

**İSTANBUL VE ÇEVRESİNDE SÜS BİTKİLERİNDE
GÖRÜLEN FİTOPATOJEN BAKTERİLERİN
NEDEN OLDUĞU
HASTALIKLAR ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Arzu Yonca BAYAR

**Yüksek Lisans Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇITIR
2009**

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İSTANBUL VE ÇEVRESİNDE SÜS BİTKİLERİNDE GÖRÜLEN
FİTOPATOJEN BAKTERİLERİN NEDEN OLDUĞU HASTALIKLAR
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Arzu Yonca BAYAR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Ahmet ÇITIR

TEKİRDAĞ-2009

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İSTANBUL VE ÇEVRESİNDE SÜS BİTKİLERİNDE GÖRÜLEN FİTOPATOJEN BAKTERİLERİN NEDEN OLDUĞU HASTALIKLAR ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Arzu Yonca BAYAR

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇITIR

İstanbul İli'nin Bağcılar, Bakırköy, Fatih, Esenler, Eyüp, Sarıyer, Silivri, Şile, Şişli, Üsküdar ve Zeytinburnu ilçelerinde 2008 yılında fidanlıklar, park, bahçe ve rekreasyon alanlarındaki çok yıllık süs bitkileri üzerinde yapılan alan çalışmaları sonucu fitopatojen bakterilerin neden oldukları bazı hastalıklar gözlenmiştir. Bu alan çalışması esnasında 12 ayrı süs bitki türünde hastalık belirtileri sergileyen toplam 70 yaprak ve sürgün örneği elde edilmiştir. Uygulanan klasik bakteriyolojik tanı yöntemleri sonucunda söz konusu örneklerde *Agrobacterium tumefaciens*'in neden olduğu kök ve kök boğazı kanseri, *Xanthomonas campestris*'in neden olduğu yaprak lekeleri *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*'nin neden olduğu dal kanseri *Pseudomonas cichorii*'nin neden olduğu yaprak lekeleri saptanmıştır. Bu patojen türlerinden önemli görülen *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* *Nerium oleander* (Zakkum) üzerinde *Pseudomonas cichorii*'nin *Schefflera arboricola* (Aralya)'da önemli ölçüde yaygın oldukları görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Fitopatojen bakteriler, süs bitkileri, *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*, *Pseudomonas cichorii*, PCR

2009, 39 sayfa

ABSTRACT

M Sc. Thesis

PRELIMINARY STUDIES ON DISEASES CAUSED BY PHYTOPATHOGEN BACTERIA ON ORNAMENTAL PLANTS IN ISTANBUL PROVINCE IN TURKEY

Arzu Yonca BAYAR

Namık Kemal University
Graduate School Of Natural And Applied Science
Department Of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÇITIR

Some bacterial diseases were observed on ornamental plants in nurseries, parks, gardens and recreational sites in Bağcılar, Bakırköy, Fatih, Esenler, Eyüp, Sarıyer, Silivri, Şile, Şişli, Scutary and Zeytinburnu districts of İstanbul Province in 2008. As a result of this survey studies 70 symptomatic leaf and shoot samples were collected from 12 species of ornamental plants. By employing classical bacteriological diagnostic methods root and crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*, leaf spots caused by *Xanthomonas campestris*, shoot and branch cancer caused *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and leaf spot disease caused by *Pseudomonas cichorii* were identified. *P. savastanoi* pv. *savastanoi* on *Nerium oleander* (Oleander) and *P. cichorii* on *Schefflera arboricola* (Aralia) were determined as an important and the wide spread pathogens.

Key words: Phytopathogen bacteria, ornamental plants, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Pseudomonas cichorii*, PCR

2009, 39 pages

TEŞEKKÜR

Engin deneyimlerinden yararlandığım, yüksek hoşgörü sahibi ve bana “İstanbul ve Çevresinde Süs Bitkilerinde Görülen Prokaryotik Mikroorganizmaların Neden Olduğu Hastalıklar Üzerine Araştırmalar” konulu Yüksek Lisans Tezini veren danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Ahmet ÇITIR**’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda ve önerilerde bulunan hocam Sayın **Araş. Gör. Dr. Mustafa MİRİK**’e şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans çalışmam içerisinde bulunan yağ asit profillerinin tanısı için Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik laboratuvarının olanaklarından yararlanmamı sağlayan hocam Sayın **Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN**’e teşekkür ederim. Ayrıca süs bitkilerinin isimlendirme ve tanılanması konusunda yardımlarını esirgemeyen Peyzaj Mimarlığı Bölüm Başkanı hocam Sayın **Prof. Dr. Aslı B. KORKUT**’a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Tezimde kullandığım fotoğrafların çekiminde yardımcı olan hocalarım Sayın **Prof. Dr. Nuray ÖZER** ve Sayın **Araş. Gör. Dr. N.Desen KÖYÇÜ**’ye teşekkürü bir borç bilirim.

Keza çalışmalarım esnasında benden her türlü yardım katkı ve önerilerini esirgemeyen hocalarım Sayın **Doç. Dr. Havva İLBAĞI** ve Sayın **Yard. Doç. Dr. Arzu COŞKUNTUNA** ’ya şükranlarımı sunarım. Tezin bilgisayarda yazımı esnasında bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım **Araş. Gör. Özgür SAĞLAM**’a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca benim için motivasyon kaynağı olan ve manevi desteğini esirgemeyen hocam Ardahan Üniversitesi Rektör yardımcısı Sayın **Prof. Dr. Rüstem HAYAT**’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Manevi destekleri ve sevgileriyle her zaman yanımda olduklarını bildiğim annem **Adalet BAYAR** ve babam **Oktay BAYAR**’a özellikle de biricik kardeşim **Aslı Nergiz BAYAR**’a sonsuz teşekkürler...

Ziraat Mühendisi
Arzu Yonca BAYAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Süs Bitkilerinde Bakteriyel Yaprak Lekeleri ve Yanıklıklar Hakkında Kaynaklar...	3
2.2. Süs Bitkilerinde Görülen Bakteriyel Kanserler Hakkında Kaynaklar.....	6
3. MATERYAL VE METOT	9
3.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması.....	9
3.2. Örneklere Uygulanan Klasik Tanı Testleri.....	9
3.2.1. King B Besi Yerinde Gelişim.....	9
3.2.2. Potasyum Hidroksit Testi (KOH).....	10
3.2.3. Levan Oluşumu.....	10
3.2.4. Oksidaz Testi.....	10
3.2.5. Pektolitik Aktivite Testi.....	10
3.2.6. Arginin Dehidrolaz Testi.....	10
3.2.7. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi.....	11
3.2.8. Nişasta Hidrolizasyonu.....	11
3.2.9. Katalaz Reaksiyonu.....	11
3.2.10. Patojenite Testleri.....	11
3.3. Moleküler Tanı Testleri.....	13
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu.....	13
3.3.2. PCR Testi.....	14
3.3.3. Yağ Asit Profillerinin Elde Edilmesi ve Tanı Amacı İle Değerlendirilmesi.....	15
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	16
4.1. Alan Tarama Bulguları.....	16
4.2. Klasik Tanı Testleri Bulguları.....	23
4.3. Moleküler Test Bulguları.....	27
4.4. Yağ Asit Profillerine Ait Bulgular.....	28
4.5. Tanı Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	28
5. TARTIŞMA	30
6. KAYNAKLAR	33
EKLER	37
EK 1	37
EK 2	38
ÖZGEÇMİŞ	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. İstanbul'un yıllık % 3,3 nüfus artış hızına göre nüfusu.....	1
Çizelge 2.1. <i>Pseudomonas cichorii</i> 'nin görüldüğü tek ve çok yıllık bitkiler.....	5
Çizelge 3.1. <i>Pseudomonas</i> türlerinin tanımlanması	11
Çizelge 3.2. PCR İşleminde Kullanılan Reaksiyon Karışımının İçeriği.....	15
Çizelge 4.1. İstanbul ilinin değişik ilçelerinde bakteriyel hastalık belirtisi gösteren bitki türleri ve toplanan örnek sayıları.....	16
Çizelge 4.2. İstanbul ve çevresinden toplanan süs bitki örneklerine uygulanan klasik test sonuçları.....	23
Çizelge 4.3. İstanbul ve çevresinde bazı süs bitkileri üzerinde saptanan bakteriyel hastalıkların etmen tanı sonuçları.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. İstanbul ilinde süs bitkilerindeki bakteriyel hastalıklar üzerinde alan çalışması yapılan ilçeler.....	9
Şekil 3.2. DNA ekstraksiyonu sonucunda % 1'lik Agarose jelde elde edilen DNA moleküllerine ait bantlar	14
Şekil 4.1. Fatih ilçesinde Atatürk Bulvarı üzerinde dikili zakkumlarda saptanan kanser tümörleri.....	17
Şekil 4.2. Sarıyer ilçesinde özel bir kuruluşa ait fidanlıkta zakkum sürgün ve çiçeklerinde oluşan kanser tümörleri.....	17
Şekil 4.3. Zeytinburnu Adliye'sinin önünde bulunan zakkum yapraklarındaki tümörler.....	18
Şekil 4.4. Esenler şehirlerarası otoparkında beton-taş çiçekliklerde yetiştirilen zakkumlardan alınan bakteriyel tümör örnekleri.....	18
Şekil 4.5. Üsküdar ilçesindeki bir fidanlıkta bakteriyel yaprak lekeleri sergileyen Manolya fidanları.....	19
Şekil 4.6. Manolya fidanında bakteriyel yaprak lekelerinin yakından görünümü.....	19
Şekil 4.7. Gardenya'da bakteriyel yaprak lekeleri ve klorozun yakından görünüşü.....	20
Şekil 4.8. Saksılı Gardenya fidanında bakteriyel yaprak lekeleri, kloroz ve cücelik belirtileri.....	20
Şekil 4.9. Bakteriyel yaprak lekelerinden etkilenmiş olan Defne çalısında kloroz ve yapraklarda marjinal kurumalar.....	21
Şekil 4.10. Bakteriyel enfeksiyon sonucu Sardunya yapraklarında "V" şeklinde kenarlardan merkeze doğru kurumalar ve buna bağlı olarak sürgün ve çiçek kurumaları.....	22
Şekil 4.11. Sağlıklı yapraklar arasında bakteriyel enfeksiyona maruz kalmış Sardunya yaprağı.....	22
Şekil 4.12. Fatih ilçesinden alınan zakkum örneğinden sağlanan izolatın patojenite testi sonucu neden olduğu tümör belirtisi.....	26

Şekil 4.13. Eyüp ilçesinden alınan Aralya örneğinden izole edilen bakteri izolatının patojenite testi sonucunda sağlıklı Aralya yaprakçıklarında oluşturduğu klorotik sarı lekeler..26

Şekil 4.14. Eyüp ilçesinde Süs Elma'sından alınan bakteri izolatının havuçta yapılan patojenitesi sonucu oluşan urların görünümü.....27

Şekil 4.15. PCR sonucu *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ile enfekteli zakkum örneklerine ait moleküler bantlar (M: Marker; 1-14 zakkum örnekleri)..... 28

1. GİRİŞ

İstanbul Türkiye'nin kültür, turizm, sanayi ve ticaret merkezi olup kara, deniz, demir ve havayolu ulaşımının da başlangıç noktasıdır. Ayrıca İstanbul son yıllarda projelendirilen ve inşaatı başlatılan enerji hatlarının güzergahı üzerinde olduğu için daha da önemli hale gelmiştir. Öte yandan bir finans merkezi olarak uluslar arası önemi her geçen gün artan İstanbul sahip olduğu tarihi, kültürel ve doğal güzellikleri ile 2010 Dünya Kültür Başkenti olmak gibi seçkin bir konuma da layık görülmüştür.

