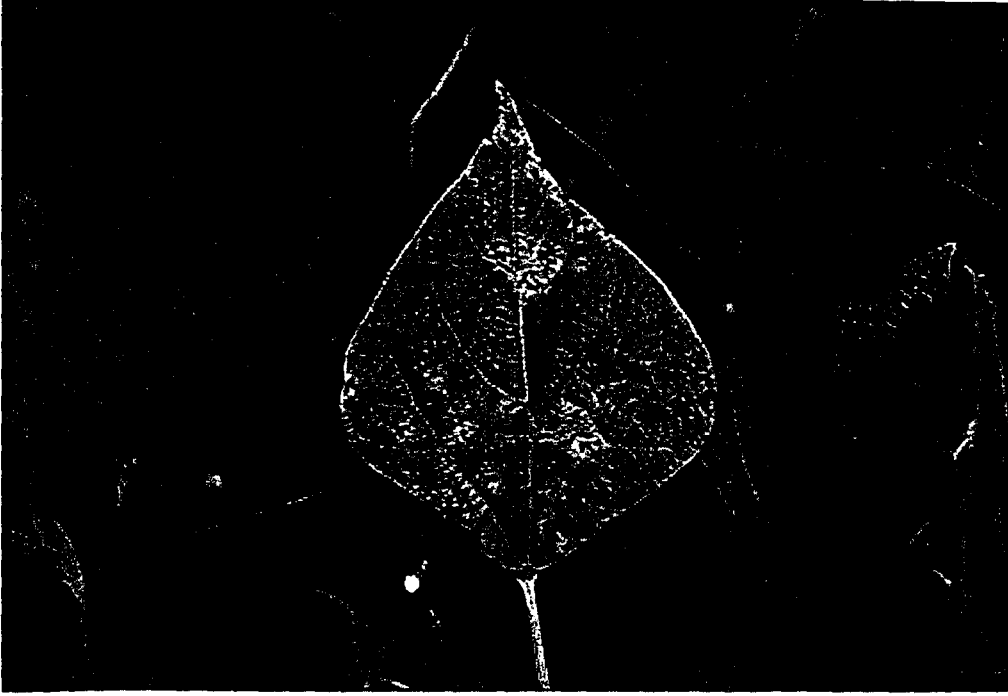


Şekil 1.3. Bitki büyüdükçe hastalığın daha da belirgin bir görünüm alması

Yapraklar daha çok küçükken görülen hastalık, bitkiler büyüdükçe, daha belirgin bir durum alırlar (Şekil 1.3) [12].

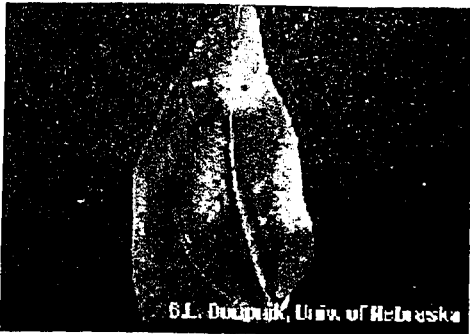


Şekil 1.4. Fasulye bitkisi yaprağı üzerinde suyla ıslanmış görünümü veren lekeler



Şekil 1.5. Yaprak üzerindeki nekrotik alanlar

Lekeler genişleyip birleşerek daha sonra büyük nekrotik alanları oluştururlar (Şekil 1.5.) [15]. Yapraklar üstünde küçükü büyüklü lekeler oluşur. Bu lekeler önceleri sarı renklidir (Şekil 1.6.) [12].



Şekil 1.6. Yaprak üzerindeki sarı renkli lekeler

Hale yanıklığında, haleye benzer yeşilimsi-sarı bir doku zonu, sulu zonun dışında oluşur ve yapraklara sarımsı bir görünüş verir. Bu klorotik lekeler zamanla kurur ve kahverengine döner. Daha sonra bu lekelerin rengi saman

sarısına dönüşür. Kuru lekelerin üstü pudramsı bir toz ile kaplıdır. Aslında bu tozlu görünüş leke üstünde kuruyan bakteri süspansiyonundan bir damladır [12]. Bakteriler, aynı zamanda yaprağın vasküler dokusuna girebilirler ve gövdeye yayılabilirler. Meyvelerdeki lekeler yapraklardakinden daha büyük ve fasulye meyvesi üstüne serpilmiş durumdadır. Hastalıklı gövde, bakla (=kapsül) ve tohumlarda oluşan bakteriyel akıntı, açık krem gümüşü renktedir.

Çimlenme döneminde kotiledon yapraklarında sarı lekeler şeklinde görülür. Hastalık ilerledikçe gövde ve dallarda uzunca kırmızımsı- kahverengi lekeler oluşturur. Hastalığın ilk çıktığı tarla kısımlarında, bitkilerdeki kuruma ve çökme sonucu oluşan zarar uzaktan görülebilir.

Gövdedeki belirtiler sulu, bazen çökük ve genellikle uzunluğuna büyüyen ve kahverengileşen çoğunluk yüzeyde çatlayan ve bakteriyel akıntı çıkaran lekeler şeklinde görülür. Böyle lekeler, en çok gövdeyi tam olarak kuşatan 1. boğum yakınında yaygındır. Ağırlaşan bitki, lekelerin olduğu yerlerden kırılır ve bu simptome da **gövde kuşatması** veya **eklem çürüklüğü** adı verilir.

Gövde ve baklalarda yağ damlatılmış gibi yuvarlak ya da uzunca, krem renkli akıntılı, siğile benzer lekeler oluşturur. Bu çoğunlukla birleşir ve yaşlandıkça kırmızımtırak veya kahverengimsi olur [15]. Kapsül etmen tarafından enfeksiyona uğratıldığı takdirde bakteri iletim sistemi yardımıyla tohumu enfekte etmektedir. Özellikle beyaz tohumlu çeşitlerde tohum kabuğu üzerinde sarı renk almış enfekteli alanları görmek mümkündür [16]. Eğer bakla çoğunlukla (iletim demetlerinin olduğu) birleşme yerinden enfekte edilirse, bakteri vasküler sisteme girer ve tohumu içten enfekte eder. Tohumlar funikulus yoluyla enfeksiyonu alır [15], bazı durumlarda ise enfekteli bitki parçacıklarıyla temas eden tohum kabuğundaki çatlaklardan bakteri giriş yaparak tohum bulaşıklığına neden olmaktadır [16]. Tohumlar çürüyebilir, enfeksiyon erken dönemde olursa buruşur veya enfeksiyon zamanı ve şiddetine bağlı olarak değişik derecelerde renk değişikliği gösterebilirler [15]. Tohum kabuğu sıklıkla enfekteli bitkilerle tohum gömleğinin ilişkisi vasıtasıyla dışsal olarak zarar görmeye başlar.

Hastalık yapraklarda fazla yoğun olduğu zaman yaprakların kavrulmasına yol açar. Kavruk yapraklar çoğu zaman dökülürler. Hastalık erken dönemde başlarsa bitkiler gelişemez, çiçek açamaz ve meyve veremezler [16].

1.1.2. Hastalığın Coğrafik Dağılışı

İlk kez Amerika Birleşik Devletleri'nde rastlanan bu bakteri daha sonra Almanya'dan rapor edilmiştir [16]. Etiyopya, Malawi, Fas, Mauritius, Rodriguez Adası, Güney Afrika, Tanzanya, Uganda, Zambiya, Zimbabve, Hindistan, İsrail, Japonya, Suudi Arabistan, Avustralya, Fiji, Yeni Zelanda, Avusturya, Belçika, Britanya, Bulgaristan, Çekoslovakya, Danimarka, Fransa, Macaristan, İrlanda, İtalya, Hollanda, Polonya, Romanya, İspanya, İsveç, Rusya, İsviçre, Yugoslavya, Kanada, Meksika, Barbados, Kosta Rica, Dominik Cumhuriyeti, Şili, Guadeloupe, Arjantin, Kolombiya, Peru, Surinam, Venezuela'da bu hastalık görülmüştür. Bu hastalığa Brezilya'da rastlanmamıştır [17].

Ülkemizde hastalık ilk kez Karadeniz Bölgesi ve Bursa civarında, Afyon, Ankara, Antalya, Balıkesir, Bolu, Bursa, Çankırı, Çorum, Denizli, Edirne, Erzincan, Isparta, Kayseri, Kırşehir, Konya, Kütahya, Malatya, Niğde, Kahramanmaraş, Nevşehir, Tokat, Yozgat, Eskişehir yörelerinde tespit edilmiştir [5,18].

1.1.3. Hastalık Kontrolü

Bitkilerin bakteri hastalıklarının kontrolüne, hastalığa neden olan organizmanın izolasyonu ve identifikasyonu için gereken işlemlerin uzunluğu engel olmaktadır.

Tohumla taşınabilen patojen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder), tüm dünyada yaygın olan tohum kaynaklı bir patojen olup, canlılığını toprak yüzeyinde kalan bitki dokularında uzun süre sürdürebilmektedir. Starr ve Kercher [19], 1969'da yaptıkları çalışmada bakterinin hastalıklı bitki parçalarını yiyen kuzuların dışkılarında 9 ay canlılığını sürdürebildiğini ifade etmişlerdir. Tohum orijinli hastalıklara karşı en iyi mücadele temiz tohumluk kullanmaktır. Bu konuda tohum dezenfeksiyonu için çeşitli kimyasallar ve sıcak su uygulamaları önerilmektedir. Ancak, tohum kabuğu altında bulunan bakterilere yeterince etkin olmamaktadır, sadece inokulum potansiyelini azaltmaktadır.

Amerika'da yapılan bazı araştırmalarda denenen pek çok metoda rağmen uygulama yapılmış ve yapılmamış tohumlar arasında hastalık çıkışı açısından pek fark gözlenememiştir. Ayrıca, fasulye çeşitlerinin pek çoğunun da sıcak suya karşı duyarlı olduğu bilinmektedir.

Hastalık, bordo bulamacı, bakır oksiklorid, bakır sülfat, bakır oksit, streptomisin sülfat ve dihidro streptomisin sülfat gibi kimyasallarla kontrol edilmeye çalışılmış, ancak, bu yöntemler etkili ve pratik olamamıştır.

İlk enfeksiyonun % 98 tohumdan başladığı kabul edilerek, tohumun ekim öncesi, %0.2' lik streptomisin veya kasugamisin ile muamele edilmesinin etkili olduğu bildirilmiştir [20]. Ancak yüzeysel dezenfeksiyonlarda tohumların %0.2' lik streptomisin solüsyonunda 2 saat bekletilmesiyle çimlenmede %20' lik zararın meydana geldiği gözlenmiştir [12].

Penicilin, Streptomisin, Aureomycin, Chloromycetin, Neomisin ve Subtilin gibi antibiyotikler denenmiş ve kısmen sonuç alınmıştır [16]. Antibiyotiklerin kolayca dirençlilik kazanma ve insan sağlığı yönünden sakıncaları da olabilir.

Kültürel uygulamalar olarak

- Hastalıkla bulaşık tarlalardan elde edilen tohumlar asla kullanılmamalıdır.
- Tohumluk retimi hastalık için uygun olmayan bölgelerde, yani sıcak ve kurak bölgelerde yapılmalıdır. (Bu şartlarda yapılan üretimlerde bile tohumların tamamen temiz olduğu söylenemez ve tohum üreten şirketler tohumların sağlığını garanti edemez).
- Ekim nöbeti uygulanmalı, ekimden önce tarla derin bir şekilde sürülmeli, bir önceki yıldan tarlada bırakılan hastalıklı bitki parçaları tarladan uzaklaştırılıp, yakılmalıdır.
- Hastalığa tolerant çeşitlerin üretimine yönelinmelidir.
- Sekonder enfeksiyonları arttıran yağmurlama sistemi sulamadan mümkün olduğunca kaçınılmalıdır.
- Hastalığın bulaşık ekipmanla tarladan tarlaya geçişinde dikkatli olunmalıdır. Hastalığın kontrolü amacı ile karışık ekim

önerilmektedir. (örneğin Karadeniz Bölgesi'nde fasulye-mısır karışık ekimlerinde hastalığın geniş alanlara yayılması engellenmiştir. Bunun nedeni olarak mısır bitkisinin bakteri sporlarının yayılmasında fiziksel bir önleyici rol oynadığı kanısına varılmıştır [12,21,22].

Bu yöntemlerin hepsi hastalığın yayılmasını ve zararını en aza indirmektedir, fakat kesin sonuç vermemektedir.

Bu yöntemlerin yanında hastalıkla mücadelede tohum sertifikasyon programları da uygulanmaktadır ve hastalığın yayılmasında ve zararın en aza indirgenmesinde etkili bir yol olarak görülmektedir. Yaygın yanıklığa karşı Michigan'daki tohum sertifikasyon programı laboratuvar testleri; enfekte olmadığı bilinen tohumlar ile tarlada yetiştirme esnasında % 0,05 oranında yanıklığa sebep olan tohumlara izin vermektedir [23].

Amerika Birleşik Devletleri'nde temiz tohum üretimi Hale Yanıklığı kontrolü için ana metottur. Idaho'daki temiz tohum üretimi programı için yapılan çalışmalarda; enfeksiyonun gözle görülebilir delillerinin saptanması amaçlı arazi denetimleri, şüpheli "pod" ların tohum örneklerinden preparasyonlarla laboratuvar inokülasyonlarının yapılması, tohumla taşınan mikroorganizmaların serolojik değerlendirilmesi, patojen bulunan bölgelerden fasulye tohumlarının girişini önlemek amacıyla karantina uygulamaları gerçekleştirilmektedir. Eğer tohum yığnında bakteri tespit edilirse bu tohumlar sertifika alamaz ve ekimi yapılamaz [12].

Bir çok araştırmacı tohum sertifikasyonunda kullanmak için daha ileri yöntemleri denemişlerdir. Tarlalarda hale yanıklığı hastalığı riskini azaltmak ve fasulye tohumlarında *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* varlığının tespiti için immunofluoresans mikroskopi yöntemi [24,25], ELISA testi [26] ve immunosorbent dilüsyon plak yöntemi (ISDP) [27], denenmiş olup tohum sertifikasyonunda rutin olarak kullanılabilirliği araştırılmaktadır.

1.2. Patojen (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder))

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (Burkholder) aerobik, gram negatif çubuklardır. Büyüklükleri 1.5-5.0x0.5-1.0 mikron dur. 1-6 mono veya bipolar kamçılı olup, hareketlidirler. Genellikle tek ya da çift fakat nadiren zincir halinde görünürler [28].

Büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaz. Poly- β -hidroksibutirat hücre içi karbon rezervi olarak biriktirilmez. Glutarat, meso-tartrat, DL-gliserat, izoaskorbat, eritritol, sorbitol, meso-inositol ve N-kaproatı kullanamazlar. D-glukonat, L(+) arabinoz, sukroz, suksinat, DL- β -OH butirat, transakonitat, L-serin, L-alanin ve p-hidroksibenzoatı kullanabilirler [12].

Havuç ve patates agarda daha ince bir tabaka yaratırlar. Steril havuç ve patates dilimlerinde iyi gelişirler. Asit ortamda gelişmezler. Jelatini sulandırmazlar. Sütü ne kuagüle eder ne de peptonlaştırırlar. Nitratları redükte etmezler. Ne indol ne de hidrojen sülfid oluştururlar, fakat amonyak meydana getirirler. Uschinsky ve Cohn eriyiklerini sınırlı bulandırır ve hafif yeşil bir renk gösterirler. Bu belirtiler Fermi eriğinde meydana gelmez. Glukoz, sakkaroz, maltoz ve rhamnose'den asit oluşturur fakat gaz oluşturmazlar. Laktoz, arabinoz, mannitol, dulsitol veya sorbitoldan asit ve gaz oluşturmazlar. Nişastayı bazı yazarlar sulandırıldığını, bazıları da sulandırmadığını yazar. Pamuk tohumu yağın bozmazlar. Optimum gelişme sıcaklığı 25-30 °C arası, maksimum 36-37 °C ve minimum 0 °C altındadır. Termal ölüm noktası 49-50 °C dir. Gelişmesi için uygun pH dereceleri 5-8,8 dir. Optimum derece ise pH 6,7-7,3 tür. Bakteri suda çözülen ve pyoverdin olan floresan pigmentine sahiptir. Bu pigment uzun dalga boylu ultraviole ışığı altında (365 nm) yeşil ışımaya verir.

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (Burkholder); *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ile %60-63, *Pseudomonas aptata* ile %60, *Pseudomonas morsprunorum* ile %83-84, *Pseudomonas tomato* ile %63, *P.cichorii* ile %34 DNA-DNA homoloji derecesine sahiptir. Pektolik aktivite göstermediği için yumuşak çürüklük symptomu meydana getirmezler [12,29].

Bakteriyal hücreler, sıvı nitrojen içinde -172°C'de 30 ay patojenite özelliklerini kaybetmeden canlı halde kalabilirler [12].

1.3. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' nın Sinonimleri

Kuru fasulye hale yanıklığı etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) günümüze değin aşağıdaki adları almıştır [17].

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye&Wilkle, 1978 *Phytomonas medicaginis* var.*phaseolicola* (Burkholder), 1926

Bacterium medicaginis var.*phaseolicola* (Burkholder),Link& Hull, 1927

Pseudomonas medicaginis var. *phaseolicola* (Burholder) Stapp& Kottle, 1929

Pseudomonas medicaginis f.sp. *phaseolicola* (Burkholder) Dowson, 1957

Xanthomonas medicaginis var. *phaseolicola* (Burkholder) Elliott, 1951

Pseudomonas phaseolicola (Burkholder) Dowson, 1943

Bacterium puerariae, Hedges, 1927

Phytomonas puerariae (Hedges), Bergey et. Al. 1930

1.4. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' nın Konukçuları

Esas konukçusu kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris*)dir. Diğer konukçuları ise, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus angularis*, *Phaseolus bracteatus*, *Phaseolus polyanthus*, *Phaseolus polystachyus*, *Phaseolus radiatus*, *Cajanus cajan* (L, Millsp.) *Macroptilium atropureum* (*Phaseolus atropurpureus*), *Phaseolus coccineus*, *P. lunatus* (*P. lunatus* var. *macrocarpus*), *Pisum sativum*, *Puararia lobata* (Wild), *P. thunbergiona*, *Vigna radiata* (*Phaseolus aureus* L. Wilczek), *V. Unguiculata* (*V.sinensis* Elliot, 1951)dir. Ayrıca *Glycine jaunica*, G. Max (L. Merill), *G. Wightii* de de bildirilmiştir [17].

