



**MARMARA BÖLGESİ'NDE KİRAZ DAL  
YANIKLIĞI HASTALIK ETMENİNİN TANISI,  
GENOTİPİK KARAKTERİZASYONU ve  
FARKLI PREPARATLARA KARŞI  
DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ**  
**Cansu ÖKSEL**

**Doktora Tezi**

**Bitki Koruma Anabilim Dalı**  
**Danışman: Prof. Dr. Mustafa MİRİK**  
**2020**

**T.C.**  
**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**MARMARA BÖLGESİ'NDE KİRAZ DAL YANIKLIĞI HASTALIK ETMENİNİN**  
**TANISI, GENOTİPİK KARAKTERİZASYONU ve FARKLI PREPARATLARA**  
**KARŞI DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ**

**Cansu ÖKSEL**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Mustafa MİRİK**

**TEKİRDAĞ-2020**

**Her hakkı saklıdır.**



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Cansu ÖKSEL

İMZA



Bu tezin bir kısmı TÜBİTAK 2214-A tarafından 1059B141801417 numaralı proje ile Amerika Birleşik Devletleri State University, Otis L. Floyd Nursery Research Center'da yapılmıştır.

Prof. Dr. Mustafa MİRİK danışmanlığında, Cansu ÖKSEL tarafından hazırlanan “Marmara Bölgesi’nde Kiraz Dal Yanıklığı Hastalık Etmenlerinin Tanısı, Genotipik Karakterizasyonu ve Farklı Bakırlı Preparatlara Karşı Duyarlılığının Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından gg.aa.yyyy tarihinde Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul/red edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa MİRİK

*İmza:*

Üye : Prof. Dr. Nuray Özer

*İmza:*

Üye : Prof. Dr. Yeşim AYSAN

*İmza:*

Üye : Prof. Dr. Soner SOYLU

*İmza:*

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Adnan KARA

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç.Dr. Bahar UYMAZ  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

MARMARA BÖLGESİ'NDE KİRAZ DAL YANIKLIĞI HASTALIK ETMENİNİN  
TANISI, GENOTİPİK KARAKTERİZASYONU ve FARKLI PREPARATLARA KARŞI  
DUYARLILIĞININ BELİRLENMESİ

**Cansu ÖKSEL**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

*Pseudomonas syringae*' nin neden olduğu kiraz bakteriyel dal yanıklığı hastalığı kiraz ağaçlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu çalışmada 2016-2018 yılları arasında Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarından izole edilen 82 adet izolatın klasik, biyokimyasal, moleküler testlerle tanısı, ERIC-, REP-, BOX-PCR ile genetik karakterizasyonu ve Multi Lokus Sekans Analiz (MLSA) ile filogenetik akrabalığı belirlenmiştir. MLSA çalışmalarında 4 farklı housekeeping (*gyrB*, *rpoDs*, *rpoDp* ve *gltA*) genleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda hastalıklı bitkilerden izole edilen 63 adet izolat klasik, biyokimyasal ve moleküler testlere göre *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmıştır. MLSA çalışmalarına göre elde edilen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatları, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* ve *Pseudomonas avellane* ile yakınlık göstermiştir. İzolatların DNA sekans bilgileri NCBI veri tabanına kaydedilmiştir. Çalışmada hastalık etmenine karşı bakır oksiklorür, bakır sülfat, bakır hidroksit, maneb, mancozeb ve bordo bulamacı (kalsiyum hidroksit+bakır sülfatın) *in vitro* antibakteriyel etkinlikleri belirlenmiştir. Kullanılan tüm preparatların *in vitro* bakteri popülasyonunun gelişimin engellenmesi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Arazi çalışmalarında hastalık gelişimin engellenmesi üzerine bakır hidroksit, bakır oksiklorür, bakır sülfat, fosetyl-al ve bakır tuzları + mancozeb etkinliği araştırılmıştır. Çalışma sonucunda bakır hidroksit kontrole göre hastalık şiddetini %85,72 oranında azaltmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Kiraz, bakır, MLSA, filogenetik

**2020, 107 sayfa**

## ABSTRACT

PhD Thesis

IDENTIFICATION, GENOTYPIC CHARACTERIZATION of CAUSAL AGENT of CHERRY BACTERIAL CANCKER in MARMARA REGION and DETERMINATION of SUSPECTIBILITY AGAINST DIFFERENT COMPOUND

**Cansu OKSEL**

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Cherry bacterial branch canker disease caused by *Pseudomonas syringae* causes serious economic losses in cherry trees. In this study, the diagnosis of 82 isolates, isolated from the cherry production areas in Marmara Region between 2016 and 2018 years, were determined by using classical, biochemical, molecular tests. Genetic characterization and phylogenetic relationship among the isolates were determined by using ERIC-, REP-, BOX-PCR and Multilocus Sequence Analysis (MLSA). Four different housekeeping genes (*gyrB*, *rpoDs*, *rpoDp* and *gltA*) have been used in MLSA studies. As a result of the study, 63 isolates obtained from diseased plants, were identified as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* according to classical, biochemical and molecular analyses. According to MLSA studies, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates showed affinity with *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* and *Pseudomonas avellane*. DNA sequences of representative isolates were recorded in the NCBI database. In the study, antibacterial activities of copper oxychloride, copper sulphate, copper hydroxide, maneb, mancozeb and Bordeaux mixture (calcium hydroxide+copper sulphate) were also determined *in vitro* conditions. All preparations used have been found to be effective on *in vitro* inhibition of bacterial population. In the field studies, copper hydroxide, copper oxychloride, copper sulfate, fosetyl-Al and copper salts + mancozeb were used to prevent disease development and occurrence. As a result of the study, copper hydroxide reduced the disease severity by 85,72% compared to control.

**Key words:** Cherry, copper, MLSA, phlylogenetic

**2020, 107 pages**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ .....	v
ŞEKİL DİZİNİ .....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>24</b>
3.1. Materyal.....	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Hastalık Belirtisi Gösteren Kiraz Bitkilerinin Toplanması.....	24
3.2.2. Hastalıklı Bitkilerden Bakteriyel Etmenin İzolasyonu.....	24
3.2.3. Elde Edilen İzolatların Klasik Testlerle Tanısı.....	25
3.2.4. Elde Edilen İzolatların PCR Testi ile Tanısı.....	28
3.2.5. ERIC-, REP- ve BOX-PCR ile İzolatların Genotipik Karakterizasyonu.....	29
3.2.6. İzolatların MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) ile Tanılanması.....	31
3.2.7. MLSA (Multilocus Sequence Analysis) Çalışmaları.....	31
3.2.8. İzolatların SEM Elektron Mikroskopunda Görüntülenmesi.....	35
3.2.9. Kiraz Dal Kanseri Hastalık Etmenine Karşı Farklı Preparatların Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi.....	35
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
4.1. Hastalık Belirtisi Gösteren Kiraz Bitkilerinin Toplanması.....	38
4.2. Hastalıklı Bitkilerden Bakteriyel Etmenin İzolasyonu.....	44
4.3. Elde Edilen İzolatların Klasik Testlerle Tanısı.....	45
4.4. Elde Edilen İzolatların PCR Testi ile Tanısı.....	50
4.5. ERIC-, REP- ve BOX-PCR ile İzolatların Genotipik Karakterizasyonu.....	50
4.6. İzolatların MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) ile Tanılanması.....	59
4.7. MLSA (Multilocus Sequence Analysis) Çalışmaları.....	60



4.9. Kiraz Dal Kanseri Hastalık Etmenine Karşı Farklı Bakırlı Preparatların Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi.....	68
<b>5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>72</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>88</b>



## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye 2014-2019 yıllarında kiraz üretimi ve ağaç sayısı .....	1
Çizelge 1.2. Dünya kiraz üretiminde önde gelen ülkeler .....	2
Çizelge 3.1. Tanı çalışmalarında kullanılan referans izolatlar.....	24
Çizelge 3.2. Moleküler çalışmalar için kullanılan PCR karışımı.....	28
Çizelge 3.3. <i>P. s. pv syringae</i> için <i>syrB</i> geninden dizayn edilen primer için PCR programı.....	29
Çizelge 3.4. <i>P. s. pv morsprunorum</i> için <i>cfl</i> geninden dizayn edilen primer için PCR programı.....	29
Çizelge 3.5. ERIC-, REP- ve BOX-PCR için kullanılan primer ve PCR programı.....	30
Çizelge 3.6. MLSA çalışmalarında kullanılan primerler ve sekansları.....	32
Çizelge 3.7. MLSA çalışmalarında kullanılan PCR programı.....	32
Çizelge 3.8. Filogenetik çalışmalarda kullanılan NCBI sekans dizilimleri.....	33
Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan kiraz izolatları.....	35
Çizelge 4.1. 2016-2018 yıllarında Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarında yapılan surveyler.....	41
Çizelge 4.2. <i>Pseudomonas syringae</i> re-izolatlarının tanı test sonuçları.....	47
Çizelge 4.3. ERIC-PCR sonucunda <i>P. s. pv. syringae</i> izolatlarının oluşturdukları bant uzunlukları.....	51
Çizelge 4.4. REP-PCR sonucunda <i>P. s. pv. syringae</i> izolatlarının oluşturdukları bant uzunlukları .....	53
Çizelge 4.5. BOX-PCR sonucunda <i>P. s. pv. syringae</i> izolatlarının oluşturdukları bant uzunlukları.....	55
Çizelge 4.6. Gradient PCR sonucunda belirlenen yeni bağlanma sıcaklıkları.....	61
Çizelge 4.7. İzolatlar arasındaki moleküler varyans analizi.....	66
Çizelge 4.8. <i>gyrB</i> , <i>rpoDs</i> , <i>rpoDp</i> , <i>gltA</i> gen bölgelerinin özellikleri.....	66
Çizelge 4.9. Çalışmalarda farklı primerler ile <i>Pseudomonas syringae. pv. syringae</i> olarak tanımlanmış izolatların GenBanka (NCBI)'nda erişim kayıt numaraları kayıtları.....	69
Çizelge 4.10. Bakırlı preparat, Manep ve Mancozeb' in farklı lokasyonlardan elde edilen <i>P. s. pv. syringae</i> izolatlarının <i>in vitro</i> popülasyonu üzerine etkisi.....	69
Çizelge 4.11. Kullanılan bakırlı preparatların <i>P. s. pv syringae</i> izolatlarının <i>in vitro</i> popülasyonunun gelişimi üzerine etkisi.....	70
Çizelge 4.12. Bakırlı preparatların farklı dozlarının <i>P. s. pv syringae</i> izolatlarının <i>in vitro</i> popülasyonu gelişimi üzerine etkisi.....	70
Çizelge 4.13. Farklı kimyasal preparat uygulamalarının <i>in vivo</i> hastalık şiddeti üzerine etkisi.....	71

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1 Bakteriyel dal yanıklık etmeninin kiraz ağaçlarında neden olduğu belirtiler.....	4
Şekil 4.1. Marmara Bölgesi survey yapılan kiraz üretim alanları. ....	38
Şekil 4.2. Çanakkale ilinde çiçeklenme döneminde survey yapılan kiraz bahçesi.....	39
Şekil 4.3. Kiraz ağaçlarında gözlenen hastalık belirtileri .....	40
Şekil 4.4. Kiraz bahçelerinden hastalık belirtisi görülen örneklerin alınması.....	40
Şekil 4.5. İzolatların LOPAT tanı karakteri test sonuçları.....	46
Şekil 4.6. İzolatların ham kiraz meyvelerinde patojenite testi sonucu oluşan kahverengi-siyah/çökük lekeler.....	46
Şekil 4.7. Kiraz re-izolatlarının GATTa test sonuçları.....	47
Şekil 4.8. İzolatların PCR jel görüntüleri.....	50
Şekil 4.9.ERIC-PCR sonucunda elde edilen bant uzunlukları.....	52
Şekil 4.10. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının ERIC-PCR dendogramı.....	52
Şekil 4.11. REP-PCR sonucunda elde edilen bant uzunlukları.....	54
Şekil 4.12. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının REP-PCR dendogramı.....	54
Şekil 4.13. BOX-PCR sonucunda elde edilen bant uzunlukları.....	56
Şekil 4.14. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının BOX-PCR dendogramı.....	57
Şekil 4.15. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının ERIC-, REP-, BOX-PCR kümülatif dendogramı.....	58
Şekil 4.16. <i>P. s.</i> pv <i>syringae</i> TK31 izolatının MALDI-TOF analiz sonucu.....	59
Şekil 4.17. <i>P. s.</i> pv <i>syringae</i> izolatının elektron mikroskop altında çubuk şeklinde görüntüsü.....	60
Şekil 4.18. <i>gyrB</i> geni sekans sonucuna göre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının Neighbor-joining ağacı.....	61
Şekil 4.19. <i>rpoDs</i> geni sekans sonucuna göre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının Neighbor-joining ağacı.....	62
Şekil 4.20. <i>rpoDp</i> geni sekans sonucuna göre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının Neighbor-joining ağacı.....	63
Şekil 4.21. <i>gltA</i> geni sekans sonucuna göre <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının Neighbor-joining ağacı.....	64
Şekil 4.22. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatlarının <i>gyrB</i> , <i>rpoDs</i> , <i>rpoDp</i> , <i>gltA</i> housekeepin genlerinin MLSA çalışmaları sonucunda oluşturulan Neighbor-joining ağacı....	65

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\mu$ l	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
NA	: Nutrient agar
NB	: Nutrient broth
NJ	: Neighbor joining
MLSA	: Multilocus sequence analysis
NCBI	:National Center of Biotechnology Information
FAO	:Gıda ve Tarım Organizasyonu
TÜİK	:Türkiye İstatistik Kurumu

## TEŞEKKÜR

Akademik yaşantımın her aşamasında değerli fikirleri ile bana her zaman yol gösteren, tez konumun belirlenmesinde ve tez çalışmanın her aşamasında desteğini esirgemeyerek bana yardım eden danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa MİRİK' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca Tez İzleme Komitesi'nde bulunan, bilgi ve katkılarıyla çalışmama yön veren Sayın Prof. Dr. Soner SOYLU' ya ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Adnan KARA' ya, tez jürimde yer alan ve tecrübe ve bilgileriyle tezime katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Yeşim AYSAN' a ve Sayın Prof. Dr. Nuray ÖZER' e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin moleküler çalışmalarını yapmam için Amerika Tennessee State University, Otis L. Floyd Nursery Research Center, Öğretim Üyesi Sayın Dr. Fulya BAYSAL-GÜREL'e sunduğu laboratuvar imkanları, bilgi, tecrübe ve desteği için teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin arazi, laboratuvar ve istatistik hesaplama çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Özgür SAĞLAM' a, Dr. Farhat A. AVIN' e, Zir. Yük. Müh. Milan PANTH' e, Ziraat Mühendisi Akın İBAR' a, Tekirdağ Tarım İl Müdürlüğü Bitki koruma şubesi Ziraat Mühendisi Mehmet KIZILKULAK' a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı 1059B141801417 nolu proje kapsamında doktora tezimin Amerika' da yaptığım kısmı için beni destekleyen TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

Eğitim-öğretim yaşamım boyunca birçok fedakârlık göstererek beni destekleyen, bana güç veren ve her zorlukta yanımda olan anneme ve babama; tezimin her aşamasında gerek fiilen gerek manevi destek olan kardeşim Hasan Can ÖKSEL' e sonsuz teşekkür ederim.

Haziran, 2020

Cansu ÖKSEL  
Araştırma Görevlisi

## 1.Giriş

Türkiye birçok meyvenin anavatanı ve meyvecilik kültürünün beşiğidir (Gerçekçiöğlü, Bilginer ve Soylu, 2006). Bugün meyvecilik tarımında önem kazanmış olan elma, armut, ayva, erik, üzüm, incir gibi birçok meyve türü ülkemiz topraklarında ortaya çıkmıştır. Anadolu birçok meyve türünde olduğu gibi, kiraz (*Prunus avium* L.)'ın da anavatanı sınırları içerisinde. Kiraz, birçok ılıman iklim meyve türünün de bulunduğu Rosaceae familyası içinde yer alır. Hazar Denizi ile Karadeniz arasındaki bölge kirazın anavatanı olarak bilinmektedir. Avrupa ve diğer kıtalara kirazı tohumlarının kuşlar, diğer hayvanlar ve göçmenler tarafından taşınmalarıyla yayılmıştır. İklim bakımından sıcak bir büyüme sezonu, kış mevsiminde belli bir süre dinlenme ve yağmursuz bir hasat dönemine ihtiyaç duyar. Kışın dinlenme döneminde kiraz ağaçlarının gövde ve ana dalları -26°C, çiçek tomurcukları -2.4°C'ye dayanabildiği halde çiçeklenme döneminde bu sınır -2°C'dir. Kiraz ılıman iklim meyve türleri içerisinde meyvelerini en erken olgunlaştıran türdür. Kiraz ağaçlarında gençlik kısırlığı süresi 5-6 yıl olup, bir kiraz bahçesinin ekonomik olarak ömrü 25-30 yıldır. Kiraz yetiştiriciliğini etkileyen en önemli faktör sıcaklıktır. Hem çok yüksek hem de çok düşük sıcaklıklar kiraz yetiştiriciliği üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır (Burak, 2003). Türkiye'nin her bölgesinde kiraz yetiştiriciliği yapılmakta olup üretilen kirazın tamamına yakını taze halde tüketilmektedir (Burak, 2003). Önemli bir ihracat ürünü olan kirazın Çizelge1.1' de Türkiye'de son yıllarda hem ağaç sayısı hem de üretiminde artış görülmektedir.

Çizelge 1.1. Türkiye 2014-2019 yıllarında kiraz üretimi ve ağaç sayısı (TÜİK [Türkiye İstatistik Kurumu], 2019)

Yıllar	Ağaç Sayısı (Bin)		Toplam	Üretim (Ton)
	Meyve veren	Meyve vermeyen		
2014	19.087	7.232	26.319	445.556
2015	20.616	6.614	27.230	535.600
2016	21.314	6.447	27.761	599.650
2017	21.587	6.332	27.919	627.132
2018	20.880	6.060	26.940	639.564
2019	21.115	5.917	27.032	664.224

Dünyada kiraz üretimi coğrafik olarak dünyanın farklı bölgelerine yayılmış durumdadır. Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO)'nun 2018 yılı verilerine göre Türkiye, dünya kiraz üretiminde 6.395.64 ton ile Dünya'da birinci sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2). Ülkemizi 3.124.30 ton üretim ile Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ikinci sırada, Şili ise 1.559.35 ton üretim ile üçüncü sırada izlemektedir ((FAO [Gıda ve Tarım Organizasyonu], 2018).

Çizelge 1.2. Dünya kiraz üretiminde önde gelen ülkeler (FAO [Gıda ve Tarım Organizasyonu], 2018).

Ülkeler	Kiraz Üretimi (Ton)
Türkiye	639.564
ABD	312.430
Şili	155.935
İran	137.268
İtalya	114.798
Dünya	2.547.944

TÜİK (2019) verilerine göre 2014-2019 yılları arasında meyve veren ağaç sayısı ile doğru orantılı olarak kiraz üretim miktarında da artış görülmektedir. 2019 yılı TÜİK verilerine göre 21.115 bin meyve veren kiraz ağacından 664.224 ton ürün elde edilmiştir.

İhracatıyla ülkemizi birinci sıraya taşıyan kirazın, üretimini tehdit eden pek çok biyotik ve abiyotik etmen vardır. Kiraz ağaçlarında *Stigmia carpophila* (yaprak delen hastalığı), *Monilinia laxa* (monilya hastalığı) ve *Nectria galligena* (dal yanıklığı hastalığı) gibi fungal hastalık etmenlerinin yanında bakteriyel dal kanseri hastalık etmenleri *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*P. s.* pv. *syringae*) ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (*P. s.* pv. *morsprunorum*) hem ürünlerde kalite ve verim kayıplarına, hem de ağaçlarda ölümlerine neden olmaktadır. *Pseudomonas syringae*'nin neden olduğu dal yanıklığı hastalığı Dünya'da meyve üretimi yapılan her yerde kirazın yanı sıra pek çok meyve ağacında yaygın olarak görülmektedir. Hastalığın özellikle de genç bahçelerde %75'e varan oranlarda kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Spotts, Wallis, Serdani ve Azarenko, 2010).

Hastalık etmeninin görüldüğü fidanlıklarda, meydana gelen sistemik enfeksiyonlar sonucunda fidan ölümleri gerçekleşmekte ve önemli ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Hastalıktan dolayı her yıl Almanya'da ağaçların %30'u ölürken, İtalya ve diğer Avrupa

ülkelerinde de farklı düzeylerde zararlanmalara neden olduğu görülmektedir (Kennelly, Cazorla, Vicente, Ramos ve Sundin, 2007).

Kirazlarda dal yanıklığı hastalığına neden olan *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum*, düz ya da eğik çubuk şeklinde, bir veya iki kamçıya sahip gram negatif bakterilerdir. *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*)'nin ilk orjinal izolatu 1902 yılında Van Hall tarafından hastalıklı bir leylak (*Syringae vulgaris*) bitkisinden izole edilmiştir. *P. syringae* kompleks bir patojen olup Gardan vd. (1999) önce 56 farklı patovarylarının bulunduğunu ve DNA:DNA hibridizasyonu sonucunda izolatların 6 genomspesiese ayrıldığını belirlemişlerdir. Parkinson, Bryant, Bew ve Elphinstone (2011), etmenin DNA-DNA hibridizasyonuna göre 9 genomspesiese, Multilocus Sequence Analysis (MLSA) göre ise 13 filogruba ayrıldığını bildirmişlerdir. Kaluzna, Janse ve Young (2012) ise etmenin yaklaşık 64 patovary olduğunu bildirmiştir. Bunlar DNA:DNA hibridizasyonuna göre 3 farklı genomspesiese ayrılmıştır. Birincisi içerisinde *P. s. pv. syringae*, ikincisinde *P. s. pv. morspurunorum* ırk 1, üçüncüsünde ise *P. s. pv. morspurunorum* ırk 2, *P. s. pv. avii* ve *P. s. pv. persicae*' nin yer aldığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda bu 5 patojen *Prunus* spp. (Sert çekirdekli meyve ağaçları)'de hastalığa neden olmaktadır.

Kirazlarda dal yanıklığı hastalık etmeni *P. s. pv. syringae* geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Başta kiraz ve kayısı olmak üzere 80 kadar meyve türünün yanı sıra turunçgiller, armut, badem, dişbudak, ceviz, gül, leylak, zakkum, meşe, söğüt, kızılılık gibi çeşitli bitkilerde ve hatta pek çok otsu bitki türünde hastalık yapmakta iken; *P. s. pv. morsprunorum*'un ise sadece kiraz, erik ve badem türlerine özelleştiği bildirilmiştir (Agrios 2005; Kaluzna 2019).

*P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum*, kiraz ağacının yaprak, sürgün, çiçek gibi kök hariç bütün organlarına ve yapılarında ortaya çıkarak hastalık belirtilerine neden olur. Etmenin neden olduğu hastalık belirtisinin ağacın yaşına, çeşidine, bitki dokusuna, izolatu virülensliğine ve çevre koşullarına göre değişkenlik gösterebildiği belirlenmiştir (Gasic, Prokic, Ivanovic, Kuzmanovic ve Obradovic, 2012)

Hastalık etmeni çiçek demeti yanıklığı, sürgünlerde geriye doğru ölüm, yaprak ve meyve lekeleri, meyve miktarında azalma ve bitkinin odun dokusunda kanser ve zamklanmaya (Şekil 1.1) sebep olmaktadır (Kennelly vd., 2007).