İstanbul metropol kent merkezi olarak ilin her yerleşim birimini etkilemekte ve kentin sahip olduğu yaşam alanları avantajları veya olumsuz yapılanmaları ile ili etkisi altına almaktadır.12,5 milyon nüfusu ile Türkiye'nin en kalabalık kenti ve ili olarak İstanbul Dünya'nın da sayılı kalabalık metropollerinden birisidir.

Türkiye'nin diğer illeri ve kentlerine göre her yıl nüfusu hızla artan İstanbul Doğu Roma, Bizans ve Osmanlı İmparatorluklarına başkentlik yaparak tahminen 5000 yıllık bir tarihi geçmişin mirasını da barındırmaktadır. Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi İstanbul'un nüfusu her yıl ortalama % 3.3 oranında yüksek bir hızla artmakta ve sahip olduğu doğal zenginliklerini, yaşam alanlarını, tarihi ve kültürel varlıklarını yok ederek kent ve il olarak içinden çıkılmaz sorunların da merkezi haline dönüşerek, yönetilmesi olanaksız hale getirmektedir.

Çizelge 1.1. İstanbul'un yıllık % 3,3 nüfus artış hızına göre nüfusu (Anonim,2008)

1990	1995	2000	2005	2008
7.195.773	8.383.093	9.766.303	11.377.742	12.504.138

İstanbul'un bulunduğu coğrafi konumu, iklimi ve diğer ekolojik özellikleri bu kente ve çevresine zengin bir flora oluşturma olanağı sunmuştur. Hızla artan nüfusuna rağmen zengin florasının ortaya çıkardığı ormanlar, korular, parklar, bahçeler ve diğer rekreasyon alanları önemli ölçüde varlığını sürdürmektedir. Tek ve çok yıllık ağaçlar, çalılar, süs bitkileri yanında botanik bahçeleri ve Atatürk Arboretumu'nda ekzotik bitki türlerini de barındırmaktadır. Şüphesiz İstanbul'da yaşayanların barındıkları mekanlarda iç mekan bitki türleri de İstanbul'un bitki tür zenginliğini artırmaktadır.

Her canlı türünde görüldüğü gibi İstanbul ve çevresindeki süs bitki türleri de hastalık ve zararlıların olumsuz etkilerine maruz kalmaktadırlar. Süs bitkilerinden tek yıllık ve çok yıllık türlerin abiyotik etmenlerden, fungal, prokaryotik ve virütik patojenlerden kaynaklanan pek çok hastalığı bulunmaktadır. Söz konusu bu süs bitki hastalıkları hakkında çalışmalar ve yayınlar, süs bitki gruplarına, üretim yerlerine ve hatta süs bitkisinin türüne göre yapılmakta olup bazıları şunlardır; Chase (1987) ornamental süs bitkilerinden çok yıllık çalı ve ağaç hastalıklarını yayınlarken, Daughtrey ve ark. (1995) saksılı iç mekan bitkilerinin, böcek ve akarların neden oldukları zararlar dışında 67 patojenik, 4 abiyotik ve 4 ayrı nematodtan dolayı hastalandıklarını bahsetmişlerdir. Jones ve Benson (2001) ise süs bitki fidanlıkları ve gölge ağaçlarından 63 türdeki hastalıkları anlatmıştır. Horst ve Cloyd (2007) ise sadece güllerde görülen patojenik ve abiyotik 44 hastalıktan ve 12 ayrı zararlıdan olumsuz yönde etkilendiklerini açıklamışlardır. Süs bitki hastalıkları konusunda Türkiye’de de benzer çalışmalar gerçekleştirilmiş olup bunlardan Bremer (1954) 28 familyaya ait 43 cinse giren süs bitki türlerindeki hastalıkların her birini açıklamıştır. Yine Selik (1966) orman ve ornamental ağaç türlerinde görülen hastalıkları, patojenlerin taksonomideki sırasına göre anlatmıştır.

Patojenik süs bitki hastalıklarından prokaryotik olanlar diğerlerine göre mücadelesi oldukça zor hastalıklar olup ayrı bir bölüm altında incelenmektedir. Nitekim Bremer (1954) çam başta olmak üzere sümbül, süsen, glayöl, düğün çiçeği begonya ve leylakta görülen bakteriyel hastalıkları sıralarken Selik (1966)’de bakteriyel hastalıkları, patojen türlerinin adı altında ve meşe, huş, akçaağaç, söğüt, ceviz, kiraz, kayın, kavak, elma, Avrupa dışbudak ağacı ve atkestanesi gibi konukçu ağaç türleri üzerinde tanımlamıştır. Görüldüğü gibi ornamental süs bitkileri patojenik fitopatojen bakterilerin enfeksiyonlarından muaf değildir.

Bu çalışma ile İstanbul ve çevresindeki bazı süs bitkilerinde, özellikle de ağaç ve çalılarda görülen bazı fitopatojen bakterilerin neden oldukları hastalıkların tanımını yapmaktır. Ayrıca önemli görülen hastalık etmenlerinin klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak etmen tanılarını gerçekleştirmek amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Akalın (1952) tarafından yapılan çalışmada, süs bitkileri de dahil 10509 adet bitki türünün bilimsel adlarına ek olarak Türkçe, İngilizce ve Almanca isimleri listelenmiştir. Ayrıca bu bitkilerin önemli bir kısmının şekilleri gösterilmiştir. Çalışmada adı geçen bazı bitki türlerinin Türkçe ve Latince adları bu kaynağa dayandırılmıştır.

Agrios (2005) bitkilerde hastalıklara neden olan prokaryotik patojenleri, Bakteriler ve Mollicute'ler başlığı altında fitopatojen bakterilerin genel özelliklerini ve çağdaş taksonomi içerisindeki yerlerini gösterdikten sonra hastalık belirtilerine göre yedi ayrı alt başlık altında Dünya çapında önemli 43 adet bitki hastalığının bulunuşu, belirtileri, patojenin özellikleri, hastalık seyri ve epidemiyolojisi ile mücadelesi sırasına göre açıklamıştır.

Benzer şekilde Saygılı ve ark. (2006) Fitobakteriyoloji bilimini iki bölüm içinde 14 başlıkta altında detayları ile açıklamışlardır.

Saygılı ve ark. (2008) Türkiye için önemli bitki bakteri hastalıklarından 46 adedini bu hastalıklar konusunda uzmanlaşmış 18 yazar ile birlikte hastalıkların bulunuşu, belirtileri, patojenin özellikleri, hastalık seyri ve epidemiyolojisi ile mücadelesi sırasına göre açıklamışlardır.

2.1. Süs Bitkilerinde Bakteriyel Yaprak Lekeleri ve Yanıklıklar Hakkında Kaynaklar

Engelhard ve ark. (1983) *Pseudomonas cichorii*'nin ilk defa sardunyalarda, karnabaharlarda ve kasımpatı çeşitlerinde hastalık yaptığını ileri sürmüştür. Hastalığa karşı bakırlı preparatlar ve Mancozeb'in kullanılmasını önermişler ise de tek tek veya kombinasyon halinde kullanılan bu fungusitlerin bakteriyel yaprak lekesini önlemede pek fazla etkili olmadıklarını ancak bir ölçüye kadar hastalığı kontrol ettiklerini saptamışlardır.

Chase ve Brunk (1984) *Pseudomonas cichorii*'nin cüce aralya başta olmak üzere yedi ayrı süs bitkisi ile iki salata bitki türünde de hastalık yaptığını saptamışlardır. Ancak cüce aralyanın bu patojene karşı duyarlı olduğu ve önemli ölçüde zarara uğradığı ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Jones ve ark. (1984) *Pseudomonas cichorii*'nin kasımpatı ve sardunya çeşitlerinde neden olduğu yaprak lekelerinin ortam sıcaklığı ve ortamın bağıl nem koşullarına bağlı olarak değiştiğini saptamıştır. 28 °C ortam sıcaklığında patojenin gelişmesinin azaldığı ve yaprak lekelerinde genişlemenin durduğu görülmüştür.

Chase ve Jones (1986) *Schefflera arboricola*'da yaprak lekelerine neden olan *Pseudomonas cichorii*'nin patojenitesini çalışmıştır. İnokule edilen aralya fidelerinde verilen gübrelerin seviyesi (tavsiye edilen 12 g / 10 cm saksıya) arttıkça, oluşan yaprak lekelerinin ve

beneklerinin sayıları ve çapları azalmaktadır. Yine inokule edilen yaprakların yaşları arttıkça lekelerin sayılarının ve çaplarının azalmakta olduğu görülmüştür. Buna karşılık ışık yoğunluğunun patojenin oluşturduğu yaprak lekesi sayısı ve çapını etkilemediğini saptamışlardır.

Dünyanın tropik ve subtropik bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen flamingo çiçeği (*Anthurium andraeanum* L.) İstanbul'da iç mekan bitkisi olarak değerlendirilmekte olup çiçekçiler ve fidanlıklar tarafından sera koşullarında yetiştirilerek muhafaza edilmektedir. Flamingo çiçeğinde bakteriyel yanıklık hastalığına neden olan *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* Sathyanarayana ve ark. (1997) tarafından Hollanda'da, Fukui ve ark. (1999) tarafından da Hawaii'de saptanmıştır.

Dal Bello ve Carranza (1995) Arjantin'de yaptıkları çalışmalarda sardunyalarda %70 oranında yaprak lekelerine ve kurumalarına neden olan bir patojenin *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* olduğu saptanmıştır. Yaprak ayalarının marjinal kesimlerinde damarlarla sınırlı V şeklinde bölgesel kurumalar bu hastalığın en tipik belirtisi olarak bildirilmiştir.

Daughtrey ve ark. (1995) süs bitkilerinde yaprak lekelerine neden olan bakteriyel patojen olarak *Pseudomonas cichorii* ve *Pseudomonas syringae*'yi incelemişlerdir. Her iki patojenin neden oldukları süs bitkilerindeki yaprak leke hastalıkları arasında benzerlikler ve farklılıklar kaydeden araştırmacılar, her iki patojeninde hastalık seyrinde benzerlikler saptamışlardır. Bunlardan *Pseudomonas cichorii* sebzelerde ve süs bitkilerinde hastalık yaparken patojenin değişik izolatları arasında konukçu çevrelerinin de değiştiğini vurgulamışlardır. *P. cichorii* optimum 20-28 °C'de hastalık oluşturabilirken bu patojenin ülkeler veya bölgeler arasında efektif üretim materyalleri ile yayıldığını, bahçe koşullarında ise hastalıklı bireylerden sağlıklı olanlara rüzgarlı havalarda yağmur damla darbeleri veya yağmurlama sulama damla darbeleri ile yayıldığına işaret etmektedirler.