1.5. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' nın Enfeksiyonu

Bu hastalığı bulaştıran bakteriler tohumun içinde, tohum kabuğu ile kotiledon yaprakları arasında veya tohumun üstünde bulunurlar [12]. Bakteri kışı tohumda ya da hastalıklı bitki artıkları üzerinde toprakta geçirir. Bulaşık tohumlarda canlılığını 2-12 yıl koruyabilir [21].

Bakteri enfeksiyonu tohum içerisinde ve fasulye gövdelerinde başlar. Tohumda bakteriler önce kotiledonları enfekte eder ve buradan da yapraklara sıçrar ya da vaskuler sisteme girerek sistemik enfeksiyona neden olurlar [15]. Ayrıca bakteriyle bulaşık bitki salgılarından yayılarak enfeksiyon yaparlar. Stoma yoluyla penetrasyon olduğunda enfeksiyon da lokal olarak gelişir. O zaman hastalık hangi yaprakta, meyvede oluşmuşsa, orada kalır. Ya da sistemik olur. O zaman da bütün bitkiye yayılır [12]. Böylelikle gövde ve yaprak lezyonları oluşur. Dahili olarak, bakteriler hücreler arası hareket eder ve hücreler çöker. Böylelikle boşluklar oluşur. Ksilemde iken bakteriler çok çabuk çoğalırlar. Aşağı yukarı hareket ederler, parankimayı dışarı doğru iterler. Doku içindeki stoma veya yarıklardan dışarı doğru akıntı şeklinde çıkarlar. Stoma ve yara yoluyla gövde yapraklara tekrar girebilirler.

Ayrıca *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) ile sadece dıştan kontamine olmuş olan tohumlardan da bu hastalık fidelere geçebilmektedir [22]. Enfeksiyon bakterinin hareketi sayesinde bir dış kabuk lezyonundan alttaki yakın bir tohum yüzeyine olabilir. Fasulyede hale yanıklığı semptomları 24-28 °C de 6-10 gün içinde gelişmektedir. Yüksek ıslarda gelişme 2-3 gün gecikir. Gelişen semptomların gözle görülebilmesi için 30 cm' lik bir yaprak dokusunda bir milyon koloni oluşturan birim bulunması gerekmektedir [5].

Bakteri yayılışı ile klorotik lekeler arasında bir ilişki bulunmadığı anlaşılmıştır. Leke taşımayan yapraklardan izole edildiği halde bazı klorotik lekelerin bulunduğu yapraklardaki bakteri izole edilememiştir. Bu klorotik lekelerin bakteri olmaksızın, toksinlerden ileri geldiği anlaşılmıştır [12]. Bu toksin *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) tarafından üretilen ve N-phosphosulfamylornithine yapısında olan Phaseolotoksin olarak bilinmektedir. Bitkilerde pas enfeksiyonu da varsa, hale yanıklığı lezyonları daha da

belirginleşmektedir [5]. Gerçekten *Pseudomonas phaseolicola* kuvvetli bir toksin salgılamaktadır. Ancak bakteri olmadan toksinlerle bu lekelerin oluşma şekli henüz açıklanabilmiş değildir [12].

Patojen yağmurlu günlerde su zerrecikleri ve rüzgar yardımı ile bitkiler arasında hızla yayılmaktadır. Daha sonra, bakteriler tomurcuk, nod ve bakla aksonlarında çoğalmaktadır. Patojen özellikle, çiğli ve nemli ortamda bitkinin yaprak yüzeyinde hızla çoğalmaktadır [5,12].

1.6. Serolojik Terminoloji:

" İmmün" Latince kökenli bir deyimdir.Eski Roma' da vergiden ve askerlikten bağışlanmış (muaf) olanlara denirdi.

Benzer biçimde, kişilerde bazı hastalıklara karşı bir muafiyet kazanılabileceği ve bu suretle hasta olmaksızın bu hastalıklardan hatta belki yaşam boyu artık muaf (bağışlanmış) kalınabileceği eskiden beri bilinmektedir. Bu muafiyet (bağışıklık) haline **immünite** denmektedir.

İmmünoloji, bu bağışıklığın nasıl oluştuğunu, biyolojik ve klinik sonuçları ile birlikte inceleyen bir bilim dalıdır .

1.6.1. Antijen:

Bağışık yanıt verebilecek düzeyde gelişmiş organizmalara verildiklerinde, kendilerine karşı bir bağışık yanıtının oluşmasına yol açan ve bu yanıt sonucunda ortaya çıkan ürünler ile özgül olarak birleşme özelliğindeki maddelerdir. Antijenler genellikle verildiği organizmaya yabancı olan kompleks moleküllerdir. Bazı maddeler örneğin büyük molekül ağırlıklı polisakkaritler ve proteinler mükemmel antijenlerdir.

1.6.2. Antikor:

İmmün cevap süresince oluşan bir globulin proteindir. Antikor molekülünün antijene bağlanacak spesifik bağlanma bölgeleri bulunur.

Antijenler ve antikorlar arasındaki reaksiyonları inceleyen bilim dalına ise seroloji denir.

Antikorlar gamma globulin yapısındadır.

Bir antijen organizmaya girdiğinde, hücresel ve/veya sıvısal yapıda bir bağışık yanıtı harekete geçirir. Bağışık yanıtta, antijenin immun sistem tarafından tanındıktan sonra, yanıtı organize edebilecek, immunolojik bakımdan elverişli belirli sayıda hücrenin harekete geçmesi gerekir. Bağışık yanıtta makrofajlar ve lenfositler olmak üzere iki çeşit hücre rol oynamaktadır.

Saf haldeki tek bir antijene, fakat gerçekte o antijenin çeşitli bütün determinantlara karşı, muhtelif antikor yapıcı hücre klonlarının sentezledikleri antikorlar heterojen bir populasyon oluştururlar. Bu heterojen populasyonda, immunoglobulinlerin ağır zincir izotipine, hafif zincir tipine, allotipine, V bölgesi amino asit sekansına ve idyotipine göre, değişik yapıda antikorlar yer alırlar. Bu antikora **poliklonal antikorlar** denir.

Tek bir hücre klonunun sentezlediği antikorlar ise **monoklonal antikorlar** 'dır.

1.6.3. Antijen Antikor Reaksiyonları

1.6.3.1. Aglütinasyon:

Antijen bir partikül (örn: bakteri hücresi) veya bir hücre komponenti (örn: kamcı) olduğu zaman spesifik antikoru ile birleşerek kümeler meydana getirilmesi olayıdır.

1.6.3.2. Presipitasyon:

Antijen suda eriyebilir özellikte bir madde (örn: bakterinin yüzeyindeki lipopolisakkaritler) ise spesifik antikoru ile birleşerek çökelir. Bu olaya da presipitasyon denir.

1.6.4. Adjuvantlar

Zayıf antijenler, bazı maddeler ile karıştırılıp şırınga edildiğinde, zayıf antijenlere karşı kuvvetli immün cevap alınmaktadır. İmmün cevabı artırıcı özgül olmayan bu maddelere adjuvant adı verilir. Freund adjuvantı en çok kullanılan adjuvantlardan birisidir. Freund adjuvantı tam veya tam olmayan diye iki türlü hazırlanır. Tam olmayan Freund adjuvantı sadece lanolin ve parafin yağı karışımı olup, suda erimiş özgül antijen ile iyice karıştırılarak deney hayvanına şırınga edilir, tam Freund adjuvantı ise tam olmayan adjuvanta ölü tüberküloz basili ilavesi hazırlanır. Tüberküloz basilinin adjuvant etkisi bakterinin hücre duvarında bulunan balmumu D maddesindeki peptido-glukolipid molekülü ile ilgilidir. Tam Freund adjuvantı hem hücresel, hem de humoral cevapta artırıcı etki yapar. Adjuvant etkisi gösteren birçok madde bildirilmiştir. Bunlardan bazıları şunlardır: Potasyum alüminyum sülfat (Alum), Alüminyum fosfat, Alüminyum hidroksit, Kalsiyum fosfat, silika parçacıkları, madeni yağlar, saponin, lanolin, amonyum bileşikleri, vitamin A, bunlara ilaveten birçok bakterilerinde özgül olmayan adjuvant etkileri vardır, örneğin, Bordetella pertussis, Corynebacterium parvum, BCG gibi. Endotoksinler, stafilokok ekzotoksini, fitohemagglutinin ve nükleik asidin yıkım ürünleri olan polinükleotidler de adjuvandır. Adjuvantlar çok yaygın bir kullanım sahası bulmasına rağmen etki mekanizması kesin olarak bilinmiyor. Fakat adjuvantların etki mekanizmasında aşağıdaki etkenlerin rol oynadığı sanılmaktadır:

1-Antijenin adjuvantın lipofilik ve hidrofilik etkisiyle devamlı bir emülsiyon halinde kalması ve bu suretle antijenin emilimi ve atılımı gecikerek, uzun süre antijenik uyarımın devam etmesi,

2-Makrofajların fagositoz etkisini artırarak, antijenin immün cevap için işleme girmesinin hızlandırılması,

3-Yerel yangısal cevabın artırılması,

Adjuvant maddeler karıştırılarak verildiği gibi ayrı ayrı da verilebilir, bu hallerde adjuvantı antijenden önce veya aynı zamanda vermek gerekir. Eğer adjuvant madde, antijenden sonra şırınga edilirse humoral cevapta artma olmasına

rağmen hücre sel cevapta azalma veya baskılanma olur ki bu olaya **immün sapma** denir [30].

1.7. Serolojik Teknikler

Serolojik reaksiyonlar antijen ve antikorların meydana çıkarılması için yapılan deneylerdir. Bunlardan birisinin bizim tarafımızdan bilinmesi gereklidir. Bu şekilde diğerinin varlığını ve miktarını tahmin edebiliriz. Örneğin bilinen bir antijen kullanarak insanın kan serumunda buna karşı antikor bulunup bulunmadığını meydana çıkarabildiğimiz gibi bunun miktarını da belirleyebiliriz. Bunun tersine elimizde bilinen antikorlar varsa bir mikroorganizmanın değişik antijenlerinin veya diğer biyolojik maddelerin tanınması mümkündür. Bu şekilde bir enfeksiyondan izole edilmiş olan mikroorganizmanın kesin olarak tanınması olasıdır.

İmmunofluoresan mikroskopi (IF) yöntemi de tohum sertifikasyon programlarında rutin olarak kullanılabilirliği araştırılmış olan bir yöntemdir.

İmmunofloresan yönteminin özelliği antikor molekülünün floresan ışımaya veren çeşitli kimyasal bileşikler ile birleştikten sonra immünolojik özgüllüğünün değişmemesidir. Direkt ve indirekt şeklinde iki tip uygulama alanı vardır. Direkt yöntemde örneğin, bir bakteri tanısında o bakteriye özgül antiserum, fluorescein isothiocyanate (FITC) ile kimyasal olarak bağlanır. FITC yerine diğer bir floresans veren madde rhodamin ile de işaretleme yapılabilir. Rhodamin ile işaretlenen antikor boyanmalarında mikroskopta kırmızı renkli floresan görülür. Bu bakteriden şüphe edildiği ortamdan alınan örnek lam üzerine yayılıp tesbit edildikten sonra işaretlenmiş antiserum lam üzerine damlatılır. Belirli bir süre bekletildikten sonra yıkanır ve floresan ışık veren ışık kaynağı ile mikroskopta incelenir. FITC ile işaretli antiserumlar ile yapılan boyamada bakteriler yeşil-sarı görülür. Direkt yöntem özellikle hasta numunelerinde bakteri teşhislerinde kullanılmaktadır. Bugün dışkıdan enteropatojenik *E.coli*, boğazdan alınan örneklerde β -hemolitik streptokok grup A tanısında, kuduz tanısında kuduzlu beyinlerden yapılan sürme preparatlarda Negri cisimciklerinin saptanmasında ve diğer birçok bakteri ve virüs tanısında kullanılmaktadır [30].

IF yönteminin başka bir uygulama şekli de Immunofloresan koloni boyama (Immuno fluorescein colony staining) (IFC) adı verilen yöntemdir. Bu yöntem de bakteri aranması ve izolasyonu için kullanılmaktadır. Agar üzerinde mikro-koloniler oluşturulduktan sonra sıcak hava ile ortam kurutulur. FITC bağlı antikolar ile inkübasyon sonunda mikroskopta inceleme yapılır ve ışımaya gösteren kolonilerin hedef bakteriye ait olduğu saptanmış olur. Saptanan bu koloniler yeni besiyerine aktararak izolasyonu sağlanmış olur. Yöntemin en büyük özelliği canlı hücreleri ayırt etme gücüdür. Bu nedenle IFC yöntemi vasıtasıyla belirlenen canlı hücreler izole edilip diğer testler için de kullanılabilir. Franken ve Van Vuurde, IFC yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada yöntemin *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* aranmasında iyi sonuç verdiğini bulmuşlardır [31].

Tohum örneklerindeki bitki patojeni bakterilerin rutin indekslemelerinde deteksiyon metodları yüksek duyarlılık ve spesifisite de olmalıdır. Standartizasyonu ve otomasyonu mümkün olmalı, çok miktardaki tohum örneklerine uygulanabilmesi için de hızı yüksek olmalıdır. IF gibi serolojik testler, bu özel gereklilikleri karşılayabilecek potansiyeldedir.

Serolojik testler hızlı olmaları, kolay uygulanabilirlikleri ve çok miktardaki örneği test edebilme güçleri nedeniyle rutin uygulamalar için uygundur. Daha da önemlisi IF gibi serolojik testler çok duyarlıdır. IF' nin duyarlılığı gözlenen mikroskop alanının arttırılmasına bağlı olarak arttırılabilmektedir.

Tohumla taşınan bakterilerin aranmasında kullanılan diğer serolojik tekniklerle IF' yi karşılaştırdığımızda IF' nin diğerlerine göre çok avantajlı olduğu açıkça görülür. Çünkü IF yönteminin analitik spesifisitesi, analitik duyarlılığı, potansiyel standartizasyonu ve fazla miktardaki örneğe potansiyel uygulanabilirliği yüksektir. Serolojik tekniklerin bu çok önemli 4 kriterine bakıldığında IF' nin diğerlerine göre daha avantajlı olduğu görülmektedir. ELISA, Ouchterlony Double Diffusion (ODD) ve Lam Aglutinasyon testlerinin analitik duyarlılığı IF' ye göre çok düşüktür. IF' nin hızı da diğerlerine göre çok daha fazladır ve daha çabuk sonuç verir [31].

Trigalet ve Bidaud, yaptıkları çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın tohum ekstraktında direkt identifikasyonu için immunofloresan mikroskopiyi kullanmışlardır [32].

Wyatt ve arkadaşları, fasülye hale yanıklığı hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın spesifik deteksiyonu için ELISA tekniğini uygulamışlardır. Patojenisitede rol oynayan yüzey polisakkaritlerinin bir preparasyonunu immunojen olarak kullanmışlar ve bu yüzey polisakkaritlerinin organizma için karakteristik olduğunu bulmuşlardır. Metodun alternatif yöntemlere göre önemli derecede hızlı olduğunu ve üretilmiş antiserumun, organizmanın IF mikroskopi ile deteksiyonu için de kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir [33].

Van Vuurde, Van Den Bovenkamp ve Brinbaum, yaptıkları çalışmada IF'nin, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın fasülye tohumlarında aranması açısından ELISA'ya göre daha güvenilir ve rutin uygulamalar için daha ucuz olduğu sonucuna varmışlardır [26].

Van Vuurde ve arkadaşları, tohumla taşınan *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın rutin aranması için direkt IF'yi kullanarak bir düzenek oluşturmuşlardır. Bu rutin metod 1980 yılından beri Government Seed Testing Station'da ticari örnekler üzerinde uygulanmaktadır. Yine aynı çalışmada IF'nin kısa inkübasyon periyodu ve düşük sıcaklıkta çalışması nedeniyle muhtemel non-spesifik bakterilerin artışı sınırlayan bir teknik olduğu bildirilmiştir [26].

Van Vuurde, IF'nin 10.000-50.000 tohumdaki 1 enfekte olmuş tohumu detekte edebildiğini göstermiştir [26].

Van Vuurde ve Van Henten, katı faz immunosorbsiyon metodları olan immunosorbent immunofloresan mikroskopi (ISIF) ve immunosorbent dilüsyon-plate (ISDP) yöntemlerini bakteriyolojik araştırmalar için geliştirmişler ve tohum patolojisi için adapte etmişlerdir. ISIF'in temel avantajının, IF mikroskopi yönteminin kalitesini ve duyarlılığını artırması olduğunu bildirmişlerdir. Bunu da konsantre tohum ekstraktlarından patojenik bakterilerin lam üzerine seçici absorpsiyonu yolu ile göstermişlerdir. Çalışmalarında IF metodu ile mililitredeki 10^2 antijenik bakteriyel hücrenin belirlenebileceğini tespit etmişlerdir [27].

Benlioğlu ve Özakman, tavşanlarda *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın ısıyla muamele edilmiş hücrelerine ve aynı bakterinin glutaraldehitle fikse edilmiş hücrelerine (iki farklı enjeksiyon şeması uygulayarak) üç antiserum üretmişlerdir. Farklı orjinli *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* strainlerini, kuru fasülyeden izole edilmiş bazı floresan *Pseudomonas*ları ve bazı diğer bitki patojeni bakterileri iki serolojik metotla (İndirekt floresan antikor boyama (IFAS) ve ELISA) test etmişlerdir. Bu iki deneyin deteksiyon limitlerini ve bakteri strainleriyle çapraz reaksiyonlarını değerlendirmişler ve IFAS'ın ELISA'ya göre hale yanıklığı hastalığı etmeninin deteksiyonunda daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır [18].

Bu çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* için spesifik 3 farklı poliklonal antiserum üretilmiştir. Bu antiserumların immunofloresan mikroskopi ve immunofloresan koloni boyama metodları açısından kullanılabilirliği öncelikle referans kültürlerde yapılan çalışmalarla araştırılmış, daha sonra da aynı yöntemlerle Eskişehir ve çevresindeki fasülye üretimi yapılan alanlardan sağlanmış kuru fasülye tohumlarında, hastalık etmeni bakteri aranmıştır.