Şekil 1.1. Bakteriyel dal yanıklık etmeninin kiraz ağaçlarında neden olduğu belirtiler

Hastalığa karşı dayanıklı çeşit kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda hastalık etmeninin kompleks yapısından dolayı farklı kiraz varyeteleri etmene karşı dayanıklıdır (Farhadfar, Keshavarzi, Bouzari, Monghadam ve Soleimani, 2016). Hastalık etmeni epifitik ve endofitik olarak iki döneme sahip olması etmenin mücadelesini zorlaştırdığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Hattingh, Roos ve Mansvelt, 1989; Kennely vd., 2007). Bakırlı preparatların kullanımı ile hastalığın mücadelesi sınırlı olarak kontrol altına alınabilmektedir (Stone ve Baker, 2010).

Hastalığın ülkemizde varlığı ilk olarak 1966 yılında Karaca tarafından rapor edilmiştir. Sonraki çalışmalarda *P. s. pv. syringae* hastalık etmeninin Antalya, Mersin ve Adana'da turunçgillerde (Mirik vd., 2005), Erzurum ve ilçelerinde kayısı ağaçlarında (Görmez 2011), diğer etmen *P. s. pv. morsprunorum*'un ise kirazda Marmara ve Ege Bölgesi, bademde ise Ege Bölgesinde görüldüğü tespit edilmiştir (Ertimurtaş ve Özaktan 2014; Mirik, Oksel ve Bulbul, 2015).

Hastalığın tahripkar etkilerinin görüldüğü Tekirdağ ili kiraz üretim alanlarında yapılan survey çalışmaları sonucunda kiraz üretim alanlarında hastalık yaygınlığının %20-57 oranında, hastalık şiddetinin ise %20-85 oranında olduğu tespit edilmiştir (Mirik vd., 2015).

Dünya çapında önemli ekonomik kayıplara neden olan *P. syringae* (Van hall) patovarylarının neden olduğu bakteriyel hastalığın üretim alanlarındaki mücadelesi son derece zordur. Patojen hem genç hem de yaşlı ağaçları öldürme yeteneğine sahiptir. Sistemik enfeksiyonlar ve genç ağaçların ölümü fidanlıklarda sürekli bir sorundur. Meyve yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede, sert çekirdekli meyve ağaçlarının yetiştiriciliğini engelleyen en önemli hastalıklardan birisidir (Kennelly vd., 2007).

*Pseudomonas* cinsi içerisinde farklı gruplar bulunmaktadır. **LOPAT** (Levan oluşumu, Oksidaz testi, Patateste pektolitik aktivite, Arginin dehidrolaz ve Tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu) tanı çalışmaları ile bu grupların farklılıkları ortaya konulmaktadır. *P. syringae* LOPAT test sonuçları levan oluşumu ve tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif, oksidaz, patateste pektolitik aktivite ve arginin dehidrolizasyonu negatiftir. LOPAT karakterlerine göre *P. syringae* Ia grubunda yer almaktadır (Lelliott, Billing ve Hayward, 1966). Diğer bir tanı testi ise *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum*'un ayırımında kullanılan **GATTa** (Gelatin hidrolizasyonu, Aesculin hidrolizasyonu, Tyrosin ve Tartarik asit kullanımı) testidir. Test sonucu (++--) olduğun etmen *P. s. pv. syringae*, (--++) olduğunda ise *P. s. pv. morsprunorum* olarak tanılanmaktadır. *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve ırk 2 olarak iki ırka sahiptir. Etmenin ırk ayırımı ise yine GATTa testi ile belirlenmektedir. GATTa test sonucu (--++) ise etmen ırk 1, (+++-) olduğunda ise ırk 2 olarak tanılanmaktadır (Lattorre ve Jones 1979; Bultreys ve Kaluzna 2010).

Mirik vd., (2015), kiraz dal yanıklığına sebep olan etmenlerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonunu belirlemek için yaptıkları çalışmada LOPAT ve GATTa test sonucuna göre 29 adet izolatu *P. s. pv. syringae*, 20 adet izolatu ise *P. s. pv. morsprunorum* olarak

tanımlanmışlardır. Moleküler testlerde kullanılan spesifik primerler ile 29 adet izolat 650 bp tekrarlanabilir bant oluşturarak *P. s. pv. morsprunorum* ve 20 adet izolat 752 bp tekrarlanabilir bant oluşturması nedeniyle *P. s.pv. syringae* olarak tanımlanmıştır. ERIC-, REP-, BOX-PCR çalışmaları için tesadüfen seçilen izolatlar %62-90 oranında benzerlik göstermiştir. Ayrıca yaptıkları fenotipik karakterizasyon sonucunda izolatların 2 farklı kümede toplandığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda yaptıkları genotipik olarak benzerliklerinde de izolatlar birbirinden fenotipik karakterizasyonda iki kümeye ayrılmıştır.

Farklı konukçulardaki *P. syringae* izolatları arasındaki genetik ve fenotipik çeşitlilik, konukçu bitkinin orijiniyle alakalı olabileceği hipotezi; çeşitli semptomlara sebep olan *P. syringae* izolatları zaman içinde kendi konukçuları dışında yakın türlerdeki diğer konukçulara da adapte olarak hastalık meydana getirdiğini göstermiştir (Bui Thi Ngoc vd., 2010). ABD’ de hiyargil (karpuz, kavun, kabak) ve hiyardan izole edilen ve *P. s. pv. lachrymans* olarak belirlenen izolatların, genetik olarak ayrıldığı bildirilmiştir (Newberry vd., 2016). Benzer şekilde Fransada kavun bitkisinden izole edilen *P. syringae* izolatları biyokimyasal ve patojenite testleriyle *P. s. pv. aptata* olarak tanımlanmışken (Morris vd., 2000), Çin’de kavunlardan izole edilen izolatlar metabolik ve genetik testlerde *P. s. pv. lachrymans* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma hiyar ve kavundan izole edilen *Pseudomonas syringae* izolatlarının heterojenik olabileceğini göstermiştir (Newberry vd., 2016).

Ülkemizde yapılmış olan çalışmalarda *P. syringae* izolatlarının genetik karakterizasyonu ERIC-, REP- ve BOX-PCR ile belirlenmiş ve buradan sonraki adıma geçilememiştir. Dolayısıyla ülkemizde bulunan *P. syringae* izolatlarının genetik orijini, dünya izolatlarıyla karşılaştırılması ve farklı *Pseudomonas* türleriyle olan genetik benzerliği üzerine bir çalışma mevcut değildir. Konukçu ve semptom açısından zengin bir grup olan *P. syringae*’ nin yeni nesil yöntemlerinden birisi olan MLSA ile aynı cins içindeki farklı türler arası genetik köken ve izolatlar arası genetik uzaklığın belirlenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca aynı cinse ait izolatların genetik özellikleri ve virülenslik faktörlerine göre filogruplara ayrılabilmesi belirlenmiştir (O’Brien, Thakur ve Guttman, 2011). Benzer şekilde, ülkemizdeki *P. syringae* izolatlarının MLSA ile genotipik karakterizasyonu hakkında yayın bulunmamaktadır. Ancak ülkemizde domatesten izole edilen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının beş housekeeping genle (*bipA*, *gyrB*, *kdpA*, *ligA* ve *sdhA*) MLSA analizinin yapıldığı görülmektedir (Sen vd., 2018).

MLSA ile belirlenen filogrular ile birçok cinse ait izolatların genetik kökenleri ve akrabalıkları belirlenmiştir. Bu yöntemin Dünya’da tercih edilmesinin nedeni ise bakteri türlerinin genetik tanımlarında hem güvenilirliği hem de tekrarlanabilir olmasıdır (Marcelletini ve Scortichini 2014).

*Pseudomonas* türlerinin kiraz ağaçlarında sebep olduğu hastalıkların mücadelesi oldukça zordur. Bunun sebebi olarak etkili bir kimyasal, biyolojik mücadele ve dayanıklı çeşit eksikliği ve hastalık döngüsündeki bazı fazlar boyunca patojenin endofit olarak yaşaması gösterilmektedir. Bakırlı preparatlar bazı bakteriyel hastalıkların kontrolü için standart bakterisit olarak kullanılır fakat fitotoksisite, bazı izolatların dayanıklılık kazanması, kullanma zamanı gibi sebepler bakırlı preparatların kullanımını sınırlamaktadır. Bakır kontak etkilidir bu yüzden bitkinin tomurcuk gibi iç kısmında bulunan bakteri popülasyonuna etki etmemektedir. Bu nedenle bakır uygulaması yapıldığında bitkinin fizyolojik dönemi, patojenin bitkide bulunduğu konum ve iklim şartları gibi faktörlerin hepsinin de uygun olduğu bir dönem olması gerekmektedir. Çiçeklenme dönemi gibi zamanlarda bakırlı preparatların kullanılması uygun değildir. Sonbahar ilaçlamalarının amacı yaprak yüzeyinde bulunan patojen popülasyonunu azaltarak kanserlerin oluşmasını önlemek ve bakterinin epifitik dönemdeki popülasyonunu azaltmaktır (Olson ve Jones, 1985; Penyalver vd., 2006). Kaliforniya da kirazlarda ve İspanya da mango da *P. syringae* ile mücadele için bakırlı preparatlar kullanıldığında bazı izolatların dayanıklılık kazandığı görülmüştür (Cazorla vd., 2002; Sundin vd., 1988).

Bu çalışmanın birinci amacı Marmara ili kiraz üretim alanlarında bakteriyel dal yanıklığı hastalığına neden olan hastalık etmenlerinin klasik, biyokimyasal ve klasik PCR ile tanılamak; tanılanan izolatların ERIC-, REP- ve BOX- PCR ile genetik akrabalıklarını belirlemek daha sonra çoklu housekeeping gen bölgelerine (*gyrB*, *rpoD*, *gltA*) göre farklı lokasyonlardan toplanan izolatlar arasındaki genetik yakınlığı belirlemek; elde edilen sekans sonuçlarını NCBI veri tabanına yüklemektir. İkinci amacı ise etmene karşı kullanılan ticari preparatların hastalık gelişimi üzerine olan etkisini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırmaktır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### Patojenin isim ve taksonomisi

Boyer ve Lambert (1893) tarafından *Pseudomonas* türlerini içeren bitki patojeni bakterilerden ilk olarak *Pseudomonas mori* rapor edilmiştir. Daha sonra van Hall tarafından 1902 yılında leylak bitkisinden izole edilerek *Pseudomonas syringae* olarak rapor edilmiştir.

Gardan, Shafik ve Grimont (1997), *P. syringae* türünün 57 patovaryinin bulunduğunu, Gardan vd., (1999) yapmış olduğu bir çalışmada ise DNA:DNA hibridizasyonu sonucunda izolatların 9 genospecies olduğunu bildirmişlerdir. Tür düzeyinde yüksek heterojenlik gösteren bu tür ile ilgili taksonomik çalışmalar halen devam etmektedir.

Young (2010)'un bildirdiğine göre, 1894 yılında Migula tarafından *Pseudomonas* cinsi gram negatif çubuk şeklinde, aerobik ve bir ya da iki kamçısı ile hareket edebilen bakteriler içine dahil edilmesi önerilmiştir. Fakat günümüzde artık taksonomik çalışmalarda 16S rDNA kullanılarak yapılmasından dolayı, *Pseudomonas*'ların sınıflandırması floresan, poly- $\beta$  hydroxybutyrate depolamayan *Pseudomonaslar P. syringae*'ninde içinde bulunduğu; *P. aeruginosa*'nın ise günümüzde  $\gamma$ -Proteobacteria içerisine dahil edilmiştir. Çoğu floresan olmayan poly- $\beta$  hydroxybutyrate depolayan *Pseudomonaslar* ise *Acidovorax*, *Burkholdera* ve *Ralstonia* cinslerinin içine dahil edilmiş ve  $\beta$ -Proteobacteria içerisinde sınıflandırılmıştır.

Lelliott vd. (1966), bitki patojeni floresan *Pseudomonas* türlerinin ayrımını yapmak için tanımlanan 15 testin sadece levan oluşumu, oksidaz aktivitesi, patatestte çürüklük oluşturma, arginin dehidrolazın oluşumu ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonunu kapsayan LOPAT testinin tür ayrımında kullanılmasını önermiştir.

Bradbury (1986), patovaryların sinonimi olarak 16 *Pseudomonas* türünü rapor etmiştir. Ayırt edilebilir patovaryların ayrımı ile, *P. s. pv. syringae*'nin konukçularının *P. syringae* ile aynı grupta yer aldığını bildirmiştir.

Patojen *P. s. pv. syringae* ilk izole edildiğinde konukçusunun ismini alıyordu fakat daha sonra izolatların 44 'ten fazla bitki türünde hastalık oluşturmalarına rağmen leylak üzerinde yapılan patojenite testlerinde negatif sonuç vermiştir. Bunun yanında leylakta patojen olan izolatlarla aynı karakteristik özellikleri gösteren izolatların bulunduğu bildirilmiştir. Leylaktan

izole edilen *P. syringae* izolatlarının *rpoD* sekans analizinde konukçular arasındaki bir ilişkinin bulunduğu belirlenmiştir (Parkinson, Bryant ve Elphinstone, 2011).

Kemotaksonomik testlerin gelişmesi, yağ asit analizi, protein profili, DNA ve RNA yapılarının karşılaştırılmasının yanı sıra izolatların moleküler sekansları bitki patojeni bakterileride içeren bakteri gruplarının sınıflandırılmasına olanak sunmuştur (Gillis, Vandamme, Vos, Swings ve Kersters, 2005).

*Pseudomonas* cinsi, tanı çalışmalarında kullanılan LOPAT özelliklerine göre farklı gruplar oluşturmuştur. LOPAT olarak isimlendirilen test grubu içerisinde sukroz ortamında levan tipi koloni üretimi, oksidaz reaksiyonu, pektat jel veya patates dilimlerinde pektolitik aktivitesi, arginin dehidrolaz aktivitesi ve tütün yaprağında aşırı duyarlılık (HR) reaksiyonunu testleri yer almaktadır. Yeşil floresan *Pseudomonas*'lar LOPAT karakterlerine göre gruplara ayrılmıştır. Ia (+---+) grubunda yer alanların *P. syringae* türü, Ib (----+) grubunda yer alanların *P. s. pv. savastanoi* ve *P. delphini* türü, II (-/+++) grubunda yer alanların *P. viridiflava* türü, III (-+++ ) grubunda yer alanların *P. cichorii* türü, IVa (++++-) grubunda yer alanların *P. marginalis* türü, IVb (-++++) grubunda yer alanların *P. fluorescens* türü, Va (-++-) grubunda yer alanların *P. tolasii* ve bazı saprofitik pseudomonaslar, Vb (+++-) grubunda ise *P. fluorescens* ile bazı saprofitik pseudomonasların olduğu belirlenmiştir (Gonzalez, Ackerley, Park ve Martin, 2003; Lelliott vd., 1966).

Kaluzna vd. (2012)'un yapmış olduğu çalışmada *P. syringae* 'nin yaklaşık 64 patovaryasının olduğu bildirilmiştir. Bunlar aynı zamanda DNA:DNA hibridizasyonuna göre 3 farklı gruba ayrılmaktadır. Birincisi içerisinde *P. s. pv. syringae*, ikincisinde *P. s. pv. morspurunorum* ırk 1, üçüncüsünde ise *P. s. pv. morspurunorum* ırk 2, *P. s. pv. avii* ve *P. s. pv. persicae* yer aldığını bildirilmektedir.

Son zamanlarda yapılan MLST çalışmalarına göre *P. syringae* 60' dan fazla patovara, 15 genomspecies ve 13 filogruba ayrılmaktadır (Parkinson vd., 2011).

### **Hastalığın Epidemiyolojisi ve Konukçuları**

*P. syringae* 50 den fazla patovara ve 9 genomspecies ayrılan fitopatojenik bir bakteri türüdür (Bradbury, 1986; Gardan vd., 1999; Young, vd., 1996). İlk olarak *P. s. pv. syringae* genomspecies 1 olarak, kiraz (*Prunus avium* L), vişne (*Prunus cerasus* L), erik (*Prunus domestica* L), Japon eriği (*Prunus salicina* L), şeftali (*Prunus persicae* L), kayısı (*Prunus*

*armenica* L), elma (*Malus pumila* L), balkabağı (*Cucurbita pepo* L) ve ahududu (*Rubus idaeus* L) gibi birçok konukçu bitkide patojen olarak belirlenmiştir (Ilić, Balaž ve Josic 2014; Gardan vd., 1999; Gavrilovic vd., 2012; Ivonovic vd., 2009; 2012; Marcelletti ve Scortichini, 2014). Daha sonra *P. s. pv. morsprunorum*, kiraz, erik ve kayısıda tespit edilmiştir (Wormald, 1932). *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2' nin kiraz, erik, Japon eriği ve Japon kayısını etkilediği belirlenmiştir (Freigoun ve Crosse, 1975; Kennelly vd., 2007; Lee, Koh, Sohn, Koh ve Jung, 2012).

Chandler ve Daniell (1976), bakteriyel kanserin hayat döngüsünün ilkbahar ayındaki kolonizasyonlar ile başladığını ve çiçekler üzerinde bakteri popülasyonunun arttığını primer inokulum kaynağının dormant dönemdeki tomurcuklar veya kanserlerin olduğunu bildirmişlerdir. Etmen çiçeklerde  $10^4$ - $10^6$  popülasyon yoğunluğunda olabilmekte ve yağmurlu soğuk havalar veya dondan sonra belirtiler daha tahripkâr hale gelmektedir. Araştırmacılar çiçek enfeksiyonların odun dokusu enfeksiyonuna sebep olduğunda kanser formlarının meydana gelebileceği fakat bunun tipik olarak yayılabilmesi için don zararının odun dokusunda çatlamalara ya da zararlanmalara neden olması gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca kanserli dokularda ve budanmış dallarda patojenin kolonize olmasına sebep olduğunu saptamışlardır.

Otta ve English (1970), Georgia' da yapılan bir çalışmada şeftali ağaçları Ekim veya Aralık ve Nisan aylarında budanmış ve budanan yerler patojen *P. syringae* izolatı ile inokule etmişlerdir. Çalışma sonucunda Kasım veya Aralık ayında budama yapılan ağaçlarda %57-100 arasında ölüm meydana gelirken, Nisan ayında budama yapılan ağaçlarda ölüm meydana gelmediği saptanmıştır. California' da Fransız eriği ile yapılan bir çalışmada Kasım ayında yapılan budama ile Aralık veya Mart ayında yapılan budama kıyaslandığında *P. syringae* enfeksiyonunun Kasım ayında yapılan budamada azaldığı belirlenmiştir.

Budama döneminin hastalık şiddetinde önemli bir rolü olduğunu özellikle kış budamalarında hastalık etmeninin odun dokusunda doku donmalarına sebep olmasından dolayı ciddi problemlere sebep olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Sobiczewski ve Jones, 1992; Vigourox, 1989; Weaver, 1987).

Hastalık etmeninin konukçusu üzerinde epifitik ve endofitik olarak hayatta kalabildiği belirtilmiştir (Crosse, 1956; Hirano ve Upper, 2000). *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum*' un epifitik fazında, bitkiye giriş yaptığı gelişme dönemi boyunca yapraklar

üzerinde ve sağlıklı görünen çiçeklerde hayatta kalabildiği ve gelişebildiği bildirilmiştir (Sundin ve Olson, 1988).

Yaz ayları boyunca patojenler meyve ve yaprak lekesi lezyonlarına neden olmakta ve/veya sağlıklı görünen yaprakların yüzeyinde epifitik olarak hayatta kalmadığı belirlenmiştir. Epifitik popülasyonlar yaz ayları boyunca yavaş yavaş azalmakta fakat sonbaharda sıcaklığın düşmesi ve yağmurların artmasıyla popülasyonun tekrar arttığı bildirilmiştir (Crosse, 1957-1966; Sundin, Olson ve Jones, 1988).

İngiltere’de kiraz ağaçlarında, *P. s. pv. morsprunorum*’un, Afrika ve ABD’nin Michigan eyaletinde hem *P. s. pv. syringae* hem de *P. s. pv. morsprunorum*’un sürgünlerde kışladığı belirlenmiştir (Crosse, 1956; Roos ve Hattingh, 1986; Sundin vd, 1988). Sonbaharda yere düşen yaprakların yaprak sapındaki enfeksiyon kirazın dormant sürgünlerinde kolonize olduğu saptanmıştır. Yağmur, rüzgar, soğuk hava gibi çevre şartlarına maruz kalan bitkilerde *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum*’un yaprak yüzeyinden yaprak sapına geçerek sistemik kolonizasyonunu meydana getirdiği belirlenmiştir (Sundin vd., 1988). Bu durumda sürgünler sağlıklı görünmesine rağmen bazen patojenin kanser başlangıcı ve sürgünlerde geriye doğru ölüm belirtilerine neden olabilmektedir. Sağlıklı görünen sürgünlerdeki bakterinin ilkbaharda sürgünlerde kolonize olarak hastalığın gelişmesine neden olduğu bildirilmiştir. *P. syringae* sıcaklığa duyarlı olmasından dolayı patojenin epifitik popülasyonu endofitik popülasyonu kadar uzun süre hayatta kalmadığı bu yüzden *P. syringae*’nin endofitik popülasyonları sistemik enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Hattingh vd., 1989).

*Pseudomonas* patovarylarının iki karakteristik aktif döneme sahip olduğu belirlenmiştir. Birinci dönemde sonbahar ve kışın don zararı sonucunda ağaçlarda enfeksiyon meydana gelir ve zararlanmalara yol açar. Meyve veren dallarda gözle görülemeyen zararların meydana geldiği ve etmenin kabuk dokusunda özellikle floeme yerleştiği dönemdir. Bazı zamanlarda bu dallarda kabukların soyulmasına sebep olabildiği gözlenmiştir. Sonuçta ilkbaharda yaprak ve çiçeklerde solmaların meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Hastalığın karakteristik ikinci dönemi ise ilkbahar aylarında tomurcukların yanmasına, sürgünlerde geriye doğru ölümlere ve dallarda yanıklıklara neden olduğu dönemdir. Etmenin kayısı ve kirazlarda zamklı yanıklıklara neden olduğu saptanmıştır. Yaprak ve meyve enfeksiyonlarının ilkbaharın sonuna doğru görüldüğü, patojenin popülasyonunun ise yaza doğru azaldığı fakat semptom göstermeksizin yapraklarda hayatta kaldığı bildirilmiştir (Young, 1987).



## Hastalık Etmeninin Neden Olduğu Simptomlar

*P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. morsprunorum* kiraz, vişne, kayısı ve diğer sert çekirdeklielerde çiçek yanıklığı, geriye doğru ölüm, yaprak ve meyve lezyonları, odunsu dokularda zamklanma ile ilişkili yanıklıklar, ağacın ana dallarında ölümlere ve ürün veriminde azalmalara neden olduğu bildirilmiştir. Her iki etmende kiraz bahçelerinde ciddi kayıplara neden olmasına rağmen *P. s. pv. syringae*' nin kirazda ve diğer sert çekirdekli meyvelerde, *P. s. pv. morsprunorum*' un ise vişne de daha virulent olduğu belirtilmektedir (Cross vd., 1959; Jones, 1971; Lattorre ve Jones, 1979).

Whitesides ve Spotts (1991), patojenin erken dönemde popülasyonunun sağlıklı görünen çiçeklerde arttığını bildirmişlerdir. Soğuk, yağışlı havalardan sonra çiçek yanıklığı symptomunun meydana geldiğini belirtmişlerdir. Armutta görülen çiçek yanıklığı symptomu ile sert çekirdekli meyvelerde görülen çiçek yanıklığı symptomunun birbirine benzer olduğu belirlenmiştir.