Chase ve ark. (1995) tek ve çok yıllık süs bitkilerinde görülen bakteriyel hastalıkların listelerini vermektedirler. Bunlardan *Pseudomonas cichorii*'nin etkilediği ve bu patojene duyarlı süs bitkileri listesi çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. Ancak listede aralyanın bulunmadığı görülmüştür. *Agrobacterium tumefaciens*'e duyarlı çok sayıda bitki olmasına karşın yazarlar bu patojene ilişkin sadece 19 adet bitki türünü listelemişlerdir.

Alippi (1996) Golden boy çeşidi kerevizlerde saptamış olduğu bakteriyel leke hastalığının aynı zamanda domates, lahana, brokoli, karnabahar, hindiba sebze çeşitleri yanında kasımpatı çiçeklerinde de hastalık yaptığını gözlemlemiştir. Uyguladığı tanı testleri sonucunda patojenin *Pseudomonas cichorii* olduğunu saptamıştır.

Çizelge 2.1. *Pseudomonas cichorii*'nin görüldüğü tek ve çok yıllık bitkiler

Bitkinin Bilimsel Adı	İngilizce Adı	Türkçe Adı
<i>Anthurium sp.</i>	Tailflower	Flamingo çiçeği
<i>Argemone mexicana</i>	Mexican poppy	Dikenli Gelincik
<i>Barleria cristata</i>	Philippine violet	Filipin Menekşesi
<i>Caladium spp.</i>	Elephant's ear	Kaladyum
<i>Calendula officinalis</i>	Pot marigold	Portakal Nergizi, Aynisefa
<i>Capsicum spp.</i>	Pepper (ornamental)	Süs Biberi
<i>Chrysanthemum maximum</i>	Shasta daisy	Kasımpatı
<i>Coreopsis spp.</i>	Tickseed	Kızgözü
<i>Delphinium spp.</i>	Larkspur	Hazeran çiçeği
<i>Chrysanthemum x morifolium</i>	Florists' chrysanthemum	Hibrit Kasımpatı
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Poinsettia	Atatürk çiçeği
<i>Gaillardia pulchella</i>	Blanket flower	Gayardiya
<i>Gazania spp.</i>	Treasure flower	Koyungözü, Gazanya
<i>Geranium spp.</i>	Cranesbill	İtır çiçeği
<i>Gerbera spp.</i>	Transvaal daisy	Papatya
<i>Hedera helix</i>	English ivy	Sarmaşık
<i>Hibiscus spp.</i>	Swamp mallow	Çin gülü
<i>Hydrangea spp.</i>	Hydrangea	Ortanca
<i>Impatiens spp.</i>	Impatiens	Cam güzeli
<i>Jasminum spp.</i>	Jasmine	Yasemin
<i>Justicia spp.</i>	Shrimp plant	Karides çiçeği
<i>Mentha spp.</i>	Mint	Süs Nanesi
<i>Ocimum basilicum</i>	Basil	Fesleğen
<i>Pachystachys lutea</i>	Cardinal's guard	Sarıkarides çiçeği
<i>Pelargonium x hortorum</i>	Zonal geranium	Sardunya
<i>Petunia x hybrida</i>	Petunia	Petunya
<i>Rhododendron spp.</i>	Azalea	Açelya
<i>Rosa spp.</i>	Rose	Gül
<i>Ruscus spp.</i>	Butcher's brom	At dili, Dil dikenli
<i>Salvia spp.</i>	Sage	Ateş çiçeği
<i>Tagetes spp.</i>	Marigold	Kadife çiçeği

Holcomb ve Cox (1998) *Pseudomonas cichorii* patojeninin fesleğen (*Ocimum basilicum*) üzerinde nekrotik yaprak lekelerine neden olduğunu, park ve bahçelerde böyle lekelerin çeşitlere göre sayılarının ve boyutlarının değiştiğini saptamışlardır. Park ve bahçe koşullarında önemsiz gibi görünen bu bakteriyel hastalığın sertifikalı fesleğen fidesi üretimini önemli ölçüde tehdit ettiğini vurgulamışlardır.

Putnam (1999) küçük, çok yıllık yayılıcı park ve bahçelerde tarh çiçeği olarak değerlendirilen Pembe Çiçekli Lobelya (*Lobelia ricardii*) üzerinde de *Pseudomonas*

cichorii'nin şiddetli yaprak yanıklığına neden olduğunu ve özellikle de fidanlıklarda epidemik boyutlarda enfeksiyonlara neden olduğunu saptamıştır.

Obradovic (2002) tarafından yapılan araştırmada Sırbistan'da kavun (*Cucumis melo* L.) ve karpuz (*Citrullus vulgaris* L.)' ların kotiledon yapraklarında sulanma şeklinde başlayan nekrotik yaprak lekelerinin daha sonra sürgünlerde solgunluğa neden olmak suretiyle üründe % 20 oranında verim kayıpları oluşturan bakteriyel bir hastalık olduğu görülmüştür. Yapılan tanı testleri sonucu hastalık etmeni *Pseudomonas cichorii* olarak tanımlanmıştır.

Garibaldi ve ark. (2005) *Pseudomonas cichorii* 'nin İtalya'da alev çiçeği (*Phlox paniculata*)'nde hastalık yaptığını ve yapraklarda kırmızı-kahverengi 1-2 mm çapında lekeler oluşturduklarını saptamışlardır.

2.2. Süs Bitkilerinde Görülen Bakteriyel Kanserler Hakkında Kaynaklar

Çok yıllık süs bitkilerinde bakteriyel kök ve kök boğazı kanserine neden olan *Agrobacterium tumefaciens* en çok bilinen bakteriyel patojen olup süs bitkileri de dahil olmak üzere 93 familyaya ait 200'den fazla otsu ve 400'den fazla odunsu bitki türünde hastalık yapmaktadır. İlk defa Bremer ve ark. (1948) tarafından şeker pancarı kökünde tümör olarak ve asma üzerinde kol kanseri ve kanser tümörü olarak tanımlanmış olup bu hastalık üzerinde daha sonra pek çok araştırmacı çalışma yapmıştır. Nitekim Bremer (1954)'in *Pseudomonas tumefaciens* adını verdiği bu bakteriyel patojen tarafından mazı, kavak, kasımpatı, sardunya ve güllerde oluşturduğunu ileri sürdüğü kök ve kök boğazı kanserlerini gözlemlemiştir. Karaca (1977) ise etmeninin *Agrobacterium tumefaciens* olarak adlandırıldığı bakteriyel kök ve kök boğazı kanserinin, Türkiye'de özellikle genç meyve ağaçlarında görülen önemli bir hastalık olduğunu ileri sürmüştür.. Ancak daha sonra *Agrobacterium tumefaciens*'in Türkiye'de güllerde neden olduğu kök ve kök boğazı kanserinin varlığı ve yaygınlığı Aysan ve Şahin (2003) tarafından bildirilmiştir.

Karaca (1977)'ya göre 1886 yılında İtalya'da Arkangeli tarafından tanımlanan zeytinlerde dal kanseri hastalığının etmeni olan bakteri, 1889 yılında Savastano tarafından izole edilmiş ve *Pseudomonas savastanoi* adı altında Dünya'ya duyurulmuştur. Zeytin dışında bu bakterinin konukçuları olarak Altınçanak (*Forsythia sp.*), Dişbudak (*Fraxinus spp.*), Yasemin (*Jasminum sp.*), bildirilmiştir. Arı ve Çeçen (1961) Türkiye'de zeytin, altınçanak, dişbudak ve yasemine ek olarak bakteriyel dal tümörlerini Leylak (*Syringa spp.*), Kurtbağrı (*Ligustrum vulgare* L.), Zakkum (*Nerium oleander* L.) ve Akçakesme (*Phyllirea angustifolia* L.) türlerinde de görmüşlerdir.

Surico ve ark. (1984) zeytin ve zakkumlarda yaygın olarak görülen dal kanseri etmenini *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* olarak adlandırmakta ve patojen bakterinin

indolasetik asit (IAA) sentezlenmesi sureti ile enfekteli dallarda gal ve tümörleri oluşturduğunu saptamış bulunmaktadırlar.

Surico ve Lavermicocca (1989) *Pseudomonas syringae pv. savastanoi* izolatlarının saprofit bakterilerden çok daha iyi gelişebileceği PVF-1 agar adı altında yeni bir besi yeri formüle etmişlerdir. Zeytinlerden ve zakkumlardan sağlanan 32 farklı strain bu yeni agar ortamı üzerinde % 90 oranında başarılı bir şekilde gelişme göstererek patojenin seri olarak tanısını kolaylaştırmışlardır. Azad ve Cooksey (1995) benzer şekilde çalışma yaparak zakkum dal kanserlerinden izole ettikleri *Pseudomonas savastanoi* izolatları için Oleander Knot Agar (OKA) ortamını hazırlayarak patojenin gelişmesinde % 93.6 oranında başarılı olmuş ve ayrıca % 89- % 96.7 oranlarında saprofit bakterilerin gelişmesini önlemişlerdir.

Bertolini ve ark. (2003) dört farklı RNA virüsü dışında zeytinlerde izole ettikleri *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*'nin kesin tanısı için nested reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) yöntemini geliştirmişlerdir. Benzer şekilde Sisto ve ark. (2004) ise zeytinlerde dal kanserine neden olan *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* hiperplastik simptomlarının oluşumunda hrp/hrc genlerinin etkili olduğu ve bu genlerin bakterinin patojenisitesinde rol oynadığını saptamışlardır.

Mirik ve ark. (2004) tarafından, Türkiye'de değişik illerden toplanan zeytin, zakkum, yasemin, cılbırtı (*Fontonesia phillyreoides*) ve mersin (*Myrtus communis* L.) bitkilerinden izole edilen *Pseudomonas savastanoi*'nin 22 izolatı tanılanmış ve bunlardan 10 izolatin yukarıda sayılan tüm bitki türlerinde patojen olduğu ancak izolatin kendi orijinal konukçusuna inokule edildiğinde daha saldırgan bir davranış sergilediği saptanmıştır.

Penyalver ve ark. (2006) zeytin dal kanserine karşı dayanıklılık araştırmasında tüm zeytin çeşitlerinin *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*'ye karşı duyarlı olduğunu ancak testlenen 29 ayrı çeşide iki farklı patojen ırkına ait iki farklı inokulum dozunun uygulanması sonucunda yüksek düzeyde orta derecede veya düşük düzeyde duyarlılık sergileyen çeşitleri belirlemişlerdir.

Mirik ve Aysan (2008) Türkiye'de zeytin dal kanserinin bulunuşu, belirtileri patojen bakterinin *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*'nin özellikleri hastalık seyri ve epidemiyolojisi ve mücadelesi hususlarını inceleyerek tartışmışlardır. Mücadele için ise hijyenik önlemler yanında bakırlı preparatlarla ilaçlamayı önermektedirler.