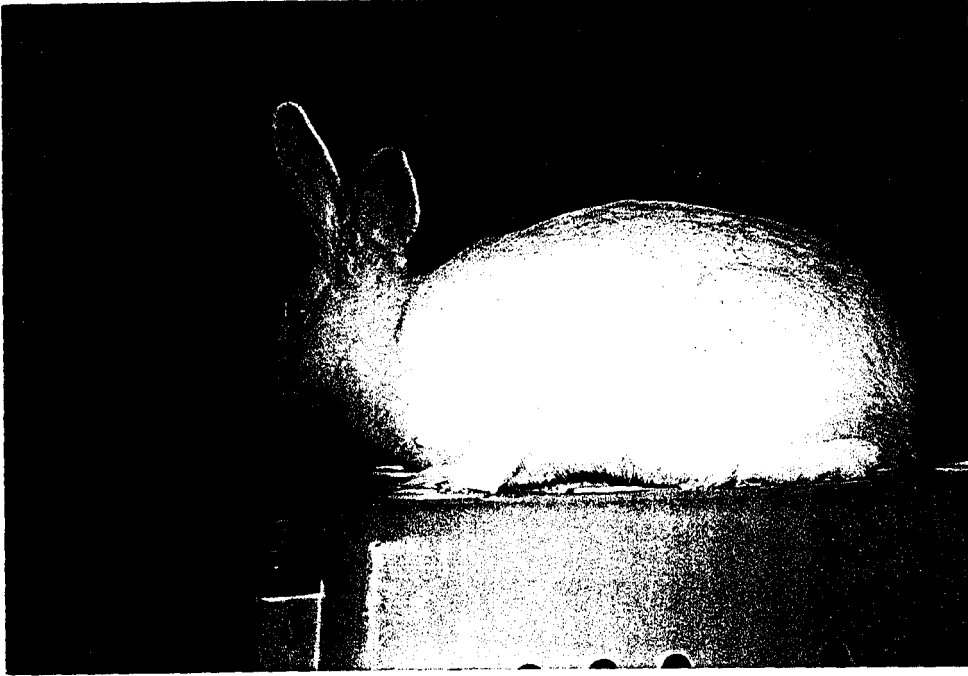
Elde edilen sonuçların temiz tohumluk tescilinde öncü bir yöntem olarak uygulanabileceği ve rutin kullanıma imkan sağlayabileceği düşünülmüştür. Bu yöntemle patojen bakteri içerdiği tespit edilen tohum örnekleri reddedilerek bunun yerine başka tohumun kullanılması tavsiye edilecek ve bu sayede çiftçiye temiz tohum sağlanmasına katkıda bulunulacaktır. Sonuçta da verimi arttırarak ülke ekonomisine bir katkı sağlanabilecektir. Ayrıca uygulanacak IFC yöntemi ile tohum örneklerindeki canlı bakteriler ayırt edilebilecek ve bunlar izole edilip büyütülerek farklı çalışmalarda kullanılabilir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılmak amacıyla İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesine bağlı DETAM (Deney Hayvanları Tıbbi Araştırma Merkezi)'dan 3 adet Yeni Zelanda cinsi dişi tavşan temin edilmiştir. Tavşanlar 3 aylık ve yaklaşık 1.5 kg ağırlığında olanlardan seçilmiştir. Bakımları 55x30x35 cm ebatlarındaki çelik kafesler içinde ve oda sıcaklığında yapılmıştır. Kafeslerin taban kısmına talaş dökülerek kafes temizliğinin kolay yapılması ve ısı muhafazası sağlanmıştır. Her tavşan ayrı bir kafes içerisinde büyütülmüş ve beslenmeleri sırasında taze sebzeler ve kuru yem kullanılmıştır.



Şekil.2.1. Antiserum Üretimi için Kullanılan Yeni Zelanda Cinsi Tavşan

2.1.2. Kuru Fasülye Örneklerinin Toplanması

2000 yılı Eylül ve Ekim ayları arasında Eskişehir' in dört ayrı semtinde kurulan halk pazarlarından temin edilen, Seyitgazi, Alpu, Sivrihisar ilçelerine ve Konya iline ait kuru fasülye örnekleri temiz naylon poşetler içinde laboratuvara getirilerek, hale yanıklığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' nın deteksiyonu için incelemeye alınmıştır.

2.1.3. Test Bakterileri

Çalışmamızda kullanılan test bakterileri ve alındıkları yerler Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bakteri strainleri

ORGANİZMA	STRAIN NO	KÖKENİ
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırk1	NCPPB 52	Kanada
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırk1	T 1516 A *	
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırk1	T 1355 A *	
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırk2	T 1599 A *	
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırk2	T 1817 A *	
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırk2	Q 1495 A *	
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırk3	T 1301 A *	Tanzanya
<i>P. s. pv. phaseolicola</i> ırk1	TPPB 4101 **	Türkiye
<i>P. s. pv. tomato</i>	TPPB 4212 **	Türkiye
<i>P. marginalis</i>	TPPB 4650 **	Türkiye
<i>P. cichorii</i>	TPPB 4061 **	Türkiye
<i>P. flourescens</i>	TPPB 4660 **	Türkiye
<i>P. s. pv. syringae</i>	TPPB 4250 **	Türkiye
<i>X.c. pv. phaseoli</i>	TPPB 5001 **	Türkiye
<i>Bacillus cereus</i>	***	
<i>Escherichia coli</i>	***	

* :East Anglia Üniversitesi Norwich/İngiltere (Dr. John Turner)

** :Ankara Ziraat Araştırma Merkezi (Kemal Benlioğlu)

*** :Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

2.1.4. Besiyerleri ve Tampon Çözeltiler

2.1.4.1. KING'S MEDIUM B:

Proteose pepton	20.0 gr
Gliserol.....	10.0 ml
K ₂ HPO ₄	1.5 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1.5 gr
Agar.....	15 gr
Distile su.....	1000 ml

pH=7.2'ye ayarlanmıştır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve daha sonra steril petrilere 15-20'şer ml olacak şekilde dağıtılmıştır [34].

2.1.4.2. NUTRIENT BROTH

Nutrient Broth.....	8gr
Distile su.....	1000ml

Tüplere dağıtıldıktan sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [35].

2.1.4.3. MİNİMAL MEDIUM

K ₂ HPO ₄	10.5 gr
KH ₂ PO ₄	4.5 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 gr
Sodyum sitrat-2H ₂ O.....	0.5 gr
MgSO ₄ -7H ₂ O.....	0.25 gr
Sukroz.....	2 gr
Agar.....	15 gr

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [36].

2.1.4.4. FOSFAT TAMPONLU TUZ (PBS) (0.01 M, pH 7.2)

NaCl.....8gr
 Na₂HPO₄.12H₂O.....2.7gr
 NaH₂PO₄.2H₂O.....0.4gr
 Distile su.....1000ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [37].

2.1.4.5. 0,01 M FOSFAT TAMPONLU TUZ (PBS) (pH 7.2)

NaCl.....8 gr
 Na₂HPO₄. 12H₂O.....2.7 gr
 NaH₂PO₄. 2H₂O.....0.4 gr
 Distile su.....1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [37].

2.1.4.6. 0.01 M FOSFAT TAMPONLU TUZ (PBS) (pH 7.4)

NaCl.....8 gr
 KH₂PO₄.....0.2 gr
 Na₂HPO₄. 12H₂O.....2.9 gr
 KCl.....0.2 gr
 Distile su.....1000 ml

121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [37].

2.1.4.7. 17.5 mM PO₄⁻ (pH 6.5)

Na₂HPO₄.....0.369 gr (160 ml için)

Na₂HPO₄. 2H₂O.....0.928 gr (340 ml için)

0.369 gr Na₂HPO₄ 160 ml distile su içinde ve 0.928 gr Na₂HPO₄. 2H₂O 340 ml distile su içinde çözündürülmüştür. Karışım distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [37].

2.1.4.8. 35 mM PO₄⁻ (pH 6.5)

Na₂HPO₄0.396 gr (160 ml için)

Na₂HPO₄. 2H₂O.....0.928 gr (340 ml için)

0.369 gr Na₂HPO₄ 160 ml distile su içinde ve 0.928 gr Na₂HPO₄. 2H₂O 340 ml distile su içinde çözündürülüp karıştırılır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [37].

2.1.4.9. 0.5 M PO₄ (pH 8.0)

Na₂HPO₄.....4.58 gr (64.6 ml için)

K₂HPO₄.....0.42 gr (6.22 ml için)

4.58 gr Na₂HPO₄ 64.6 ml distile su içinde ve 0.42 gr K₂HPO₄ 6.22 ml distile su içinde çözündürülüp karıştırılır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [37].

2.1.4.10 0.1 M KARBONAT-BİKARBONAT TAMPONU (pH 9.5)

NaHCO₃.....8.4 gr / 100 ml

Na₂CO₃.....5.3 gr / 100 ml

56.8 ml NaHCO₃ çözeltisi 14.4 ml Na₂CO₃ çözeltisi ile karıştırılır. Distile su ile 1000 ml' ye tamamlanır. 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [37].

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Antijenlerin Hazırlanması:

Tavşanlarda poliklonal antiserum üretimi için kullanılacak olan antijenler 3 farklı yöntemle hazırlanmıştır.

2.2.1.1. EPS (Exopolisakkarit) Ekstraksiyonu ile Antijen Hazırlanması:

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* NCPPB 52 (N52)' nin stok kültürü Tryptic Soya Broth' da 28° C' de bir gece çalkalamalı etüvde inkübe edilerek canlandırılmış ve daha sonra Anderson' a göre [36], 200 ml Minimal Medium (10.5 g K₂HPO₄, 4.5 g KH₂PO₄, 1 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g sodyum sitrat-2H₂O, 0.25 g MgSO₄-7H₂O, 2 g sukroz ve 15 g agar) içeren erlenlere aşılınmış 25°C'de 2 gün çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. 12.000 g' de 10°C'de 10 dakika santrifüjle elde edilen pelet 1M NaCl (100ml) içinde çözünmüş ve bu süspansiyon yavaşça çalkalanmıştır. Tekrar santrifüjden sonra, işlem 1 M NaCl ile ve sonra da 0.15 M NaCl ile tekrarlanmıştır. Süspansiyon çeşme suyuna ve distile suya karşı diyaliz edilmiş ve diyaliz ekstraktı rotary evaporator (Rotavapor R-3000 BUCHI Switzerland) ile (40°C, 4 saat) konsantre edilmiştir. Konsantre edilen bu ekstraktın üzerine 60 ml etanol eklenmiş ve 6 °C' de 12 saat bekletildikten sonra toplanan presipitat 10 dakika 10.000 g 'de santrifüjle pelet olarak elde edilmiştir. Pelet 50 ml distile suda çözülmüş ve bakteriyel hücre yüzeyinin EPS komponentleri antijen olarak kullanılmak üzere elde edilmiştir. Süspansiyon 0.5 ml' lik hacimler halinde steril Ependorf tüplerine konarak -20 °C' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

2.2.1.2. Glutaraldehit Fiksasyonu ile Antijen Hazırlanması:

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* NCPPB 52 'nin stok kültürü 10 ml Tryptic Soya Broth da 28 °C' de bir gece çalkalamalı etüvde inkübe edilerek canlandırılmış ve buradan tekrar 100 ml Tryptic Soya Broth besiyerine ekim

yapılmıştır. 28 °C' de çalkalamalı etüvde bir gecelik inkübasyondan sonra kültür 12.000 g' de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan pelet 0.01 M PBS (pH 7.2) ve 0.15 M NaCl tamponları içinde 3' er kez yıkanmış ve yıkanan bakteriler 10 ml 0.01 M PBS (pH 7.2) içinde çözündürülmüştür. Bakteri süspansiyonu, %2' lik glutaraldehite karşı 3 saat ve sonrasında da 0.01 M PBS (pH 7.2)' ye karşı +4 °C' de 20 saat süresince diyaliz edilmiş (Diyaliz tüp no Sigma D-9777) ve diyaliz tamponu sık sık değiştirilmiştir. Elde edilen süspansiyon 0.5 ml' lik hacimler halinde Ependorf tüplerine konmuş ve -20 °C' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir [38].

2.2.1.3. Toplam Hücre Antijenlerinin Hazırlanması:

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* irkl NCPPB 52 bakterisi stok kültüründen KB besiyerine ekim yapılmış ve saflığından emin olunan kültürden NB sıvı besiyerine pasajlanmıştır. Kültürler 120 rpm de 30 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Süspansiyondan 30 ml alınarak 15000 rpm, 4 °C sıcaklıkta 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak peletin üzerine 30 ml 0.01 M fosfat tamponlu tuz (PBS) (pH 7.2) eklenerek hücreler 2 kez yıkanmıştır. Süspansiyonun optik yoğunluğu, Benlioğlu ve Özakman' ın yöntemine [18] göre, PBS (pH=7.2) kullanılarak $A_{550}=0.63$ 'e ayarlanarak ml' de 10^9 bakteri içermesi sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyondan steril Ependorf tüplerine 0.7'şer ml konularak, enjeksiyona kadar -20 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir [18].

2.2.2. Ön Bağışıklık Testi

Her bir antijen için bir tavşan belirlenmiş ve tavşanın kulağındaki tüyler jiletle traşlanarak vazelin ile kulak kökünden ucuna doğru sıvazlamalar yapılarak kan toplanması sağlanmıştır. Temiz ve steril bir jiletle kulak toplardamarına küçük bir çizik yapılarak kanın akması sağlanmış ve yaklaşık 5 ml kan temiz bir beherde toplanmıştır. Kan, önce oda sıcaklığında 2-3 saat, daha sonra da +4 °C' de bir gece bekletilerek kırmızı kan hücreleri dibe çöktürülmüştür. Üstte toplanan

sıvı kısım (serum) 4.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildikten sonra steril Ependorf tüplerine alınmıştır.

Ön bağışıklık testi mikroaglutinasyon testi ile [37] yapılmış ve 96 çukurlu ELISA petrileri kullanılmıştır. Bir çukura 50 µl serum 50 µl antijen diğer bir çukura ise 50 µl serum ve 50 µl 0.01 M PBS (pH 7.2) konmuştur. Önce 27 °C' lik etüvde 2-3 saat, daha sonra +4 °C' de bir gece bekletilerek aglutinasyon olup olmadığı gözlenmiştir.

2.2.3. İmmünizasyon

Yukarıda belirtildiği gibi farklı şekillerde hazırlanan antijenlere spesifik olan antiserumlar, 3 aylık Yeni Zelanda cinsi beyaz dişi tavşanların immünizasyonu ile elde edilmiştir. Tavşanlarda EPS antiserumu için Wyatt [33], Glutaraldehit antiserumu üretimi için Allan ve Kelman [38] ve toplam hücre antijenlerine karşı üretilen antiserum için ise Schaad ve De Boer' in [39] yöntemleri kullanılmıştır. Antiserum üretimi için uygulanan enjeksiyon yolları ve miktarları sırasıyla Çizelge 2.2, Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4' te verilmiştir. Antiserum titresi test kanatmalarıyla 1/1024 ya da daha yüksek bulunduğunda antiserumun toplanması planlanmıştır.

Çizelge 2.2. EPS antiserumunun üretimi için uygulanmış olan enjeksiyon şeması:

GÜN	İŞLEM
0. gün	Ön kanatma
1. gün	I.Enjeksiyon (100 µl antijen + 2 ml Freund's incomplete adjuvant*) (Ense deri altı)
7. gün	II.Enjeksiyon (100 µl antijen + 2 ml Freund's incomplete adjuvant*) (Ense deri altı)
14. gün	III.Enjeksiyon (100 µl antijen + 2 ml Freund's complete adjuvant**) (Ense deri altı)
21. gün	IV.Enjeksiyon (100 µl antijen + 2 ml Freund's complete adjuvant**) (Bacak kas içi)
28. gün	V.Enjeksiyon (100 µl antijen + 2 ml Freund's complete adjuvant**) (Ense deri altı ve bacak kas içi)
32. gün	Titrasyon tayini için test kanatması
35. gün	VI.Enjeksiyon (300 µl antijen + 3 ml Freund's complete adjuvant**) (Ense deri altı)

* Freund's Incomplete Adjuvant Sigma F-5506

** Freund's Complete Adjuvant Sigma F-5881

Çizelge 2.3. Glutaraldehit Fiksasyonu Antiserumu Üretimi İçin Uygulanan Enjeksiyon Şeması

GÜN	İŞLEM
0. gün	Ön kanatma
1. gün	I.Enjeksiyon (1000 µl antijen + 1 ml Freund's incomplete adjuvant*) (Bacak kas içi)
7. gün	II.Enjeksiyon (1000 µl antijen + 1 ml Freund's incomplete adjuvant*) (Bacak kas içi)
14. gün	III.Enjeksiyon (1000 µl antijen + 1 ml Freund's incomplete adjuvant*) (Bacak kas içi)
21. gün	IV.Enjeksiyon (1000 µl antijen + 1 ml Freund's complete adjuvant**) (Bacak kas içi ve ense deri altı)
28. gün	Titrasyon tayini için test kanatması
35. gün	V.Enjeksiyon (2000 µl antijen + 2 ml Freund's complete adjuvant**) (Ense deri altı ve bacak kas içi)

*Freund's Incomplete Adjuvant Sigma F-5506

** Freund's Complete Adjuvant Sigma F-5881

Çizelge 2.4. Toplam Hücre Antijenleri antiserumunun üretimi için uygulanmış olan enjeksiyon şeması:

GÜN	İŞLEM
0. gün	Ön kanatma
1. gün	I.Enjeksiyon (1 ml 10^9 hücre/ml' lik bakteri süspansiyonu+ 1 ml Freund's complete adjuvant**) <p>(Ense deri altı)</p>
11. gün	II.Enjeksiyon (1 ml 10^9 hücre/ml' lik bakteri süspansiyonu + 1 ml Freund's complete adjuvant**) <p>(Ense deri altı)</p>
22. gün	III.Enjeksiyon (1 ml 10^9 hücre/ml' lik bakteri süspansiyonu + 1 ml Freund's complete adjuvant**) <p>(Ense deri altı ve bacak kas içi)</p>
39. gün	IV.Enjeksiyon (1 ml 10^9 hücre/ml' lik bakteri süspansiyonu + 1 ml Freund's incomplete adjuvant*) <p>(Ense deri altı ve bacak kas içi)</p>
53. gün	Test kanatması
55. gün	Kanatma

*Freund's Incomplete Adjuvant Sigma F-5506

** Freund's Complete Adjuvant Sigma F-5881

2.2.4 Antiserumun Ayrılması ve Saklanması

Her 3 antiserum için de aynı yöntem kullanılarak kan alınmıştır. İntrakardiyak yöntemi uygulanarak tavşanın kalbine enjektörle girilmiş ve çekilebilen tüm kan alınmıştır. Tavşan kanı steril bir cam beher içinde toplanmış ve önce oda sıcaklığında 2-3 saat, daha sonra da + 4 °C' de bir gece bekletilmiştir. Serum kısmını kırmızı kan hücrelerinden ayırmak için 4.000 rpm' de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üstte kalan berrak kısım steril Ependorf tüplerine alınarak hiçbir koruyucu madde ilave edilmeden -20 °C' de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2.5. Antiserum Titresinin Tayini

Antiserum titresinin tayini mikroaglutinasyon testi ile 96 çukurlu mikrotitrasyon petrilerinde yapılmıştır.