Stead vd., (2003), don zararının, bakteriyel yanıklık enfeksiyonları için bitkide yaraların açılmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Nekrotik çiçek enfeksiyonlarından başlayan yaygın bir symptomdur. Bazı zamanlarda don zararının sonucunda geriye doğru ölümlerin meydana geldiğini ve bitkinin büyüme dönemi boyunca meyve lekelerinin yaygın olarak görülebildiğini bildirmişlerdir. Meyve symptomları su emmiş lezyonlar olarak başlar ve gelişerek kahverengi bir renk alması şeklinde açıklanmıştır. Yaprak belirtileri, yapraktaki lekelerin etrafının gelişme döneminin başında klorotik halka ile çevrili olduğunu ve lekeler genişleyerek yaprak üzerinden düşerek yaprakların delikli bir görünüm aldığını belirtmişlerdir. Lekelerin düştüğü yerde deliklerin olduğunu saptamışlardır. Kirazda, yaprak symptomları tipik olarak yaprağın kenarında meydana geldiğini ve sonuçta kıvrımlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Yanıklık oluşumu, soğuk hava koşulları veya don zararı gibi bitkinin maruz kaldığı durumlardan dolayı bitkinin predizpozisyonunu bozarak zayıflattığı ve enfeksiyona kanserli dallar veya gövdenin üzerinde çöküntü gibi bir görünüm ve zamklanmalara neden olduğu saptanmıştır. Hastalık etmeninin bitkiye girişinde veya bahçe içerisinde yayılmasında budamanın etkili olduğunu, dormant tomurcuklar bazen kanserlerden yayılan direkt veya sistemik enfeksiyon sonucunda ölü tomurcuk symptomuna neden olduğunu bildirmişlerdir.

## Hastalık Etmeninin Tanınması ve Genetik Karakterizasyonunun Belirlenmesi

*P. syringae* izolatlarının sınıflandırılmasında tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR) ve King B besi ortamında fluoresan özellik gösterme gibi testleri içeren tanılama yöntemlerinin kullanıldığı bildirilmektedir (Klement ve Goodman 1967; King, Ward ve Raney, 1956; Lelliott vd., 1966).

Weingart ve Völksch (1997), bazı durumlarda, yalnızca bir veya iki primer seti ile PCR yapılmasının bazı yakın patovaların izolatları arasındaki ayrımı yapmada yeterli olamayabileceğini bildirmişlerdir.

*P. syringae* izolatları arasında büyük farklılıklar bulunduğu için, izolatların ayırımında patovalarının doğru olarak belirlenmesi için farklı konukçularda yapılan patojenite, biyokimyasal ve moleküler yöntemler gibi uygun tanı testleri gerekli olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Young, Takikawa, Gardan ve Stead, 1992; Gilbert, Legros, Maraite ve Bultreys, 2009).

Sawada, Suzuki, Matsuda ve Saitou (1999), *P. syringae*'nin aynı patovar izolatlarının daima genetik olarak yakın akrabalık göstermediğini filogenetik çalışmalar ile göstermişlerdir. *P. syringae* patovalarının filogenetik olarak sınıflandırılabilmesi için Tip 3 salgı sistemine bağlı olarak konukçu-patojen ilişkisini ve housekeeping genler arasındaki uygunluğun önemini vurgulamışlardır.

Feil ve Spratt (2001), MLST çalışmaları ile izolatların evrimsel gelişimlerinin ve orjinlerinin belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

Menard, Sutra, Luisetti, Prunier ve Gardan (2003), *P. s. pv. persicae*'nin yabancı kirazdan elde edilen izolatlarının ERIC- ve BOX-PCR ile ayırımının yapılırken REP-PCR ile yapılamadığını bildirmiştir.

Vicente ve Roberts (2007), kiraz ve yabancı kirazdan elde ettikleri *P. syringae* izolatlarının patovar ve ırk düzeyinde ayırmak için ERIC-, REP-, BOX-PCR yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen agaroz jel görüntülerinde bu yöntemlerin *P. s. pv. syringae* izolatlarını ayırmada kolaylık sağladığı fakat *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve ırk 2'yi ayırmak için uygun olmadığını bildirmişlerdir. Kullanılan yöntemler arasında REP-PCR metodu ile *P. s. pv. morsprunorum* ırkları arasındaki uzaklığın net bir şekilde belirlenebildiğini bildirmişlerdir.

Vicente ve Robert (2007), kiraz, vişne ve fındıktan izole edilen *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum* izolatları arasındaki genetik karakterizasyonun BOX-PCR ile ortaya konulduğunu bildirmiştir. Diğer taraftan Gilbert vd. (2009), kiraz, erik ve kayısıdan izole edilen *P. syringae* ve *P. viridiflava* izolatlarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde BOX-PCR' in yeterli olmadığını bildirmişlerdir.

Gilbert vd. (2009) Belçika'da 1993-2002 yılları arasında 36 farklı şeftali, erik ve kiraz bahçelerine yaptıkları survey çalışmaları sonucunda yaklaşık 356 adet bakteri izolatu elde etmişlerdir. İzolatların tanı ve genetik karakterizasyonlarının belirlenmesi için klasik testler ve REP-, ERIC-, BOX- ve IS50-PCR yöntemlerini kullanmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda 280 adet izolat *P. s. pv. syringae*, 41 adet izolat *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1, 12 adet izolat *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2, 3 adet izolat *P. viridiflava* ve 20 adet izolat ise patovar düzeyinde tanılanamayan *P. syringae* olarak belirlenmiştir. Genetik karakterizasyonun belirlenmesinde REP-PCR ve özellikle BOX-PCR'in *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2'in ayırımı için kullanılabilir olduğunu belirlemişlerdir. Genetik sonuçlarına göre *P. s. pv. avii* 'nin homogenitesine göre kıyaslandığında *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 yüksek oranda *P. s. pv. syringae* 'den ayrılmıştır. *P. s. pv. syringae* aynı konukçuları (armut, kiraz veya erik) homojen genetik grup içerisinde bulunduğunu saptamışlardır.

Ivanovic vd. (2009) şeftali, armut, elma, erik, kiraz, vişne ve böğürtlenden izole ettikleri izolatların armut, kiraz ve limon meyveleri üzerinde patojenisite çalışmalarını yapmışlardır. Şeftali, armut, elma ve böğürtlenden izole edilen izolatlar patojenisite çalışmalarına göre etmeni *P. s. pv. syringae* olarak tanılamışlardır. Erik ve kiraz gözleri ile vişne meyvelerinden izole edilen izolatların kiraz meyvelerindeki patojenite test sonucuna göre *P. s. pv. morsprunorum* olduğu bildirmişlerdir. İzolatların GATTA sonuçlarına göre elma, armut ve şeftali izolatlarını içeren birinci grup test sonuçları (++--) ile *P. s. pv. syringae* olarak, ikinci kiraz ve erik izolatlarını içeren ikinci grup ise test sonucu (--++) olarak değerlendirilerek *P. s. pv. morsprunorum* olarak tanılanmıştır. Genetik çalışmalar sonucunda şeftali, armut, elma, erik vişne ve böğürtlen gibi farklı konukçulardan elde edilen izolatların konukçularına göre ayırmda özellikle BOX –PCR kullanılması ile belirlenebileceği bildirilmiştir.

*P. syringae* izolatlarının karakterizasyonu için kullanılan çeşitli moleküler metotlar arasında bulunan ERIC-, REP-, BOX PCR, sert çekirdekli meyve ağaçlarında bakteriyel kansere sebep olan çeşitli patojenlerin analizi, sınıflandırılması ve tanılanmasında kullanılan en

yaygın yöntemler olduğu bildirilmiştir. Özellikle REP-PCR, *P. s. pv. syringae*'nin de içinde bulunduğu *Pseudomonas syringae* izolatları arasındaki genetik karakterizasyonun belirlenmesindeki en ayırt edici metot olduğu saptanmıştır (Rademaker ve De Bruijn, 1997; Scortichini vd., 2003; Gilbert vd., 2009).

Bultreys ve Kaluzna (2010), GATTa testine ek olarak sukroz nutrient broth besi yerinde gelişim, buz çekirdeği aktivitesi ve insitolden asit üretimi gibi testlerin *P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 nin tanısında kullanmışlardır. Sukroz nutrient broth besi yerinde *P. s. pv. syringae*'nin sarı renkte koloni gelişimi, *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1'in beyaz renkte koloni gelişimi gösterdiğini, *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2'nin ise değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Kaluzna, Ferrante, Sobiczewski ve Scortichini (2010), kiraz (*Pisum avium* L), vişne (*Pisum cerasus* L), erik (*Pisum domestica* L), şeftali (*Pisum persica* L) ve kayısıdan (*Pisum armeniaca* L) elde ettikleri izolatları LOPAT tanı testlerine göre tanıyarak 23 adet izolatın *P. syringae* olduğunu belirlemişlerdir. İzolatların biyokimyasal testler ile tanı çalışmaları için GATTa ve L-lactate testlerini kullanmışlardır. Test sonuçlarına göre 23 izolattan 10 izolat *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1, 6 adet izolat *P. s. pv. syringae* ve 6 adet izolat ise *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 olarak tanılamışlardır.

Parkinson ve Elphistone (2010), *rpoD* gen bölgesi kullanılarak yapılan sekans çalışmalarında etmenin sekans sonuçları NCBI veri tabanında taranarak patovar düzeyinde izolatlarının tanısını yapmışlardır. Bu gen bölgesi filogenetik ve taksonomik analiz çalışmaları içinde kullanılmasında etkili genin *rpoD* olduğunu bildirmişlerdir (Mulet, Lalucat ve Garcia-Valdes, 2010). Rajwar ve Sahgal (2016), *rpoD* gen bölgesinin, *Pseudomonas* türleri arasındaki alttürlerin belirlenmesinde son zamanlarda 16S rRNA'dan daha iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

Kaluzna vd. (2012), biyokimyasal testlerden olan GATTa testi *P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 arasındaki ayırımı açıkça ortaya koyduğunu bildirmişlerdir. GATTa testine göre (++--) *P. s. pv. syringae*, (--++) *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve (+--) ise *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 olarak tanılandığı bildirilmiştir.

Gavriloviç vd. (2012), Sırbistan'da kiraz üretim alanlarından elde ettiği *Pseudomonas* izolatlarının tanısını patojenite testi ve GATTa testine göre yapmışlar ve iki farklı grubun olduğunu belirlemişlerdir. Birinci grupta yer alan kiraz nekrotik dallarından izole edilen

izolatların kiraz, armut, limon, leylak ve fasulye bitkilerinde yapılan patojenite testi sonucunda nekroza sebep olan izolatlara GATTa testi yapmışlardır. İzolatlar test sonuçları (++--) olmasından dolayı *P. s. pv. syringae* olarak tanılamışlardır. İkinci grubu ise kiraz tomurcuklarındaki nekrotik alanlardan izole edilen izolatların patojenite testi sonucunda nekroza sebep olmadığı ve GATTa test sonuçlarına göre (--++) olduğu saptanarak *P. s. pv. morsprunorum* olarak tanılamışlardır.

Gasic vd. (2012), *P. syringae* patovarlarının sert çekirdekli bitkilerde oluşturdukları semptomların karıştırılabilmesinden dolayı patovarların ayırımında kullanılacak bazı standart ve moleküler yöntemlerin araştırılması üzerine çalışmışlardır. İzolatların tanısı ve ayırımında LOPAT ve GATT testlerinin yanı sıra buz çekirdeği aktivitesi ve çeşitli karbon kaynaklarında kullanımı gibi testleri uygulamışlardır. Moleküler çalışmalarda *P. s. pv. syringae* için *syxB* ile *syxD* ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 için *cfl* genlerini kullanmışlardır. Ayrıca *Geotrichum candidum*, *Saccaromyces cerevisiae* ve *Rhodotorula plumanae* bitkilerini kullanarak *P. s. pv. syringae* 'nin syringomisin üretimini testlemişlerdir. İzolatların patojenite testi için limon, nektarin ve fasulye kapsüllerinden faydalanmışlardır.

Gasic vd. (2012), King B besi ortamında floresan koloni gelişiminin ve LOPAT testlerinin *Pseudomonas* türlerini birbirinden ve bazı diğer cinslerden ayırmak için kullanılacak yöntemlerden biri olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle King B besi ortamında gösterdikleri floresan özellik *Pseudomonas* türlerini birbirinden ayırmak için oldukça önemli olduğunu belirtmiştir. Örneğin *P. s. pv. persicae* King B besi ortamında çok yavaş geliştiğini ve floresan pigment ürettiğini bildirmişlerdir. Latorre ve Jones, (1979; Gilbert vd. (2009), *P. syringae* 'nin patovar ayırımı için kullanılan GATTa testinin *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ayırımında kullanılabilirliğini, *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2' nin ayırımı için kullanılamayacağını bildirmişlerdir.

Ivanovic vd. (2012) böğürtlen, erik, kiraz, vişne, şeftali, armut ve elma ağaçlarından izole ettikleri *P. syringae* izolatlarının moleküler analizlerini yapmışlardır. Yapılan profil çalışmaları sonucunda izolatların *P. s. pv. morsprunorum*'a benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Bunun yanında REP-PCR kullanılarak yapılan çalışmalarda *P. syringae*'nin farklı konukçulardan izole edilen izolatlarının yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçları gibi farklı gruptan izole edildiklerinin ayırımının yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Kaluzna vd. (2012), Polonya ve İtalya’da kiraz (*Pisum avium* L.), vişne (*Pisum cerasus* L.), erik (*Pisum domestica* L.) ve fındık (*Corylus avellana* L.) bitkilerinden elde ettikleri 33 adet bakteri izolatını klasik testler ile tanılamışlardır. İzolatlardan 16 tanesi *P. s. pv. syringae*, 12 adedi *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve 5 adedi ise *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 olarak saptamışlardır. İzolatların toksin üretimleri incelendiğinde, *P. s. pv. syringae* izolatlarından 11 adedinin syringomisin (*syfB*), 3 adedinin *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 coronatin (*cfl*) ve 3 adedinin ise *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 izolatı yersiniabactin (*irpI*) genine sahip oldukları belirlenmiştir. ERIC, REP ve BOX-PCR kullanılarak patovaryalar ve ırkların ayrımlarını yapmışlardır. Bunlardan ERIC ve BOX benzer sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir. *gyrB*, *gapA*, *gltA* ve *rpoD* genleri kullanılarak yapılan MLST-PCR’da izolatlar *P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 olmak üzere 3 gruba ayrıldığını saptamışlardır.

Abbasi, Rahminian ve Ghanbari (2012), *P. s. pv. syringae* ’nin moleküler tanısı *syfB* genine göre dizayn edilen primerin kullanıldığında 752 bp baz uzunluğunda PCR ürünleri elde edilirken, Albelleria vd. (2014), yaptıkları çalışmada *P. s. pv. morsprunorum* ’un moleküler tanımlanmasında kullanılan *cfl* geninin kullanıldığı PCR çalışmalarında ise 650 bp baz uzunluğunda PCR ürünlerinin elde edildiğini bildirmişlerdir.

Haghighi ve Taghavi (2014) yapmış olduğu bir çalışmada *Prunus* türleri ile şeker pancarı, armut, ayva, yulaf, buğday, arpa ve çeltik gibi diğer konukçularından elde edilen *P. s. pv. syringae* izolatlarının REP-PCR ve RAPD PCR teknikleri kullanarak genetik karakterizasyonunu belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda bu teknikler kullanılarak yumuşak çekirdekli, sert çekirdekli ve buğdaygil (tahıl) konukçuları gibi farklı konukçulardan elde ettikleri *P. s. pv. syringae* izolatlarının genetik ayrımının yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Horuz (2014), yapmış olduğu çalışmada AFLP-PCR yöntemiyle izolatlar arasındaki genetik akrabalığı belirlemiştir. Çalışmada Dünya ve ülkemizdeki *Acidovorax citrulli* izolatlarının genetik benzerlikleri belirlenerek, izolatların inokulum kaynakları belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda izolatların iki gruba ayrıldığı ve her iki grupta yer alan izolatlarında inokulum kaynağının karpuz ve diğer kabakgil türleri olduğu belirlenmiştir. Farklı ülkelerden elde edilen izolatlarla ülkemizdeki izolatların aynı kökenli olduğu, hastalığın bu sebepten dolayı tohum ticaretiyle yayılmış olabileceğini moleküler yöntemlerle kanıtlamıştır.

Ertimurtaş ve Özaktan (2014) *P. syringae* patovarylarının, LOPAT, GATTA testleri, karbon kaynaklarında asit oluşumu testi (mannitol, sorbitol, inositol, erythritol, tartaricacid, lacticacid, tyrosin) gibi klasik yöntemlerin yanı sıra, patojenisite ve patolojik temelli fitotoksinlerinin dikkate alındığı *in vitro*' da syringomycin üretiminin ve buz çekirdeği oluşturma aktivitesinin saptanması gibi tanılama yöntemleri ile tanılamalarını yapmıştır. *P. s. pv. syringae* 'nin syringomycin sentezinden sorumlu *syrB* geni ve *P. s. pv. morsprunorum* 'un coronatine sentezinden sorumlu *cfl* geninin moleküler tanısı, klasik PCR testi ile kesin tanılamasını yapmışlardır. Ayrıca *P. syringae* patovarylarının ayırt edilmesinde kullanılan *cts*, *gapA* *gyrB* ve *rpoD* genlerinin sekans analizlerini de yapmışlardır. Klasik ve moleküler tanılama testleri sonucunda, testlenen 15 *P. syringae* izolatının 9' unun *P. s. pv. syringae* olduğunu saptamışlardır.

Ilıcık, Balaz, Stojsin ve Josic (2016), Sırbistan'da farklı lokasyonlardaki kiraz alanlarındaki farklı kiraz varyetelerinden *P. syringae* patovarylarını izole etmişlerdir. Elde ettikleri izolatları aynı bölgeden daha önce elde ettikleri kiraz, vişne ve balkabağından izole ettikleri izolatlar ile karşılaştırmışlardır. GATTA ve LOPAT testleri sonucunda izolatlar *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 olarak tanılanmıştır. REP-PCR ile izolatlar arası genetik akrabalık belirlemişlerdir. *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 izolatları farklı gruplarda yer alarak %42 oranında benzerlik göstermişlerdir. Farklı lokasyonlardan ve farklı kiraz varyetelerinden elde edilen izolatlar arasında herhangi bir farklılık görülmediğini belirlemişlerdir. *P. s. pv. syringae* izolatları kirazdan izole edilmiş olan referans T6 *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 izolatı ile %19 ve balkabağından izole edilmiş T21 izolatı ile %25 benzerlik göstermiştir.

Giovanardi, Ferrante, Scortichini ve Stefani (2018), Kuzey İtalya kayısı bahçelerinde yaptıkları surveyler sonucunda elde ettikleri izolatların King B besi ortamında koloni morfolojisi, tütün bitkisinde HR testi sonucuna göre 31 izolatı *Pseudomonas* sp. olarak belirlemişlerdir. GATTA test sonuçlarına göre 31 izolatın 20 adeti *P. s. pv. syringae*, 8 adeti *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 ve 3 adeti ise *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 olarak tanılamışlardır. Klasik PCR ile izolatların tanısı syringomycin sentezinden sorumlu *syrD* ve coronatine sentezinden sorumlu *cfl* primerleri kullanıldığında, *syrD* primeri çifti kullanıldığında 19 izolat 1040 bp uzunluğunda bant oluşturarak *P. s. pv. syringae* ve *cfl* primer çifti kullanıldığında ise 8 izolat 650 bp uzunluğunda bant oluşturarak *P. s. pv. morsprunorum* olarak tanılamışlardır. İzolatlar ile *rpoD* gen bölgesinin sekans analizi yapılarak sonuçlar NCBI veri tabanında kontrol

edildiğinde 20 izolatın *P. s. pv. syringae*, 8 izolatın *P. s. pv. morsprunorum* olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesi için ERIC-, REP-, BOX-PCR yapılarak, izolatların 100 bp ile 5000 bp arasında bant oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bant uzunluklarına göre oluşturulan dendogramda *P. s. pv. syringae* izolatları için 6 grup, *P. s. pv. morsprunorum* ırk 1 için 2 grup, *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 için 1 grup ve hem *P. s. pv. morsprunorum* ırk1 hem de *P. s. pv. morsprunorum* ırk 2 yi birlikte içeren 2 grup olmak üzere toplamda 11 grup belirlemiştir.

Kaluzna (2019), kızılçık (*Cornus mas* L.) ve yabancı kızılçık (*Cornus sanguinea*)' dan elde ettikleri izolatların LOPAT testleri ile tanısında, izolatların LOPAT 1a grubunda yer alarak *P. syringae* olduğunu belirlemiştir. İzolatların moleküler tanısı için coronatin sentezinden sorumlu *cfl*, syringomycin sentezinden sorumlu *syxB* ve *syxD*, yersinibactin sentezinden sorumlu *irpI* primerleri kullanıldığında, kızılçıktan izole edilen 5 izolatın *irpI* primer çifti için 967 bp uzunluğunda bant oluşturduğu ve yabancı kızılçıktan izole edilen 1 izolatın *syxB* ve *syxD* primer çiftleri için 752 bp ve 2048 bp uzunluğunda bant oluşturduğu belirlenmiştir. 16S rRNA ve *gyrB* ve *rpoD* housekeeping genleri kullanılarak yapılan sekans çalışmaları sonucunda oluşturdukları maximum-benzerlik analizi ile filogenetik ağaç oluşturmuştur. İzolatların diğer *Pseudomonas* türleri ile genetik yakınlığı incelendiğinde kızılçıktan izole edilen izolatların en fazla yakınlığı fındıkta patojen olan *P. avellane* ile gösterdiğini belirlemiştir. Yabancı kızılçıktan elde edilen izolat ise *P. s. pv. syringae* olarak tanımlamıştır.

### **Hastalık Etmeni ile İlgili Genetik Akrabalık Çalışmaları**

O'Brien vd. (2011) bildirdiğine göre gelişen teknolojiyle birlikte, moleküler bitki patolojileri bitkilerde hastalık oluşumu için konukçu ve patojen arasındaki ilişkiyi tanılamak ve bu genetik kaynakları belirlemek için yeni yöntemler geliştirmektedir. Bilimsel çalışmaların *in vitro* ve *in vivo* olarak bilinen klasik işleyişine, *in silico* ile yeni bir bakış açısı getirmeye çalışılmaktadır. Moleküler çalışmaların sonuçlarının farklı veri tabanlı programlar (MEGA, MacOSX, MySQL, BioSQL) kullanılarak yapılan çalışmalar, yeni bir bakış açısı ve heyecan getirmektedir. Son yıllarda next-generation genomlarının kabul edilmesiyle alternatif bir gen yaklaşımı sağlanmıştır. Bu metodlar ile bakteri genomunun karşılaştırılabilir analizi ortaya çıkarılmıştır.

*P. syringae* izolatları' nın genetik karakterizasyonu ERIC-, REP- ve BOX-PCR ile belirlenmiş ve buradan sonraki adıma geçilememiştir. Dolayısıyla ülkemizde bulunan *P. syringae* izolatlarının genetik orijini, dünya izolatlarıyla karşılaştırılması ve farklı



*Pseudomonas* türleriyle olan genetik benzerliği üzerine bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle konukçu ve simptom açısından zengin bir grup olan *P. syringae*'nin yeni dönem yöntemlerinden birisi olan MLSA ile aynı cins içindeki farklı türler arası genetik köken ve izolatlar arası genetik uzaklığın belirlenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca aynı cins ait izolatların genetik özellikleri ve virülenslik faktörlerine göre filogruplara ayrılabilceği belirlenmiştir (O'Brien vd., 2011).