Rodriguez-Moreno ve ark. (2008) tarafından gram negatif bitki patojeni *Pseudomonas syringae* türüne ait 50 ayrı patovar incelenerek bunların in-vitro koşullarda mikroüretim yöntemiyle elde edilen zeytin bitkileri üzerinde neden oldukları farklılıkları incelemişlerdir. Sonuçta zakkumlarda kanser tümörlerine neden olan *Pseudomonas*

savastanoi pv. savastanoi' nin, zeytinlerde kanser tümörlerine neden olan *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* türünün bir mutanı olduğu ve birinin diğerinden bir mutasyonla ayrıldığı fonksiyonel genom analizi sonucu kanıtlanmıştır. Böylece zakkumlarda kansere neden olan türün *Pseudomonas savastanoi pv. nerii* olarak adlandırılması gerektiğini ileri sürmüştür. Araştırcılar bu iki türe ait farklılıkları zeytin ile zakkumda oluşan tümörlerin IAA ve sitokinin üretim seviyelerine dayandırmışlardır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi İstanbul ve çevresinde bulunan çeşitli fidanlıklar, park ve bahçeler ile rekreasyon alanları ziyaret edilerek hastalık belirtileri sergileyen bitkiler incelenerek belirtiler tanımlanmış bunlardan 70 adet yaprak, dal, sürgün ve kök örnekleri toplanmıştır. Örnekler toplandıktan sonra uygun bir kağıda sarılmış olarak etiketlenmiş polietilen torbalar içerisinde paketlenerek buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiştir.



Şekil 3.1. İstanbul İli'nde Süs Bitkilerindeki Bakteriye Hastalıklar Üzerinde Alan Çalışması Yapılan İlçeler

3.2. Örneklerle Uygulanan Klasik Tanı Testleri

Bakteriyel hastalık belirtileri gösteren ve İstanbul'un değişik ilçelerinden toplanan bitki materyallerinin her biri primer enfeksiyona neden olan fitopatojen bakterinin tanısı için aşağıda sıralanan testlere tabi tutulmuşlardır.

3.2.1. King B Besi Yerinde Gelişim

Örnekler üzerinde hastalık belirtileri sergileyen dokulardan bistiüri yardımı ile alınan parçalar steril havanda ezilerek bitki özsuvarı elde edilmiş ve King B besı yerine çizilmişlerdir. Çizilen petri kaplarındaki izolatların gelişmesi için petri kapları 24-48 saat süre ile 25 °C'de inkübasyona tabi tutulduktan sonra koloni gelişimine göre değerlendirilmeler yapılmıştır. Petri kaplarında ortaya çıkan koloniler renk, şekil ve boyutlarına göre değerlendirilmeler yapılmıştır. Patogen bakteri olduğu düşünülen koloniler King B besı yerine

yeniden çizilerek saflaştırılmışlardır. Böylece izole edilen bakteriler tanıya dönük diğer testler için eğik agar ortamına alınarak muhafaza edilmişlerdir.

3.2.2. Potasyum Hidroksit Testi (KOH)

Taze hazırlanan % 3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra elimizde bulunan izolatların 48 saatlik kültüründen platin öze ile alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990).

3.2.3. Levan Oluşumu

Nutrient agar ortamına % 5 oranında sakkaroz eklenerek hazırlanan Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine izolatlar çizildikten sonra 25 °C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Kalın, beyaz, konveks, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.4. Oksidaz Testi

Taze hazırlanan % 1'lik N; N; N;N'-Tetramethyl-1.4 phenylene diammonium diclorid eriyiği steril filtre kağıdına damlatılmıştır. Elimizde bulunan izolatların 48 saatlik kültürleri platin öze ile ıslak kurutma kağıdına çizildiğinde 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956).

3.2.5. Pektolitik Aktivite Testi

Patateslerin yüzeysel sterilizasyonu için önce deterjanlı suda fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra % 1'lik NaOCl 'da 3 dakika bekletilmiştir. NaOCl'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemden sonra steril bir bisturi ile kabukları soyulmuştur. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petri içine kabuğu soyulmuş 1 cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu bakteri kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25 °C'de iki günlük inkübasyondan sonra yumuşama yönünden değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.6. Arginin Dehidrolaz Testi

Taze kültür, Thornley 2A ortamının bulunduğu ve otoklavı yapılmış tüpler içerisindeki yumuşak agar içerisine ekilmiştir. Üzerine bir pipet yardımıyla 750 µl gliserol dökülerek hava ile teması engellenmiştir. Daha sonra tüpler inkübatöre koyularak 28 °C'de dört gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu zaman dilimi sonunda açık pembeden kırmızıya doğru bir renk değişimi görülmediğinden sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir (Thornley 1960, Saygılı ve ark. 2006).

3.2.7. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi

Tütün (*Nicotiana tabacum* cv Samsun N) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına söz konusu izolatların 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Klement ve Goodman 1967, Klement ve ark. 1990).

Çizelge 3.1. *Pseudomonas* Türlerinin Tanılanması (Saygılı ve ark. 2006)

Yapılan Testler	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i>
Oksidaz	+	-
Arginin dehidrolaz	-	-
Levan	-	-
Pektolitik Aktivite	-	-
Tütünde HR	+	+

3.2.8. Nişasta Hidrolizasyonu

Niştastanın hidrolizasyonu için litrede 23 g nutrient agar içeren besi yeri içerisine % 2 oranında eriyebilir nişasta ilave edilmiştir. Bunun için 10-20 ml distile suda eritilen nişasta ısıtılarak çözüldükten sonra nutrient agara ilave edilmiş ve 121 °C'de 15 dakika otoklav edilip steril petrilere dökülmüştür. Besi yerine çizilen izolatlar ve orijinal bakteri kültürleri 7-14 gün 25 °C'de inkübasyondan sonra kültürler üzerine lugol eriyiği (1 g iyot ve 2 g KI 300 ml distile suda eritilmiştir) dökülmüştür. Niştastanın hidralizasyonu şerit şeklindeki bakteri kolonisinin etrafında meydana gelen boyanmamış alanın izlenmesiyle saptanmıştır. (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.9. Katalaz Reaksiyonu

Litrede 23 g nutrient agar ile hazırlanan ortam 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra steril petrilere dökülmüştür. 36-48 saatlik izolatlar ve orijinal bakteri kültürleri petrilere zigzag şeklinde çizilmiş ve 25 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerlerine 1 ml % 3'lük hidrojen peroksit dökülmüştür (Solüsyon taze olarak hazırlanmamış ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir.) Pozitif reaksiyonda birkaç saniye içinde katalaz aktivitesi sonucu açığa çıkan oksijen kabarcıkları gözlenmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.10. Patojenite Testleri

Hasta zakkum bitkilerinden izole edilen bakteri izolatlarının 36-48 saatlik bakteri kültürleri, zakkum bitkisinin steril koşullarda ve saksılarda yetiştirilmiş bir yaşlı bitkilerinin gövdelerinde steril bir bisturi ile kesilip açılan yarıklara steril bir kürdan vasıtasıyla sürülmüştür. Daha sonra destile suda ıslatılmış steril pamuk ile daha sonra da parafin kağıdı ile sarılmış ve bu kısımlar hastalık belirtisi olan tümörler gelişinceye kadar gözleme tabi

tutulmuştur. Bir buçuk iki ay veya daha uzun zaman diliminde oluşan tümörlerden tekrar izolasyon yapılarak re-izolatlar elde edilmiştir.

Saflaştırılan re-izolatlar tekrar konukçu bitkiye inokule edilerek bu izolatların patojen olup olmadıkları gözlenmiştir. Elde edilen re-izolatlar tanı çalışmalarında kullanılmak üzere eğiş besisi yerine (Ek 1) alınarak + 4 °C’de saklanmıştır. Böylece Koch postulatları gerçekleştirilmiştir.

Alan çalışmaları esnasında Aralya bitkilerinden elde edilen bakteri izolatu 36-48 saatlik süre ile King B besiyerinde çoğaltıldıktan sonra patojenite testlerine tabi tutulmuştur. Bu amaçla *Schefflera arboricola* bitkisinin steril koşullarda ve saksılarda yetiştirilmiş iki yaşlı bitkilerinin her birinin sekizer yaprakçıktan oluşan bileşik yaprakları ele alınmıştır. Kültürden alınan bir öze dolusu bakteri 100 ml saf su içerisinde seyreltikten sonra elde edilen bakteri inokulumu 10 ml’lik (Ayset marka) veya 5 ml’lik (Set marka) enjektörler yardımıyla yaprakçıkların her birinin alt yüzeyine yaprakçıklardaki hücreler arası boşluklar tamamen dolacak şekilde verilerek birinci inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Bu yaprakçıklarda oluşan lekelerden izolasyon yapılarak re-izolatlar elde edilmiş ve tekrar sağlıklı konukçu bitkiye verilerek ikinci inokulasyon yapılmıştır.

Alan çalışması esnasında Benjamin kauçuğu ve Defne bitkisinden elde edilen bakteri izolatları yine 36-48 saat süre ile King B besiyerinde çoğaltıldıktan sonra yine bir öze dolusu bakteri kültürünün 100 ml saf su ile seyreltilmek sureti ile elde edilen inokulum steril koşullarda saksıda yetiştirilmiş, bir yaşlı fidanların yapraklarına 1 lt hacimli steril pompalı el pülverizatörü ile püskürtülerek inokulasyon gerçekleştirilmiştir.

Alan çalışması esnasında Pitosporum ve Gardenya bitkilerinden izole edilen bakteri izolatının 36- 48 saatlik kültürü bir öze dolusu 100 ml saf su ile seyreltilerek inokulum elde edilmiştir. Tekirdağ Belediye fidanlığından sağlanan sağlıklı birer adet saksılı Pitosporum ve Gardenya bitkilerinin yapraklarına 500 mesh’lik karborandum serpilerek steril tülbent bez parçası ile yapraklar aşındırılmıştır. Daha sonra bakteri inokulumu pompalı el pülverizatörü ile püskürtülerek inokulasyon gerçekleştirilmiştir.

Alan çalışması esnasında süs elmasının kök boğazındaki tümörlerden izole edilen bakteri izolatının 36-48 saatlik kültürü alınmıştır. Üç adet sağlıklı taze havuç kökleri yüzeysel sterilizasyon için % 1’lik NaOCl’de 10 dakika bekletilmiş ve her bir havuçtan birer cm kalınlığında üçer dilim kesilmiştir. Saf su ile nemlendirilmiş kurutma kağıtları kaplı 9 adet petri kabına havuç dilimleri numaralandırılarak yerleştirilmiştir. Havuç dilimlerinin üzerine steril kabin içerisinde bakteri kültürü öze ile sürülerek inokulasyonlar yapılmış ve petri kapları 25 °C ’de iki hafta boyunca inkübe edilerek patojen bakterinin gelişmesi izlenmiştir.

Alan çalışması sırasında hasta sardunya bitkilerinden elde edilen izolatların 36-48 saatlik kültürleri sağlıklı sardunya bitkilerinden alınan çeliklere steril kürdan yardımıyla verilmiştir. Bakteri aşılama bu çelikler, içerisinde saf su bulunan beherlere koyulup iklim odasına yerleştirilmiş ve yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süre ile polietilen torba içerisinde bekletilmiştir. Bu zaman dilimi sonunda torbalar çıkartılarak hastalık belirtileri gözlenmiştir.