Yukarıda belirtildiği şekilde elde edilen antiserumdan PBS (pH 7.2) ½' lik seyreltmeler yapılmış ve ½' den 1/1024' e kadar dilüsyonlar elde edilmiştir. Antiserum üretimi için kullanılan standart antijen süspansiyonundan 50' şer µl, mikrotitrasyon petrisindeki 12 çukura konmuştur. Üzerine antiserum dilüsyonlarının her birinden 50 µl ilave edilerek karıştırılmıştır. Son çukura PBS konarak negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Önce 27 °C' de etüvde 2-3 saat, daha sonra +4 °C' de bir gece bekletilerek aglutinasyonun gözlemlendiği son çukurdaki seyreltme antiserumun titresini olarak kaydedilmiştir.

2.2.6. Immünoglobulin (Ig) G Fraksiyonunun Saflaştırılması

Antiserumun IgG kısmının saflaştırılması işlemi Tijssen' e [40] göre 2 aşamada gerçekleştirilmiştir.

2.2.6.1. DEAE-Sephacel Kolon Uygulaması

Safılaştırılacak 1 ml antiserum için 2.5 ml DEAE-Sephacel kaidesinden bir kolon hazırlanmıştır. Kullanılacak olan DEAE-Sephacel öncelikle 175 mM PO_4^- (pH 6.5) ile daha sonra da 17.5 mM PO_4^- (pH 6.5) tamponları ile bir beher içinde 2-3 kez yıkanmıştır. Antiserum, eşit hacimde 35 mM PO_4^- tamponu içinde seyreltilmiştir. Kolon hazırlanırken 5 ml hacimli bir şırınganın iç tabanına, tüp çapında kesilmiş, filtre (cam kağıdı) yerleştirilmiştir. 1ml antiserum için 2.5 ml olarak hesaplanan DEAE-Sephacel tüp içine doldurulmuş ve kolonun üst yüzeyi üzerine yine tüp çapında kesilmiş bir filtre (cam kağıdı) yerleştirilmiştir. Kolon üzerine 2-3 kez 2' şer ml 17.5 mM PO_4^- (pH 6.5) tamponu eklenmiş ve kolondan süzülen tamponun pH' ı pH metre kağıdı ile kontrol edilmiştir. Süzülen kısmın pH' ı stok tamponun pH' ı ile aynı olduğu zaman antiserum kolona aktarılmıştır. Antiserum kolona konduktan sonra süzülen her 2 ml' lik fraksiyon sırasıyla 12. tüpe kadar tüpler içinde toplanmaya başlanmıştır. Bu arada kolona 2' şer ml' lik 17.5 mM PO_4^- (pH 6.5) tamponundan eklenmeye devam edilmiştir. Tüplerdeki fraksiyonlar A_{278} nm' de kuartz küvetlerde okunmuştur. Kör olarak 17.5 mM PO_4^- (pH 6.5) tamponu kullanılmıştır. Okunması yapılan fraksiyonlar alındıkları tüpe geri konmuştur. Tüm fraksiyonların okunması bittikten sonra A_{278} nm' deki absorbans değeri 0.2' den büyük olanlar tek bir tüp içinde toplanarak birleştirilmiştir. Defalarca değiştirilen 0.5 M PO_4^- (pH 8) tamponuna karşı +4 °C' de 1 gece diyaliz edilmiştir.

2.2.6.2. Amonyum Sülfat Presipitasyonu

Diyalizden sonra protein solüsyonunun hacmi ölçülerek %18 ağırlık/hacim (w/v) oramında amonyum sülfat (Na_2SO_4) çok hafif bir şekilde çalkalanmakta olan solüsyona küçük miktarlar halinde 1 saat süresi içinde eklenmiştir. Bulanık hale gelmiş olan protein solüsyonu 8.000 rpm' de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pelet kısmı orijinal protein solüsyonunun %40' ı miktardaki 0.5 M PO_4^- (pH 8.0) tamponu içinde

çözündürülmüştür. Amonyum sülfat %12 (w/v) oranında azar azar solüsyona tekrar eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakikalık bir inkübasyondan sonra bulanık haldeki süspansiyon 8.000 rpm' de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek, pelet orijinal protein solüsyonunun 1/10' u hacmindeki 0.1 M Karbonat-bikarbonat (pH 9.5) tamponu içinde çözündürülmüştür. Solüsyonun protein konsantrasyonu Bradford yöntemiyle [41] belirlenmiştir.

2.2.7. IgG Preparasyonunun FITC (Fluoresein izotiyosiyanat) ile Konjugasyonu

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*' ya karşı üretilmiş olan 3 farklı antiserumun saflaştırma işleminden sonra FITC ile konjuge edilmesi Allan ve Kelman' ın yönteminde [38] bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. IgG solüsyonlarının protein içeriği 0.1 M Karbonat-bikarbonat (pH 9.5) tamponu eklenmesiyle 10 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. 0.1 M Karbonat-bikarbonat (pH 9.5) tamponu içinde ml' de 2 mg olacak şekilde FITC standart solüsyonu hazırlanmıştır. FITC solüsyonu 1/10' luk oranda çok yavaş bir şekilde çalkalanmakta olan IgG solüsyonuna 5µl' lik hacimler halinde eklenmiştir. FITC içeren IgG solüsyonunun pH' sı 0.1 N NaOH ilavesiyle pH 9.5' a getirilmiş ve reaksiyon tüpleri ışık geçirmeyen bir kutuda oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir.

2.2.8. Konjugasyon İşleminde Sonra Bağlanmamış FITC' nin Uzaklaştırılması

FITC ile konjugasyondan sonra bağlanmayan FITC' nin uzaklaştırılması için Chantler ve Mc Illmurray' ın yöntemi [42] küçük değişikliklerle uygulanmıştır. Bunun için konjugat süspansiyonu defalarca değiştirilen 0.01 M PBS (pH 7.4) tamponuna karşı +4 °C' de 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Daha sonra partikül halindeki materyallerin uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla diyalizat 3000 rpm' de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

2.2.9. Konjugasyonun Değerlendirilmesi ve IgG-FITC Konjugatlarının Saklanması

Konjugasyon işleminin başarılı olup olmadığı, Chantler' de [42] tanımlandığı gibi, diyalizden sonra konjugatın optik yoğunluğunun 280 nm ve 495 nm' de ölçümüyle belirlenmiştir. Konjugatın A_{495}/A_{280} oranı değerinin 0.6 ve 0.9 arasında olması optimum konjugasyon değeri olarak belirlenmiştir. Bu nitelikteki konjugatlar (FITC-As) 25 μ l' lik hacimler halinde temiz Ependorf tüpleri içine konarak ve hiçbir koruyucu ilavesi yapılmadan -20 °C' de muhafaza edilmişlerdir.

2.2.10. Kuru Fasülye Örneklerinin Un Haline Getirilmesi

Fasülye örnekleri 2 mm gözenek çaplı bitki öğütme değirmeninde (Uslu) öğütülerek un haline getirilmiş ve fasülye unları temiz naylon poşetler içinde $+4$ °C' de muhafaza edilmiştir.

2.2.11. Un Haline Getirilmiş Fasülye Örneklerinin IF Hücre boyama ve IF Koloni Boyama için Hazırlanması

Fasülye unundan 100 gr tartılarak üzerine 400 ml distile su eklenmiş ve $+4$ °C' de 6 saat bekletilmiştir. Sıvı kısım IF hücre boyama ve IF koloni boyama yöntemleri ile incelenmiştir.

2.2.12. Immunofloresan (IF) Hücre Boyama

Van Vuurde ve Van Den Bovenkamp' ın yöntemine [26] göre, Tryptic soya agar da geliştirilen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* N52 ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 bakterileri 0,05 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile 10^8 - 10^9 hücre/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* N52'nin saf kültürü ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 ile 1:5, 1:6, 1:8, 1:10, 1:100 ve 1:1000

oranında karışık süspansiyonlar hazırlanmıştır. Temiz bir lam etanolle silindikten sonra üzerine 6 mm çaplı daireler çizilmiş ve hazırlanmış olan saf ve karışık kültürlerden 30 µl bu dairelerin içine konup süspansiyon havada kurutulmuştur. Alevle fiksasyondan sonra preparat 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.2) ile 3 dakika yıkanmış fazla sıvının emilmesinden sonra 1:10 ve 1:100 oranlarında 0.01 M PBS (pH 7.4) içinde seyreltilmiş olan FITC-As dan 30 µl eklenerek 28 °C' de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Bağlanmayan FITC-As yıkanarak uzaklaştırılmış ve floresan mikroskopta (Olympus BX 50F) 40X lık objektifte incelenmiştir.

2.2.13. İmmunofloresan Koloni Boyama (IFC)

Van Vuurde' un yöntemi [43] bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. 4 ml KB besiyeri, küçük şişelerde otoklavlanmıştır. Daha sonra, 45 °C' lik su banyosunda tutularak besiyerinin sıvı halde kalması sağlanmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* N52'nin saf kültürü ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* TPPB 5001 ile 1:5, 1:6, 1:8, 1:10 oranlarındaki karışık kültürlerinin dilüsyon serilerinden 1' er ml, erimiş haldeki (~45-50 °C) 4 ml KB besiyeri ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Bu karışım 5 cm çapındaki steril petrilere boşaltılmış ve homojen bir dağılım sağlanmıştır. Topluğne başı büyüklüğünde koloniler oluşuncaya kadar petrilere 28 °C' de 2 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

10^3 - 10^4 koloni içeren petrilere seçilmiş ve 40 °C' lik sıcak hava agar yüzeyine 6-8 saat boyunca üflenerek bu petrilereki agarın ince bir film tabakası haline gelmesi sağlanmıştır. Kolonileri içeren kurutulmuş agar filmi + 4 °C' de silika jelli bir kutuda boyama yapıncaya dek muhafaza edilmiştir.

FITC ile konjuge edilmiş olan antiserumlardan 25µl 0.01 M PBS (pH 7.4) tamponu içinde 10 kez (1:10) ve 100 kez (1:100) seyreltilmiş ve kurutulmuş agar filmi yüzeyine dökülmüştür. Işık geçirmeyen bir kutuda bir gecelik inkübasyondan sonra bağlanmamış konjugatın uzaklaştırılması için 0.01 M PBS (pH 7.4) ile 5 dakikalık bir yıkama işlemi uygulanmıştır. Bundan sonra agar filmi floresan mikroskopta (Olympus BX 50F) 4X lük ve 10X luk objektifler kullanılarak incelenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Ön Bağışıklık Testi Sonuçları

Ön bağışıklık testi için ilk kanatma kulak veninden yapılmıştır. Bir gün +4 °C' de bekletilen üç tavşana ait serumların hiçbirinin aglütinasyon oluşturmadığı gözlenmiştir. Bu sonuç, tavşanların *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' ya karşı bir ön bağışıklıklarının olmadığını göstermiştir. Bu nedenle tavşanlarda immünizasyon işlemine başlanmıştır.

3.2. Titrasyon Tayini Sonuçları

96 çukurlu mikrotitrasyon petrilinde yapılan titrasyon tayini sonuçlarına göre EPS ekstraksiyonu ile hazırlanmış olan antijene karşı üretilmiş olan antiserumun titresi 1/1024, Glutaraldehit fiksasyonu ile hazırlanmış antijene spesifik antiserumun 1/1024, Toplam Hücre antijenlerine spesifik antiserumun titresi ise 1/512 olarak tespit edilmiştir.

3.3. Antiserum Spesifikliğin Tayini

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* için üretilen antiserumların spesifikliği test edildiğinde üretilmiş olan antiserumların *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* dışındaki diğer bakterilerle reaksiyon vermediği gözlenmiştir. Bu durum her üç antiserumun da bakteriye oldukça spesifik olduğunu göstermektedir. Çizelge 3.1 EPS-Antiserumun, Çizelge 3.2 Glutaraldehit fiksasyonlu-Antiserumun ve Çizelge 3.3 toplam hücre antijenlerine karşı üretilmiş antiserumun spesifikliğini göstermektedir.

Çizelge 3.1. *P. s. pv. phaseolicola* NCPPB 52 (N52) bakterisine karşı üretilen EPS antiserumunun spesifikliğı

Organizma	Poliklonal IgG			
	Seyreltilmemiş	1:10	1:100	PBS
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> NCPPB 52	++	++	++	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> TPPB 4101	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1516	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1817	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> Q 1495	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1301	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1599	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1355	++	+	+	-
<i>P.s.pv.syringae</i> TPPB 4250	-	-	-	-
<i>P.marginalis</i> TPPB 4650	-	-	-	-
<i>P.cichorii</i> TPPB 4061	-	-	-	-
<i>P.flourescens</i> TPPB 4660	-	-	-	-
<i>P.s.pv.tomato</i> TPPB 4212	-	-	-	-
<i>Xanthomonas.campestris.pv.phaseoli</i> TPPB 5001	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-

++: Çok kuvvetli pozitif

+: Pozitif

-: Negatif

Çizelge 3.2. *P. s. pv. phaseolicola* NCPPB 52 (N52)' nin glutaraldehitte fikse edilmiş hücrelerine karşı üretilen Glutaraldehit antiserumunun spesifikliği

Organizma	Poliklonal IgG			PBS
	Seyreltilmemiş	1:10	1:100	
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> NCPPB 52	++	++	++	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> TPPB 4101	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1516	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1817	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> Q 1495	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1301	+	+	-	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1599	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1355	++	+	+	-
<i>P.s.pv.syringae</i> TPPB 4250	-	-	-	-
<i>P.marginalis</i> TPPB 4650	-	-	-	-
<i>P.cichorii</i> TPPB 4061	-	-	-	-
<i>P.flourescens</i> TPPB 4660	-	-	-	-
<i>P.s.pv.tomato</i> TPPB 4212	-	-	-	-
<i>Xanthomonas.campestris.pv.phaseoli</i> TPPB 5001	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-

++: Çok kuvvetli pozitif

+: Pozitif

-: Negatif

Çizelge 3.3. *P. s. pv. phaseolicola* NCPPB 52 (N52) bakterisine karşı üretilen toplam hücre antiserumunun spesifikliği

Organizma	Poliklonal IgG			PBS
	Seyreltilmemiş	1:10	1:100	
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> NCPPB 52	++	++	++	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> TPPB 4101	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1516	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1817	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> Q 1495	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1301	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1599	++	+	+	-
<i>P.s.pv.phaseolicola</i> T 1355	++	+	+	-
<i>P.s.pv.syringae</i> TPPB 4250	-	-	-	-
<i>P.marginalis</i> TPPB 4650	-	-	-	-
<i>P.cichorii</i> TPPB 4061	-	-	-	-
<i>P.flourescens</i> TPPB 4660	-	-	-	-
<i>P.s.pv.tomato</i> TPPB 4212	-	-	-	-
<i>Xanthomonas.campestris.pv.phaseoli</i> TPPB 5001	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-

++: Çok kuvvetli pozitif

+: Pozitif

-: Negatif

3.4. DEAE-Sephacel Kolon Uygulaması

Antiserumlar kolona konup süzülen fraksiyonlar 2' şer ml' lik hacimler halinde spektrofotometrede okutulduklarında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir:

EPS Ekstraksiyonu ile Hazırlanmış Antijenlere Spesifik Antiserumun DEAE-Sephacel Kolon dan süzülmesi işlemi sırasında okunan absorbans değerleri:

<u>Fraksiyon No:</u>	<u>A₂₇₈' de Okunan Değeri</u>	
1	0,676	} 0.2' den büyük olanlar toplanmıştır
2	1.214	
3	0.711	
4	0.219	
5	0.200	
6	0.198	
7	0.120	
8	0.080	
9	0.045	
10	0.012	

Glutaraldehit Fiksasyonu ile Hazırlanmış Spesifik Antiserumun DEAE-Sephacel Kolon dan süzülmesi işlemi sırasında okunan absorbans değerleri:

<u>Fraksiyon No:</u>	<u>A₂₇₈' de Okunan Değeri</u>
1	0.303
2	1.472
3	1.992
4	0.820
5	0.457
6	0.384
7	0.306
8	0.298
9	0.360
10	0.221
11	0.181
12	0.144

0.2' den büyük olanlar toplanmıştır

Toplam Hücre Antijenlerine Spesifik Antiserumun DEAE-Sephacel Kolon dan süzülmesi işlemi sırasında okunan absorbans değerleri:

<u>Fraksiyon No:</u>	<u>A₂₇₈' de Okunan Değeri</u>
1	0.012
2	0.305
3	0.237
4	0.225
5	0.203
6	0.178
7	0.152
8	0.094
9	0.082

0.2' den büyük olanlar toplanmıştır

3.5. FITC-As Konjugasyonlarının Değerlendirilmesi

Diyaliz işleminden sonra her üç antiserumun FITC konjugatlarının optik yoğunlukları A_{278} ve A_{495} nm' de okunarak A_{495}/A_{278} oranları belirlenmiştir. Buna göre aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

EPS ekstraksiyonu ile hazırlanmış antijenlere spesifik antiserumun FITC konjugatı A_{495}/A_{278} oranı 0.9 olarak bulunmuştur.