Sarkar ve Guttman (2004), farklı konukçulardan izole edilen 21 patovar ve 2 non-patojeni içeren 60 adet *P. syringae* izolatının genom yapısını MLST ile incelemiştir. *P. syringae*'nin merkez genomunda bulunan 7 housekeeping genin sekansını yapmışlardır. Filogenetik ve maximum-likelihood analizleri, evrimsel gelişimlerini belirleyebilmek için yaygın olduğu bilinen 7 gen arasındaki uygunluğun farkedilir derecede olduğunu ortaya koymuşlardır. MLST ve popülasyon genetik analizleri sonucunda rekombinasyon seviyelerinin düşük olduğunu belirlemiştir. Çalışmada kullanılan skyline plot programı *P. syringae*'nin demografik tarihi üzerinde çalışarak türlerin zaman içinde sabit bir popülasyon büyüklüğünü devam ettirdiklerini bulmuşlardır. Japonya ve Amerika gibi farklı yerlerden izole edilen izolatların uzun yıllar boyunca genetik özelliklerini koruduklarını belirlemiştir. Moleküler varyans analizi çalışmaları (AMOVA), örnekler içerisindeki toplam genetik çeşitliliğin yalnızca küçük bir kısmının konukçu ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Chapman vd. (2012), efektör gen sekansları ve housekeeping genlerinin kullanıldığı MLSA çalışmaları ile izolatların gruplandırılabilceğini bildirmiştir.

Martin-Sanz, Perez de la Vega, Murillo ve Caminero (2013), *P. syringae* patovamları ve konukçuları arasındaki ilişkiyi çözmek için MLST yönteminden yararlanmışlardır.

Marcelletini ve Scortichini (2014), MLSA ile belirlenen filogruplar ile birçok cins ait izolatların genetik kökenleri ve akrabalıklarını belirlemiştir. Bu yöntemin dünyada tercih edilmesinin nedeni ise bakteri türlerinin genetik tanımlarında hem güvenilirliği hem de tekrarlanabilir olmasından dolayı olduğunu belirlemiştir. Zamanın en değerli kavram olduğu günümüzde kısa zamanda doğru ve kesin sonucu veren yöntemin tercih edilmesi bilime yapılan etkili bir katkı niteliğinde olduğunu bildirmiştir.

Bui Thi Ngoc vd (2010), farklı konukçulardaki *P. syringae* izolatları arasındaki genetik ve fenotipik çeşitlilik, konukçu bitkinin orijiniyle alakalı olabileceği hipotezi; çeşitli simptomlara sebep olan *P. syringae* izolatları zaman içinde kendi konukçuları dışında yakın

türlerdeki diğer konukçulara da adapte olarak hastalık meydana getirdiğini belirlemişlerdir. Newberry vd. (2016), bundan dolayı Amerika’ da diğer cucurbit (karpuz, kavun, kabak) ve hiyardan izole edilen izolatlar *P. s. pv. lachrymans* olarak belirlenen izolatların, genetik olarak ayrıldığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Morris vd. (2000), Fransada kavundan izole edilen *P. syringae* izolatları biyokimyasal ve patojenite testleriyle *P. s. pv. aptata* olarak tanılanmışken (Morris vd., 2000), Newberry vd (2016), Çin’ de kavunlardan izole edilen izolatların metabolik ve genetik testlerde *P. s. pv. lachrymans* olarak tanılanmışlardır. Bu çalışma ile hıyar ve kavundan izole edilen *P. syringae* izolatlarının heterogenik olabileceğini göstermişlerdir.

Hall, Dry, Blanchard ve Whitelaw-Ceckert (2016), Avustralya’ da bağ alanlarından izole edilen *P. s. pv. syringae* izolatlarının *gapA*, *gltA*, *gyrB* ve *rpoD* genlerini kullanarak yaptıkları MLST çalışmaları ile izolatların 2 gruba ayrıldığını tespit etmişlerdir.

Lu, Breitwieser, Thielen ve Salzberg (2017), housekeeping genleri bakterilerin sınıflandırılması ve filogenetik analiz çalışmaları için büyük bir potansiyel olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada 100 adet *Pseudomonas* izolatı için 16S rRNA, *rpoD*, *gapA*, *gltA* ve *gyrB* housekeeping genleri kullanmışlar ve *rpoD* ile *gapA* housekeeping genlerinin çoğu *Pseudomonas* patovaryalarının ayırımında en yüksek kabiliyet gösterdiği belirlemişlerdir.

Hall, Dry, Gopurenko ve Whitelaw-Wreckel (2018), bağ alanlarından izole ettikleri *P. s. pv. syringae* izolatlarının genotipik ve fenotipik karakterizasyonunu belirlemek için, MLST, AMOVA ve biyokimyasal testlerini kullanmışlardır. İzolatların MLST sonuçlarını PAMDB veri tabanında kayıtlı bulunan diğer filogruplar ile kıyasladıklarında yeni bir sınıf olan *P. syringae* filogrup 2’ de yer aldığını tespit etmişlerdir. Bu yeni filogrubun hem epidemik *P. syringae* izolatlarını hemde non-patojenik izolatları birlikte içerdiğini ortaya koymuşlardır.

### **Hastalığın Mücadelesi ve Bakıra Dirençle İlgili Çalışmalar**

Benlioğlu ve Benlioğlu (1998), yaptıkları çalışmada ülkemizde domatesten izole edilen *Pseudomonas syringae* pv tomato izolatlarının bakırlı preparatlara (bakır oksiklorür, bakır oksit, bakır hidroksit) ve ethylene bisdithiocarbamate’lı fungusitlere (maneb, mancozeb) *in vitro* ve sera testlerinde etkisiz olduğunu belirlemişlerdir.

Sayler ve Kirkpatrick (2003), sert çekirdekli meyvelerde ekonomik kayıplara sebep olan *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum*’ un mücadelesi için, bakır ve N-K-P gübre uygulamalarının hastalık şiddeti üzerine olan etkisini belirlemişlerdir. Dormant dönemde N-K-

P gübre uygulaması ve bakır uygulaması birlikte yapıldığında hastalık şiddetinin önemli ölçüde azaldığını saptamışlardır. Bakır tek başına uygulandığında ise hastalık şiddeti üzerine büyük bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Scortichini ve Ligouri (2003), Acibenzolar-S-methly (ASM) birleşiminin bitkide sistemik dayanıklılığı teşvik ederek patojen saldırılarına karşı bitkiyi koruduğunu bildirmişlerdir. İtalya’ da fındık üretim alanlarında sorun olan *P. s. pv. syringae*’ nin, fındık bahçelerine aylık uygulanan ASM ile hastalık şiddetinin düşürdüğünü saptamışlardır.

Mirik, Aysan ve Çınar (2007), yaptıkları çalışmada ülkemizde biberden izole edilen *Xanthomonas campestris pv campestris* izolatlarının bakıra dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada SPA besi ortamına bakır sülfatın 30 ve 150 µg/ml dozları eklenmiştir. 10<sup>8</sup> cfu/ml yoğunluğunda hazırlanan bakteri solüsyonu SPA bulunan petri kaplarına yayılmıştır. Petriye 36-48 saat 28°C’de inkübe edilerek koloni gelişimleri gözlenmiştir. Çalışma sonucunda izolatların bakıra direnç (dayanıklılık) gösterdiği belirlenmiştir.

Çetinkaya-Yıldız (2007), yaptığı çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* izolatlarının bakır sülfata karşı dayanıklılığını belirlemiştir. Çalışmada kullanılan 15 izolatın bakır sülfatın 300 ppm dozuna duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir.

Farhadfar vd. (2016), 21 farklı kiraz ve vişne varyetesinin hastalığa karşı dayanıklılık reaksiyonları üzerine arazi çalışması yapmışlardır. Çalışma sonucunda Siyah-daneshkadeh çeşidinin hastalığa karşı en duyarlı, Albaloo-meshkinshahr çeşidinin ise en dayanıklı çeşit olduğunu belirlemiştir.

Hulin vd. (2018), farklı kiraz çeşitlerinin *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morsprunorum*’a karşı çeşit reaksiyonları üzerine çalışmışlardır. Napoleon, Van ve Merton Glory çeşitleri kullanılarak yapılan çalışma sonucunda Merton Glory kiraz çeşitlerinin diğer çeşitlere göre hastalığa karşı dayanıklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Shahryari, Rabiei ve Somayeh (2020), sert çekirdekli meyve ağaçların da sorun olan *P. s. pv. syringae*’ ye karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda gümüş nanopartikülleri (AgNPs) ve AgNPs+kitosan (Cs) kombinasyonunun hastalık şiddeti üzerine olan etkisini denemişlerdir. AgNPs ve Cs-Ag’ nin *in vitro* çalışmalar sonucunda minimum engelleme konsantrasyonu (MIC) sırasıyla 12 ppm ve 9.2 ppm Cs /4 ppm AgNPs olarak belirlenmiştir. Çalışmanın *in vivo* denemelerini 2 yıllık kayısı fidanları üzerinde denemişlerdir. 100 ppm konsantrasyonunda

AgNPs ve 100 ppm AgNPs/ 231,48 ppm Cs kombinasyonu kullanılarak yapılan uygulamalarda sırasıyla hastalık şiddetinin %89,40 ve %86,61 oranında azaldığını belirlemişlerdir.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3. 1. MATERYAL

Karakteristik hastalık belirtisi gösteren kiraz bitki örneklerinden izole edilen bakterilerin tanılama çalışmalarında karşılaştırma kültürleri Çizelge 3.1’de verilen referans izolatlar, Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarından izole edilen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatları, besi yerleri, çeşitli kimyasallar, laboratuvar malzemeleri, inkübatör, etüv, otoklav, pH metre, spektrofotometre ve PCR aleti bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

Çizelge 3.1. Tanı çalışmalarında kullanılan referans izolatlar

Hastalık Etmeni	İzolat sahibi
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> Cmm 3a-r	Prof. Dr. Yeşim AYSAN
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> Naip1-1	Prof. Dr. Mustafa MİRİK
<i>Erwinia amylovora</i> 55	Yük.Zir.Müh. Nesrin TUNALI
<i>Pectobacterium caratovororum</i> subsp. <i>caratovororum</i> Rb4e	Prof. Dr. Yeşim AYSAN

#### 3. 2. YÖNTEM

##### 3. 2. 1. Hastalık Belirtisi Gösteren Kiraz Bitkilerinin Toplanması

Marmara Bölgesinde kiraz üretiminin yapıldığı Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Edirne, İstanbul, Kırklareli, Kocaeli, Tekirdağ ve Yalova illerine 2016-2018 yılları arasında surveyler yapılmıştır. Kiraz bahçelerinde sürgünlerde ve dallarda kahverengi lekelenmeler ve zamklanma belirtilerinin görüldüğü bitkiler toplanarak gazete kağıdına sarılmış ve polietilen torbalar içerisine konularak buz kutusu içinde survey çalışması süresince muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir. Çalışmada kullanılan referans izolatların listesi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

##### 3.2.2. Hastalıklı Bitkilerden Bakteriyel Etmenin İzolasyonu

İnceleme yapılan bahçelerden laboratuvara getirilen örneklerden Schaad, Jones ve Chun (2000)’e göre hastalıklı ve sağlıklı dokuyu içerecek şekilde 1-3 mm çapında parçalar steril bir bistürü yardımıyla kesilmiştir. %70’ lik alkolle her bir parçanın yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra steril havanlarda ezilmiş ve 2 ml nutrient broth eklenerek homojenize edilmiştir. Bu süspansiyondan bir öze dolusu alınarak King B (10,0 g proteose peptone, 10,0 g

tryptone, 1,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10,0 ml gliserol, 15 g agar, 1000 ml saf su) besi ortamı bulunan petrilere 3 çizgi yöntemiyle çizimleri yapılmıştır. Petrilere 25 °C deki inkübatörde 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. King B besi yerinde gelişen krem renkli koloniler saflaştırılarak izolatlar elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere iki farklı şekilde saklanmıştır. Bunlardan birincisi Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agar (YDCA) besi yerinde +4 °C buzdolabında (Lelliott ve Stead, 1987) ve diğeri 500 µl steril nutrient broth içeren ependorf tüpler içerisine 1 öze dolusu bakteri ve %30 oranında gliserol'den 500 µl eklenerek -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. Elde Edilen İzolatların Klasik Testlerle Tanısı

Kiraz bahçelerinde hastalık belirtisi gösteren ağaçların dal ve sürgünlerinden izole edilen bakteri izolatlarının klasik testlerle tanısı yapılmıştır. İzolatların patojenite testi için ham kiraz meyveleri kullanılmıştır. İzolatların fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için %3' lük potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi ile Gram reaksiyonu, LOPAT (L: SNA besi yerinde **L**evan tipte koloni gelişimi, O: **O**ksidaz reaksiyonu, P: **P**atatestte pektolitik aktivite, A: **A**rginin dehidrolaz aktivitesi, T: **T**ütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu) ve GATTA (G: **G**elatinin hidrolizi, A: **A**esculin hidrolizi, T: **T**irosin kullanımı, Ta: **T**artarik asit kullanımı) testleri yapılmıştır.

**Patojenite Testi ve Re-izolasyon:** Elde edilen izolatların ham kiraz meyveleri üzerinde patojenite testleri yapılmıştır. Sağlıklı kiraz bahçelerinden temin edilen ve herhangi bir lekelenmenin olmadığı yeşil (ham) kiraz meyveleri %5' lik hipoklorit içerisinde 5 dakika bekletildikten sonra 3 defa steril su ile yıkanarak yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Patojenite çalışmalarında kullanılmak üzere 48 saat geliştirilmiş bakteri kültürü steril bir kürdan ile alınarak ham kiraz meyvesi üzerine inokule edilmiştir. İnokule edilen kiraz meyveleri içerisinde steril su ile ıslatılmış kurutma kağıdı bulunan plastik petrilere konularak 25 °C' de 7-10 gün inkübe edilmiştir (Moragrega, Llorente, Manceau ve Montesinos, 2003). Pozitif kontrol olarak Naip1-1 izolatı, negatif kontrol olarak steril saf suya batırılan steril kürdan ile kiraz üzerinde küçük delikler açılmıştır.

İnkübasyon süresinden sonra kirazlar üzerinde görülen kahverengi-siyah nekrotik alanların oluşumuna göre belirti var/yok olarak değerlendirilmiştir. Belirti var olarak değerlendirilen kirazlardan re-izolasyonlar yapılarak elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmaları yapılmıştır.

**Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon:** Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra 48 saatlik bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak, solüsyon içerisinde dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu sünmenin nedeni ise potasyum hidroksit' in Gram negatif bakterilerin hücre duvarını parçalanmasıdır (Sands, 1990). Kontrol olarak gram pozitif özelliğe sahip Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, gram negatif özelliğe sahip Naip1-1 izolatları kullanılmıştır.

### **LOPAT Karakterlerinin Belirlenmesi**

**Levan Oluşumu:** Nutrient Agar ortamına %5 oranında sakkaroz eklenerek hazırlanan Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine Marmara Bölgesi izolatları çizildikten sonra 25°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Kalın, beyaz, konveks, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Levan pozitif özellikteki bölgemizden izole edilen 55 kodlu *Erwinia amylovora* izolatı çalışmada kullanılmıştır.

**Oksidaz Testi:** Taze hazırlanan %1'lik N; N; N; N'- Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diclorid eriği steril filtre kağıdına damlatılmıştır. İzolatlarının 48 saatlik kültürü platin öze ile ıslak kurutma kâğıdına çizildiğinde 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kovaks, 1956). Oksidaz pozitif özellikteki Naip1-1, negatif kontrol olarak Pst1 kodlu *P. s. pv. tomato* izolatı çalışmada kullanılmıştır.

**Pektolitik Aktivite Testi:** Patates yumruları önce deterjanlı suda fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra yüzey dezenfeksiyonu için %1'lik NaOCI'da 3 dakika bekletilmiştir. NaOCI'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemden sonra steril bir bisturi ile kabukları soyulmuştur. Steril nemli filtre kağıdı içeren steril petri içine kabuğu soyulmuş bir cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu bakteri kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25°C'de iki günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Pektolitik enzim ürettiğinden dolayı patates dilimlerinde yumuşak çürüklüğe neden olan Rb4e kodlu *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* negatif kontrol olarak Naip 1-1 izolatı çalışmada kullanılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

**Arginin Dehidrolaz Testi:** Thorney 2A (1 L distile su, 1,0 g peptone, 5,0 g NaCl, 0.3g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,0 g Agar, 0.01g phenol red, 10,0 g/l L-arginine) besi yerinde tüplere 3'er ml

konulmuş ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika bekletilerek steril edilmiştir. Daha sonra tüplere bakteri kültürleri aşılanmış ve üzerleri 2 ml sıvı parafinle kapatılmıştır. 7-10 gün 27°C'de inkübasyondan sonra ortamın pembe-kırmızıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak Naip1-1 kodlu *P. s. pv. syringae* izolatu, kontrol olarak kullanılmıştır.

**Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi:** Tütün (*Nicotiana tabacum* cv Samsun N) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına izolatlarının 10<sup>8</sup> hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak değerlendirilmiştir (Klement ve Goodman, 1967). Pozitif kontrol olarak Naip1-1 *P. s. pv. syringae* izolatu kullanılmıştır.

### **GATTa Karakterlerinin Belirlenmesi**

**Jelatin hidrolizi:** *P. syringae* izolatlarının jelatin hidrolizi için besi yeri 5,0 g pepton, 3,0 g beef extract ve 120,0 g jelatin içermektedir. Karışım tartıldıktan sonra, jelatin 50°C' de eritilmiş, pH 7-7.2' ye ayarlanmıştır. Tüplere 5 ml konmuş ve otoklavda 121°C de sterilize edilmiştir. Tüplere bakteri aşılandıktan sonra 20°C'de 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. *P. s. pv. syringae* için tüplerdeki jelatin akıcı ve test sonuçları pozitif; *P. s. pv. morspurunorum* için tüplerdeki jelatin katı ve test sonuçları negatif olarak değerlendirilmiştir (Schaad vd., 2001).

**Esculin hidrolizi:** Bakteriyel izolatların esculin hidrolizini belirlemek için besi yerinde 10 g pepton, 1,0 g Eskülin, 1,0 g sodyum sitrat ve 0,05 g demir sitrat içermektedir. Besi yerinin hazırlandıktan sonra pH 7'ye ayarlanmış ve 5 ml olacak şekilde tüplere konularak otoklavda steril edilmiştir. Tüplere bakteri aşılandıktan sonra 27-28°C' de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besi yerinin kahverengi-siyah renk alması pozitif olarak değerlendirilmiştir.

**Karbon kaynaklarının kullanımı:** *P. s. pv. syringae* ve *P. s. pv. morspurunorum* izolatlarının ayırımında karbon kaynaklarını kullanım durumları önemlidir. Hazırlanan bazal ortama için (1 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl, 0,2 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,08 g Bromthymol blue, 14 g Agar) agar dışındaki kimyasallar 900 ml saf suda eritilmiş, pH 7' ye ayarlanmış daha sonra karışıma ilave edilen agar eritildikten sonra tüplere 4.5 ml konularak otoklavda steril edilmiştir. Testte kullanılan karbonhidratların (tartarik asit ve tyrosin) her birinden 2 g tartılarak 20 ml saf su içerisinde (%10' luk) eritilmiş ve tekrar pH 7 değerine ayarlanmış ve filtreden geçirilerek soğuk sterilizasyonu yapılmıştır. Otoklavdan çıkarılan tüplere karbon kaynaklarından 0,5 ml eklenmiştir. Tüplere bakteri izolatlarının aşısı yapıldıktan sonra 24-27 °C inkübe edilmiştir.



Tüplerdeki renk değişiminin sarıya dönmesi asit üretildiğinin göstergesi olduğundan renk değişimi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Schaad vd.,2001).

### 3.2.4.Elde Edilen İzolatların PCR Testi ile Tanısı

**Genomik DNA İzolasyonu:** Patojenisite ve klasik tanı testleriyle *Pseudomonas syringae* olarak tanılanan re-izolatlar için türe özgü spesifik primer ile PCR testinde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu De Boer ve Ward (1995)' e göre yapılmıştır. Bu yöntemle göre petride 24 saat gelişen bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak 9 ml Nutrient broth sıvı besi yerine aşılansak orbital çalkalayıcıda 150 rpm' de 24 saat geliştirilmiştir. Bakteri solüsyonundan pipet ile 1 ml alınarak steril ependorf tüplere aktarılmış ve 14.000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet yeni bir ependorf tüpe aktararak üzerine hücre parçalanmasını sağlamak için %1' lik SDA buffer 100 µl eklenmiş ve vortekslenmiştir. Tüpler 3 saat 50 °C' deki su banyosunda 3 saat bekletildikten sonra 7.5 M amonyum asetat solüsyonundan 50 µl eklenmiştir. 14.000 rpm' de santrifüj edilen tüplerde amonyum asetat artıkların altta toplanmasını sağlamıştır. Üstte kalan yaklaşık 130 µl DNA ise pipetle alınarak yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır. 130 µl isopropanol eklenen tüpler derin dondurucuda 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 10.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek pellet alınmış ve tüplere %70' lik alkolden 100 µl eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki alkol döküldükten sonra steril kabinde bir saat kurutulmuştur. Daha sonra 40 µl bidistile su eklenen tüpler -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

**PCR Çalışmaları:** *P. syringae* re-izolatlarının moleküler test ile tanısı için syringomycine ve coronatine enzimlerinin sentezinden sorumlu *syrB* ve *cfl* genlerinden dizayn edilen primerler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan PCR programı ve kullanılan karışım Çizelge 3.2, 3.3 ve 3.4' de verilmiştir (Bereswill, Pahl, Bellemann, Zeller ve Geider, 1992; Abbasi vd. 2013).

Çizelge 3.2. Moleküler çalışmalar için kullanılan PCR karışımı

Reaksiyon karışımının içeriği	Miktarı (µl)
PCR Master Mix (Promega)	12.5
10pmole primer 1	2.0
10 pmole primer 2	2.0
Nükleaz free water	6.5
DNA	2.0

Çizelge 3.3. *P. s. pv syringae* için *syfB* geninden dizayn edilen primer için PCR programı

Basamak	Programlandırma	Sıcaklık (°C)	Süre (da)
1	İlk denatürasyon	94	4
2	Denatürasyon	94	1.5
3	Primer annealing	60	1.5
4	Extention	72	3
5	2., 3. ve 4. Basamaklar 35 döngü		
6	Final extention	72	10

Çizelge 3.4. *P. s. pv morsprunorum* için *cfl* geninden dizayn edilen primer için PCR programı

Basamak	Programlandırma	Sıcaklık (°C)	Süre (da)
1	İlk denatürasyon	93	2
2	Denatürasyon	93	1
3	Primer annealing	52	2
4	Extention	72	2
5	2., 3. ve 4. Basamaklar 37 döngü		
6	Final extention	72	10

PCR ürünlerinin agarose jel elektroforezine yönelik çalışmalar Sambrook, Fritsch ve Maniatis (1989)'a göre yapılmıştır. Bunun için 90 ml 1XTAE tamponuna 0,9 g agarose eklenerek mikrodalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulan solüsyon, taraklar yerleştirilen jel tankına dökülmüştür. Agaroz jelin donmasından sonra jel tankı içerisine jeli örtüncüye kadar 1 X TBE buffer eklenmiştir. Daha sonra örnek koymak için kullanılan tarak dikkatlice çekilerek çıkarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan agaroz jel çukurlarına 3 µl loading buffer ve 12 µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımı ile yüklenmiştir. Moleküler ağırlık işaretleyici (Marker) olarak 100bp DNA işaretleyici (Marker, Fermentos SM 0623) kullanılmıştır. PCR ürünleri 100V elektrik akımında yaklaşık 1 saat yürütülmüştür. Bantların görülmesi için ethidium bromür ile (10mg/ml) 10 dak. boyama yapılmış ve bunu takiben 15 dak. saf su ile jel yıkanarak transliminatörde (302nm) bantlar incelenmiş ve B1-B2 primer çifti için 752 bp; CFLF-CFLR primer çifti için 650 bp uzunluğundaki bantlar gözlemlenmiştir.