3.3. Moleküler Tanı Testleri

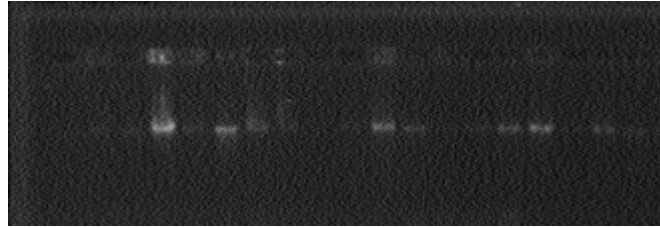
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Nerium oleander'den alınan ve *Pseudomonas savastanoi pv. nerii* olduğu düşünülen izolatlar, Dr. Cindy Moris'ten alınan CFPB 1672 kodlu referans izolatı ile mukayese için DNA'ları De Boer ve Ward (1995)'in *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* için geliştirdikleri yöntemle göre izole edilmişlerdir. Bu yöntem:

- 1- 48 saatlik bakteri kültürü Nutrient Broth sıvı besiyeri yerine (Ek 1) aşılama için 24 saat geliştirilmiştir.
- 2- Bakteri süspansiyonunda 2,75 gr ependorf tüpüne alınmış ve tüplerin ağırlıkları dengelenerek 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet alınarak süpernatant atılmıştır.
- 3- Pellet üzerine hücre parçalanmasını sağlamak amacıyla % 1'lik SDS (Sodium dodecyl sülfat) içeren Tris-EDTA bufferdan (Ek 2) 100 µl eklenmiş ve tüp karıştırıcısında karıştırılarak tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.
- 4- Ependorf tüpleri 50 °C'deki su banyosunda 3 saat süre ile bekletilmiştir.
- 5- Isı ile muamele edilmiş örnekler 7,5 M Amonyum asetat (Ek 2) (1 ölçüğe yarım ölçük olacak şekilde) eklenerek karıştırılmıştır.
- 6- 14.000 rpm'de santrifüj edilerek amonyum asetat artıklarının altta toplanması sağlanmıştır.
- 7- Üstte kalan süpernatant içindeki DNA alınarak (yaklaşık 130 µl) yeni bir ependorf tüpüne aktarılmıştır.
- 8- Süpernatanta eşit miktarda (yaklaşık 130 µl) derin dondurucuda soğutulmuş isopropanol eklenmiştir.
- 9- Ependorf tüpleri derin dondurucuda 45 dakika süre ile bekletilmiştir.
- 10- 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek pellet alınmıştır.
- 11- Soğutulmuş % 70'lik alkolden 100 µl ependorf tüplerine eklenerek 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve alkolle yıkanmıştır.

12- Ependorf tüplerinden alkol dökülerek steril kabinde bir saat kurumaya bırakılmış ve daha sonra ependorfların içerisine 50 µl bidestile su (ddH₂O) eklenerek tüp karıştırıcısında karıştırılmıştır.

Elde edilen DNA moleküllerini jel üzerinde görmek için % 1'lik Agarose jel (Ek 2) hazırlanmıştır. 0.9 g agarose üzerine 90 ml 1xTAE (Ek 2) buffer eklenerek mikrodalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Daha sonra içerisine taraklar yerleştirilen jel tepsisine dökülmüş ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hazırlanan Agarose jel, içeriside 1xTBE buffer (Ek 2) bulunan jel tankına konularak, jel tarakları dikkatle çıkartılmıştır. İzole edilen DNA molekülleri jele yüklenerek Transilluminatörde bantların görüntüsü elde edilmiştir. Elde edilen bakteri DNA'sının ve PCR ürünlerinin Agarose Jel Elektroforezine yüklenmesine yönelik çalışmalar Sambrook ve ark. (1989)'a göre yapılmıştır.



Şekil 3.2. DNA ekstraksiyonu sonucunda % 1'lik Agarose jelde elde edilen DNA moleküllerine ait bantlar

3.3.2. PCR Testi

İzole edilen her bir izolata ait DNA moleküllerinden 2 µl alınarak 0,5 ml'lik ependorf tüplere konulmuştur. Çizelge 3.2.'de görüldüğü üzere Master mix karışımdan 14.5 µl, 9.5 µl H₂O (Nuclease free water) ve 2 µl primer PSS1, 2 µl primer PSS2'den olmak üzere her bir izolata ait ependorf tüplerin her birine toplam 30 µl PCR bileşenleri konulmuştur. Primer PSS1 ve PSS2 primerlerinin dışında Primer PSS3, PSS4 Ersoy (2002) ve Primer IAAR, IAAF Penyalver ve ark. (2000) primerleri olmak üzere üç farklı primerlerle PCR çalışmaları yürütülmüştür. Hazırlanan PCR bileşenleri Techne marka PCR cihazına konulmak suretiyle PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon için program 1 döngü 94 °C'de 5 dakika, 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 62 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 30 saniye ve son olarak 1 döngü 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde uygulanmıştır (Penyalver ve ark. 2000; Ersoy 2002). PCR işleminden sonra hazırlanan reaksiyon karışımları 8 µl, DNA marker ise 6 µl olacak şekilde Agarose jele yüklenerek 70 miliamperde yarım saat yürütülmüştür. Bantların jel üzerinde görüntülenmesi için etidium bromid (10 mg/ml) ile boyama yapılarak 10 dakika

bekletilmiştir. Daha sonra 15 dakika saf su ile yıkanan jel Uvitec marka Transilluminatörde (302nm) ortaya çıkan bantların fotoğrafları çekilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR İşleminde Kullanılan Reaksiyon Karışımının İçeriği

Reaksiyon Karışımının İçeriği	Miktarı (µl)
PCR Master Mix	14.5
Primer 1	2.0
Primer 2	2.0
H ₂ O (Nuclease free water)	9.5
g-DNA	2.0
Toplam	30

3.3.3. Yağ Asit Profillerinin Elde Edilmesi ve Tanı Amacı ile Değerlendirilmesi

Enfekteli zakkum örneklerinden izole edilen ve dal kanserine neden olan *Pseudomonas savastanoi pv. nerii*'nin kesin tanısını sağlamak üzere patojenite ve PCR testi ile doğrulanmış olan, Fatih ilçesinden alınan bir adet zakkum izolatının yağ asit profillerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Laboratuvarında yürütülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Alan Tarama Bulguları

2008 yılında gerçekleştirilen bu çalışma kapsamı içerisinde İstanbul ilinin şekil 3.1.'de gösterilen Bağcılar, Bakırköy, Fatih, Esenler, Eyüp, Sarıyer, Silivri, Şile, Şişli, Üsküdar ve Zeytinburnu ilçelerinde yapılan gözlemler sonucunda çizelge 4.1.'de gösterilen süs bitkilerinde karakteristik bakteri hastalık belirtileri incelenmiş ve enfekteli bitkilerden örnekler alınmıştır.

Çizelge 4.1. İstanbul ilinin değişik ilçelerinde bakteriyel hastalık belirtisi gösteren bitki türleri ve toplanan örnek sayıları

İlçe Adı	Tür Adı	Hasta Bitki Sayısı	Örnek Sayısı
Bakırköy	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	6	-
Bağcılar	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	-	-
Fatih	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	25	10
	Manolya (<i>Magnolia grandifolia</i>)	3	3
	Sardunya (<i>Pelargonium zonale</i>)	50	5
Esenler	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	15	5
Eyüp	Aralya (<i>Schefflera arboricola</i>)	4	4
	Benjamin kauçuğu (<i>F. benjamina</i>)	2	2
	Flamingo çiçeği (<i>A. andraeanum</i>)	3	3
	Pitosporum (<i>Pitosporum sp.</i>)	8	5
	Sardunya (<i>Pelargonium zonale</i>)	10	6
	Süs elması (<i>Malus floribunda</i>)	6	4
Sarıyer	Defne (<i>Laurus nobilis</i>)	5	3
	Mahonya (<i>Mahonia sp.</i>)	1	1
	Vangelya (<i>Vangelia sp.</i>)	2	2
	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	5	5
Silivri	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	30	9
Şile	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	4	-
Şişli	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	10	-
Üsküdar	Gardenya (<i>Gardenia sp.</i>)	1	1
	Manolya (<i>Magnolia grandifolia</i>)	2	2
Zeytinburnu	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)	10	-
Toplam		202	70

Parklar, bahçeler, yol kenarları, refüjler ve fidanlıklar gezilerek değişik türlerdeki süs bitkilerinde saptanan bakteriyel enfeksiyonları ve sergiledikleri çarpıcı hastalık belirtileri bulunan örnekler materyal olarak değerlendirilmiştir. Sürveyler esnasında hasta bitkilerden örnekler alındığı gibi renkli fotoğrafları da çekilmiştir.

Şekil 4.1. ve şekil 4.2.'de zakkumların çiçek ve sürgünlerinde, şekil 4.3.'de yapraklarında ve şekil 4.4.'de ise gövde ve dallarında görüldüğü gibi hiperplastik belirtilerden

urlar ve tümörlere sıklıkla rastlanmıştır. Böyle hastalıklı zakkumlardan patojen bakteriyi içeren tümör ve bitki doku örnekleri alınmıştır.



Şekil 4.1. Fatih ilçesinde Atatürk Bulvarı üzerinde dikili zakkumlarda saptanan kanser tümörleri.



Şekil 4.2. Sarıyer ilçesinde özel bir kuruluşa ait fidanlıkta zakkum sürgün ve çiçeklerinde oluşan kanser tümörleri



Şekil 4.3. Zeytinburnu Adliyesi' nin önünde bulunan zakkum yapraklarındaki tümörler



Şekil 4.4. Esenler şehirlerarası otoparkında beton-taş çiçekliklerde yetiştirilen zakkumlardan alınan bakteriyel tümör örnekleri

Manolya ağaçlarında ve fidanlarında ise bakteriyel yaprak lekeleri dikkati çekmekte olup şekil 4.5. ve şekil 4.6.'da sergilendiği gibi söz konusu ağaçlarda ve fidanlarda kaliteyi olumsuz yönde etkilemektedir.



Şekil 4.5. Üsküdar ilçesindeki bir fidanlıkta bakteriyel yaprak lekeleri sergileyen Manolya fidanları



Şekil 4.6. Manolya fidanında bakteriyel yaprak lekelerinin yakından görünümü

İç mekan süs bitkilerinden Aralya'da ise özellikle fidanlıkların seralarında yetiştirilme aşamasında karşılaşılan bakteriyel yaprak lekelerinin daha sonra tüm bitki yapraklarında sararma ve kloroza dönüştüğü dikkati çekmiştir. Ancak fidan kalitesini önemli ölçüde düşüren böyle lokal bakteriyel yaprak lekelerinin fidan kayıplarına neden olmadığı saptanmıştır. Özellikle salon süs bitkisi olarak değerlendirilen Gardenya (*Gardenia jasminioides*)'nın bakteriyel yaprak lekeleri sergileyen bazı örneklerine özel fidanlıklarda rastlanmıştır. Şekil 4.7. ve şekil 4.8.'de dikkati çekeceği gibi bu bitkinin hastalıklı fidanlarında yaprak lekelerine ek olarak kloroz ve cücelik belirtilerine de rastlanmıştır.