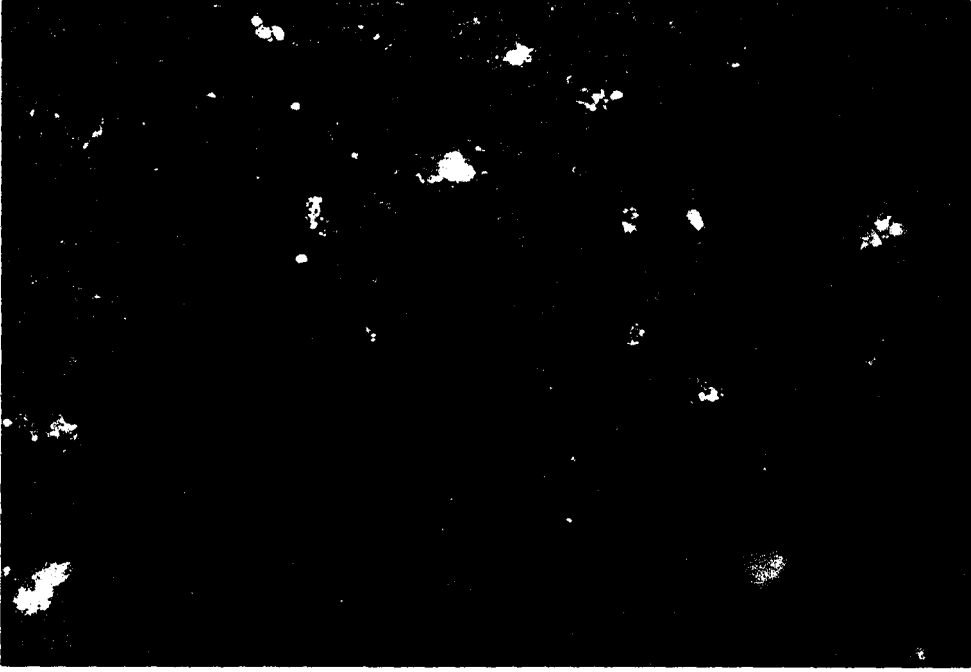
Glutaraldehit fiksasyonu ile hazırlanmış antijenlere spesifik antiserumun FITC konjugatı A_{495}/A_{278} oranı 0.71 olarak bulunmuştur.

Toplam Hücre antijenlerine spesifik antiserumun FITC konjugatı A_{495}/A_{278} oranı 0.635 olarak bulunmuştur.

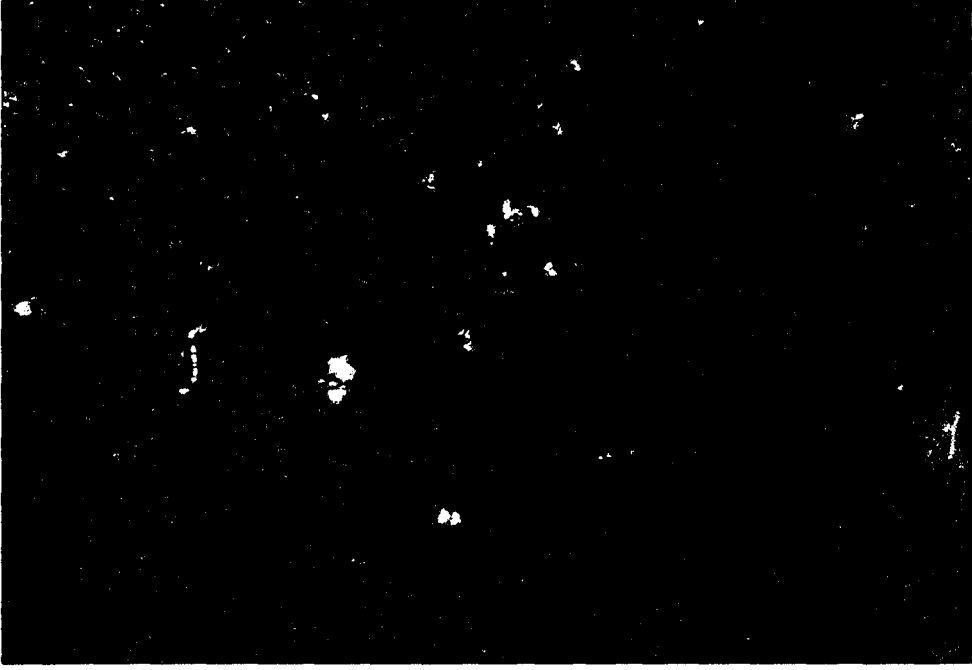
Elde edilen bu sonuçlar optimum konjugasyon değeri olarak belirlenen 0.6 ve 0.9 değerleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle konjugatların IF mikroskopi ve IF koloni boyama çalışmaları açısından kullanılabilir durumda olduğu belirlenmiştir.

3.6. IF Hücre Boyama

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* NCPPB 52'ye spesifik olarak üretilmiş antiserumların her birinin IgG fraksiyonlarının FITC ile hazırlanan konjugatı (FITC-As) floresan mikroskopta bakteri kültüründen hazırlanmış çeşitli seyreltmelerdeki örneklerle inkübe edilmiştir. Floresan ışımının saptanması antiserum-FITC konjugatının optimum bağlandığını ve bu konjugattan bakteri deteksiyonu amacıyla yararlanılabileceğini göstermiştir. Yapılan deneylerde PBS pH 7.4 ile 1:10 oranında seyreltilmiş FITC-As' nın 1:100 oranında seyreltilmiş FITC-As' a göre direkt IF yönteminde daha iyi floresan ışımaya verdiği gözlenmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NCPPB 52 çubuk şeklinde bir bakteridir, genellikle tek ya da çift nadiren zincir şeklinde görülür. FITC etiketli EPS, Glutaraldehit ve Toplam Hücre antikorları ile reaksiyona giren bakteriler floresan mikroskopta koyu zemin üzerinde floresan yeşili renk vermiştir (Şekil 3.1., Şekil 3.2., Şekil 3.3.)



Şekil 3.1. EPS ekstraksiyonuyla elde edilmiş antiserumun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek koyu zemin üzerinde floresan yeşil renk veren hedef bakteriler (Saf kültürde)



3.2. Glutaraldehyt fiksasyonu ile elde edilmiş antiserumun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek koyu zemin üzerinde floresan yeşil renk veren hedef bakteriler



3.3. Toplam Hücre Antiserumunun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek koyu zemin üzerinde floresan yeşil renk veren hedef bakteriler

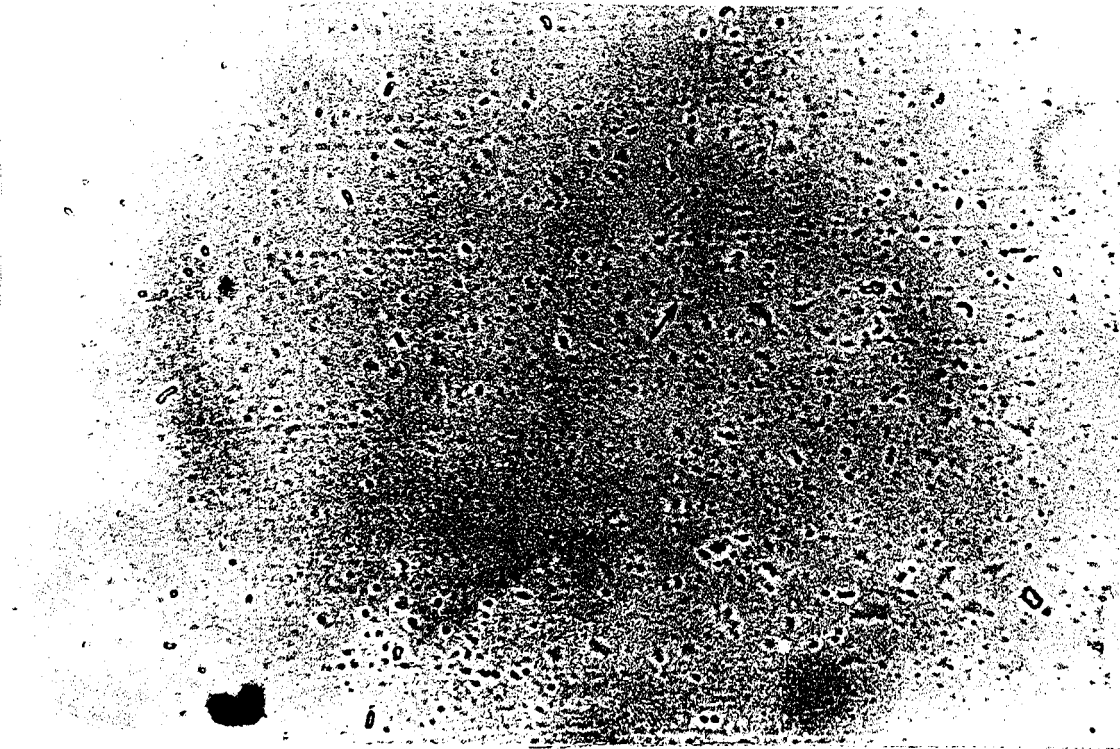
Karışık kültürde ise *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* bakterisine ait hücreler FITC-As' ları ile reaksiyona girmediğinden ışığa göstermemiştir. Bu nedenle karışık kültürle hazırlanmış preparatlarda floresan mikroskopta görülen ışığa veren bakteriler *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* olarak ayırt edilmiştir.

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* bakterisine karşı üretilmiş üç farklı antiserumun *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' nın *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ile 1:5, 1:6, 1:8, 1:10, 1:100 ve 1:1000 oranında hazırlanmış karışık kültürlerinin IF hücre boyama yöntemi için hassasiyetleri Çizelge 3.4' te gösterilmektedir. Çizelgeden de anlaşılacağı gibi her üç antiserum da 1:1000 oranındaki karışık kültürlerde bile hedef bakteriye ait hücreleri detekte edebilmiştir. Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.' te 1:100 oranındaki karışık

kültürde EPS ekstraksiyonuyla elde edilmiş spesifik antiserumun FITC konjugatının hedef bakteriyi detekte edebildiği görülmektedir. Karışık kültürün floresan mikroskoptaki görüntüsünde parlak ışımaya veren hedef bakteriler, ışık mikroskobu görüntüsünde ise hedef bakteri hücreleri ile *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* 'ye ait floresan mikroskopta ışımaya vermeyen hücreler görülmektedir.



Şekil.3.4. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* N52 ile *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* 'nin 1:100 oranındaki karışık kültürünün floresan mikroskopta görüntüsü (40X objektif). (Okla gösterilen hücre FITC-As (EPS) ile boyanmış tipik bir *P.s.* pv. *phaseolicola* N52 hücresidir.)



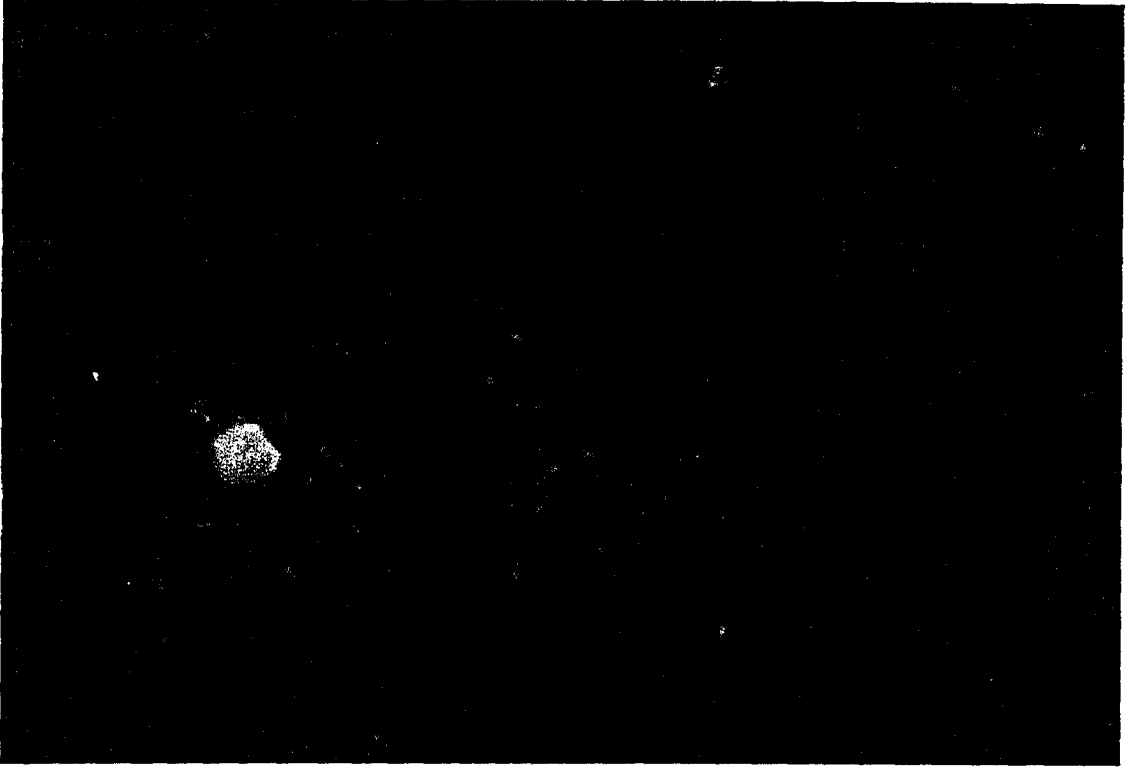
Şekil 3.5. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* N52 ile *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* 'nin 1:100 oranındaki karışık kültürünün ışık mikroskobundaki görüntüsü (40X objektif). (Okla gösterilen hücre Şekil de gösterilmiş olan FITC-As (EPS) ile boyanmış hücredir.)

Çizelge 3.4. Üç Farklı Antiserumun IF Hücre Boyama Yönteminde Karışık Kültürlerdeki Hedef Bakteriye Ait Hücreleri Detekte Edebilme Gücü

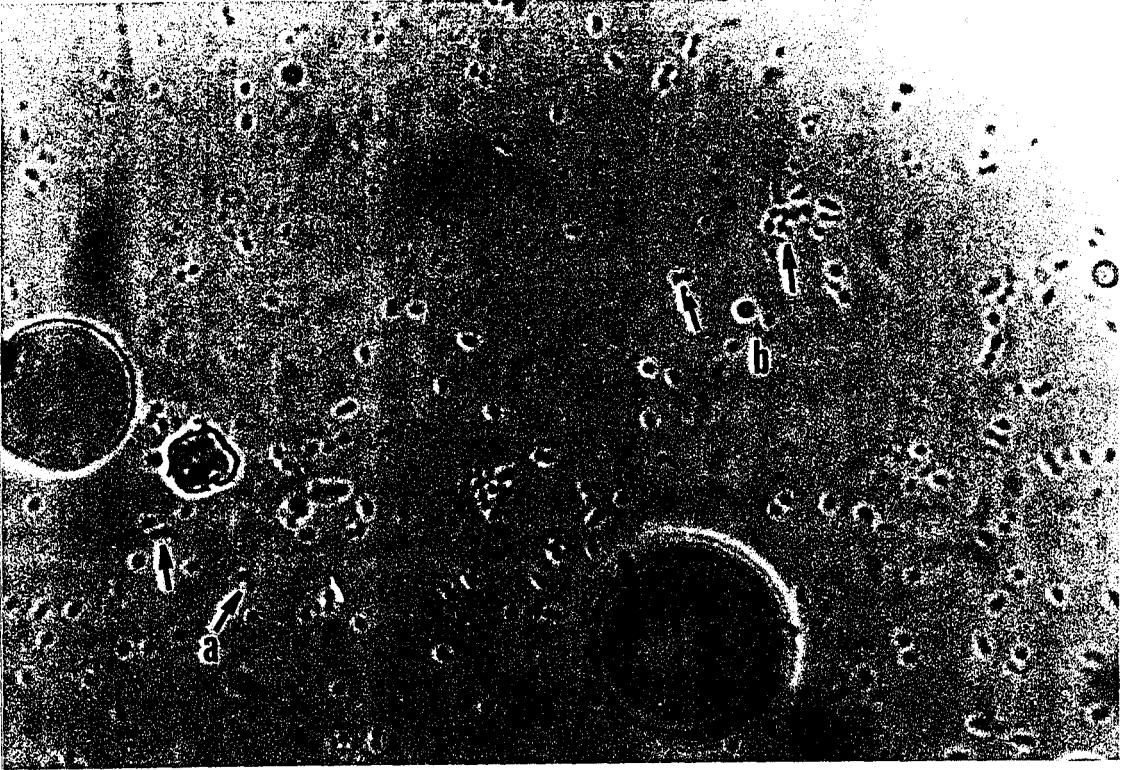
Karışık Kültürün Oranı (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> / <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>)	IF Hücre Boyamada Kullanılan Antiserum		
	EPS	Glutaraldehit	Toplam Hücre
1:5	+	+	+
1:6	+	+	+
1:8	+	+	+
1:10	+	+	+
1:100	+	+	+
1:1000	+	+	+

+ = Hedef bakteri deteksiyonundaki başarı durumu

IF hücre boyama yöntemi, un haline getirilmiş fasülye örneklerine uygulandığında spesifik FITC-As ile reaksiyona giren hedef bakteriler verdikleri floresan ışığa ile tespit edilebilmişlerdir (Şekil 3.6. ve Şekil 3.7.). Un haline getirilmiş fasülye örneklerinde 100 mikroskop alanında floresan ışığa veren hücrelerin sayısı Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6' da gösterilmektedir.