### 3.2.5. ERIC-, REP- ve BOX -PCR ile İzolatların Genotipik Karakterizasyonu

Repetitive extragenic palindromic (REP-PCR), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR), BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic-PCR (BOX-PCR), evrensel primerler kullanılarak yapılan bir PCR metodudur. Bu PCR çalışmasında farklı yerlere dağılmış olarak bulunan, tersinden de aynı şekilde okunan, tekrarlanan gen bölgesi çoğaltılarak birbirine bağlanır. Tekrarlanan gen bölgeleri arasındaki mesafe, çoğaltılan parçanın

büyükliğüne etki eder ve böylece farklı büyüklükte bantlar jelde gözlenir. Bu çalışmada, De Boer ve Ward (1995)'e göre saflaştırılmış genomik DNA'lar arasındaki polimorfizmden kaynaklanan genetik farklılığı belirlemek için, Louws, Fulbright, Stephens ve DeBrujin (1994) ile Norman, Yuen, Resendiz ve Boswell (2003)' a göre ERIC-, REP-, BOX-PCR uygulamaları yapılmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. ERIC, REP ve BOX-PCR için kullanılan primer ve PCR programı

Metod	Primer	Program	
ERIC	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA AC-3' 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'	1 döngü	95 °C-7da
		30 döngü	94°C-1da 52°C-1da 65°C-8da
		1 döngü	65°C-15da
		1 döngü	95 °C-7da
REP	5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3' 5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'	30 döngü	94°C-1da 44°C-1da 65°C-8da
		1 döngü	65°C-15da
		1 döngü	95 °C-7da
		1 döngü	94°C-1da
BOX	5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'	30 döngü	94°C-1da 53°C-1da 65°C-8da
		1 döngü	65°C-15da
		1 döngü	95 °C-7da
		1 döngü	94°C-1da

Elde edilen PCR ürünlerinin elektroforezi için %1,5' lik agaroz ve 0,5 TAE buffer hazırlanmıştır. Marker olarak 1 kb' lik ve 100 bp'lik DNA ladderlar (Promega, G571A)) kullanılmıştır. Agaroz jeldeki her bir kuyu içerisine 5 µl PCR ürünü yüklendikten sonra jel 6 saat boyunca 50 V da 100 mA' de yürütülmüştür. Daha sonra agaroz jel üzerinde oluşan bantların görüntülenebilmesi için etidyum bromür içerisinde (0,5 mg etidyum bromür/L steril saf su) 10 dakika bekletilerek boyanmış ve jel steril saf su ile çalkalanmıştır. Etidyum bromür ile boyanan jeller üzerindeki bantlar jel görüntüleme cihazında (BIO-RAD, Gel Doc™ EZ Imager) incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Sambroo vd., 1989). Her bir izolatanın oluşturduğu bant uzunluğu not edilmiş ve Past4 istatistik programı kullanılarak analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre oluşturulan dendogram ile izolatların akrabalık oranları belirlenmiştir.

### 3.2.6. İzolatların MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) ile Tanınması

Klasik ve biyokimyasal testler ile tanılanan izolatlar içerisinde, her bölgeyi temsilen seçilen 12 izolatın tanı işlemleri, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya) Mikroorganizma Tanımlama cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, saf bakteri kültürlerinden protein izolasyon işlemi için etanol-formik asit yöntemi kullanılarak ön ekstraksiyon işlemleri yürütülmüştür (Aktan ve Soylu, 2020). Daha sonra Cihazın flex kontrol yazılım programı (Biotyper 3.0; Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ile elde edilen spektrumlar, Maldit Biotyper Real-Time Classification (RTC) yazılımı ile karşılaştırılarak tanı işlemi sürdürülmüştür. Analiz sonucunda, yüksek olasılıklı tür teşhisi: 2 000-3 000 (yeşil renk); cins düzeyinde ve muhtemel tür düzeyinde teşhis: 1.700-1.999 (sarı renk) arasındaki skala değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.7. MLSA (Multilocus Sequence Analysis) Çalışmaları

MLSA, bir grup içerisinde yer alan organizmaların geçirdiği değişiklikleri ortaya çıkarmada yani filogenetik çalışmalarda kullanılan bir moleküler yöntemdir. Uygulamada 4 veya 8 gen, ayrı ayrı veya küçük parçalar halinde analiz edilerek filogenetik ağaç, bakterilerin sınıflandırılması, tanılanması, epidemiyolojisi ve evrimsel biyolojisinde güçlü ve yararlı bir yöntem olarak kullanılır. Klasik ve moleküler çalışmalar sonucunda *P. s. pv. syringae* olduğu belirlenen izolatlardan rastgele, her bir lokasyonu temsil edecek şekilde 12 izolat seçilmiştir (Çizelge 3.9). Çalışmanın bu kısmı TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu kapsamında Amerika Tennessee State University, Otis Floyd Nursery Research Center, Dr. Fulya Baysal-Gürel'e ait Fitopatoloji laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan primer ve bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.6 ve 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. MLSA çalışmalarında kullanılan primerler ve sekansları

Primer	Baz Dizisi (5'-3')	Referans
<i>gyrB</i>	MGGCGGYAAGTTCGATGACCAAYTC TRAKTBKCAGTCARACCTTCRCGSGC	Sarkar ve Guttman, 2004
<i>rpoDp</i>	AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG GGAACWKGCGCAGGAAGTCGGCACG	Sarkar ve Guttman, 2004
<i>rpoDs</i>	AAGCGAATCGAAGAAGGCATYCGTG GGAACWKGCGCAGGAAGTCGGCACG	Sarkar ve Guttman, 2004
<i>gltA</i>	GCCTCBTGCAGTTCGAAGATCACC CTTGTAVGGRCYGGAGAGCATTTC	Hwang vd., 2005

Çizelge 3.7. MLSA çalışmalarında kullanılan PCR programı

Basamak	Programlandırmalar	Sıcaklık (°C)	Süre
1	İlk denatürasyon	95	5 da
2	Denatürasyon	95	30 sn
3	Primer annealing	63-62	30 sn
4	Extention	72	30 sn
5	2., 3. ve 4. Basamaklar 37 döngü		
6	Final extension	72	10 da

Elde edilen PCR ürünleri ile sekans çalışması için saflaştırılması yapılmıştır. PCR saflaştırılması için Wizard<sup>R</sup> SV Gel and PCR Clean-up sistem kiti kullanılmıştır (Promega). Elde edilen PCR ürünlerine 100 µl men blind solution eklenerek 5 saniye kadar vortekslenmiştir. Daha sonra tüm solüsyon mini column bulunduğu ependorflara aktarılmıştır. 16.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra 700 µl membran yıkama solüsyonu ependorf tüplere eklenmiştir. 16.000 rpm' de 1 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra sını kısım dökülmüştür. Membran yıkama solüsyonundan 500 µl tekrar tüplere eklenmiş, 16.000 rpm' de 1 dakika boyunca tekrar santrifüj edildikten sonra sıvı kısım dökülmüş ve tekrar santrifüj edilmiştir. Daha sonra mini column yeni bir ependorf tüpe transfer edilmiş ve 25 µl nükleaz free steril su eklenerek tüpler 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. 16.000 rpm' de 1 dakika boyunca santrifüj edilen ependorf tüplerdeki mini column kısmı atılarak ependorf tüpte kalan kısım sekans çalışmalarında kullanılmak üzere GenHunter sekans firmasına gönderilmiştir. Elde edilen sekans sonuçları NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veri tabanına kayıtlı olan diğer izolatlar ile karşılaştırılmıştır.

Her bölgeyi temsilen rastgele seçilen 12 izolatin (Çizelge 3.9) sekans ve filogenetik çalışmaları MEGA 6 programı kullanılarak yapılmıştır (Tamura, Strecher, Peterson, Filipski ve

Kumar, 2013). Elde edilen sekans sonuçları ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Neighbor-joining (NJ) ağacı her bir genin sekans sonuçlarına göre Jukes-Cantor uzaklık modeli kullanılarak MEGA 6 programında oluşturulmuştur. Bootstrap analizi 1000 tekrarlı olarak yapılmıştır. Çalışmada ayrıca her bir gen için NCBI ‘da kayıtlı olan sekans dizilimleri kullanılmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Filogenetik çalışmalarda kullanılan NCBI sekans dizilimleri

NCBI Kayıt Numarası	Tür	Referans
AB039428	<i>P. syringae</i>	Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A. and Harayama, S.
HG000215	<i>Pseudomonas</i> sp.	Kaluzna, M., Pulawska, J. and Sobiczewski, P.
LS991834	<i>P. s. pv syringae</i>	Kaluzna, M.
AB039462	<i>P. amygdali</i>	Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L. Jackson, R. W., Vivian, A. and Harayama, S.
FN554173	<i>P. avellanae</i>	Garcia-Valdes,E.
LR794180	<i>P. s. pv. syringae</i>	Kaluzna,M
LN899287	<i>P. s. pv. syringae</i>	Abdellatif, E., Kaluzna, M., Janse, J. D. and Rhouma, A.
KU934056	<i>P. s. pv. syringae</i>	Mougou, I., Moreti, C., Cortese, C., Boughalle M'Hamdi, N. and Buonaurio, R.
JX867852	<i>P. s. pv. aptata</i>	Carrion, V. J., Gutierrez Barranquero, J. A., Arrebola, E., Bardaji, L., Codina, J. C., de Vicente, A., Cazorla, F. M. and Murillo, J.
AB039499	<i>P. syringae</i>	Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A. and Harayama, S.
KP211408	<i>P. s. pv. pisi</i>	Chen, Q., Qian, T. J. and Yi, P. J.
FN433228	<i>P. s. pv atrofaciens</i>	Parkinson, N. M.
HG805523	<i>Pseudomonas</i> sp.	Beiki, F., Busquets, A., Gomila, M., Rahimian, H., Lalucat,J. And Garcia-Valdes,E.
MK210622	<i>P. s. pv atrofaciens</i>	Kim,S.-M.
MH375340	<i>P. s. pv syringae</i>	Li, H., Luo, M., Han, J. and Zhang, X.
MH375342	<i>P. s. pv syringae</i>	Li, H., Luo, M., Han, J. and Zhang, X.
KP211409	<i>P. s. pv pisi</i>	Chen, Q., Qian, T. J. and Yi, P. J.
EF203069	<i>P. s. pv avellanae</i>	Murillo, J., Bardaji, L., Navarro de la Fuente, L., Fuhrer, M. E.,Aguilera,S. and Alvarez-Morales ,A.
LT898050	<i>Pseudomonas</i> sp.	Baumgartner P, M.
KU934054	<i>P. s. pv syringae</i>	Mougou, I., Moretti, C., Cortese, C., Boughalle-M'Hamdi, N. and Buonaurio, R.
JX867805	<i>P. s. pv syringae</i>	Carrion, V. J., Gutierrez-Barranquero, J. A., Arrebola, E., Bardaji, L., Codina, J. C., de Vicente, A., Cazorla, F. M. and Murillo, J.
MK970534	<i>P. syringae</i>	Bophela, K. N., Petersen, Y., Bull, C. T. and Coutinho, T. A.
MK192425	<i>P. s. pv atrofaciens</i>	Kim, S.-M.

KF937504	<i>P. s. pv syringae</i>		Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M.-A., Manceau, C. and Vanneste, J.L.
KF937496	<i>P. savastanoi phaseolicola</i>	pv	Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M.-A., Manceau, C. and Vanneste, J. L.
KJ733925	<i>P. s. pv actinidae</i>		Dreo, T., Pirc, M., Zezlina, I., Poliakoff, F., Rivoal, C., Nice, F., Cunty, A. and Ravnikar, M.
KF937502	<i>P. amygdali morsprunorum</i>	pv	Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M.-A., Manceau, C. and Vanneste, J. L.
KF937507	<i>P. s. pv actinidiae</i>		Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M.-A., Manceau, C. and Vanneste, J. L.
LC198813	<i>P. s. pv actinidifolium</i>		Sawada, H., Fujikawa, T., Kita, N., Orihara, N., Shinozaki, T., Shimizu, S., Nakaune, R. and Takikawa, Y.
LC198818	<i>P. s. pv actinidifolium</i>		Sawada, H., Fujikawa, T., Kita, N., Orihara, N., Shinozaki, T., Shimizu, S., Nakaune, R. and Takikawa, Y.
KF937505	<i>P. s. pv actinidia</i>		Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M.-A., Manceau, C. and Vanneste, J. L.

Popülasyon genetik analiz çalışmaları: Nükleotid çiftlerinin çeşitliliği ve tekrarlanan bölgelerin sayılarını belirlemek için DnaSP 3.53 programı kullanılmıştır (Rozas ve Rozas, 1999). Elde edilen genetik veriler arasındaki ilişki Arlequin 2.0 programı içerisinde moleküler varyans analizi (AMOVA) çalışmaları yapılmıştır (Schneider, Roessli ve Excoffier, 2000).

Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan kiraz izolatları

İzolat adı	Çalışmada Kullanılan Kod	Lokasyon
TK31	C101	Tekirdağ/Naip
BaK3	C102	Balıkesir
ÇK5	C103	Çanakkale/Lapseki
ÇK8	C104	Çanakkale/Lapseki
ÇK12	C105	Çanakkale/Bayramiç
ÇK2	C106	Çanakkale/Lapseki
TK13	C107	Tekirdağ/Marmaraereğlisi
İsK1	C108	İstanbul/Selimpaşa
KK3	C109	Kırklareli
TK2	C110	Tekirdağ/Yeniçiftlik
BuK10	C112	Bursa/Osmangazi
TK24	C113	Tekirdağ/Kirazlı

### 3.2.8. İzolatların SEM Elektron Mikroskopunda Görüntülenmesi

King B besi ortamında geliştirilen 24 saatlik bakteri kültürü Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi NABİLTEM laboratuvarında SEM elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir.

### 3.2.9. Kiraz Dal Yanıklığı Hastalık Etmenine Karşı Bakırlı Preparatların Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi

Kiraz Dal Kanseri hastalık etmenine karşı bakırlı preparatların etkinliğini belirlenmesi amacıyla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır.

**İn vitro çalışmalar:** Bakıroksiklorür, Bakırhidroksit, Bakırsülfat, Kalsiyum hidroksit bakır sülfat gibi bakırlı preparatların yanı sıra Maneb ve Mancozeb preparatları kullanılarak laboratuvarında petri denemesi kurulmuştur. Preparatların 10, 25, 50, 100, 200, 300 ve 400 µg/ml dozları kullanılmıştır. Preparatların stok solüsyonları; 10, 25 ve 50 µg/ml dozlar için her bir preparattan 0,1 g tartılmış ve 10 ml steril saf suya eklenerek vortekslenmiş ve 10.000 µg/ml; 100, 200, 300 ve 400 µg/ml dozlar için ise her bir preparattan 1 g tartılarak 10 ml steril saf su içerisine eklenerek vortekslenmiş ve 1000.000 µg/ml' lik stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan ve steril edildikten sonra 50 °C' de su banyosunda



bekletilen King B besi yerine, hazırlanan stok solüsyonlardan 10, 25 ve 50 için hazırlanan 10.000 µg/ml stok solüsyonundan sırasıyla 1, 2.5, 5 ml; 100, 200, 300 ve 400 µg/ml için hazırlanan 1.000.000 µg/ml stok solüsyondan sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 ml alınarak King B besi yerine eklenmiştir. Plastik steril petrilere King B besi ortamı döküldükten sonra, *P. s. pv. syringae* olarak tanımlanan 63 adet izolatin yoğunluğu spektrofotometre de 600 absorbans değerinde 0.2 yoğunluğuna ayarlanmıştır. Hazırlanan bakteri solüsyonunun dan 6 seyreltme serisi hazırlanmış ve 6. seyreltme serisinden 100 µl alınarak King B besi ortamı bulunan petrilere her preparat için 3 tekerrür olacak şekilde yayılmıştır. Çalışmada kontrol olarak herhangi bir preparat eklenmemiş King B besi ortamı kullanılmıştır. Petriler 25 °C’ de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra petrilere gelişen kolonilerin sayımları yapılarak *in vitro* koşullarda bakırlı preparat, Maneb ve Mancozeb’ in hastalık etmenine karşı olan etkinliği belirlenmiştir.

***In vivo* çalışmalar:** Çalışmanın bu kısmı 2018 yılı Ağustos ayı ve 2019 yılı Şubat-Ağustos ayları arasında, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü’ ne ait 8 yaşındaki Ziraat 900 çeşidinin bulunduğu kiraz bahçesinde yapılmıştır. Bahçe, 6 sıradan oluşmakta ve her sırada 12 kiraz ağacı bulunmaktadır. Deneme için 1. ve 6. sıralar boş bırakılarak 2, 3, 4 ve 5. sıralar kullanılmıştır. Tesadüf blokları deneme desenine göre kurulan çalışmada *P. s. pv. syringae* TK 7 izolatu ile Aliette (%80 Fosetyl-A1), Kocide (%35 Bakır hidroksit), Hektaş göztaşı (%25 Bakırsülfat), Bestbakır (%50 Bakıroksiklorür), Tricopper forte (%20 Mancozeb + %23 bakıroksiklorür + %16 bordo + %7 bakır karbonat) ticari preparatların önerilen dozları (400 gr/100l, 400 gr/100l, 600 gr/100l, 400gr/100l, 300 gr/100l) kullanılmıştır.

TK 7 izolatu King B besi ortamında 2 gün boyunca 25 °C’ de geliştirilmiştir. Daha sonra izolatin konsantrasyonu spektrofotometre de 0.2 yoğunluğunda 600 nm absorbans değerinde  $10^8$  hüç/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Denemede kullanılacak olan kiraz ağaçlarının tüm yaprakları Ağustos ayında bir pülverizatör (10 kg/cm<sup>2</sup>) yardımıyla bakteri solüsyonuyla ıslanacak şekilde patojen inokülasyonu yapılmıştır. İnokülasyon gün batımında yapılmış olup ağacın boyutuna bağlı olmakla birlikte her ağaç için ortalama 0.2-1.5 l arasında bakteri solüsyonu kullanılmıştır (Olson ve Jones, 1983). Bakteri uygulamasından sonra, ilk ilaçlama ağaçların tamamen dormant dönemde olduğu Şubat ayının başında, ikinci ilaçlama Mart ayının başında tomurcuklar patlamadan önce ve üçüncü ilaçlama ise Mart ayının sonu-Nisan ayının başında çiçeklenme döneminden önce yapılmıştır (Scheck ve Pscheidt, 1998). Çalışmada pozitif kontrol olarak ağaçlara sadece patojen inokülasyonu yapılırken, negatif kontrol olarak kiraz ağaçlarına sadece su püskürtülmüştür.

Arazi denemesinde ilaçların hastalık üzerine olan etkinlikleri, Temmuz-Ağustos aylarında deneme bahçesindeki kiraz ağaçlarında hastalık belirtilerini gözlenerek oluşturulan skalaya (0-9 skalası) göre hastalık şiddeti belirlenmiştir. Skala değerleri **0:** %0-10, **1:** %11-20, **2:** %21-30, **3:** %31-40, **4:** %41-50, **5:** %51-60, **6:** %61-70, **7:** %71-80, **8:** %81-90, **9:** %91-100 olarak oluşturulmuştur. Hastalığın bulunma oranı ise her bir kiraz ağacından rastgele 50 dal örneği alınarak belirlenmiştir. Alınan örneklerden King B besi ortamına izolasyon yapılmıştır. 48 saat 25 °C’ de inkübe edilen petriyelerdeki krem rengindeki koloniler saflaştırılıp tekrar King B besi ortamında geliştirildikten sonra LOPAT klasik tanı testleri ile izolatların tanısı yapılarak ağaçlarda görülen belirtilere *P. s. pv. syringae*’ nin neden olup olmadığı belirlenmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Hastalık Belirtisi Gösteren Kiraz Bitkilerinin Toplanması

Hastalık surveyleri, Marmara Bölgesi'nde kiraz üretiminin yapıldığı Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Edirne, İstanbul, Kırklareli, Kocaeli, Tekirdağ ve Yalova illeri kiraz bahçelerinde 2016-2018 yılları Mart-Temmuz aylarında yapılarak kiraz dal yanıklığı belirtisine benzeyen örnekler toplanmıştır (Şekil 4.1). Dal ve sürgünlerde su emmiş ve dokuda renk değişimi meydana gelmiş belirtili örnekler alınmıştır. Etmen ilerleyen dönemlerde zamk akıntısına sebep olarak kanserlere neden olmasından dolayı zamk akıntısı görülen dallardan da örnekler toplanmıştır (Şekil 4.2; Şekil 4.3; Şekil 4.4). Yapraklarda küçük yağ lekesi görünümünde, kahverengi sarı haleli lekeler ve meyvelerde küçük kahverengi-siyah hafif çökük görüntülü örnekler toplanmıştır (Çizelge 4.1). Arazi çalışmaları sonucunda 107 kiraz bahçesinden toplanan bitki örneğinden kiraz dal yanıklığı ve kanserine neden olduğu düşünülen 82 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Hastalık belirtilerinin fizyolojik ve fungal etmenlerin sebep olduğu belirtilere benzer olmasından dolayı elde edilen izolat sayısının az olmasına neden olmuştur.



Şekil 4. 1. Marmara Bölgesi survey yapılan kiraz üretim alanları (+)

*P. s. pv. syringae*'nin neden olduğu yaprak simptomları özellikle fungal hastalık etmeni olan *Stigmmaina carpophila*'nın neden olduğu simptomlar ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca bakteriyel etmenin sebep olduğu zamk akıntısına, kirazda önemli bir sorun olan yazıcı böceklerin verdiği zarardan dolayı da zamklanmanın görüldüğü belirlenmiştir. Survey yapılan bahçelerde dip kurdu ve yazıcı böcek gibi zararlıların bitkiyi zayıflatmasından dolayı oluşan fizyolojik belirtiler ile kiraz dal yanıklığının sebep olduğu kuruma simptomlarının benzer görüntülere sebep olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2: Çanakkale ilinde çiçeklenme döneminde survey yapılan kiraz bahçesi



Şekil 4.3. Kiraz ağaçlarında gözlenen hastalık belirtileri (ok)



Şekil 4.4. Kiraz bahçelerinden hastalık belirtisi görülen örneklerin alınması

Çizelge 4.1. 2016-2018 yıllarında Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarında yapılan surveyler

No	İl	İlçe	İzole edildiği kısım	Bitkinin Çeşidi	Bitkinin Yaşın	Yıl
1	Tekirdağ	Yeniçiftlik	Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
2			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
3			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
4			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
5			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
6			Sürgün	Ziraat 900	8	2018
7			Sürgün	Ziraat 900	8	2017
8		Marmaraereğlisi	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
9			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
10			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
11			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
12			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2017
13			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
14			Dal	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
15			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
16			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
17			Kirazlı köyü	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10
18		Sürgün		Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
19		Dal		Ziraat 900/Lambert	8-10	2107
20		Dal		Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
21		Sürgün		Ziraat 900/Lambert	8-10	2107
22		Sürgün		Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
23		Sürgün		Ziraat 900/Lambert	8-10	2107
24		Sürgün		Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
25		Sürgün		Ziraat 900/Lambert	8-10	2107
26		Çınarlı köyü		Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10
27			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2107
28			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2017
29			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2107

30	Tekirdağ	Naip	Sürgün	Ziraat 900	8-10	2017	
31			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017	
32			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2107	
33			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2018	
34			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2018	
35			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2018	
36			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2018	
37			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2018	
38			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018	
39			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2016	
40			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2016	
41			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2016	
42			Sürgün	Ziraat 900	8-10	20182	
43			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018	
44			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018	
45			Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018	
46			Barbaros	Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
47				Sürgün	Ziraat 900	8-10	2018
48		Sürgün		Ziraat 900	8-10	2018	
49		Sürgün		Ziraat 900	8-10	2017	
50		Sürgün		Ziraat 900	8-10	2017	
51		Sürgün		Ziraat 900/Lambert	8-10	2017	
52		Sürgün		Ziraat 900/Lambert	8-10	2017	
53		Kumbağ		Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017
54			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2017	
55		Balıkesir	Merkez	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8	2017
56				Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8	2017
57				Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8	2017
58	Yaprak			Ziraat 900/Lambert	8	2017	
59	Yaprak			Ziraat 900/Lambert	8	2017	
60	Sürgün			Ziraat 900/Lambert	8	2017	
61	Sürgün			Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	
62	Çiçek			Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	

63			Çiçek	Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	
64			Çiçek	Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	
65			Tomurcuk	Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	
66	Bursa	Gürsu	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	
67			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	
68			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	
69			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2017	
70		Yenişehir	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2018	
71			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2018	
72			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2018	
73			Yaprak	Ziraat 900/Lambert	8-12	2018	
74			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2018	
75			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2018	
76		Osmangazi	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2018	
77			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-12	2018	
78		Çanakkale	Lapseki	Sürgün	Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2016
79				Dal	Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2016
80	Dal			Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2016	
81	Dal			Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2017	
82	Dal			Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	20172	
83	Dal			Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2017	
84	Sürgün			Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2017	
85	Dal			Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2017	
86	Dal			Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2017	



87			Dal	Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2018
88		Bayramiç	Sürgün	Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2018
89			Sürgün	Ziraat 900/Lambert/Klasik	10-15	2018
90			Dal	Ziraat 900/Lambert	5-7	2017
91			Dal	Ziraat 900/Lambert	5-7	2017
92	Kırklareli	Merkez	Dal	Ziraat 900/Lambert	5-7	2017
93			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	5-7	2017
94			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	5-7	2017
95			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	5-6	2017
96			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	5-6	2017
97	İstanbul	Selimpaşa	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	5-6	2017
98			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	5-6	2017
99			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	5-6	2017
100			Sürgün	Ziraat 900	6-8	2017
101	Edirne	Merkez	Sürgün	Ziraat 900	6-8	2017
102			Sürgün	Ziraat 900	6-8	2017
103			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2018
104	Yalova	Merkez	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2018
105			Sürgün	Ziraat 900/Lambert	8-10	2018
106	Kocaeli	Merkez	Sürgün	Ziraat 900/Lambert	7-8	2017
107			Yaprak	Ziraat 900/Lambert	7-8	2017

#### 4.2. Hastalıklı Bitkilerden Bakteriyel Etmenin İzolasyonu

2016-2018 yılları arasında yapılan arazi surveyleri sonucunda hastalık belirtisi gösteren örneklerden yapılan izolasyonlarda King B besi yerinde 2-3 gün içerisinde krem-beyaz renkte ve floresan tipte koloniler gelişmiştir. Çizelge 4.1' de görüldüğü gibi Tekirdağ, Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Kırklareli ve İstanbul ili kiraz bahçelerinden alınan örneklerden toplamda 82 adet bakteri izolatu elde edilmiştir.