Şekil 4.7. Gardenya'da bakteriyel yaprak lekeleri ve klorozun yakından görünüşü



Şekil 4.8. Saksılı Gardenya fidanında bakteriyel yaprak lekeleri, kloroz ve cücelik belirtileri

Dış mekan bitkilerinden Defne (*Laurus nobilis* L.)’de bakteriyel enfeksiyon sonucu oluşan yaprak lekelerinin yanında kloroz ve yaprakların marjinal kesimlerinden itibaren kurumalar dikkati çekmektedir. Şekil 4.9.’da görüleceği gibi her dem koyu yeşil olarak bilinen defnenin kloroz ve yaprak lekeleri yanında gelişme noksanlığı ve cücelikte dikkati çekmektedir.



Şekil 4.9. Bakteriyel yaprak lekelerinden etkilenmiş olan Defne çalısında kloroz ve yapraklarda marjinal kurumalar

İstanbul’un en önemli mekanlarından Topkapı Sarayı’na giriş yolu boyunca sıralanmış olan Sardunya (*Pelargonium zonale*)’larda yaprakların “V” şeklinde nekrotik olarak kurumaları sonucu bitkilerde gelişme noksanlığı ve kurumalar dikkati çekmektedir. Şekil 4.10. ve şekil 4.11.’de gösterildiği gibi iki farklı sardunya türünde gözlenen bakteriyel yaprak lekeleri ve “V” şeklinde kurumalar bu süs bitkisinin İstanbul ilçelerinin pek çok yerinde bakteriyel enfeksiyonlardan etkilendiğini göstermektedir.



Şekil 4.10. Bakteriyel enfeksiyon sonucu Sardunya yapraklarında “V”şeklinde kenarlardan merkeze doğru kurumalar ve buna bağlı olarak sürgün ve çiçek kurumaları



Şekil 4.11. Sağlıklı yapraklar arasında bakteriyel enfeksiyona maruz kalmış Sardunya yaprağı

4.2. Klasik Tanı Testleri Bulguları

Alan taraması esnasında toplanan 70 adet hastalıklı bitki materyallerinden izole edilen patojen bakteri izolatlarının tanılanmaları amacı ile uygulanan 9 ayrı klasik test sonuçları çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. İstanbul ve çevresinden toplanan süs bitki örneklerine uygulanan klasik test sonuçları

Testlenen Örnekler	Uygulanan Testler ve Bulgular								
	Levan	Oksidaz	Pektolitik Aktivite	Arginin	Tütün (HR)	Nişasta	Katalaz	KOH	Patojenite
Silivri-zakkum	-	-	-	-	+			-	-
Silivri-zakkum7	-	-	-	-	+			-	-
Otogar-zakkum1	-	-	-	-	+			-	-
Otogar-zakkum 2	-	-	-	-	+			-	+
Fatih-zakkum 1	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 2	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 3	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 4	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 5	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 6	-	-	-	-	+			-	+
Fatih-zakkum 2a1	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 2a2	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 2b1	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 2b2	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 6a1	-	-	-	-	+			-	+
Fatih-zakkum 6a2	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 6b1	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 6b2	-	-	-	-	+			-	-
Otogar-zakkum 2a1	-	-	-	-	+			-	-
Otogar-zakkum 2a2	-	-	-	-	+			-	-
Otogar-zakkum 2b1	-	-	-	-	+			-	-
Otogar-zakkum 2b2	-	-	-	-	+			-	-
Fatih-zakkum 6a1a	-	-	-	-	+			-	
Fatih-zakkum 6a1b	-	-	-	-	+			-	
Aralya-Eyüp 1	-	+	-	-	+			-	-
Aralya-Eyüp 2	-	+	-	-	+			-	-
Aralya-Eyüp 3	-	+	-	-	+			-	-
Aralya-Eyüp 4	-	+	-	-	+			-	+

Çizelge 4.2.'nin devamı

Aralya-Eyüp 1a	-	+	-	-	+			-	+
Aralya-Eyüp 1b	-	+	-	-	+			-	-
Aralya-Eyüp 1c	-	+	-	-	+			-	-
Aralya-Eyüp 1d	-	+	-	-	+			-	-
Aralya-Eyüp 1a1	-	+	-	-	+			-	
Aralya-Eyüp 1a2	-	+	-	-	+			-	
Benjamin-Eyüp1/1	-	+	-					-	-
Benjamin-Eyüp1/2	-	+	-					-	-
Benjamin-Eyüp2/1	-	+	-					-	-
Pitosporum-Eyüp1/1	-	+	-					+	-
Pitosporum-Eyüp1/2	-	+	-					+	-
Pitosporum-Eyüp1/3	-	+	-		-			-	-
Pitosporum-Eyüp1/4	-	+	-		-			-	-
Manolya-karaleke-Eyüp1/1	-	+	-		-			-	
Manolya-karaleke-Eyüp2/1	-	+	-		-			-	
Manolya-açıkyeşil-Eyüp1/1	-	+	-		-			-	
Manolya-Üsküdar1	-	+	-			+	+	-	
Manolya-Üsk.2/1	-	+	-			-	+	-	
Manolya-Üsk.2/2	-	+	-			+	+	-	
Mahonya	-	+			-			-	
Gardenia-Üsk. 1/1	-	+	-			+	+	-	-
Gardenia-Üsk. 1/2	-	+	-			+	+	-	-
Gardenia-Üsk. 2/1	-	+	-			+	+	-	-
Gardenia-Üsk. 2/2	-	+	-			+	+	-	-
Gardenia-Üsk.2/3	-	+	-			+	+	-	-
Defne- Fatih 2/1	-	+			-			-	-
Defne- Fatih 2/2		-						+	
Defne- Fatih 1/2		-						+	

Çizelge 4.2.'nin devamı

Defne-Fatih1/3	-	+			-			-	-
Defne-sarıyer3/15/2								+	
Defne-sarıyer12/2								+	
Anthurium-Eyüp1/1	-	+	-		-			-	
Anthurium-Eyüp2/1	-	+	-		-			-	
Vangelia-sarıyer1/1/1		+					-	-	
Vangelia-sarıyer1/1/2		+					-	-	
Vangelia-sarıyer1/2/1		+					-	-	
Vangelia-sarıyer1/2/2		+					-	-	
Sakız sard.-Fatih	+	+				+	+	-	-
Sardunya-Fatih	+	+				+	+	-	-
Sakız sardunya-Eyüp2/1	-	+	-					-	-
Sardunya-Eyüp2/1	-		-					-	-
Sardunya-Eyüp2/2	-		-					-	-
SüsElması-Eyüp 1/1								-	+
SüsElması-Eyüp 1/2								-	+

Alan taraması sırasında toplanan şüpheli örneklerden alınarak hazırlanan süspansiyon öncelikle King B besi yerine ekilmiş ve inkübasyon sonucunda ortaya çıkan koloniler incelenmiştir. Bu koloniler renk, şekil ve boyutlarına göre ayırt edilerek şüpheli kolonilerden saflaştırma yapılmıştır. Buna göre zakkum örneklerinin tamamına 7 klasik test uygulanmış olup bütün izolatlar KOH testi sonucunda gram negatif çıkmışlardır. Levan, Oksidaz, Pektolitik aktivite, ve Arginin testlerinden negatif sonuç alınmıştır. Tütünde aşırı duyarlılık testleri ise tüm izolatlar da pozitifdir. Ayrıca Koch postulatlarına göre birinci inokulasyonda Esenler ve Fatih'ten alınan iki örnekte, ikinci inokulasyonda ise sadece Fatih'ten alınan izolatta şekil 4.12.'de görüldüğü gibi olumlu sonuç alınmıştır.

Toplanan Aralya örneklerinden izole edilen bakteri izolatlarına uygulanan 7 ayrı klasik test sonucunda izolatların tamamı gram negatif olarak saptanmış olup Oksidaz ve tütünde yapılan aşırı duyarlılık testi pozitif iken Levan, Pektolitik Aktivite ve Arginin testleri negatif sonuç vermiştir. Patogenite testine tabii tutulan bu izolatlardan Eyüp'ten alınan örneklerden bir tanesinde Koch Postulatlarının 3. ve 4. aşamasında olumlu sonuç alınmıştır.



Şekil 4.12. Fatih ilçesinden alınan zakkum örneğinden sağlanan izolatın patojenite testi sonucu neden olduğu tümör belirtisi



Şekil 4.13. Eyüp ilçesinden alınan Aralya örneğinden izole edilen bakteri izolatının patojenite testi sonucunda sağlıklı Aralya yaprakçıklarında oluşturduğu klorotik sarı lekeler

Çizelge 4.1.'de sıralanan Benjamin kauçuğu, Pitosporum, Manolya, Gardenya, Defne, Vangelya, Sardunya ve Sakız sardunyasından izole edilen bakteri izolatlarına klasik testlerin uygulanması sonucu patojen bakterilerin bazıları tespit edilmiş ancak bu izolatların patojenite testlerinde başarılı olunamamıştır. Öte yandan süs elmasından izole edilen kök boğazı kanseri etmeninden havuç dilimlerine yapılan patojenite testi şekil 4.14.'te görüldüğü gibi olumlu sonuç vermiştir.

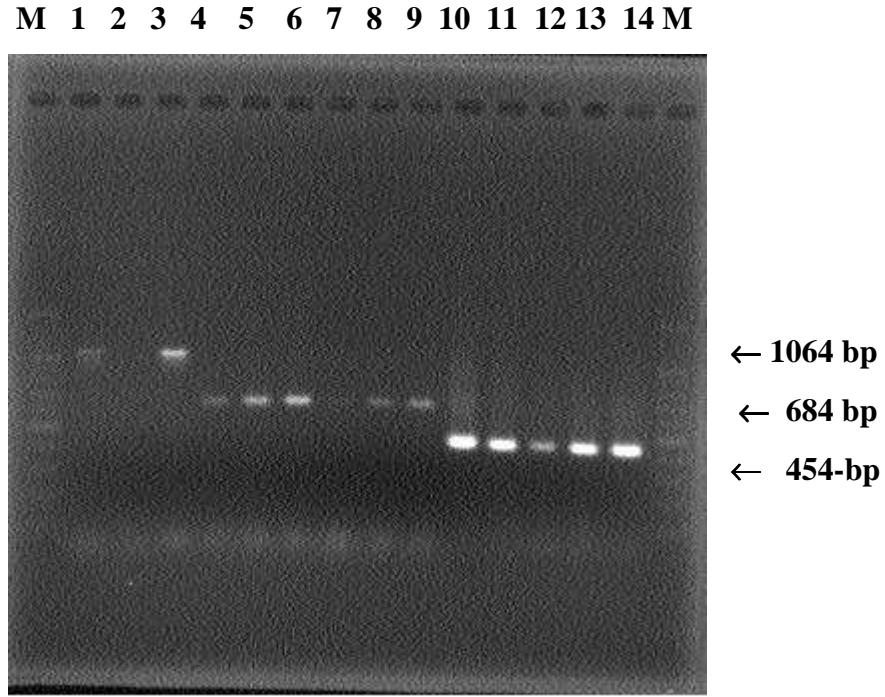


Şekil 4.14. Eyüp ilçesinde süs elmasından alınan bakteri izolatının havuçta yapılan patojenite testi sonucu oluşan urların görünümü

4.3. Moleküler Test Bulguları

Klasik testler sonucu patojenite testlerinde olumlu sonuç vermiş olan zakkum izolatının kesin tanısını doğrulamak amacıyla moleküler testlerden PCR testi uygulanmıştır. PCR çalışmasında, Fatih ilçesindeki yaprak, sürgün, çiçek ve dallarda kanser tümör belirtileri sergileyen zakkum bitkileri ile aynı izolatın patojenite testleri sonucunda elde edilen izolatlar örnek materyal olarak kullanılmıştır. 3 farklı *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* primeri kullanılarak yapılan PCR testi sonucunda elde edilen DNA moleküllerine ait bantlar şekil 4.15.'de görülmektedir. PSS3 ve PSS4 primerleri (Ersoy 2000)'nin kullanıldığı 1 ve 3 numaralı örneklerde 1064 bp'lik bir bant elde edilirken, PSS1 ve PSS2 primerleri (Ersoy 2000)'nin kullanıldığı 4,5,6,8,9 numaralı örneklerde ise 684 bp'lik bir bant oluştuğu görülmüştür. PCR amplifikasyonunda IAALF ve IAALR primerleri (Penyalver, 2000)'nin kullanıldığı 10,11,12,13,14 numaralı örneklerde ise 454 bp'lik keskin bir bant elde edilmiştir.