Şekil 3.6. Fasülye unu örneklerinden yapılan IF hücre boyama ile hedef bakterilerin floresan mikroskopta verdikleri ışıma (Toplam Hücre Antiserumunun FITC konjugatı ile) (Okla gösterilen hücreler) a: Hedef bakteriler b: Hedef olmayan ve ışıma vermeyen bakteriler



Şekil 3.7. Şekil 3.6.' da görülen alanın ışık mikroskobundaki görüntüsü (Okla gösterilen hücreler hedef bakteriye ait olan ve Şekil 3.6.' da verdikleri floresan ışıma ile diğerlerinden ayrılan hücrelerdir)

a: Hedef bakteriler b: Hedef olmayan ve ışıma vermeyen bakteriler

Çizelge 3.5. Fasülye Unu Örneklerinde, IF mikroskopi yöntemiyle, 100 mikroskop alanında 3 farklı antiserumla tespit edilen ortalama *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* sayıları (n/100)

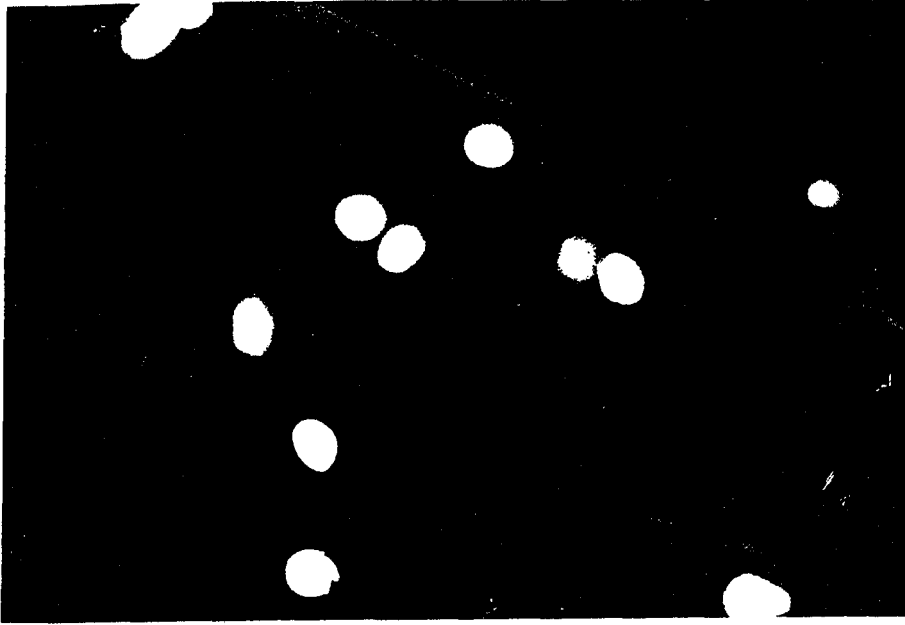
Örneğin Ait Olduğu Bölge	Toplam Hücre Antiserumu	Glutaraldehit	EPS
Sivrihisar Kaymaz I	64	57	73
Sivrihisar Kaymaz II	>100	71	>100
Seyitgazi I	12	9	21
Seyitgazi II	>100	>100	>100
Alpu I	2	0	0
Konya I	78	50	64
Konya II	36	23	45
Alpu II (Ağapınar Köyü)	29	19	44
Sivrihisar Kaymaz III	54	37	65
Seyitgazi III	67	72	90
Konya III	>100	>100	>100

Çizelge 3.6. Fasülye Unu Örneklerinde 3 farklı antiserumla tespit edilen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* sayıları (hücre/g)

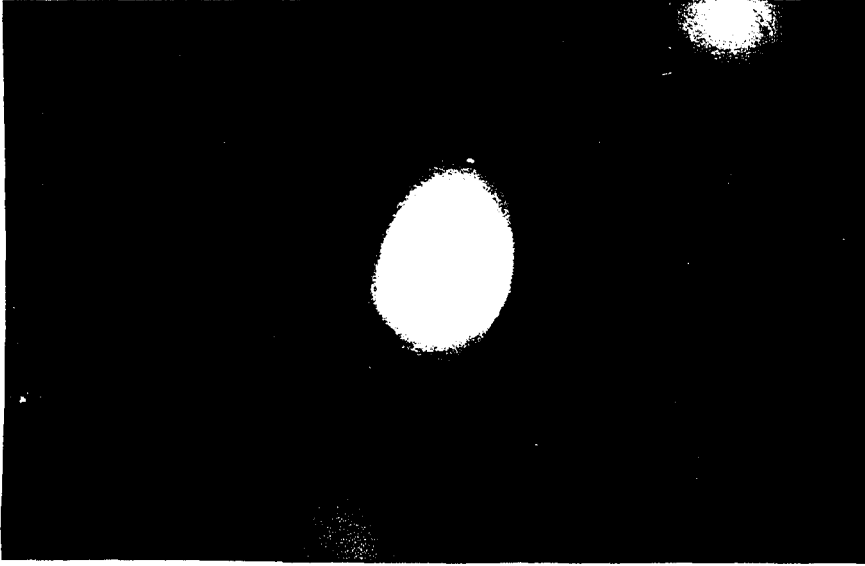
Örneğin Ait Olduğu Bölge	Toplam Hücre Antiserumu	Glutaraldehit	EPS
Sivrihisar Kaymaz I	8532	7600	9732
Sivrihisar Kaymaz II	>13332	9466	>13332
Seyitgazi I	1600	1200	2800
Seyitgazi II	>13332	>13332	>13332
Alpu I	266	0	0
Konya I	10400	6666	8532
Konya II	4800	3066	6000
Alpu II (Ağapınar Köyü)	3866	2532	5866
Sivrihisar Kaymaz III	7200	4932	8666
Seyitgazi III	8932	9600	12000
Konya III	>13332	>13332	>13332

3.7. IF Koloni Boyama

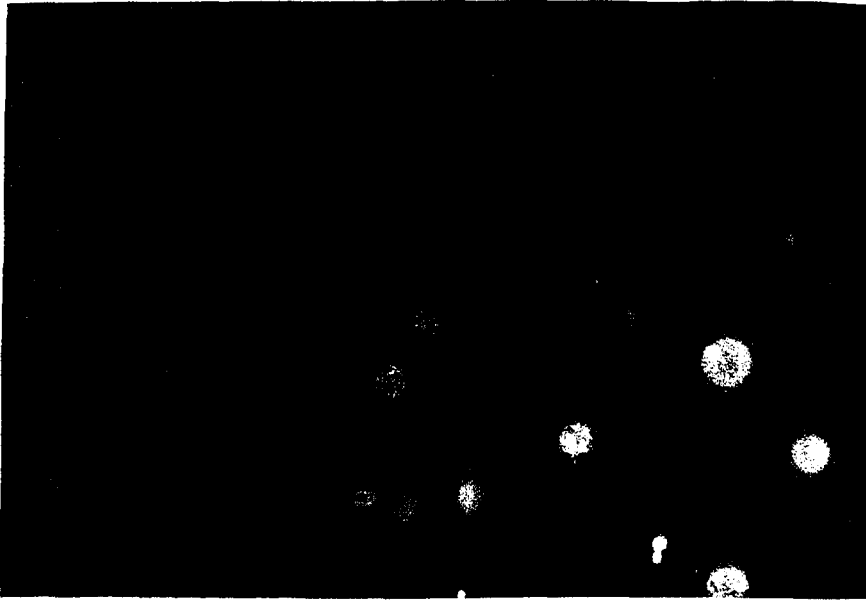
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*' nin saf kültürü ile yapılan çalışmalarda, kurutulmuş agar filminde bulunan, bakteriye ait kolonilerin her  antiserumun FITC konjugatlarıyla reaksiyona girerek floresan mikroskopta parlak ışımaya verdiği tespit edilmiştir (şekil 3.8., şekil 3.9. ve şekil 3.10.) Antiserumların 1:10 oranındaki seyreltmeleri 1:100 oranlı seyreltmelerine göre daha iyi bir ışımaya gözlenebilmesini sağlamıştır.



şekil 3.8. EPS ekstraksiyonuyla elde edilmiş antiserumun FITC konjugatı ile reaksiyona girerek ışımaya veren hedef bakteri kolonileri



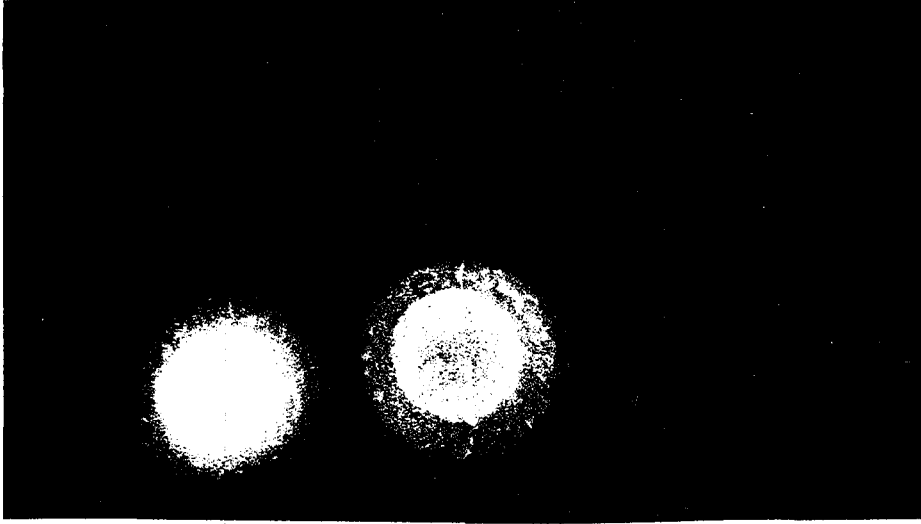
Şekil 3.9. Glutaraldehit fiksasyonu ile elde edilmiş antiserumun FITC konjufatı ile reaksiyona girerek ışına veren hedef bakteri kolonileri



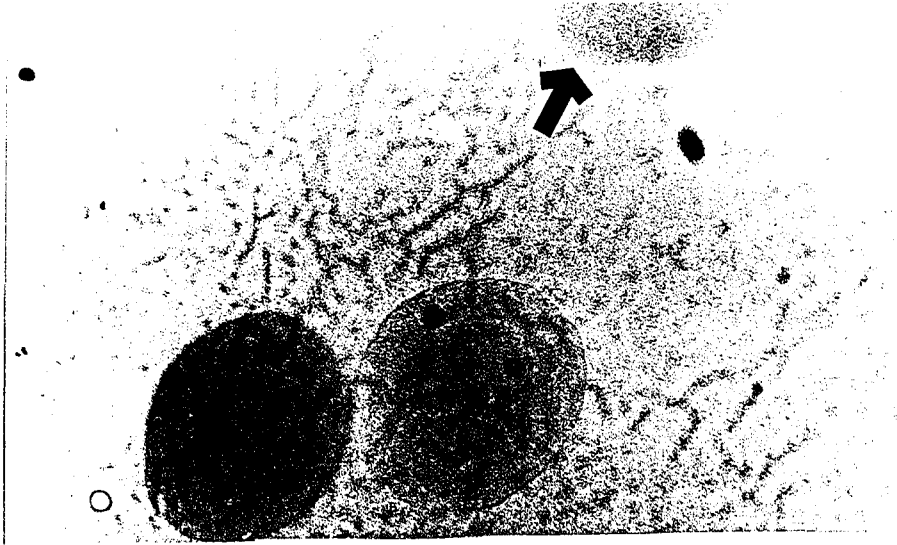
Şekil 3.10 Toplam hücre antiserumunun FITC konjufatı ile reaksiyona girerek ışına veren hedef bakteri kolonileri

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* ile *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*' nin 1:5, 1:6, 1:8 ve 1:10 oranlarındaki karışık süspansiyonlarının dilüsyon serilerinden yapılan çalışmalar da göstermiştir ki her üç antiserumun FITC konjufatı da sadece *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* kolonileri ile

reaksiyona girerek floresan ışıma vermiştir (Şekil. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*' ye ait koloniler ise floresan ışıma vermemiştir. Her üç antiserum 1:10 oranındaki karışık süspansiyonlarda dahi hedef bakteri kolonileriyle reaksiyona girerek bu kolonilerin deteksiyonunu sağlayabilmişlerdir (Şekil 3.11. ve Şekil 3.12.).



Şekil 3.11. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ile *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*' nin 1:5 oranındaki karışık kültürüne Toplam Hücre antiserumunun FITC konjugatı ile uygulanan IF koloni boyama sonucu ışıma veren hedef bakteriye ait koloniler (Floresan mikroskoftaki görünüm)



Şekil 3.12. Şekil 3.11.' de görülmekte olan sahanın ışık mikroskobu görüntüsü (Okla belirtilen koloni ışıma vermeyen *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*' ye ait bir kolonidir)

Un haline getirilmiş fasülye örnekleri ile yapılan IF koloni boyama çalışmalarında hedef bakteriye ait koloniler verdikleri floresan ışımaya ile tespit edilebilmişlerdir. Ancak örnek içerisindeki partiküller deteksiyonu zorlaştırmıştır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enfekte / kontamine olmuş tohumlar tüm dünya çapında ana besinlerin ve ekinlerin önemli fitobakteriyel hastalıklarının çoğunun öncül inokulumunun ana kaynağıdır. Bu nedenle; üretim, test etme ve patojen içermeyen tohum ve materyallerin ekimi dünyanın birçok bölgesinde, önemli bakteriyel hastalıkların kontrolünde son derece önemli bir esastır. Bu özellikle ekonomik kaynakların alternatif kontrol ölçülerinin sınırlı olduğu az gelişmiş ülkelerde daha da çok önem taşımaktadır. Enfekte tohumlar ya da çoğalma yeteneğindeki materyaller fitobakteriyel hastalıkların lokal ya da uzun mesafeli yayılımında ana faktörlerdir. Birçok ilgili kuruluş ve gruplar patojen içermeyen tohum sertifikasyonunu yapar. Bu sertifikasyon programlarının çoğu temelde ilkindir ve birkaç istisna dışında, bakteriyel hastalıkların deteksiyonu için gelişmekte olan ekinlerin görsel arazi teftişlerinin yapılmasına dayalıdır. Enfeksiyon belirtisi göstermeyen ekinlerin patojen içermediği öngörülür ve hasat edilen tohumlarla propagatif materyal “temiz” olarak değerlendirilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki bazı bakteriyel patojenler toleranlı konukçuların tohumlarıyla taşınabilmekte ve semptomsuz bitkilerden hasat edilmiş tohumlarda da bulunabilmektedirler. Bu da sadece görsel teftişlere dayalı sertifikasyon programlarının tam etkili olmadığını göstermektedir [44].

Herhangi bir ekin için özel konukçu / bitki patojeni bakteri kombinasyonu açısından bitki materyalindeki inokulumun deteksiyonu ile ilgili birçok teknik yayımlanmıştır. Ne yazık ki, farklı laboratuvarlarda geliştirilmiş bireysel teknikler farklı deteksiyon limitlerine sahiptir ki bu yüzden sonuçları kıyaslamak oldukça güçtür. Bu anlaşılmazlık farklı kuruluşlarca uygulanan ve farklı tekniklere dayanan fitosanitari ya da karantina uygulamalarında ve tanımlamalarında, özellikle de sonuçların pratiğe geçirilmesi çalışmalarında zorluklar yaratmaktadır [44].

Son 25 yılda çoğu tohumla taşınan patojenlerin tam deteksiyonu için yeni teknikler geliştirilmiştir. Bunlar çevresel inkübasyon ve identifikasyona yardımcı olan liquid plating assay, enzim bağlı immunosorbent deney (ELISA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojilerini içermektedir [45].

Herhangi bir patojenik organizmanın kontrolündeki başarı, hızlı ve güvenilir deteksiyon ve identifikasyon metodlarının uygulanabilirliğine bağlıdır. Direkt ve indirekt olmak üzere, iki temel metodoloji, tohumlardaki ve diğer bitki çoğalma parçalarındaki bitki patojeni bakterilerin deteksiyonu için kullanılabilir. Metod seçimi şu faktörlere bağlıdır:

- a) Deneyin amacı (Araştırma ya da rutin testleme amaçlı mı?)
- b) Patojenin lokasyonu
- c) Uygun zaman ve ekipman
- d) Personelin eğitimi
- e) Bakteriyel popülasyonun düzeyi
- f) Tohum yığımında hastalığın gelişimi için gerekli inokulum düzeyi

Direkt deteksiyon metodları, patojenin ekstraksiyon basamağı olmadan yapılan deteksiyonu tanımlarlar. Direkt deteksiyon metodları çok az teknik bilgi gerektirir fakat pahalı olabilir, çok fazla zaman harcanır ve sıklıkla yetersiz sonuç verirler. Direkt deteksiyonun en yaygın metodu yetiştirme testleridir ki bu testler arazide ya da seralarda yapılmaktadır. Tohum yığınları özellikle virüs ya da bakterilerden çok funguslarla kontamine olmuş tohumlar açısından yüksek oranlıdır. Yetiştirme ve diğer direkt deteksiyon metodları tohumla taşınan funguslar açısından hala gözde olan tekniklerdir. Fakat bakterilerle kontamine olmuş tohumların yüzdesi sıklıkla % 0.1 ya da daha azdır. Dahası her tohum için bakteriyel inokulumun yoğunluğu çok düşüktür. Bu düzeydeki kontaminasyonlar her kontamine tohum başına 10.000 ya da daha fazla tohumun arasından örnek ekimlerini gerektirir ve bu yüzden çok pahalı ve zaman alıcıdır. Yetiştirme testlerinin diğer dezavantajları tohum çimlenmesine çevresel faktörlerin etkisi ve diğer organizmaların neden olduğu semptomların etkisi olarak sayılabilir [34].

Tohumla taşınan patojenlerin deteksiyonu üzerine ilk çalışmaların çoğu şüpheli tohumların arazi ekimlerinin yapılması ile gerçekleştirilmiştir. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, *Xanthomonas campestris* pv. *incanae*, *Xanthomonas campestris* pv. *nigramaculans*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Pseudomonas syringae* pv.

phaseolicola ve *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* gibi birçok organizmanın deteksiyonu yetiştirme testleriyle yapılmıştır. Canlılığa dayalı prosedürler konukçu bitkinin tohum ekstraktıyla inokulumunu ya da şüpheli patojenin agar ortamında izolasyonunu içerir. Konukçu bitkiler tohum ekstraktlarıyla enjeksiyon yoluyla ya da ham tohum ekstraktının spreyleneşmesiyle inoküle edilebilirler. Patojenler, oluşmuş lezyonlardan izole edilebilmeli, ardından kültür haline getirilip patojenitesi belirlenmelidir. Bu gerekliliklerden dolayı bu testler çok pahalı, zaman alıcı ve uygulanma açısından da oldukça güçtür. Bu testlerin en büyük avantajı konukçu bitki üzerinde çok az sayıdaki bakterinin çoğalarak semptom oluşturabilmesidir. Agar ortamında patojenlerin izolasyonundaki başarı ise büyük oranda seçici besiyerlerinin uygunluğuna bağlıdır. Son yıllara kadar çok az sayıda böylesi besiyeri uygun olabirmiştir. Bazı patojenlerin izolasyonu genel besiyerlerinde mümkün olmaktadır. Örneğin *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* King's B ortamında izole edilebilmektedir. *X. c.* pv. *phaseoli* nütrient agarda, *X. c.* pv. *campestris* nütrient starch agarda izole edilebilmektedir [34].