### 4.3. Elde Edilen İzolatların Klasik Testlerle Tanısı

**Patojenite Testi ve Re-izolasyon:** Elde edilen izolatların patojenite testinde öncelikle ham kiraz meyvelerine bakteri izolatlarının 48 saatlik kültürleri inokule edilmiştir. İnokulasyondan 7-10 gün sonra ham kiraz meyveleri üzerinde kahverengi-siyah/çökük lekeler gözlenmiştir (Şekil 4.6, Çizelge 4.2).

Yapılan re-izolasyonlar sonucunda petride gelişen krem-beyaz renkte, floresan tipte 82 adet re-izolat saflaştırılmıştır. Elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmaları yapılmıştır.

**Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon:** Kiraz izolatları viskoz, yapışkanimsi bir sünmeye neden olmuş ve reaksiyon pozitif sonuç vermiştir. Elde edilen re-izolatlar gram negatif bakteri olarak değerlendirilmiştir. Gram pozitif özellikte olan Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatı ise herhangi bir sünmeye ve uzama göstermemiştir (Çizelge 4.2).

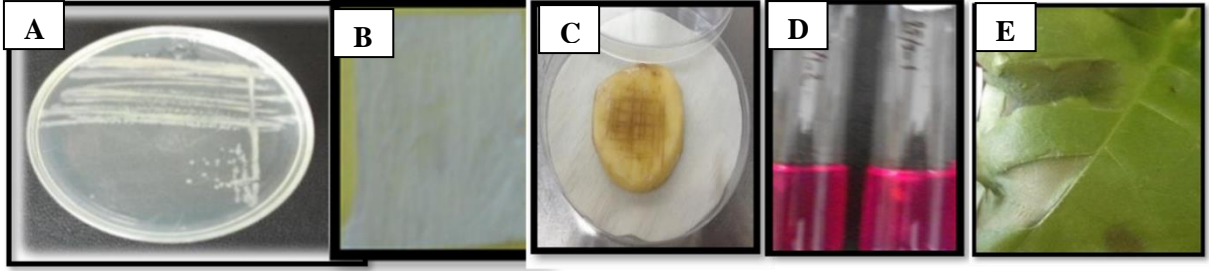
**Levan Oluşumu:** Tüm re-izolatlar ve pozitif kontrol olan *Erwinia amylovora* 55 gibi SNA besi yerinde beyaz renkte, kubbemsi, mukoid tipte koloni gelişimi göstererek pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5A, Çizelge 4.2).

**Oksidaz Testi:** Tüm re-izolatlar ve kontrol olarak kullanılan Naip1-1 izolatı yaklaşık olarak 5-10 saniye herhangi bir renk değişimine sebep olmadığından oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5B, Çizelge 4.2).

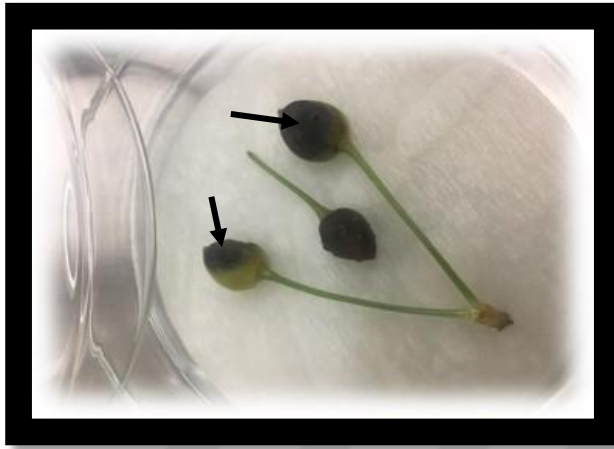
**Pektolitik Aktivite Testi:** Patates dilimlerine bulaştırılan re-izolatlar ve Naip 1-1 izolatı herhangi bir yumuşama, çürüme ve kokuya sebep olmadığından pektolitik aktivite negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatı ise patates dilimlerinde yumuşama ve pis kokuya sebep olmuştur (Şekil 4.5C, Çizelge 4.2).

**Arginin Dehidrolaz Testi:** Thorney 2A besi ortamına ekilen tüm re-izolatlar ve Naip1-1 izolatının 7-15 gün sonra herhangi bir renk değişimine neden olmadığı görülmüştür. Arginin dehidrolaz test sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5D, Çizelge 4.2).

**Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi:** Tütün (*Nicotiana tabacum* cv Samsun N) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına enjekte edilen re-izolatlar ve Naip1-1 izolatı, 24-48 saat sonra nekroz lekelerine sebep olmuş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir. Re-izolatların tamamının HR pozitif olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5E, Çizelge 4.2).



Şekil 4.5. İzolatların LOPAT tanı karakteri test sonuçları. (A) Levan, (B) Oksidaz, (C) Patates pektolitik aktivite, (D) Arginin dehidrolaz, (E) Tütün aşırı duyarlılık (HR) test sonuçları



Şekil 4.6. İzolatların ham kiraz meyvelerinde patojenite testi sonucu oluşan kahverengi-siyah/çökük lekeler (ok)

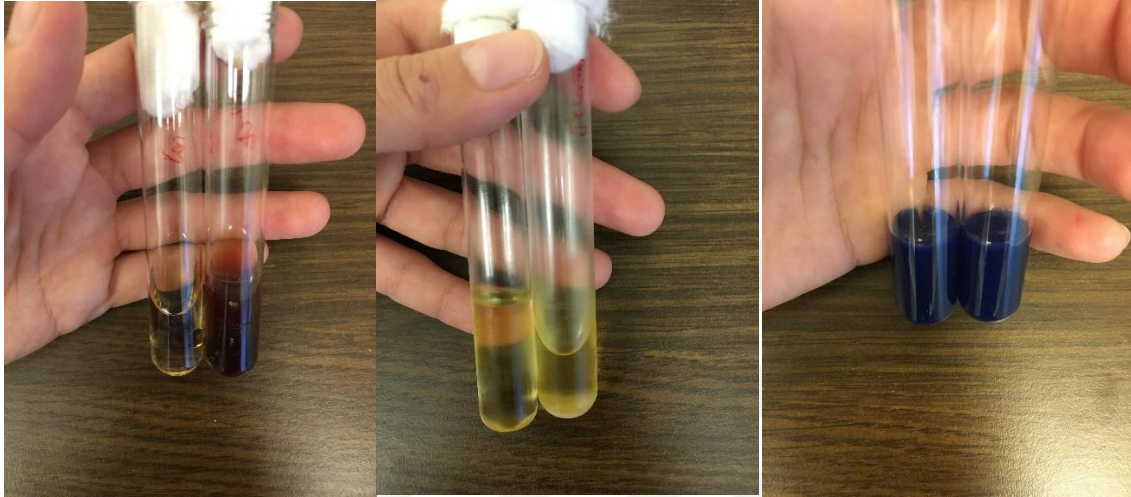
### GATTa Biyokimyasal Testler

**Jelatin hidrolizi:** Tüplere aşılana tüm re-izolatlar 7-14 gün süreyle kontrol edilmiş ve 82 izolatın 70 adetinde re-izolatın aşılacağı tüpte jelatinin akıcı olduğu gözlemlenmiştir. Test sonucu jelatin pozitif olarak değerlendirilmiştir.

**Esculin hidrolizi:** Re-izolatlar hazırlanan besi ortamına ekilerek 27-28°C' de 3-4 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra 82 adet re-izolattan 63 adetinin ekili olduğu tüplerde besi yerinin kahverengi-siyah renk aldığı gözlenmiştir. Toplam 63 adet re-izolat için esculin hidrolizi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

**Karbon kaynaklarının kullanımı:** Tartarik asit ve Tyrosin kullanılarak hazırlanan besi ortamına ekilen re-izolatlar asit üretimine neden olmayarak tüplerde herhangi bir renk değişimine sebep olmamıştır. Tartarik asit ve tyrosin test sonucu negatif olarak değerlendirildiğinden re-izolatların tamamının *P. s. pv. syringae* olduğu belirlenmiştir.

LOPAT test sonuçlarına göre 82 adet re-izolat LOPAT 1a grubunda yer alarak *P. syringae* GATTa testleri sonucunda ise 63 adet re-izolattın *P. s. pv. syringae* olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2) (Şekil 4.7). Ayrıca 19 adet izolatın *P. syringae* karakterine uygun olmasına rağmen *P. s. pv. syringae* olarak tanısı yapılmamıştır. Bu izolatlar eğik tüplere alınarak stoğa alınmıştır.



Şekil 4.7. Kiraz re-izolatlarının GATTa test sonuçları

Çizelge 4.2. *Pseudomonas syringae* re-izolatların tanı test sonuçları

İzolat Adı	KOH	LOPAT*					G	A	T	Ta	Patojenisite Testi	Sonuç
		L	O	P	A	T						
TK1	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i> **
TK2	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK3	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK4	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK5	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK6	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK7	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK8	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK9	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK10	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK11	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>

TK12	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK13	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK14	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK15	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp</i>
TK16	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp</i>
TK17	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK18	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK19	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK20	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK21	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK22	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK23	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK24	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK25	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK27	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK28	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK29	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK30	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK31	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK32	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK33	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK34	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK35	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK36	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK37	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK38	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK39	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK40	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK41	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK42	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
TK43	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
TK44	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BaK1	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>

BaK2	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BaK3	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BaK4	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BaK5	Gram(-)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
BaK6	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
BaK7	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BaK8	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BaK9	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
BuK1	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BuK2	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BuK3	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BuK4	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
BuK5	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
BuK6	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BuK7	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BuK8	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BuK9	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
BuK10	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK1	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK2	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK3	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pseudomonas sp.</i>
ÇK4	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK5	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK6	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK7	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK8	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK9	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK10	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK11	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK12	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
ÇK13	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
KK1	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
KK2	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>

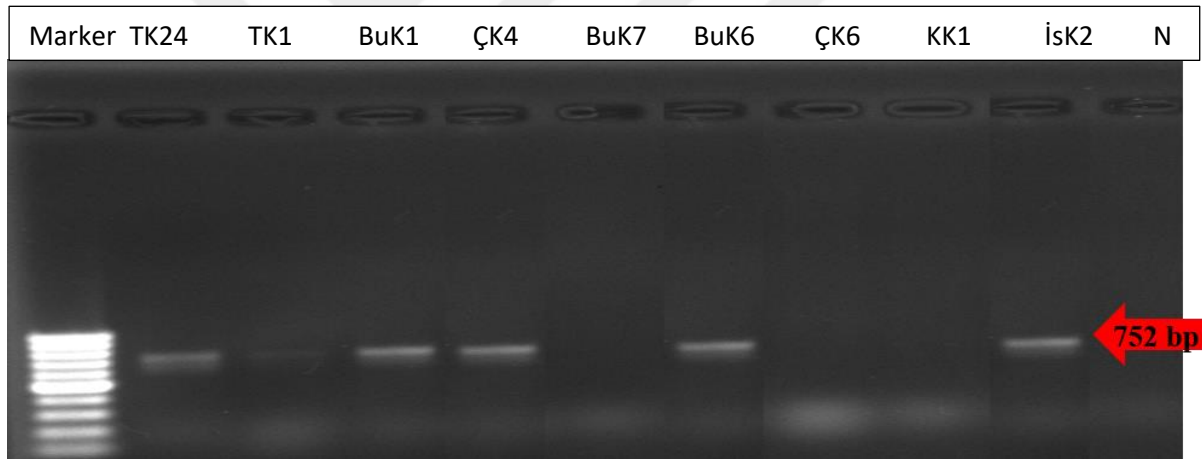
KK3	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
KK4	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
İsK1	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>
İsK2	Gram(-)	+	-	-	-	+	+	+	-	-	Siyah-kahverengi leke	<i>Pss</i>

\* L: levan; O: oksidaz; P: patates pektolitik aktivite; A: arginin dehidrolaz; T: tütün aşırı duyarlılık testi; G: Gelatin hidrolizi, A: aesculin hidrolizi, T: tyrosin aktivitesi, Ta: tartaric acid kullanımı

\*\* *Pss*: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

#### 4.4. Elde Edilen İzolatların PCR Testi ile Tanısı

Klasik ve biyokimyasal testler ile *P. s. pv. syringae* olarak tanımlanan re-izolatların tanı sonucunu desteklemek için *syfB* gen bölgesine ait B1 ve B2 primerleri türe spesifik primerlerle yapılan klasik PCR test sonucunda 63 izolatın Şekil 4.8’de görüldüğü üzere agaroz jel üzerinde 752 bp uzunluğunda bant oluşturduğu gözlenmiş ve izolatların *P. s. pv syringae* olduğu teyit edilmiştir.



Şekil 4.8. İzolatların PCR jel görüntüleri (100 bp marker kullanılmıştır)

#### 4.5. ERIC-, REP- ve BOX -PCR ile İzolatların Genotipik Karakterizasyonu

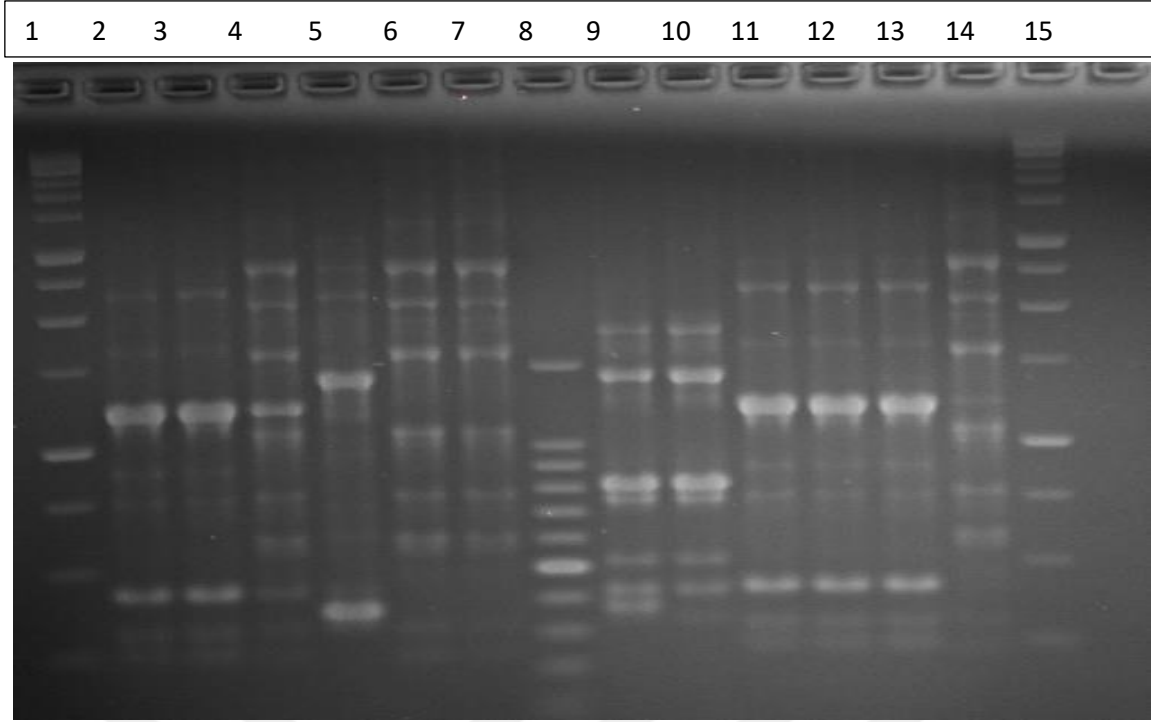
Marmara bölgesi kiraz üretim alanlarından elde edilen ve *P. s. pv. syringae* olduğu tanımlanan 63 adet izolat içerisinde her bölgeyi temsilen rastgele 12 izolat seçilerek, farklı lokasyonlardan elde edilen izolatlar arasındaki genetik karakterizasyon belirlenmiştir. Seçilen izolatlar arasındaki benzerliği belirlemek için yapılan ERIC-, REP- ve BOX-PCR çalışmaları sonucunda agaroz jel üzerinde 150-4500 bp aralığında 63 adet bant kaydedilmiştir.

Çizelge 4. 3. ERIC-PCR sonucunda *P. s. pv. syringae* izolatların oluşturdukları bant uzunlukları

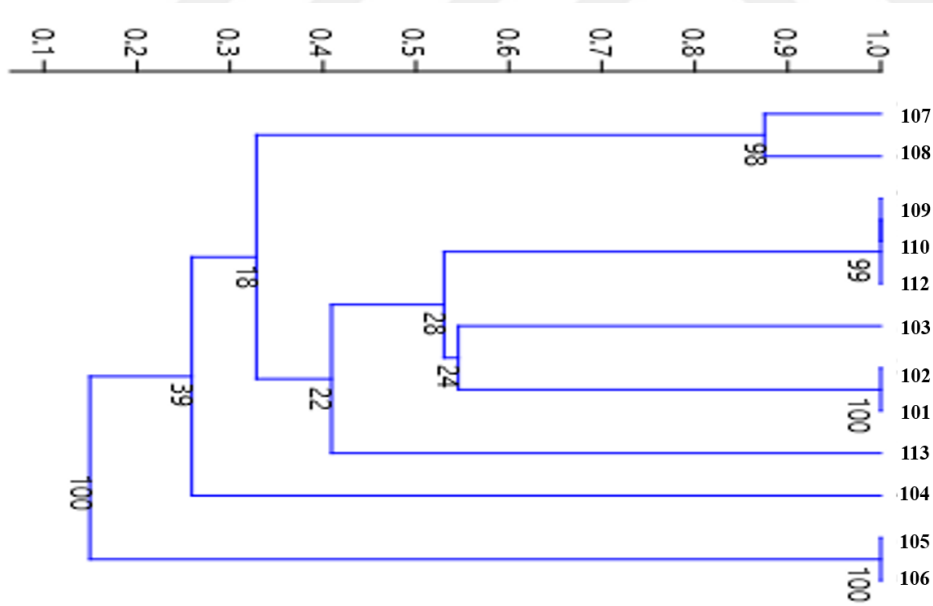
Bant uzunluğu (bp)	İzolat Adı											
	101*	102	103	104	105	106	107	108	109	110	112	113
4500	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4000	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3000	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
2500	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
2250	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
1750	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
1500	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1400	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
1250	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
1050	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
1000	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
900	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
800	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
750	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
600	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
500	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
400	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
350	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
300	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
250	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
200	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

\*101:TK31, 102:BaK3, 103:ÇK5, 104:ÇK8, 105:ÇK12, 106:ÇK2, 107:TK13, 108:İsK1, 109:KK3, 110:TK2, 1112:BuK10, 113:TK24





Şekil 4.9. *P. s. pv. syringae* izolatlarının ERIC-PCR sonucunda elde edilen bant uzunlukları (çukur1: Marker 1kb, çukur2: TK31, çukur 3: BaK3, çukur 4: ÇK5, çukur 6: ÇK8, çukur 7: ÇK12, çukur 8: Marker 100 bp, Çukur 9: TK13, Çukur 10: İK1, Çukur 11: KK3, Çukur 12: TK2, Çukur 13: BuK10, Çukur 14: TK14, Çukur 15: Marker 1kb)



Şekil 4.10. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının ERIC-PCR dendogramı

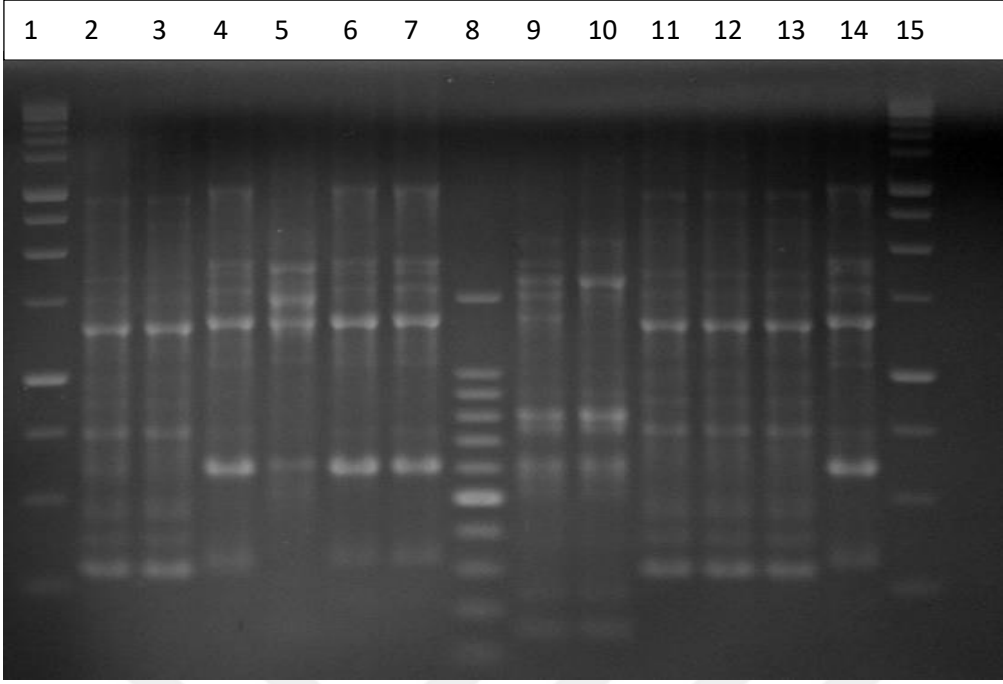
101: TK31 Tekirdağ/Naip, 102: BaK3 Balıkesir, 103: ÇK5 Çanakkale/Lapseki, 104: ÇK8 Çanakkale/Lapseki, 105: ÇK12 Çanakkale/Bayramiç, 106: ÇK2 Çanakkale/Lapseki, 107: TK13 Tekirdağ/Marmaraeğlisi, 108: İK1 İstanbul/Selimpaşa, 109: KK3 Kırklareli, 110: TK2 Tekirdağ/Yeniçiftlik, 112: BuK10 Bursa/Osmangazi, 113: TK24 Tekirdağ/Kirazlı köyü

ERIC PCR ile yapılan çalışmalar sonucunda izolatların 200-4500 bp uzunluğunda bant oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.9). Şekil 4.10 da görüldüğü gibi izolatlar C107-C108, C109-C110-C111, C103, C101-C102, C112, C104 ve C105-C106 olmak üzere 7 gruba ayrılmıştır. C107 ve C108 izolatları kendi aralarında %98, C109, C110, C111 %99, C101-C102 ve C105-C106 izolatları ise kendi arasında %100 benzerlik göstermiştir. C107 ve C108 izolatlarının C109, C110, C111, C102, C112 ve C104 izolatları ile %39 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. C105 ve C106 izolatları ise diğer izolatlardan tamamen farklılık göstermektedir.