Bu sonuçlar 3 farklı primer setleriyle yapılan PCR amplifikasyonunda patojenin *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.15. PCR sonucu *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ile enfekteli zakkum örneklerine ait moleküler bantlar (M: Marker; 1-14 zakkum örnekleri)

4.4. Yağ Asit Profillerine Ait Bulgular

Fatih ilçesinden alınan bir adet zakkum izolatu için yapılan yağ asit profillerine ait test sonuçları patojenin *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olduğunu göstermiştir. Bu test sonucunda patojende 17 farklı yağ asitleri izole edilmiştir.

4.5. Tanı Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Alan çalışması esnasında gözlemlenen belirtiler, klasik test sonuçlarına göre tanılanan patojen bakteri türlerinin adları çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Bunlardan zakkumda saptanan *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*'nin tanısı moleküler testlerle de doğrulandığı için kesinleşmiş bulunmaktadır. Aralya üzerinde tanılanan *Pseudomonas cichorii* ve Süs elması üzerinde tanımlana *Agrobacterium tumefaciens*'de gözlenen belirtiler ve klasik test sonuçlarına ek olarak patojenite testi ile de doğrulanmış bulunmaktadır. Diğer süs bitkilerinden izole edilen patojen bakterilerin ise tanıları cins düzeyinde kalmış olup tür ve pathovar seviyesindeki tanıları için patojenite testleri dışında diğer moleküler testlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 4.3. İstanbul ve çevresinde bazı süs bitkileri üzerinde saptanan bakteriyel hastalıkların etmen tanı sonuçları

Konukçu süs bitkisinin adı	Patojenin adı	Tanı yöntemi
<i>Nerium oleander</i> (Zakkum)	<i>Pseudomonas savastanoi</i> <i>pv. nerii</i>	Simptomatolojik, klasik, moleküler
<i>Schefflera arboricola</i> (Aralya)	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Malus floribunda</i> (Süs elması)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Pelargonium zonale</i> (Sardunya)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Ficus benjamina</i> (B. Kauçuğu)	<i>Pseudomonas sp.</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Magnolia grandifolia</i> (Manolya)	<i>Xanthomonas sp.</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Pitosporum sp.</i> (Pitosporum)	<i>Pseudomonas sp.</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Gardenia sp.</i> (Gardenya)	<i>Xanthomonas sp.</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Laurus nobilis</i> (Defne)	<i>Clavibacter sp.</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Anthurium andraeanum</i> (F. Çiç.)	<i>Pseudomonas sp.</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Mahonia sp.</i> (Mahonya)	<i>Xanthomonas sp.</i>	Simptomatolojik, klasik
<i>Vangelia sp.</i> (Vangelya)	<i>Xanthomonas sp.</i>	Simptomatolojik, klasik

5. TARTIŞMA

Türkiye’de İstanbul ilinin şekil 3.1’de gösterilen değişik ilçelerinde gerçekleştirilen alan çalışmaları sonucunda süs bitkilerindeki bakteriyel hastalıkların neler oldukları araştırılmıştır.

Bu bağlamda şekiller 4.1., 4.2., 4.3. ve 4.4.’de sergilendiği gibi farklı mekanlarda zakkumların değişik dokularında kanser tümörleri saptanmıştır. *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*’nin neden olduğu kanser tümörlerine, zakkumun Türkiye’de süs bitkisi olarak üretildiği bölgelerde bulunduğu Bremer (1954), Arı ve Çeçen (1961), tarafından da bildirilmiştir. Gözleme dayalı bu bulgular çizelge 4.2.’de listelendiği gibi klasik bakteriyel tanı yöntemleri ile tanılanmış olup, çizelge 4.3.’de listelendiği şekilde de moleküler yöntemlerle de doğrulanmıştır. Her bakteriyel hastalıkta etmen tanısı için uygulanan klasik tanı yöntemleri Lelliott ve Stead (1987), Azad ve Cooksey (1995), Mirik ve Aysan (2004) ile Saygılı ve ark. (2006) tarafından önerildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Ancak moleküler testler için Bertolini ve ark. (2003)’da izlenen yöntem kullanılmıştır.

Sonuç olarak İstanbul ve çevresindeki zakkumlarda şekil 4.12.’de patojenite testi ve PCR test sonuçlarına dayanarak kanser tümörlerine neden olan patojen bakterinin *Pseudomonas savastanoi pv. neri* olarak tanılanmıştır. Elde edilen bu sonuç, Rodrigues ve ark. (2008)’nin değerlendirmeleri doğrultusunda yaptıkları ayrı tür isimlendirmesine de uygun düşmüştür.

Çizelge 4.2. ve çizelge 4.3.’de listelendiği gibi Aralya’da tanılanan klorotik sarı yaprak lekelerine neden olan ve bitkinin yaprakçıklarını zamanından önce yaşlanmasına ve dökülmesine neden olarak iç mekandaki estetik güzelliğini yok eden bir hastalıktır. Şekil 4.13.’de patojenite test sonucu da sergilenen bu bakteriyel yaprak lekeli hastalığının etmeni olarak *Pseudomonas cichorii* olarak tanılanmış bulunmaktadır. Söz konusu süs bitkisinde saptanan bu hastalığa daha önceki çalışmalardan değişik ülkelerde değişik süs bitkilerinde ve sebzelerde de görüldüğü Chase ve Brunk (1984), Engelhard ve ark. (1983), Jones ve ark. (1984), Obradovic (2002) ve Putnam (1999) tarafından da rapor edilmiş bulunmaktadır.

Çizelge 4.2. ve çizelge 4.3.’te listelendiği gibi süs elmasında tanılanan kök boğazı kanseri etmeni *Agrobacterium tumefaciens*, simptomatoloji ve klasik testler yanında şekil 4.14.’de sergilendiği gibi havuç diliminde patojenite testi ile de tanılanmış bulunmaktadır. Hastalık çok geniş bir konukçu çevresinde Türkiye’nin değişik yörelerinde Bremer (1954) ve Aysan ve Şahin (2003) tarafından da saptanmış olup bu hastalığın İstanbul’da da süs elmasında bulunduğu ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Şekil 4.2.'de listelendiği gibi Benjamin kauçuğu ve Pitosporum da İstanbul ve çevresinde süs bitkisi olarak yetiştirilen ve değerlendirilen bitkilerdir. Söz konusu bu bitkilerin yapraklarında yaprak lekelerine neden olan gram negatif bir bakterinin *Pseudomonas sp.* olarak tanısı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca şekil 4.6. Manolya ve şekil 4.7. Gardenya da sergilenen bakteriyel yaprak lekelerine neden olan patojen ancak *Xanthomonas sp.* türleri ancak simptomatolojik olarak ve sadece klasik tanı testlerinin bazıları ile tanılanabilmiştir. Bu konuda daha detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Benzer şekilde çizelge 4.2. ve 4.3.'de listelendiği gibi Defne'de İstanbul'un önemli bir süs bitkisidir. Şekil 4.9.'da yaprak lekeleri, kloroz ve yaprak kuruma belirtileri ile tanılabilen bakteriyel enfeksiyonun etmen tanısı da bazı klasik bakteri testleri ile doğrulanmış olup, gram pozitif *Clavibacter sp.* türü bir patojenden etkilendiği gibi gram negatif bir diğer bakterinin de enfeksiyonda rol oynadığı saptanmıştır.

Öte yandan Bremer (1954) tarafından Türkiye'nin değişik yerlerinde bulunduğu bildirilen Sardunya'daki yaprak lekeleri ve kurumalar İstanbul'un en önemli mekanlarından Topkapı Sarayı bahçelerinde rastlanmış olup, patojeni *Xanthomonas campestris* izolatu simptomatoloji ve bazı klasik yöntemler ile tanılanmıştır. Sardunya üretilen Dünya'nın hemen her yerinde görülen bu hastalığın Arjantin'de bulunuşu da Dal Bello ve Carranza (1995) tarafından bildirilmiş bulunmaktadır.

Çizelge 4.2. ve çizelge 4.3.'de gösterilen Vangelya ve Mahonya'da da *Xanthomonas sp.*'nin neden olduğu yaprak lekeli hastalığı da bu çalışma ile ilk defa saptanmıştır.

Halen İstanbul'da saksılı iç mekan bitkisi olarak değerlendirilen ve ekzotik bir süs bitki türü olan Flamingo çiçeği üzerinde çizelge 4.3.'de listelendiği gibi bakteriyel bir enfeksiyon saptanmış olup patojen simptomatoloji ve klasik bazı test yöntemleri ile *Pseudomonas sp.* olarak tanılanmıştır. Bakteriyel yanıklık olarak görülen bu hastalık aynı zamanda Fukui ve ark. (1999) tarafından da bildirilmiştir. Türkiye florasında yer almayan bu bitkide görülen bu hastalığın gram negatif bir patojen *Pseudomonas sp.* olabileceği tahmin edilmektedir.