Bununla beraber izolasyondaki başarı, tohum yığmındaki patojen miktarının fazlalığı ile ya da tohum yığmında nispeten az sayıda bulunan saprofitik bakterilerle sınırlanmaktadır. Bu şartlar çoğu durumda mümkün olmadığı için genel besiyerleri sınırlı bir başarıya sahip olmaktadırlar. Saprofitik bakteriyel büyüme kontrol edilebilindiğinde seçici besiyerleri oldukça değerli olabilmektedir. Şüpheli kolonilerin tahmini identifikasyonu bir ya da birkaç metolla yapılabilmektedir. Örneğin *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* gibi floresan Pseudomonaslar, yüksek dalga boylu UV ışığında KB besiyerinde karakteristik floresan pigmentlerinden dolayı ışımaya verirler. Biyokimyasal testlerle ayrıma gidilecek olunursa saprofitik Pseudomonaslar genellikle daha fazla pigment üretirler ve oksidaz pozitifirler [34].

Biyokimyasal metodların dışında identifikasyon için fajlarda kullanılabilir. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* nin hızlı identifikasyonu için fajlar kullanılmıştır [34].

Kahveci ve Maden 1994 yılında *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın bakteriyofajlar ile tespiti üzerine yaptıkları çalışmada, bakteri için 13 faj izole etmişler ve bu fajlardan 1 tanesinin bakteriye oldukça spesifik olduğunu bulmuşlardır. Bu spesifik fajın patojen bakterinin identifikasyonunda kullanışlı olabileceğini bildirmişlerdir [46].

Southern Blot yöntemiyle yapılan bir çalışmada argK geninin *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* için spesifik olduğu gösterilmiştir. Ancak yöntemin hassasiyeti, maliyeti ve kompleks oluşu nedeniyle rutin analizler için uygun bulunmamıştır. Bu nedenle aynı araştırmacılar argK geni için spesifik iki oligonükleotid tasarlamışlar ve PCR temelli bir deteksiyon prosedürü geliştirmişlerdir. Metod saf kültürlerle ve karışık kültürlerle uygulanmıştır. Ancak PCR sinyali, bir inoküle tohum 400 patojensiz tohumla karıştırıldığında gözlenmiştir. Yöntem hassas olarak değerlendirilebileceği halde oldukça yüksek maliyetlidir [2].

Tüm bu geleneksel metodlardan farklı olarak rutin testler için uygunluğu oldukça fazla olan serolojik teknikler deteksiyon amacına hizmet edebilecek niteliktedirler. Bitki patojeni bakteriler için serolojik testler 1918' den beri bilinmektedir. Bu tarihten beri birçok araştırmacı, serolojik testlerin hızlı ve güvenilir deteksiyon ya da identifikasyon kabiliyetlerinin farkındaydılar. Son yıllarda serolojik testlere olan ilgi ve tohumla taşınan bakterileri de içeren bitki patojeni bakterilerin identifikasyonu ya da deteksiyonunda serolojinin önemi büyük oranda artmıştır. Bu artan ilginin sebeplerinden biri daha kaliteli antiserumların elde edilmesi, örneğin hibridoma teknolojisinin geliştirilmesiyle monoklonal antiserumların üretimi ve spesifik bakteri antijenlerinin izole edilmesidir. Monoklonal antiserumların kullanımı sınırlı olmasına rağmen poliklonal antiserumlar tohum bakteriyolojisinde hala geniş çapta kullanılmaktadır. Tohumla taşınan bakterilerin deteksiyonu ve identifikasyonu için Uluslararası Tohum Test Etme Birliği (ISTA)' nde en çok kullanılan serolojik testler: Immunofloresan Mikroskopisi (IF), Enzim Bağlı Immunosorbent Deneyi (ELISA), Ouchterlony Double Diffusion (ODD), Aglutinasyon testleridir. Çizelge 4.1' de tohumla taşınan bakterilerin deteksiyonunda en çok kullanılan serolojik tekniklerin bazı önemli özellikleri karşılaştırılmaktadır [31].

Çizelge 4.1. Tohumla Taşınan Bakterilerin Deteksiyonunda En çok Kullanılan Serolojik Tekniklerin Bazı Önemli Özellikleri (31).

	ELISA	ODD	IF	Slide Aglutinasyon
Analitik Spesifitesi	2-3	1	2	3
Analitik Duyarlılık	3	4	2	3
Potansiyel Standartizasyonu	1	1	2	1-2
Çok Miktardaki Örneğe Potansiyel Uygulanabilirliği	1	2-3	2	2

1= Çok Yüksek

2= Yüksek

3= Makul

4= Düşük

[31]

Serolojik testlerin uygulanmasında temel unsur spesifik antiserumların üretilmesidir. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* için ilk spesifik antiserum Guthrie ve ark. [13] tarafından 1965 yılında üretilmiş ve antiserum üretiminde Yeni Zelanda cinsi beyaz tavşan kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmalar sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* için spesifik antiserumu ile *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* identifikasyonunda az zamanda sonuç alınabileceğini ortaya koymuştur. Aynı çalışmada koyunda da deri altı enjeksiyonuyla antiserum üretilmiş ve serolojik testlerde kullanılmıştır [13].

Guthrie (1968) *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* için spesifik antiserum üretiminde inek kullanmıştır. Spesifik antiserumu kullanarak yaptığı immunodifüzyon testi sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın 1 ve 2 ırk izolatlarının somatik flagellar antijenlerinin homolog olduğunu göstermiştir. Antiserumun türe spesifik fakat ırklara spesifik olmadığını belirtmiştir. Benzer şekilde çalışmamızda üretilmiş olan üç farklı antiserumun türe spesifik fakat ırklara spesifik olmadığını gözlenmiştir [47].

Türkiye'de ise ilk defa Öktem 1976 yılında Yeni Zelanda cinsi beyaz tavşan kullanarak *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (NCPBP 52) için spesifik antiserum üretmiş, aynı işlem için koyun da kullanılabilirliğini belirtmiştir. Yaptığı çalışmalarda üretilen spesifik antiserumun identifikasyonda kullanılabilirliğini ve kısa sürede sonuç alınabileceğini göstermiştir [48]. Bizim çalışmamızda da üretilen antiserumların aglutinasyon testleriyle spesifik oldukları belirlenmiş ve çapraz reaksiyon vermedikleri için identifikasyon amaçlı kullanılacakları gösterilmiştir.

Alan ve Kelman 1977 yılında, *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*'nın %2' lik glutaraldehitte fikse edilmiş hücrelerine karşı spesifik antiserum üretmişler ve ürettikleri antiserumu Floresan Antikor Boyama (FAS) yöntemi için kullanmışlardır. FAS yöntemiyle *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (Eca) ve *Erwinia carotovora* var. *carotovora* (Ecc)'nin karışık kültürlerinde mililitredeki 500 *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* hücrelerini tespit edebilmişlerdir. FAS yönteminin Eca deteksiyonu için oldukça spesifik ve güvenilir olduğu saptanmıştır [38].

Van Vuurde, Van Den Bovenkamp ve Birnbaum 1983 yılında yaptıkları çalışmada IF' nin *Phaseolus vulgaris* tohumlarında *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*'nın deteksiyonu için rutin bir metod olarak kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. IF' nin 10.000-50.000 sağlıklı tohum arasında 1 enfekte tohumu detekte edebileceği sonucuna varmışlardır. Çalışmalarında Barzic ve Trigalet (1982)'ye benzer olarak *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* identifikasyonunda IF' nin ELISA'ya göre daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır [26].

Van Vuurde ve Van Henten 1983 yılında otoklavlanmış bakteriyel hücrelerin enjeksiyonu yoluyla spesifik antiserum üretmişlerdir. Tohum ekstraktlarında serolojik pozitif hücrelerin sayısının belirlenebilmesi açısından IF' nin yüksek potansiyelde olduğunu tespit etmişlerdir. Tohum ekstraktının santrifüjü yoluyla patojenik bakterilerin konsantrasyonu artırılarak testin deteksiyon düzeyinin Immunosorbent Immunofloresan (ISIF) yönteminde artırılabilirliğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında ISIF' in duyarlılığının 100 kez konsantre edilmiş tohum ekstraktlarında beklenenden az olduğunu bulmuşlar ve

bunun sebebinin; santrifüj sırasında bakteriyel hücrelerin tohum partiküllerine spesifik olmayan absorpsiyonu ya da tohum parçacıklarının immunosorpsiyon tabakasını bloke etmesi olabileceğini bildirmişlerdir [27].

G. M. Wyatt, J. G. Turner ve M. R. A. Morgan yaptıkları çalışmada antiserum üretiminde ekzopolisakkaritleri kullanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda, bitki patojeni *Pseudomonas* türlerinin hücre yüzeyinde bulunan ve hastalığı meydana getiren ekzopolisakkaritlere karşı üretilen antiserumun oldukça spesifik olduğu gözlenmiştir [33]. Bu çalışmada da, ilk defa olarak, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* hücrelerinin ekzopolisakkarit komponentlerine spesifik antiserum üretilmiş ve bu antiserumun serolojik testlerden IF hücre ve IF koloni boyama yöntemleri için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Van Vuurde ve ark. (1991) çalışmalarında 100 alanda 2 ya da daha fazla IF pozitif hücre görülen örneklerin dilüsyon plate yöntemiyle tekrar testlerini yapmışlar ve IF pozitif hücre sayısının artmasıyla doğru orantılı olarak IF ve dilüsyon plate yöntemleri arasındaki korelasyonunu arttığını gözlemişlerdir. 100 alanda 2500'den fazla IF pozitif hücrenin görüldüğü örneklerde IF ve dilüsyon plate yöntemleriyle hedef bakterinin izolasyonunda iki yöntem arasındaki korelasyon %76.2 olarak bulunmuştur [25]. Bu değer oldukça yüksektir ve rutin indekslemelerde bu iki metodun kombinasyonu oldukça güvenilir sonuçlar vermektedir. Çalışmamızda fasulye unu örneklerinde IF pozitif hücrelerin 100 alandaki sayıları tespit edilmiştir. Örneklerdeki IF pozitif hücre sayıları genel olarak yüksek bulunmuştur ve çok sayıda patojen içeren bu örneklerin klasik deteksiyon metodları ile incelenmesi ile de örnekteki patojenin tespiti mümkün olabilecek durumdadır. Ancak az sayıda patojen içeren (çalışmamızda incelenmiş Alpu I örneği gibi) örneklerdeki hedef bakterinin deteksiyonu klasik metodlarla yapılamamaktadır. Çizelge 3.5. incelendiğinde Alpu ilçesinden alınmış fasulye örneğinde 100 alanda toplam hücre antiserumu ile 2 IF pozitif hücrenin tespit edilebildiği, Glutaraldehit fiksasyonu ve EPS ekstraksiyonu ile hazırlanmış antiserumların aynı örnekte IF pozitif hücre tespit edemediği görülmektedir. Bunun sebebi toplam hücre antiserumunun bakterinin tüm antijenik determinantlarına karşı spesifik antikor gruplarını içermesi olarak düşünülebilir. Farklı determinantlara spesifik antikor grupları çeşitli nedenlerle baskılanmış olan

antijenik determinantlarla birleşemese bile bunların dışındaki diğer determinantlarla birleşebilirler ve bu sayede bakterinin detekte edilebilmesini sağlarlar. EPS ekstraksiyonu ve glutaraldehit fiksasyonu ile hazırlanmış olan antiserumların titreleri yüksek olmasına rağmen bakterinin belirli antijenik determinantlarına spesifik antikor grupları içerdikleri için spesifik oldukları determinantlar çeşitli nedenlerle baskılandığında antijen antikor reaksiyonu oluşmamakta ve bu nedenle hedef bakteri detekte edilememektedir. Sonuç olarak toplam hücre antiserumunun IF mikroskopi yönteminde daha avantajlı olduğu düşünülebilir. Ancak farklı antijenik determinantlara spesifik antikor gruplarının fazla olmasının hedef bakteri dışındaki bakterilerdeki benzer determinantlarla çapraz reaksiyon oluşması ihtimalini arttıracığı göz önüne alınmalıdır.

Çalışmamızda fasülye örneklerinde 100 alandaki IF pozitif hücre sayısı tespit edilmiş ancak bu örneklerin dilüsyon plate yöntemleriyle kontrolü yapılmamıştır. Bunun yerine aynı örnekler IF koloni boyama yöntemiyle değerlendirilmiştir. IF pozitif hücreleri fazlaca sayıldığı örneklerde IF koloni boyama sonuçlarında da sayılan hedef kolonilerde artma olduğu gözlenmiştir. Ancak saprofitlerin artışı hedef kolonilerin açık bir şekilde tanınması zorlaştıran bir faktör olarak ortaya çıkmıştır.

Gaszcunzka ve Serfontein 1998' de yaptıkları çalışmada *Pseudomonas s. pv. phaseolicola* ve *Pseudomonas s. pv. syringae*' nin izolasyonu ve ayrımı için Milk-Tween Agar (MT)' ı kullanmışlar ve koloni morfolojisine göre bu bakterilerin ayırt edilebilirliğini göstermişlerdir. Çalışmalarında bu besiyeri ile saprofitlerin eliminasyonunu kısmen indirgeyebilmişlerdir. Ancak MT besiyerinin diagnostik bir besiyeri olmadığını belirtmişlerdir. Patojen olmayan *Xanthomonas*' lar ile saprofitik *Pseudomonas*' ların besiyerinde ayrımının mümkün olmadığını tespit etmişlerdir [49]. Milk Tween Agar gibi saprofit gelişimini baskılayan ve bitki patojeni bakterilerin gelişimini destekleyen seçici besiyerlerinin kullanılması bu sorunu giderebilecektir.

Benlioğlu ve Özakman tarafından 1993 yılında *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' nın ısı uygulanmış ve glutaraldehitle fikse edilmiş hücrelerine karşı 2 farklı enjeksiyon yöntemiyle tavşanlardan 3 antiserum elde edilmiştir. Üretilen 3 farklı antiserumdan, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' nın glutaraldehitle

fikse edilen hücrelerine karşı üretileni diğerlerinden daha spesifik bulunmuştur. Bu çalışmada da glutaraldehitte fikse edilmiş hücrelere karşı üretilmiş olan antiserumun oldukça spesifik olduğu tespit edilmiştir. Ürettikleri antiserumları İndirekt Floresan Antikor Boyama (IFAS) ve ELISA yöntemlerinde kullanmışlar ve IFAS' ın ELISA' ya göre hale yanıklığı hastalığı etmeninin deteksiyonunda daha duyarlı olduğu sonucunu elde etmişlerdir [18].

Benlioğlu ve Özakman [18] 1993' te yaptıkları çalışmada ürettikleri antiserumun *P. syringae* ırklarına (*P. s. pv tomato*, *P. s. pv pisi*, *P. s. pv glycinea*, *P. s. pv syringae*, *P. s. pv lachrymans*) ve *P. cichorii*' ye karşı çapraz reaksiyon oluşturduğunu gözlemlemiş, bunun antijenin diğer organizmalarla benzer yapıda hücre duvarına sahip olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Lucas ve Grogan 1969' da *P. s. pv tomato*, *P. s. pv phaseolicola*, *P. s. pv mori*, *P. s. pv lachrymans* izolatlarının antijenlerinin ortak olduğunu rapor etmişlerdir. Taylor 1970'de *P. s. pv phaseolicola*' nın otoklav edilmemiş toplam hücrelerine karşı *P. morsprunorum*, *P. antirrhini*, *P. maculicola*, *P. lachrymans*, *P. tomato*, *P. primulae*, *P. delphini*, *P. viridiflava* ve *P. cichorii*' ye çapraz reaksiyon verdiğini rapor etmiştir. Çalışmamızda üretilmiş olan antiserumların çapraz reaksiyon vermedikleri belirlenmiştir.

Türkiye' de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatlarının antijenik yapısı, 1995 yılında, ilk defa Ertuğrul tarafından [22] karşılaştırılmıştır. Çalışmasında *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatlarının ısıya dayanıklı antijenlerini Ouchterlony Immunodiffüzyon testini kullanarak incelemiş ve izolatların ortak antijenik yapı özelliği gösterdiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada, bizim çalışmamızın sonuçlarına uygun olarak, üretilmiş olan antiserumun *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* türüne spesifik fakat ırklara spesifik olmadığı belirtilmiştir.

Tohumla taşınan bakteriler için İmmunofloresan (IF) üzerine ilk çalışma Coleno tarafından *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* için yapılmıştır. Coleno fasülye tohumu örneklerindeki düşük sayıdaki *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* hücrelerinin IF ile potansiyel deteksiyonunu göstermiştir. Hemen ardından metot çok sayıdaki örneğe rutin uygulanabilirliği açısından adapte edilerek geliştirilmiştir. Schaad ve Donaldson, lahanaya tohumlarındaki

Xanthomonas campestris pv. *campestris* için IF ve DPI (dilüsyon plating identifikasyon) tekniklerini karşılaştırmışlar ve IF' nin duyarlılığının DPI' a yakın olduğunu bulmuşlardır [24].

IF yönteminin başka bir uygulama şekli de Immunofloresan koloni boyama (Immuno fluorescein colony staining) (IFC) adı verilen yöntemdir. Bu yöntem de bakteri aranması ve izolasyonu için kullanılmaktadır. Agar üzerinde mikro-koloniler oluşturulduktan sonra sıcak hava ile ortam kurutulur. FITC bağlı antikorlar ile inkübasyon sonunda mikroskopta inceleme yapılır ve ışımaya gösteren kolonilerin hedef bakteriye ait olduğu saptanmış olur. Saptanan bu koloniler yeni besiyerine aktarılarak izolasyonu sağlanmış olur. Yöntemin en büyük özelliği canlı hücreleri ayırt etme gücüdür. Bu nedenle IFC yöntemi vasıtasıyla belirlenen canlı hücreler izole edilip diğer testler için de kullanılabilir. Franken ve Van Vuurde, IFC yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada yöntemin *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* aranmasında iyi sonuç verdiğini bulmuşlardır [31].