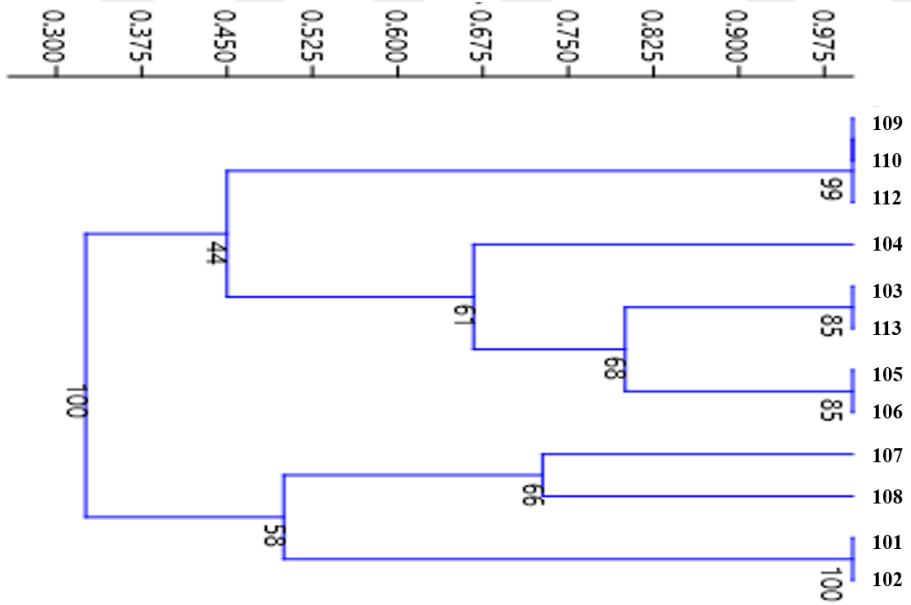
Çizelge 4. 4. REP-PCR sonucunda *P. s. pv. syringae* izolatların oluşturdukları bant uzunlukları

Bant uzunluğu (bp)	İzolat Adı											
	101*	102	103	104	105	106	107	108	109	110	112	113
3000	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
2750	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
2200	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
1750	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1500	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
1250	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
1050	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
900	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
800	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
750	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
600	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
500	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
450	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
400	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
350	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
300	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
275	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
220	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

\*101:TK31, 102:BaK3, 103:ÇK5, 104:ÇK8, 105:ÇK12, 106:ÇK2, 107:TK13, 108:İsK1, 109:KK3, 110:TK2, 111:BuK10, 113:TK24



Şekil 4.11. *P. s. pv. syringae* izolatlarının REP-PCR sonucunda elde edilen bant uzunlukları (çukur1: Marker 1kb, çukur2: TK31, çukur 3: BaK3, çukur 4: ÇK5, çukur 6: ÇK8, çukur 7: ÇK12, çukur 8: Marker 100 bp, Çukur 9: TK13, Çukur 10: İSK1, Çukur 11: KK3, Çukur 12: TK2, Çukur 13: BuK10, Çukur 14: TK14, Çukur 15: Marker 1kb)



Şekil 4.12. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının REP-PCR dendogramı

101: TK31 Tekirdağ/Naip, 102: BaK3 Balıkesir, 103: ÇK5 Çanakkale/Lapseki, 104: ÇK8 Çanakkale/Lapseki, 105: ÇK12 Çanakkale/Bayramiç, 106: ÇK2 Çanakkale/Lapseki, 107: TK13 Tekirdağ/Marmaraeğlisi, 108: İSK1 İstanbul/Selimpaşa, 109: KK3 Kırklareli, 110: TK2 Tekirdağ/Yeniçiftlik, 112: BuK10 Bursa/Osmangazi, 113: TK24 Tekirdağ/Kirazlı köyü

İzolatların 150-3000 bp uzunluğunda bant oluşturduğu REP-PCR sonucunda elde edilen Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 deki dendogramda C109, C110, C111, C104, C103, C112, C105 ve C106 izolatları; C101, C102, C107 ve C108 izolatları ile %100 oranında farklılık göstermektedir. C109-C110-C111 izolatları kendi aralarında %99, C103-C112 ve C105-C106 izolatları kendi aralarında %85 oranında benzerlik gösterirken %44 benzerlik oranıyla iki gruba ayrılmaktadır. C104 izolatu ise tek başına ayrı bir grupta yer almakta ve C103-C112 ve C105-C106 izolatları ile %61 oranında benzerlik göstermektedir. C107-C108 izolatları %66 oranında C101 ve C102 izolatları ile %100 oranında benzerlik göstererek diğer grubu oluşturmuştur. C107-C108 ve C101-C102 ise %58 oranında benzerlik göstermektedir.

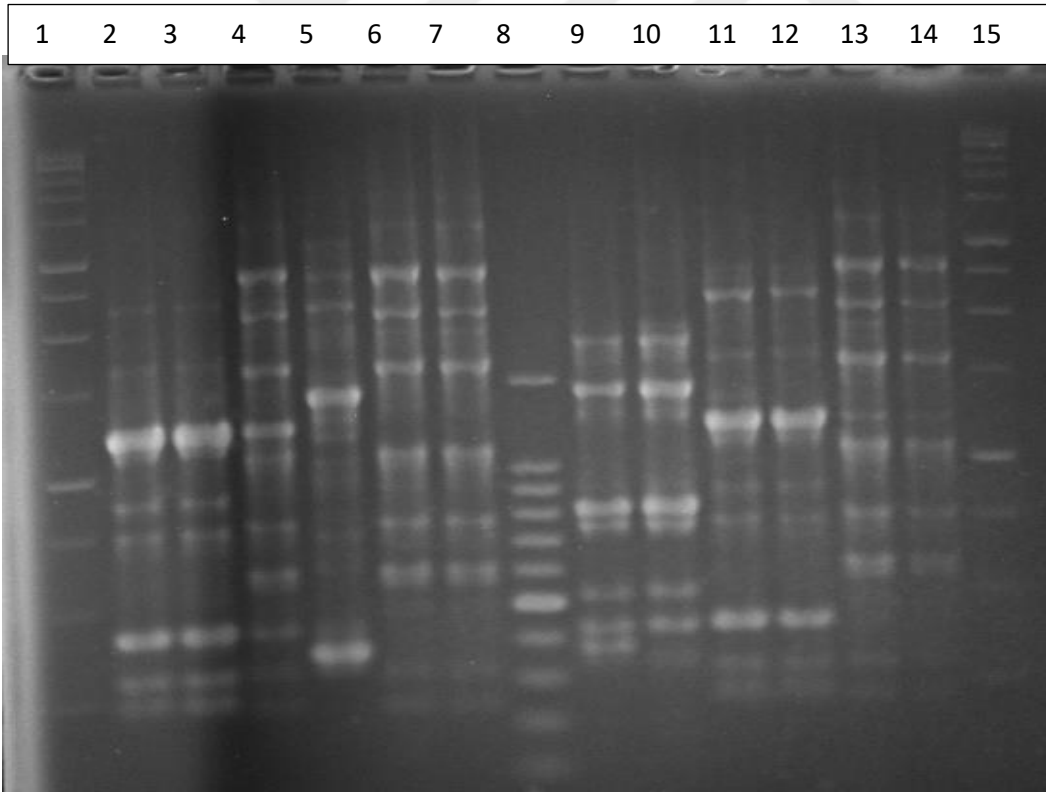
Grup 1 içerisinde yer alan C109, C110 ve C111 izolatları %99 oranında benzerlik göstererek aynı alt grup içerisinde yer alırken %61 oranında benzerlik gösteren C103, C112, C105, C106 ve C104 izolatları aynı alt grup içinde yer almaktadırlar. C103, C112, C105 ve C106 izolatları %68 benzerlik göstererek aynı alt grubun bir kolunu oluştururken C104 izolatu ise diğer kolu oluşturmaktadır (Şekil 4.12.).

Çizelge 4. 5. BOX-PCR sonucunda *P. s. pv. syringae* izolatların oluşturdukları bant uzunlukları

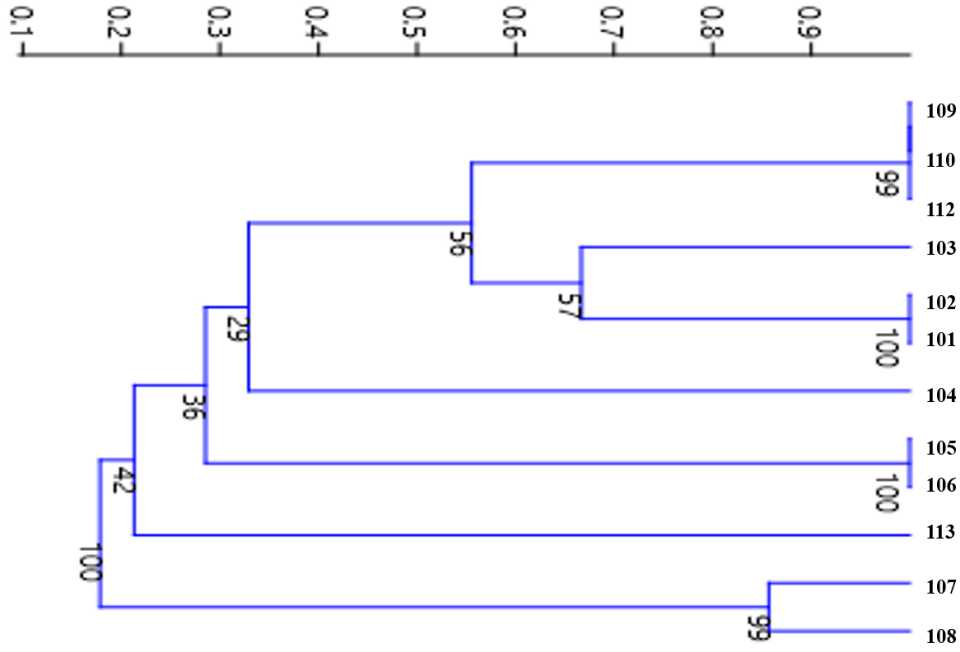
Bant uzunluğu (bp)	İzolat Adı											
	101*	102	103	104	105	106	107	108	109	110	112	113
3000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2750	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2500	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
2250	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
2000	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
1750	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
1500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1400	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
1250	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
1050	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
900	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
800	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

750	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
600	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
550	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
500	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
425	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
400	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
350	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
300	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
275	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
250	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
225	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

\*101:TK31, 102:BaK3, 103:ÇK5, 104:ÇK8, 105:ÇK12, 106:ÇK2, 107:TK13, 108:İsK1, 109:KK3, 110:TK2, 111:BuK10, 113:TK24



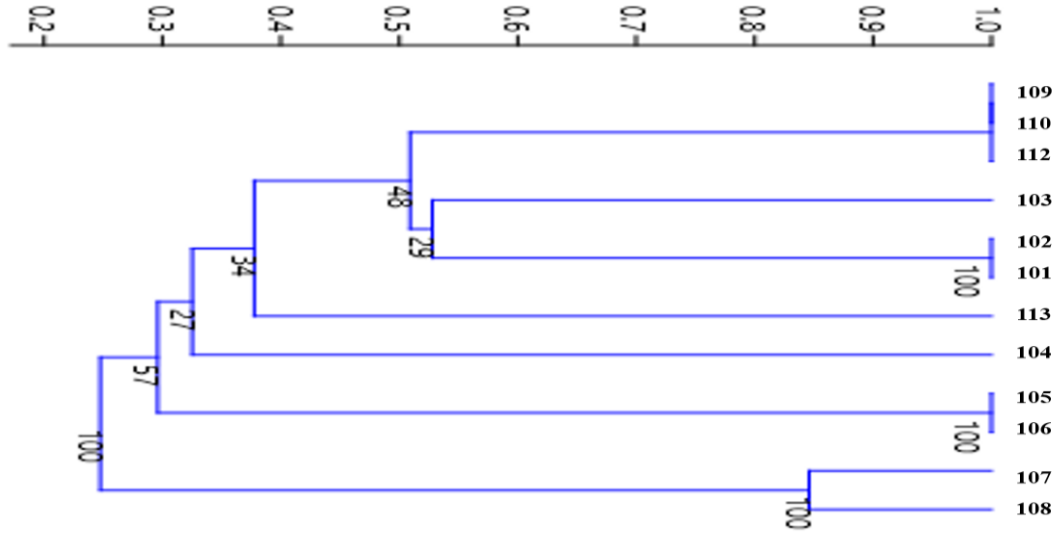
Şekil 4.13. *P. s. pv. syringae* izolatlarının BOX-PCR sonucunda elde edilen bant uzunlukları (çukur1: Marker 1kb, çukur2: TK31, çukur 3: BaK3, çukur 4: ÇK5, çukur 6: ÇK8, çukur 7: ÇK12, çukur 8: Marker 100 bp, Çukur 9: TK13, Çukur 10: İsK1, Çukur 11: KK3, Çukur 12: TK2, Çukur 13: BuK10, Çukur 14: TK14, Çukur 15: Marker 1kb)



Şekil 4.14. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının BOX-PCR dendrogramı

101: TK31 Tekirdağ/Naip, 102: BaK3 Balıkesir, 103: ÇK5 Çanakkale/Lapseki, 104: ÇK8 Çanakkale/Lapseki, 105: ÇK12 Çanakkale/Bayramiç, 106: ÇK2 Çanakkale/Lapseki, 107: TK13 Tekirdağ/Marmaraeğlisi, 108: İSK1 İstanbul/Selimpaşa, 109: KK3 Kırklareli, 110: TK2 Tekirdağ/Yeniçiftlik, 112: BuK10 Bursa/Osmangazi, 113: TK24 Tekirdağ/Kirazlı köyü

Yapılan BOX-PCR çalışması sonucunda Şekil 4. 13 ve Şekil 4. 14’de 225 ve 3000 bp arasında farklı uzunluğa sahip bantlar oluşturduğu görülmüştür. Yapılan dendrogram sonucunda 7 farklı grup belirlenmiştir. Birinci grup içerisinde Kırklareli (KK3), Tekirdağ/Yeniçiftlik (TK2) ve Bursa/Osmangazi BuK10), grup 2’ de Çanakkale/Lapseki (ÇK5), GRUP 3’ DE Tekirdağ/Naip (TK31) ve Balıkesir (BaK3), grup 4’ de Çanakkale/Lapseki (ÇK8), grup 5’ de Çanakkale/Bayramiç (ÇK12) ve Çanakkale /Lapseki (ÇK2), grup 6’ da Tekirdağ/Kirazlı köyü (TK24) ve son grup içerisinde ise Tekirdağ/Marmaraeğlisi (TK13) ve İstanbul/Selimpaşa (İSK1) yer almıştır. Gruplar içerisinde yer alan izolatlar kendi aralarında %99-100 benzerlik gösterirken gruplar arasında benzerlikler ise Şekil 4. 12 ‘de görüldüğü gibi %29-100 arasında farklılıkların bulunduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının ERIC-, REP-, BOX-PCR kümülatif dendogramı

101: TK31 Tekirdağ/Naip, 102: BaK3 Balıkesir, 103: ÇK5 Çanakkale/Lapseki, 104: ÇK8 Çanakkale/Lapseki, 105: ÇK12 Çanakkale/Bayramiç, 106: ÇK2 Çanakkale/Lapseki, 107: TK13 Tekirdağ/Marmaraeğlisi, 108: İSK1 İstanbul/Selimpaşa, 109: KK3 Kırklareli, 110: TK2 Tekirdağ/Yeniçiftlik, 112: BuK10 Bursa/Osmangazi, 113: TK24 Tekirdağ/Kirazlı köyü

Yapılan ERIC-, REP-, BOX-PCR sonucunda bütün veriler kümülatif olarak değerlendirildiğinde Şekil 4. 15’ de görüldüğü üzere 7 farklı grup ortaya çıkmıştır. Grup 1 içerisinde Kırklareli (KK3), grup 2’ de Çanakkale/Lapseki (ÇK5), grup 3’ de Tekirdağ/Naip (TK31) ve Balıkesir (BaK3), grup 4’ de Tekirdağ/Kirazlı köyü (TK24), grup 5’ de Çanakkale/Lapseki (ÇK8), grup 6’ da Çanakkale/Bayramiç (ÇK12) ve Çanakkale/Lapseki (ÇK2), son grup olan grup 7’ de ise Tekirdağ/Marmaraeğlisi (TK13) ve İstanbul/Selimpaşa (İSK1) kodlu izolatları yer almıştır. Grup içerisinde yer alan izolatları kendi aralarında %100 oranında benzerlik gösterirken gruplar arasında %27-100 arasında değişen oranlarda fark görülmüştür. En fazla farklılık Tekirdağ/Marmaraeğlisi (TK13) ile İstanbul/Selimpaşa (İSK1) bulunduğu grup 7 diğer tüm gruplarla %100 oranında farklı oldukları belirlenmiştir.

#### 4.6. İzolatların MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) ile tanınması

Survey yapılan her lokasyonu temsil edecek şekilde seçilen 12 adet izolatın protein profillerine göre tanısı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Kliniği laboratuvarında MALDI-TOF MS ile tanısı yapılmıştır. MALDI-TOF MS analiz sonucunda izolatlar klasik, biyokimyasal ve PCR çalışmalarımızı destekleyecek şekilde *P. s. pv. syringae* olarak tanılanmıştır (Şekil 4.16).

Analyte1

Bruker Logo

Analyte Name: H5  
Analyte Description: TK31  
Analyte ID: TK31  
Analyte Creation Date/Time: 2018-11-30T11:35:52.904  
Applied MSP Library(ies):  
Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

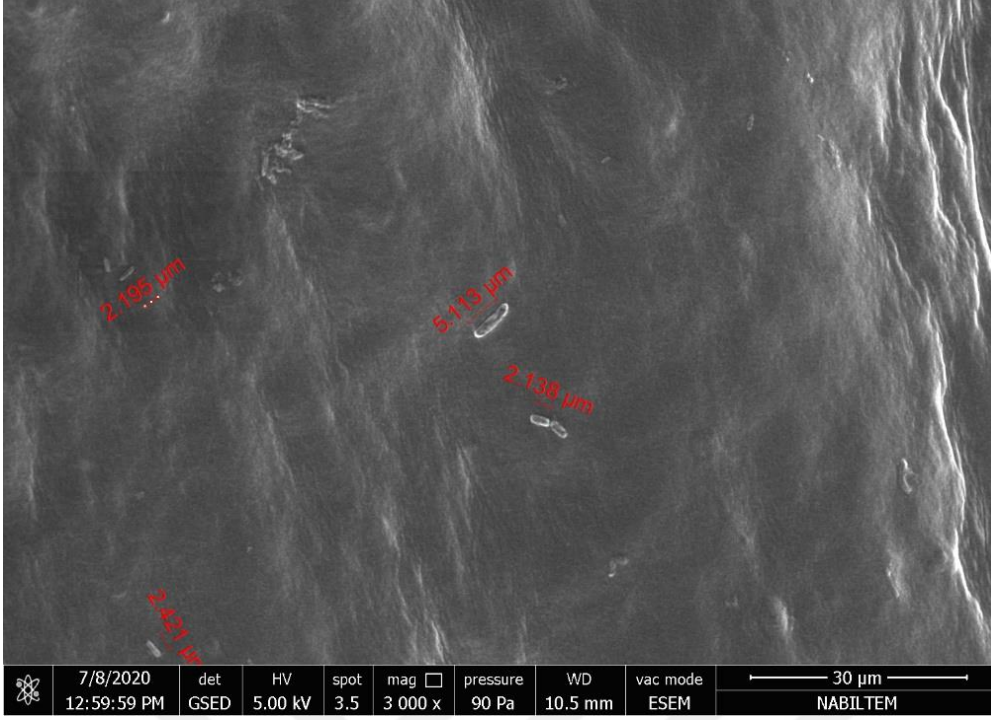
Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	CFBP-1392_Pseudomonas syringae pv. syringae_20160818	2.274	<a href="#">100134258</a>
2 (++)	CFBP-2105-Pseudomonas syringae pv. pisi_20170227	2.229	<a href="#">100134258</a>
3 (++)	CFBP-2356-Pseudomonas syringae pv. dysoxylif_20170306	2.206	<a href="#">100134258</a>
4 (++)	CFBP-2213_Pseudomonas syringae pv.atrofaciens_20161010	2.187	<a href="#">100134258</a>
5 (++)	CFBP-2895-Pseudomonas syringae pv. hibiscif_20170221	2.141	<a href="#">100134258</a>

Şekil 4.16. Bölge izolatlarından *P. s. pv syringae* TK31 izolatının MALDI-TOF analiz sonucu

#### 4.7. Elde Edilen İzolatların Elektron Mikroskop Görüntüsü

İzolatların elektron mikroskop görüntüsü Şekil 4.17’de görüldüğü gibidir. İzolatların çubuk şeklinde kolonilere sahip olduğu görülmektedir.





Şekil 4.17. *P. s. pv syringae* izolatının elektron mikroskop altında çubuk şeklindeki görüntüsü

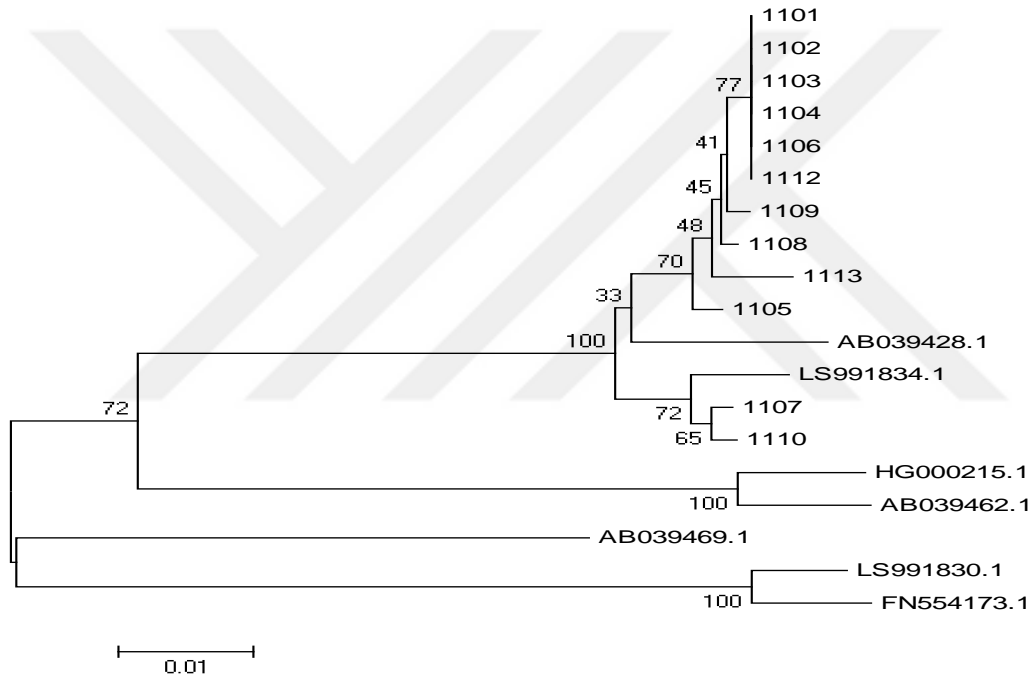
#### 4.8. MLSA (Multilocus Sequence Analysis) Çalışmaları

Son yıllarda ERIC-, REP-, BOX-PCR ile ayırımı zor olan izolatların moleküler analizlerinde MLSA kullanılmaya başlanmıştır. MLSA, bakteriyel izolatların filogenetik akrabalıklarını belirlemek amacıyla farklı gen bölgelerinin (housekeeping) kullanıldığı bir diğer farklı moleküler analiz metodudur.