Süs bitkilerinde bakteriyel hastalıkların oluşumunu engellemek için alınması gereken tedbirler şunlardır;

- Bahçe tesis edilirken temiz topraklara temiz üretim materyali dikilmeli,
- Bitkilerin yaralanması önlenmeli ve özellikle bitkilerde yaralanmalara neden olan böceklerle mücadele edilmeli,
- Budama makasları % 1'lik sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmeli ve budama yerlerine % 5'lik göz taşı ve arkasından bitkisel katran sürülmeli,

- Yağmurlama sulamadan kaçınılarak damlama sulama yapılmalı,
- Gübreleme ile hastalık gelişimindeki ilişki nedeniyle dengeli gübrelemeye dikkat edilmeli,
- Bahçede urlu dallar, enfekteli yapraklar var ise bunlar toplanıp yakılmalı hatta gerekirse hasta bitkiler sökülerek bahçeden uzaklaştırılmalı,
- Ayrıca yerine göre biyolojik ve kimyasal mücadele uygulanmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Akalm Ş (1952)** Büyük Bitkiler Klavuzu. Güzel sanatlar matbaası Ankara 1120 s.
- Alippi AM (1996)**. First Report of Bacterial Spot of Celery Caused by *Pseudomonas cichorii* in Argentina. Plant Disease 80:599
- Anonim (2008)**. T. C. Başbakanlık Devlet İstatistik Kurum Yıllığı. www.tuik.gov.tr. (erişim tarihi, 25.12.2008).
- Arı O, Çeçen K (1961)**. Zeytin ağacı kanseri ve bununla mücadele bakımından budama ve gübreleme esasları. Tarım Bakanlığı, Bornova Zirai Mücadele Enst. Yayınları. No:4
- Aysan Y, Şahin F (2003)**. An outbreak of crown gall disease on rose caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. Plant Pathology 52 (6) 780.
- Azad HR, Cooksey DA (1995)**. A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic populations of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. Phytopathology 85: 740-745.
- Agrios GN (2005)**. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press, NewYork, NY, USA. 922 p.
- Bertolini E, Olmos A, Lopez MM, Cambra M (2003)**. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. Phytopathology 93: 286-292
- Bremer DH (1948)**. Türkiye Fitopatolojisi Cilt II. Neşriyat Müdürlüğü Sayı: 657 Güney Matbaacılık ve Gazetecilik T.A.O. Ankara 237 s.
- Bremer DH (1954)**. Türkiye Fitopatolojisi Cilt III. (Bahçe Kültürleri Hastalıkları). Ziraat Vekaleti Neşriyat ve Haberleşme Müdürlüğü Sayı: 715 İstiklal Matbaası Ankara 295 s.
- Chase AR, Brunk DD (1984)**. Bacterial leaf blight incited by *Pseudomonas cichorii* in *Schefflera arboricola* and some related plants. Plant Disease 68:73-74
- Chase AR, Jones JB (1986)**. Effects of host nutrition, leaf age, and preinoculation light levels on severity of leaf spot of dwarf schefflera caused by *Pseudomonas cichorii*. Plant Disease 70:561-563
- Chase AR (1987)**. Compendium of Ornamental Foliage Plant Diseases. APS Press, St. Paul, MN, USA, 90 p.
- Chase AR, Daughtrey ML, Simone GW (1995)**. Diseases of Annuals and Perennials. APS Press, St. Paul, M.N. USA. 208 p.
- Chase AR (1997)**. Foliage Plant Disease. APS Press, St. Paul, M.N. USA.169 p.

- Dal Bello G, Carranza M (1995).** First Report of Bacterial Blight of Geranium Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in Argentina. Plant Disease 79:103.
- Daughtrey ML, Wick RL, Peterson JL (1995).** Compendium of Flowering Potted Plant Diseases. APS Press, St. Paul, MN, USA, 90p.
- De Boer SH, Ward LJ (1995).** PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* associated with potato tissue. Phytopathology, 85: 854-858.
- Engelhard AW, Mellinger HC, Ploetz RC, Miller JW (1983).** A leaf spot of florists' geranium incited by *Pseudomonas cichorii*. Plant Disease 67:541-544
- Ersoy A (2002).** Batı Akdeniz bölgesinde zeytin ağaçlarında görülen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin neden olduğu bakteriyel dal kanseri hastalığının yayılışı, etmenin moleküler tanısı, izolatlarının elde edilmesi ve moleküler karakterizasyonu. 72s.
- Fukui R, Fukui H, Alvarez AM (1999).** Effect of temperature on the incubation period and leaf colonization in bacterial blight of anthurium. Phytopathology 89:1007-1014.
- Garibaldi A, Bernetti D, Scortichini M, Gullino ML (2005).** First Report of Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas cichorii* on *Phlox paniculata* in Italy. Plant Disease 89:912
- Hildebrand DC, Schroth MN, Sands DC (1988).** *Pseudomonas*. Pages 60-80 in: N.W.Schaad, ed., Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd edition. APS Press, St. Paul, M.N.
- Holcomb GE, Cox PJ (1998).** First Report of Basil Leaf Spot Caused by *Pseudomonas cichorii* in Louisiana and Cultivar Screening Results. Plant Disease 82:1283
- Horst RK, Cloyd RA (2007).** Compendium of Rose Diseases and Pests Second Edition. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 83p.
- Jones JB, Raju BC, Engelhard AW (1984).** Effects of temperature and leaf wetness on development of bacterial spot of geraniums and chrysanthemums incited by *Pseudomonas cichorii*. Plant Disease 68:248-251
- Jones RK, Benson DM (2001).** Diseases of Woody Ornamentals and Trees in Nurseries. APS Press, 482p.
- Karaca İ (1977).** Fitobakteriyoloji ve Bakteriyel Hastalıklar. Ege Üniversitesi Matbaası Bornova-İzmir 270 s.
- King EO, Word MK, Raney DE (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J.Clin.Med. 44:301-307

- Klement Z, Goodman RN (1967).** The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 5: 17-44.
- Klement Z, Rudolph K, Sands DC (1990).** Mechanism of resistance. Methods in phytobacteriology. Edit by Z. Klement, K. Rudolph and D.C. Sands. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary. P:469-493.
- Kovacs N (1956).** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 170,173.
- Lelliott RA, Stead DE (1987).** Diagnostic procedures for bacterial plant diseases. In Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell scientific publications, Oxford, UK 216 p.
- Mirik M, Aysan Y (2004).** Türkiye’de Çeşitli Konukçu Bitkilerden İzole Edilen *Pseudomonas savastanoi* İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri 8-10 Eylül 2004, Samsun. S:139.
- Mirik M, Aysan Y (2008).** Zeytin Dal Kanseri (Bacterial Knot Disease) *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Bitki Bakteri Hastalıkları. (Edit. Saygılı H, Şahin F, Aysan Y) 113-114. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir.
- Obradovic A (2002).** First Report of a Wilt and Stem Rot of Muskmelon and Watermelon Transplants Incited by *Pseudomonas cichorii* in Serbia. Plant Disease 86:443.
- Penyalver R, Garcia A, Ferrer A, Bertolini E, Quesada JM, Salcedo CI, Piquer J, Pérez-Panadés J, Carborell EA, del Rio C, Caballero JM, Lopez MM (2006).** Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. Phytopathology 96:313-319.
- Penyalver R, Garcia A, Ferrer A, Bertolini E, Lopez MM (2000).** Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Applied and Environmental Microbiology. 2673-2677.
- Putnam ML (1999).** Bacterial Blight, a New Disease of *Lobelia ricardii* Caused by *Pseudomonas cichorii*. Plant Disease. 83:966.
- Rodriguez-Moreno L, Barcelo-Munoz A, Ramos C (2008).** In vitro analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pvs. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. Phytopathology 98: 815-822.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989).** Molecular cloning-a Laboratory Manual: Second edition (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sands DC (1990).** Physiological criteria-determinate tests. In Methods in Phytobacteriology (Edts. Klement Z, Rudolph K, Sands DC) 199-204. Akademia Kiado, Budapest, Hungary.

- Sathyanarayana N, Reddy OR, Latha S (1997).** Interception of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* on Anthurium Plants from the Netherlands. Plant Disease 82:262.
- Saygılı H, Şahin F, Aysan Y (2006).** Fitobakteriyoloji. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova-İzmir 530 s.
- Saygılı H, Şahin F, Aysan Y (2008).** Bitki Bakteri Hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir. 317 s.
- Selik M (1996).** Ormancılık Fitopatolojisi. Dizerkonca Matbaası. İstanbul 178 s.
- Sisto A, Cipriani MG, Morea M (2004).** Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is hrp-dependent. Phytopathology 94:484-489.
- Surico G, Comai L, Kosuge T (1984).** Pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* and their indoleacetic acid –deficient mutants on olive and oleander. Phythopathology 74:490-493.
- Surico G, Lavermicocca P (1989).** A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Phythopathology 79:185-190.
- Thornley MJ (1960).** The differantiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginin metabolism. J.App. Bacteriol. 1:37-52

EKLER

EK 1

Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat (YDC) Agar (Lelliott ve Stead, 1987)

Yeast Extract	10.0 g
Dextrose	20.0 g
Kalsiyum Karbonat	20.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 g

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

King B Besi Yeri (King ve ark. 1954)

Proteose Peptone	20.0 g
Gliserin	10.0 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 g

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.
pH:7.2

SNA Besi Yeri (Lelliott ve Stead, 1987)

Nutrient Agar	13.0 g
Sukroz	50.0 g
Distile su	1000 g

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

Nutrient Broth Sıvı Besi Yeri (Lelliott ve Stead, 1987)

Nutrient Broth	8.0 g
Distile su	1000 g

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

EK 2

PCR Çalışmasında Kullanılan Solüsyonlar

% 1'lik Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)

10 ml 10xTAE bufferı 90 ml su ile karıştırılmış ve behere koyulmuştur. Süspansiyon bulunan beher içerisinde sıcak su bulunan beher içerisine yerleştirilmiştir. 1 g Sodium Dodecyl Sulphate eklenerek çalkalayıcıya koyulmuş SDS'nin çözünmesi sağlanmıştır.

7.5 Amonium Acetate

57.75 g Amonium acetate 100 ml su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.

% 1 Agarose Jel

1xTAE buffer içerisine 1 g agarose koyularak mikrodalga fırında çözünmesi sağlanmıştır.

TAE Buffer (10 mm Tris. 1mm EDTA pH:8)

Tris-HCl	0.24 g
EDTA	0.074 g
Distile su	200 ml

TBE Buffer

Tris	107.89 g
Borik Asit	55.0 g
Na ₂ EDTA	7.44 g
Distile su	1000 ml
pH:8.0	

6.5x Loading Buffer

Bromophenol Blue	30.0 mg
5xTBE	4.25 ml

Her ikisi karıştırıldıktan sonra 5.75 ml Gliserin eklenerek + 4°C'de muhafaza edilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

7 Şubat 1979 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlköğretimini Katip Çelebi İlkokulu'nda tamamladıktan sonra 1995 yılında İstanbul Cibali Lisesi'nden mezun oldu. 1996 yılında girdiği ÖSYM sınavları sonucu Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde lisans öğrenimine hak kazandı. 2000 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldu ve Ziraat Mühendisi unvanına hak kazandı. 2000-2001 yılları arasında Kumsu Ltd. Şti.'de Laboratuar Sorumlusu olarak, 2001 yılı içerisinde ise İstanbul Tohumculuk Tarım San. ve Tic. Ltd. Şti.'de, 2005 yılı içerisinde ise Denpa Çevre Sağlığı ve Tarım İlaçları Tic. Ltd. Şti. Ziraat Mühendisi olarak çalıştı. Ayrıca 2004-2008 yılları arasında Anadolu Üniversitesi, İktisat Fakültesi, Kamu Yönetimi Bölümü'nü bitirdi. 2008 yılında TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, İstanbul Şube'sine bağlı olarak Kamulaştırma Alanlarında Bilirkişi olarak görev yaptı. 2001 yılından itibaren halen çalışmakta olduğu gıda işletmelerinde Sorumlu Yönetici Müdürlük görevine devam etmektedir. 2006-2007 eğitim öğretim güz yarıyılında girdiği sınavda başarılı olarak Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına kabul edildi. 2009 yılında tez sınavında başarılı olduğu takdirde Ziraat Yüksek Mühendisi unvanını almaya hak kazanacaktır.