Antiserumlar IF' de kullanılmadan önce titrelerine, spesifisitelerine göre değerlendirilmiş olmalıdır. Bu, homolog bakterinin seçilmiş strainlerine, yakın bakterilere ve materyalden izole edilmiş mikroorganizmalara karşı titrasyon yoluyla yapılır. Ouchterlony Double Diffusion gibi diğer serolojik metodlar antiserum spesifikliğin tayininde yardımcı olabilir fakat sonuçlar IF' de bulunan diğer antijenik determinantların içerilmesine dikkat edilmelidir. Antiserum spesifikliğı çapraz reaksiyon veren bakterilerle absorpsiyon yoluyla geliştirilebilir.

IgG tipi antibadilerin Fc bölgesi ile reaksiyona girebilen protein A gibi molekülleri içeren mikroorganizmaların spesifik olmayan reaksiyon gösterebileceğı gözden kaçırılmamalıdır [24].

Bu tipteki spesifik olmayan reaksiyonlar, spesifik antiserumun, aynı gamma globulin grubundan olan ancak örnekte mevcut olmayan antijenler için spesifik affinitesi (ilgisi) bulunan antibadilerle karıştırılmasıyla elemine edilebilir.

Antiserum kalitesinin ve kalite kontrol prosedürlerinin standartizasyonunun geliştirilmesi Uluslararası Tohum Test Birliğı (ISTA) çatısı altında çalışılmaktadır [24].

IF' nin dezavantajı hatalı pozitif sonuçlar verebilmesidir. Antiserum hedef organizmaların dışındaki organizmalarla spesifik olmayan reaksiyonlar verebilir.

Bu yüzden antiserumun çapraz reaksiyonlara karşı yeterli düzeyde test edilmiş olması gerekmektedir [24]. Çalışmamızda kullanılmış olan antiserumların spesifikliği yeterli düzeyde test edilmiş ve çapraz reaksiyon oluşturmadıkları gözlenmiştir. Bu nedenle IF' nin olası en büyük dezavantajı ürettiğimiz antiserumlar için geçerli değildir.

Antiserumun patojenin farklı serotiplerine karşı da test edilmesi gerekir. Çünkü hatalı negatif sonuçların kaynağı da bu testlerin yeterli yapılmamasıdır. Çalışmamızda *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' nın farklı ırklarına karşı testler uygulanmış ve her üç antiserumun da patojenin farklı ırklarını tespit edebildiği gözlenmiştir. Bu nedenle örneklerde hatalı negatif sonuçların çıkması oldukça düşük bir ihtimaldir.

Katı faz immünosorbsiyon metotları İmmunosorbent immunofloresan mikroskopi ve İmmunosorbent dilüsyon-plate, bakteriyolojik araştırmalar için geliştirilmiş ve tohum patolojisi için adapte edilmiştir. ISIF' ın temel avantajı konsantre ekstraktlardan patojenik bakterilerin lam üzerine seçici absorbsiyonu yoluyla IF mikroskopi kalitesi ve duyarlılığını arttırmasıdır. İmmünosorbsiyondan sonra tohum partikülleri ve otofloresan fungusidler indirgenebilmektedir [27].

Shephard ve arkadaşları [50] (1986) diagnostik duyarlılık ve diagnostik spesifisitenin salgın hastalıkların test değerlendirmesi açısından en önemli özellikler olduğunu bildirmişlerdir.

Diagnostik duyarlılığı; “tohum yığınının hastalık durumu bilindiğinde, spesifik hastalıklı tohum yığınlarını doğru bir şekilde pozitif testlerle tanımlayabilme gücü (Gerçek Pozitif)” olarak, analitik duyarlılığı ise “çok küçük miktarda antijeni test edebilme gücü” olarak tanımlamışlardır. Bu tanımlara göre serolojik tekniklerden IF hem diagnostik duyarlılık hem de analitik duyarlılık ölçütleri açısından uygun bir testtir.

Diagnostik spesifisite “Hastalık durumu bilindiğinde bu hastalık etmenini içermeyen sağlıklı tohum yığınlarını doğru bir şekilde tanımlayabilen negatif testlerin gücünün ölçümü (Gerçek Negatif)” olarak, analitik spesifisite ise “verilmiş antiserumla reaksiyona giren benzer antijenler (ya da organizmalar) arasındaki immünojenik çapraz reaksiyon düzeyi” olarak tanımlanmıştır [50].

Yine bu tanımlamalara göre değerlendirildiğinde IF' nin diagnostik ve analitik spesifitesinin de oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Herhangi bir patojen için deteksiyon metodolojisi göz önüne alınmadan önce; spesifiklik, duyarlılık, güvenilirlik, etkililik ve tohum yığınındaki patojen toleransının anlaşılabilirliği, tekniğin klinik tohum sağlığı testi olarak kabulünden önce düşünülüp değerlendirilmesi gereken unsurlardır. Kabul edilebilir tohum sağlığı testleri, hastalık risk yönetimi ve tohum kalitesi değerlendirmesindeki rutin kullanım açısından bir araç durumundadırlar. Tohum sağlığı sorunları uluslararası tohum ticaretinde giderek artan bir öneme sahiptir. Serbest ticaretin gelişmesiyle birlikte, birçok ülke ,ülkelerine tahrip edici patojenlerin girmesini kendi bitki sağlığı (phytosanitary) şartlarını yeniden tanımlayıp ortaya koymuşlardır [45].

Bununla beraber, birçok bitki sağlığı düzenlemeleri, patojenlerin ekonomik tehlikesi tam anlaşılmadan ya da o ülkede bulunan patojenin tam bilimsel analizi yapılmadan uygulanmaktadır. Bu da düzenlemelerin karışmasına, gereksiz testlerin yapılmasına ya da şüphe gerekçeleri ve haksız ticaret bariyerlerinin oluşmasına öncülük etmektedir. Bu nedenlerle serolojik teknikler gibi spesifitesi ve duyarlılığı yüksek testlerin ülkemizde uygulanması ekonomik yönden oldukça önemlidir. Fakat serolojik teknikler içinden de tohumla taşınan bakteriler için rutin kullanıma uygun ve spesifitesinin yüksek olmasının yanında pahalı da olmayan IF gibi bir yöntemin benimsenmesi ülkemiz tarımı için gerekli bir koşul olarak görülmektedir.

Yapılan bu çalışma ve yukarıda özetlenmiş olan diğer çalışmaların sonuçlarından da anlaşılacağı gibi IF' nin fasülye tohumlarındaki patojenlerin deteksiyonu açısından uygun bir yöntem olduğu görülmektedir. Üretilmiş olan EPS antiserumu ilk defa bu çalışmada IF ve IFC yöntemlerinin uygulanması için kullanılmış ve bu antiserumun her her iki yöntemle de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* deteksiyonunda uygun olduğu tespit edilmiştir. Glutaraldehit fikse edilmiş *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* hücrelerine spesifik olarak üretilmiş antiserum yine ilk defa bu çalışmada IF koloni boyama yönteminde kullanılmış ve yöntem için uygun bulunmuştur. Çalışmamızda üretilmiş olan üç farklı antiserumun titrelerine bakıldığında, EPS ekstraksiyonu ve Glutaraldehit fiksasyonu ile elde edilmiş antijenlere spesifik antiserumların titresi 1 / 1024,

toplam hücre antijenlerine spesifik olarak üretilmiş antiserumun titresi ise 1 / 512 olarak bulunduğu halde, toplam hücre antijenlerine spesifik antiserumun IF hücre boyama ve IF koloni boyama yöntemlerinde titresi daha yüksek olan diğer iki antiserum kadar yöntem için kullanışlı olduğu tespit edilmiştir. Her üç antiserumun FITC konjugatı da hedef bakterinin arandığı fasülye unu örneklerinde ve farklı oranlarda hazırlanmış karışık kültürlerin tümünde deteksiyon amacına hizmet edebilmişlerdir. IF hücre boyama yönteminin IF koloni boyama yöntemiyle birlikte kullanılmasının doğruluk derecesi ve pratik uygulanırlığı yüksek rutin testlemelere uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Bundan sonraki çalışmalarda daha spesifik poliklonal antiserumların üretilmesi ya da monoklonal antikörlerin kullanımı yöntemin hassasiyetini daha da arttıracak olan faktörler olarak önerilebilir. Daha spesifik poliklonal antiserumlar bakterinin diğer antijenik kısımlarının (kamçı antijenleri gibi) immünizasyonuyla farklı deney hayvanları kullanılarak elde edilebilir. Aynı örneklerin serolojik testlemesinde farklı antijenik determinantlara spesifik antiserumların eş zamanlı test sonuçları aranan patojenlerin varlığı hakkında ya da en uygun antiserumun özelliği açısından kullanışlı bilgiler verebilecektir.

KAYNAKLAR

1. GRAHAM, P. H. ve RANALLI, P., *Common Bean (Phaseolus vulgaris L.)*, Field Crops Research, 53, 131-146, 1997.
2. MOSQUEDA-CANO, G., HERRERA-ESTRELLA, L., *A Simple and Efficient PCR Method for the Specific Detection of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in Bean Seeds*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13, 463-467, 1997.
3. KIVANÇ, M., *Uygulamalı Mikrobiyoloji Ders Notları*, (Yayınlanmamış), 1997.
4. ANONYMOUS, *Herkes İçin Mercimek Sempozyumu*, Marmaris-Muğla, 29-30 Eylül 1988.
5. ÖNCELER, Z., *Bazı Kuru Fasülye Çeşit ve Hatlarında Bakteriyel Yağ Lekesi (P.s.pv.phaseolicola) Hastalığına Dayanıklılığın Kalıtımı Üzerine Araştırmalar*, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Bursa, 1995.
6. ESKİŞEHİR YEMEKLİK DANE BAKLAGİL GRUBU, *Kuru Fasülye Islahı ve Yetiştirme Teknikleri Semineri*, Eskişehir, 1993.
7. ANONYMOUS, *IGEME Kayıtları*, 1984.
8. D.I.E., Devlet İstatistik Enstitüsü, 1997.
9. IŞIK, M., *Anadolu Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Personeli, Kişisel İletişim*, 1999.

10. BENLİOĞLU, K., ÖKTEM, Y.E., *Kuru Fasülye Ekim Alanlarında Görülen Bakteriyel Yanıklık Hastalıklarının Tesbiti Projesi*, Ankara, 1988.
11. BENLİOĞLU, K., ÖZAKMAN, M., *Fasülyelerde Hale Lekesi Etmeni Pseudomonas syringae pv. phaseolicola' nın Serolojik Teşhisi Üzerine Çalışmalar*, VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, İzmir, 1991.
12. SCHWARTZ, H.F., *Bean Production Problems in the Tropics*, C.I.A.T, Colombia, p.285-301, 1989.
13. GUTHRIE, J.W., HUBER, D. M. ve FENWICK, H. S., *Serological Detection of Halo Blight*, Plant Disease Reporter, 49, 4, 1965.
14. ŞEHİRALİ, S., *Yemelik Tane Baklagiller*, Ziraat İşleri Yayınları, Ankara, 1979.
15. MADEN, S., *Bakteriyel Bitki Hastalıkları*, Ankara, 143-147, 1989.
16. KARACA, İ., *Fitobakteriyoloji ve Bakteriyel Hastalıklar*, Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Yayınları, Bornova, No:294, 1977.
17. BRADBURY, J.F., *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*, Cab International Mycological Institute, England, 1986.
18. BENLİOĞLU, K., ÖZAKMAN, M. ve ÖKTEM, Y. E., *Türkiye'de Kuru Fasülyelerde Görülen Bakteriyel yanıklık Hastalıklarının Tespiti ve P.s.pv.phaseolicola(Burkholder) ve X.c.pv.phaseoli' ye karşı Genitör Kuru Fasülye Çeşit ve Hatlarının Belirlenmesi Projesi*, Bornova, 1993.
19. STARR, G. H., KERCHER, C. J., *Passage of Pseudomonas phaseolicola in Bean Plants Through Sheep*, Phytopath., 59, 1976, 1969.

20. TAYLOR, J. D., DUDLEY, C. L., *Seed Treatment for the Control of Halo Blight of Beans*, Ann. App. Biol., 85, 223-232, 1977.
21. ÖNCELER, Z. ve IŞIK, M., *Yemelik Dane Baklagiller Gelişme Raporları*, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Eskişehir, 1991.
22. ERTUĞRUL, D., *Eskişehir Çevresinde Görülen Fasülye Hale Yanıklığı Etmeni Pseudomonas syringae pv. phaseolicola' nın Serolojisi ve Bakteriosin Aktivitesi Üzerine Çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1995.
23. SCHAAD, N. W., *Detection of Seedborne Bacterial Plant Pathogens*, Plant Disease, 885-889, 1982.
24. VAN VUURDE, J. W. L., *Detecting Seedborne Bacteria by Immunofluorescence*, Proceedings 6th International Conference Plant Pathogenic Bacteria, Bettswille, 1987.
25. VAN VUURDE, J. W. L., FRANKEN, A. A. J. M., BIRNBAUM Y. ve JOCHEMS, G., *Charachteristics of Immunofluorescence Microscopy and of Dilution-Plating to Detect Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in Bean Seed Lots and for Risk Assessment of Field Incidence of Halo Blight*, Neth. J. Pl. Path., 97, 233-244, 1991.
26. VAN VUURDE, J. W. L., VAN DEN BOVENKAMP G. W. ve BIRNBAUM, Y., *Immunofluorescence Microscopy and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as Potential Routine Tests for the Detection of Pseudomonas syringae phaseolicola and Xanthomonas campestris pv. phaseoli in Bean Seed*, Seed Sci. & Technol., 11, 547-559, 1983.

27. VAN VUURDE, J. W. L. ve VAN HENTEN, C., *Immunosorbent Immunofluorescence Microscopy (ISIF) and Immunosorbent Dilution-Plating (ISDP): New Methods for the Detection of Plant Pathogenic Bacteria*, Seed Sci. & Technol., 11, 523-533, 1983.
28. KRİEG, N. R., HOLT, J. G., *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*, 1, U.S.A., 1984.
29. SCHROTH, M. N., *Laboratory Guide for Identification Plant Pathogenic Bacteria*, Minnessota, p.37-44, 1983.
30. GÜLMEZOĞLU, E., *Bağışıklığın Temelleri*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1983.
31. FRANKEN, A. A. J. M. ve VAN VUURDE, J. W. L., *Problems and New Approaches in the Use of Serology for Seedborne Bacteria*, Seed Sci. & Technol., 18, 415-426, 1990.
32. TRIGALET, A., BIDAUD, P., *Some Aspects of Epidemiology of Bean Halo Blight*, Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, p.895-902, 1978.
33. WYATT, G. M., TURNER, J. G. ve MORGAN, M. R. A., *Rapid and Spesific detection of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola by Immunological Methods*, Food & Agricultural Immunology, 1, 53-63, 1989.
34. VAN VUURDE, J. W. L., VAN DEN BOVENKAMP, G. W., *Detection of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in bean*, Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material, Chapter 5. (Eds) Saettler, A. W., Schaad, N. W and Roth, D. A., APS Press The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 1989.

35. TAMER, A. Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M. ve OĞULTEKİN, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Anadolu Üniv. Eğitim Sağlık ve Bilimsel araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No.74, Eskişehir, 1989.
36. ANDERSON, A. J., *Unique Aspects of the Cell Surface Polysaccharide of Pseudomonas phaseolicola as Demonstrated by Bacteriophage Specificity*, Can. J. Microbiol., 26, 1422-1427, 1980.
37. GÜVEN, K., *A study of Strain Variation in Erwinia salicis in Relation to the Epidemiology of Watermark Disease*, Doktora Tezi, East Anglia Üniversitesi, İngiltere, 1992.
38. ALLAN, E., KELMAN, A., *Immunofluorescent Stain Procedures for Detection and Identification of Erwinia carotovora var. atroseptica*, Phytopathology, 67, 1305-1312, 1977.
39. BALL, E.M., HAMPTON R.O., DE BOER S.H., SCHAAD N.W., *Polyclonal Antibodies Section II. B.1, A Laboratory Manual*, (Eds) R. Hampton, E. Ball, S. De Boer, APS Press, The American Phytopathological, p.33-54, 1990.
40. TIJSSSEN, P., *Practise and Theory of Enzyme Immunoassays. in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, (Eds) Burdon R. H., Van Knippenberg P. H., Elsevier Science Publishers, p 97-101, 1985.
41. BRADFORD, M. M., *Analyt. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
42. CHANTLER, S. M., MCILMURRAY, M. B., *Labelled-Antibody Methods for Detection and Identification of Microorganisms*, Methods Microbiol., 19, 273-232, 1987.

43. VAN VUURDE, J. W. L., *Immunofluorescence Colony Staining*, Serological Methods for Detections and Identifications of Viral and Bacterial Plant Pathogens, A Laboratory Manual, (Eds) R. Hampton, E. Ball, S. De Boer, APS Press, The American Phytopathological, p.299-305, 1990.
44. SCHAAD, N. W., *Detection and Identification of Bacteria*, Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material, Chapter 3. (Eds) Saettler, A. W., Schaad, N. W and Roth, D. A., APS Press The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 1989.
45. MADDOX, D. A., *Implications of New Technologies for Seed Health Testing and the Worldwide Movement of Seed* Seed Science Research, 8, 277-284, 1998.
46. KAHVECİ, E., MADEN, S., *Detection of Xanthomonas campestris pv. phaseoli and Pseudomonas syringae pv. phaseolicola by Bacteriophages*, J. Turk. Phytopath., 23, No.2, 79-85, 1994.
47. GUTHRIE, J. W., *The Serological Relationship of Races of P. phaseolicola*, Phytopath., 58, 716-717, 1968.
48. ÖKTEM, Y. E., *Studies on Serology of Halo Blight (P. phaseolicola) (Burk) Dow. of Beans*, J. Turkish Phytopath., 5, Num.1, 1976.
49. GOSZCZYNSKA, T., SERFONTEIN, J. J., *Milk-Tween Agar, a Semiselective Medium for Isolation and Differentiation of Pseudomonas syringae pv. syringae, Pseudomonas syringae pv. phaseolicola and Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*, Journal of Microbiological Methods, 32, 65-72, 1998.

50. SHEPPARD, J. W., WRIGHT, P. F. ve DESAVIGNY, D. H., *Methods for the Evaluation of E.I.A Tests for Use in the Detection of Seed-Borne Diseases*, Seed Sci. & Technol., 14, 49-59, 1984.