*gyrB*, *gltA*, *rpoDs* ve *rpoDp* olmak üzere bu çalışmada farklı housekeeping genleri kullanılarak, kullanılan farklı genler ile farklı lokasyonlarda kiraz üretimi yapılan alanlardan elde edilen izolatların birbirinden ayırımı yapılmıştır. Aynı zamanda her gen ayrı ayrı değerlendirilerek NCBI' bulunan farklı izolatlarla benzerlikleri ortaya koyulmuştur. MLSA çalışması için kullanılan housekeeping genler için önerilen bağlanma sıcaklıklarının, referans bağlanma sıcaklıkları ile aynı olmadığı belirlenmiştir. Önerilen bağlanma sıcaklıklarında yapılan PCR işleminde elde edilen ürünlerin agaroz jelde bant görüntülerinin silik veya hiç oluşmadığı tespit edilmiştir. İzolatlara Gradient PCR yapılarak yeni bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. Gradient PCR sonucunda belirlenen yeni bağlanma sıcaklıkları

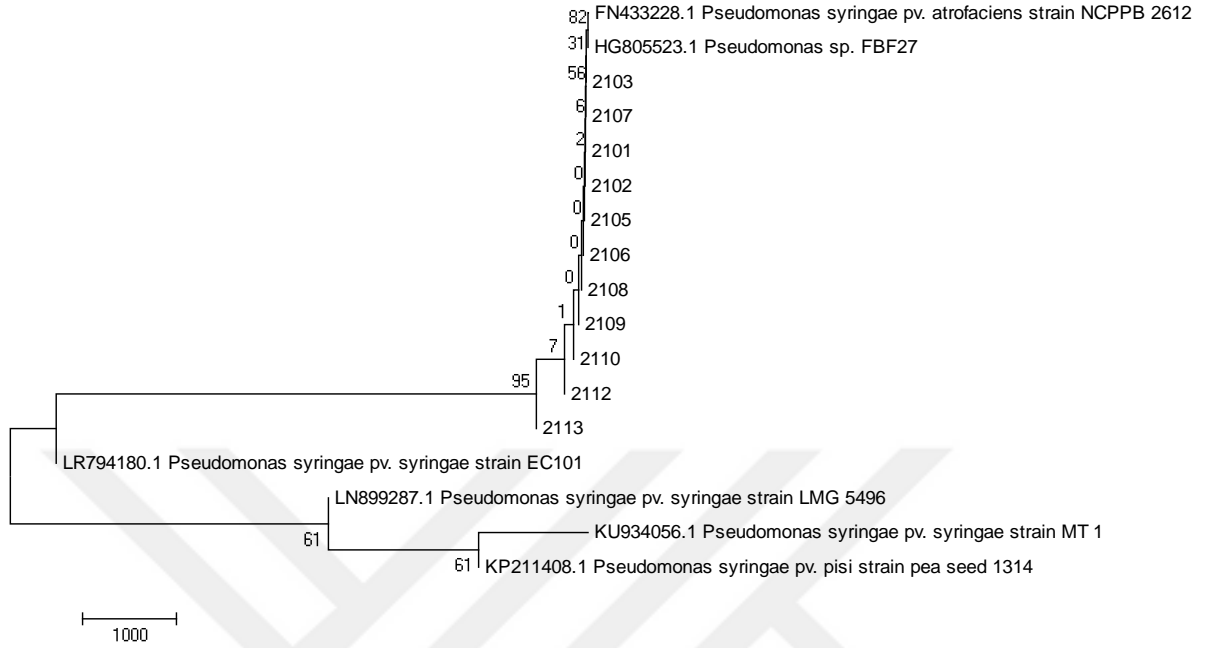
Primer	Baz dizilimi (5'-3')	Bağlanma sıcaklığı (°C)	
<i>gyrB</i>	(MGGCGGYAAGTTCGATGACCAAYTC/TRAKTBKACAGTC ARACCTTCRCGSGC)	63	63
<i>rpoDp</i>	(AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG/GGAACWKGCG CAGGAAGTCGGCACG)	63	63
<i>rpoDs</i>	(AAGCGAATCGAAGAAGGCATYCGTG/GGAACWKGCG CAGGAAGTCGGCACG)	63	66,3
<i>gltA</i>	(GCCTCBTGCAGATCGAAGATCACC/CTTGTAVGGRCY GGAGAGCATTTC)	62	64



Şekil 4.18. *gyrB* geni sekans sonucuna göre *P. s. pv. syringae* izolatlarının Neighbor-joining (NJ) ağacı. 1101: Tekirdağ/Naip, 1102: Balıkesir, 1103: Çanakkale/Lapseki, 1104: Çanakkale/Lapseki, 1105: Çanakkale/Bayramiç, 1106: Çanakkale/Lapseki, 1107: Tekirdağ/Marmaraereğlisi, 1108: İstanbul/Selimpaşa, 1109: Kırklareli, 1110: Tekirdağ/Yeniçiftlik, 1112: Bursa/Osmangazi, 1113: Tekirdağ/Kirazlı köyü

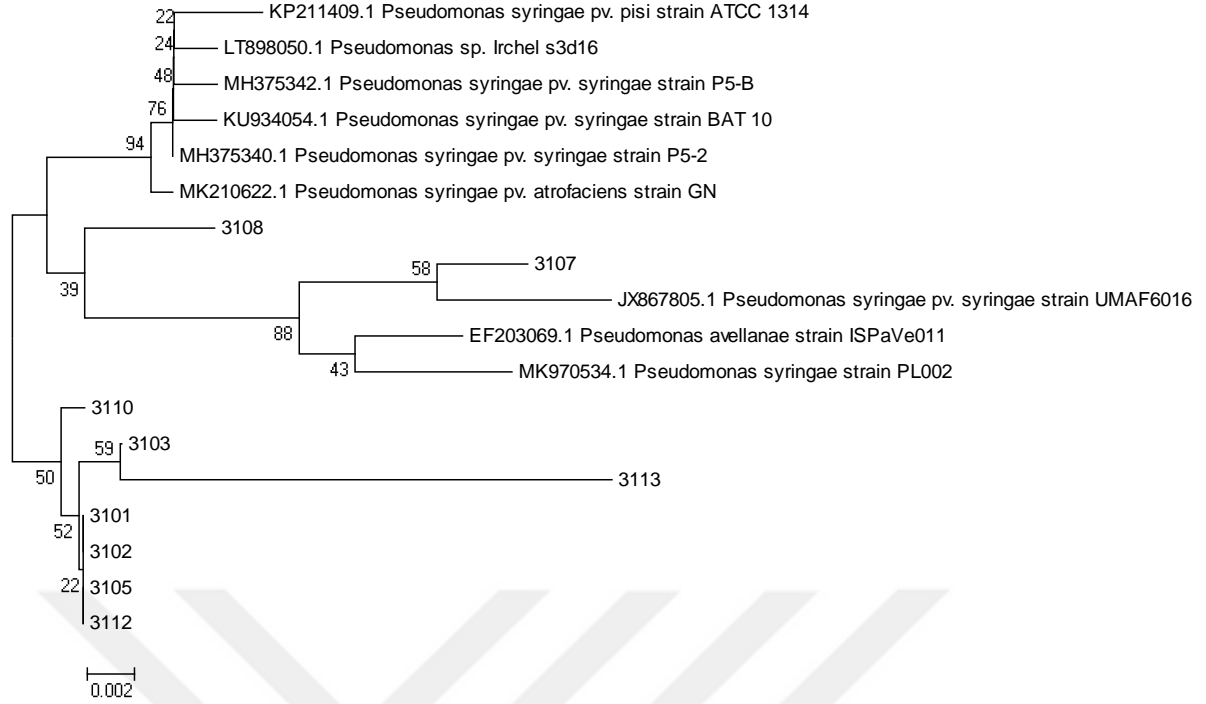
Şekil 4. 18' de görüldüğü gibi *gyrB* geni ile yapılan çalışmalarda NJ ağacında NCBI' da kayıtlı olan izolatlar ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda Tekirdağ7Naip (TK31), Balıkesir (BaK3), Çanakkale/Lapseki (ÇK5) (ÇK8) (ÇK2), Çanakkale/Bayramiç (ÇK12), İstanbul/Selimpaşa (İsK1), Kırklareli (KK3) izolatları benzerlik olarak birbirine yakınken Tekirdağ/Marmaraereğlisi (TK13) ve Tekirdağ/Yeniçiftlik (TK2) izolatları birbirinden

tamamen farklı bir grup altında toplanmıştır.



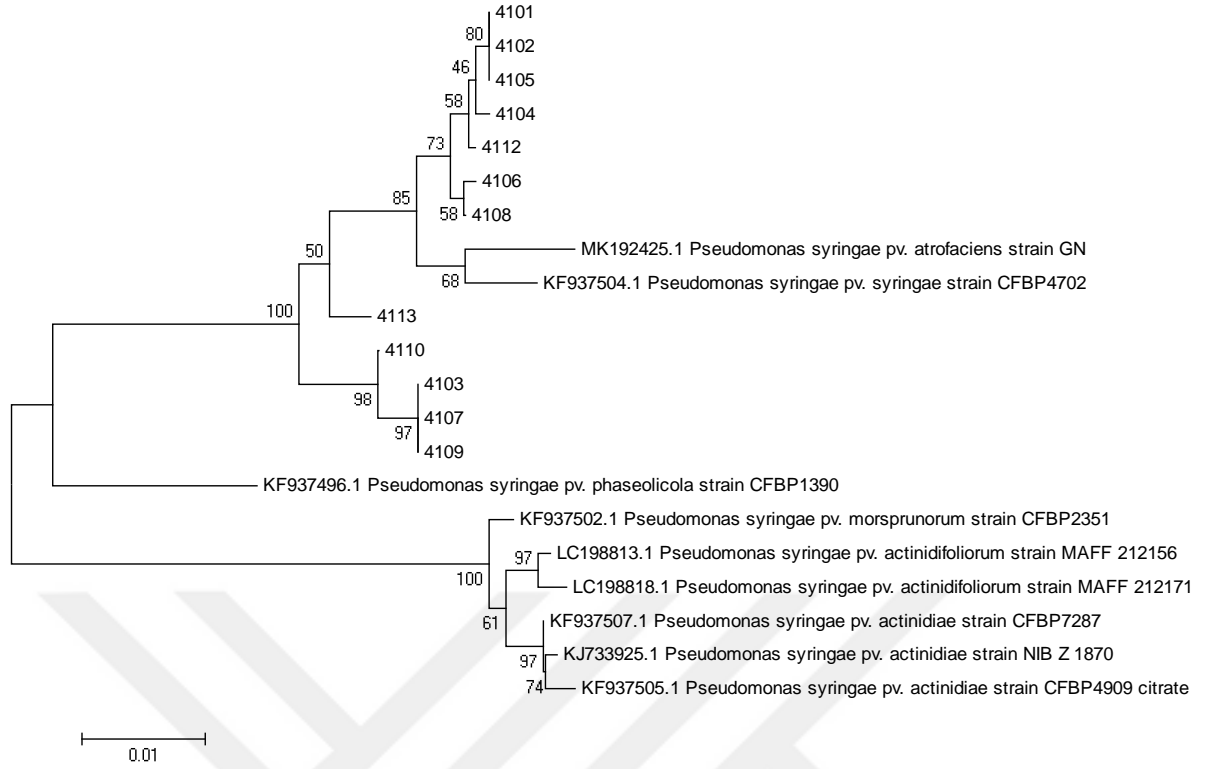
Şekil 4.19. *rpoDs* geni sekans sonucuna göre *P. s. pv. syringae* izolatlarının Neighbor-joining filogenetik ağacı. 2101: Tekirdağ/Naip, 2102: Balıkesir, 2103: Çanakkale/Lapseki, 2104: Çanakkale/Lapseki, 2105: Çanakkale/Bayramiç, 2106: Çanakkale/Lapseki, 2107: Tekirdağ/Marmaraeğlisi, 2108: İstanbul/Selimpaşa, 2109: Kırklareli, 2110: Tekirdağ/Yeniçiftlik, 2112: Bursa/Osmangazi, 2113: Tekirdağ/Kirazlı köyü

Şekil 4.19' da görüldüğü üzere *rpoDs* geni ile yapılan MLSA çalışmalarında izolatların tamamı bir grup içerisinde yer almıştır ve NCBI' da kayıtlı olan *P. s. pv. atrofaciens* strain NCPPB 2612 ve *P. s. pv. syringae* EC101 kodlu izolatları ile benzerlik gösterirken, *P. s. pv. syringae* 5496, *P. s. pv. syringae* MT1 ve *P. s. pv. pisi* 1314 izolatları ile farklı oldukları belirlenmiştir.



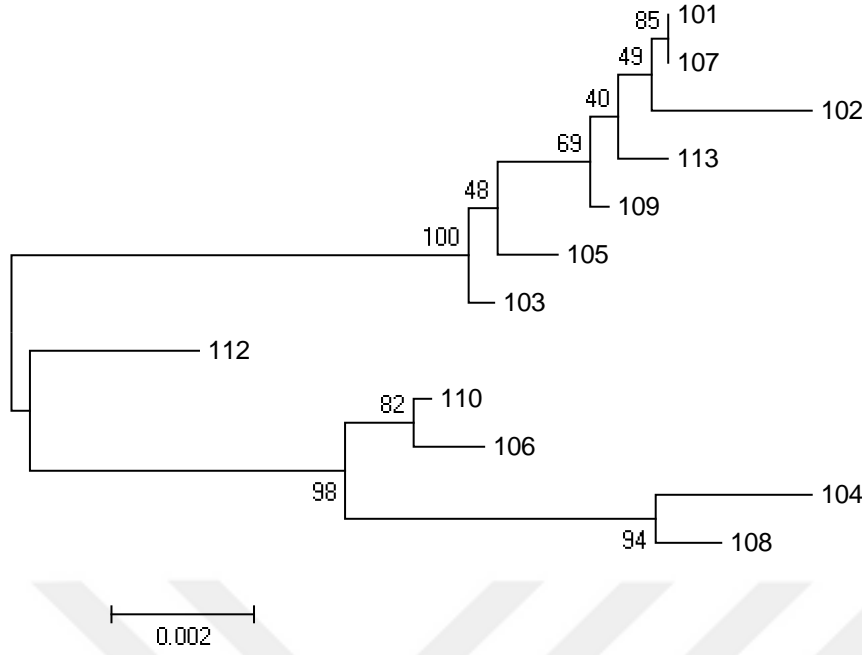
Şekil 4.20 *rpoDp* geni sekans sonucuna göre *P. s. pv. syringae* izolatlarının Neighbor-joining filogenetik ağacı. 3101: Tekirdağ/Naip, 3102: Balıkesir, 3103: Çanakkale/Lapseki, 3104: Çanakkale/Lapseki, 3105: Çanakkale/Bayramiç, 3106: Çanakkale/Lapseki, 3107: Tekirdağ/Marmaraeğlisi, 4108: İstanbul/Selimpaşa, 3109: Kırklareli, 3110: Tekirdağ/Yeniçiftlik, 3112: Bursa/Osmangazi, 3113: Tekirdağ/Kirazlı köyü

Şekil 4. 20' de görüldüğü üzere *rpoDp* geni kullanılarak yapılan MLSA çalışmalarında izolatlar arasındaki farklılıklar diğer genlere göre daha ayırıcı olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda NCBI karşılaştırma izolatlarında farklılıklar belirlenmiştir. İstanbul/Selimpaşa (İsK1) ve Tekirdağ/Marmaraeğlisi (TK13) izolatları NCBI karşılaştırma kültürlerinden *P. s. pv. syringae* UMAF6016 ile *P. syringae* PL002 izolatlarına yakınlık gösterirken diğer bütün izolatların farklı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.21. *gltA* geni sekans sonucuna göre *P. s. pv. syringae* izolatlarının Neighbor-joining filogenetik ağacı. 4101: Tekirdağ/Naip, 4102: Balıkesir, 4103: Çanakkale/Lapseki, 4104: Çanakkale/Lapseki, 4105: Çanakkale/Bayramiç, 4106: Çanakkale/Lapseki, 4107: Tekirdağ/Marmaraeğlisi, 4108: İstanbul/Selimpaşa, 4109: Kırklareli, 4110: Tekirdağ/Yeniçiftlik, 4112: Bursa/Osmangazi, 4113: Tekirdağ/Kirazlı köyü

Şekil 4. 21' de görüldüğü üzere *gltA* housekeeping geni ile yapılan MLSA sonucunda izolatlar iki farklı grup altında toplanmıştır. Birinci grup içerisinde Tekirdağ/Naip (TK31), Balıkesir (BaK3), Çanakkale/Bayramiç (ÇK12), Çanakkale/Lapseki (ÇK8) (ÇK2), Bursa/Osmangazi (BuK10), İstanbul (İsK1) ve Tekirdağ/Kirazlı köyü (TK24) yer almıştır. Bu izolatlar *P. s. pv. atrofaciens* izolat GN ve *P. s. pv. syringae* izolat CFBP4702 izolatları ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.22. *P. s. pv. syringae* izolatlarının *gyrB*, *rpoDs*, *rpoDp*, *gltA* housekeeping genlerinin MLSA çalışmaları sonucunda oluşturulan Neighbor-joining (NJ) ağacı. 101: Tekirdağ/Naip, 102: Balıkesir, 103: Çanakkale/Lapseki, 104: Çanakkale/Lapseki, 105: Çanakkale/Bayramiç, 106: Çanakkale/Lapseki, 107: Tekirdağ/Marmaraereğlisi, 108: İstanbul/Selimpaşa, 109: Kırklareli, 110: Tekirdağ/Yeniçiftlik, 112: Bursa/Osmangazi, 113: Tekirdağ/Kirazlı köyü

MLSA çalışmalarında kullanılan 4 farklı housekeeping genleri ile yapılan NJ ağacı sonucunda iki farklı grubun yer aldığı ve bu grup ayrılıklarının %100 olduğu belirlenmiştir. Birinci grup içerisinde yer alan izolatlar kendi içerisinde ise 6 farklı alt grup olarak ayrılmıştır. Altgrup 1 içerisinde Tekirdağ/Naip (TK31) ile Tekirdağ/Marmaraereğlisi (TK13) izolatları aynı alt grup içerisinde bulunurken, Balıkesir (BaK3) ve Tekirdağ/Kirazlı köyü (TK24) izolatları ayrı alt grupta yer almıştı ve aralarındaki benzerlikler %40 ile %85 oranında değişiklik göstermektedir. İkinci grup içerisinde ise 4 tane alt grup oluşmuştur. Çanakkale/Lapseki (ÇK8) ile Tekirdağ /Yeniçiftlik (TK2) aynı alt grupta yer almışlardır. Bursa/Osmangazi (BuK10) is farklı bir alt grup olarak grup içerisinde ayrılmıştır. Alt gruplar arasındaki benzerlik oranı %82 ile %94 arasında değişmiştir.

**Popülasyon genetik analiz çalışmaları:** Çalışmada kullanılan housekeeping gen bölgelerine ait özellikler ve izolatlar arasındaki moleküler varyans Arlequin ve MEGA programları kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7, 4.8)

Çizelge 4.7. İzolatlar arasındaki moleküler varyans analizi (AMOVA)

Çeşitliliğin kaynağı	Df	Source of squares	Varyans bileşeni	% Varyans	F <sub>ST</sub>
Populasyonlar arasında	5	55,00	2,31481	25,30	
Populasyonlar içinde	6	41,00	6,83333	74,70	
Total		96,000			0.25

Yapılan analizler sonucunda farklı bölgelerdeki kiraz üretim alanlarından izole edilen *P. s. pv. syringae* izolatlarının genetik verileri arasındaki ilişkinin belirlenmesi için AMOVA kullanılmıştır. Farklı bölgelerden elde edilen izolatların popülasyon çeşitliliğinin bölgesel farklılıkların herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Popülasyon içerisindeki (izolatlar arası) çeşitlilik değerlendirildiğinde tablo 4. 7 de görüldüğü gibi %74.70 bir oranda çeşitliliğin olduğu gözlenmiştir

Çizelge 4.8. *gyrB*, *rpoDs*, *rpoDp*, *gltA* gen bölgelerinin özellikleri

Gen	Sekanslanan izolat sayısı	Korunmuş alan	Değişken alan	Tanıttıcı alanın sıklığı	Tek alan	Çeşitliliğin ortalaması
<i>gyrB</i>	12	627/640 %95,24	13/640 %2,03	11/640 %1,71	2/640 %0,31	0.007
<i>rpoDs</i>	11	530/540 %98,14	10/540 %1,85	9/540 %1,66	1/540 %0,18	0.05
<i>rpoDp</i>	9	556/591 %94,07	23/591 %3,81	6/591 %1,01	12/591 %2,03	0.011
<i>gltA</i>	12	964/998 %96,60	24/988 %2,42	24/988 %2,42	0	0.012

<i>gyrB+rpoDs</i>	44	2677/2765	70/2765	50/2765	20/2765	0.010
<i>+rpoDp+glt</i>		%96,81	%2,53	%1,80	%0,72	
A						

MLSA çalışmalarında kullanılan gen bölgelerinin özellikleri DnaSP ve MEGA 6 programları kullanılarak Çizelge 4.4. deki gibi belirlenmiştir. Kullanılan genlerden *gyrB* ve *gltA* çalışmada kullanılan 12 izolatın hepsinde çalışırken *rpoDs* 11, *rpoDp* ise 9 izolat üzerinde başarılı olmuştur. Çalışma sonucunda *rpoDs* gen bölgesi kullanıldığında izolatlardaki korunan bölgenin %98.14 olduğu görülmüştür.

**Sekans sonuçlarının NCBI veri tabanına yüklenmesi:** *gyrB*, *rpoDs*, *rpoDp* ve *gltA* housekeeping genleri kullanılarak yapılan sekans işleminde elde edilen sonuçlar NCBI veri tabanında kayıtlı olan izolatlar ile kontrol edilmiştir. NCBI da kayıtlı olan izolatlar ile çalışmada kullandığımız izolatların benzerlik oranları göz önünde bulundurularak kontrol yapılmış ve NCBI' dan referans izolat seçilmiştir. *P. s. pv. syringae* izolatlarımız ile referans izolatımızın nükleotit dizileri ExPASy (Expert Protein Analysis System Translation Tool-Swiss Institute of Bioinformatic) programı ile protein dizisine çevrilerek başlangıç ve bitiş kodonları kontrol edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatlar NCBI içerisinde BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri yükleme bölümüne yüklenmiştir. Çalışmada kullanılan izolatlar her bir gen için NCBI veri tabanına kaydedilerek accession numaraları alınmıştır (Çizelge 4.9).



Çizelge 4.9. Çalışmalarda farklı primerler ile *P. s. pv. syringae* olarak tanımlanmış izolatların GenBankası (NCBI)'nda erişim kayıt numaraları

Sekans adı	İzolat adı	GenBank Accession numarası			
		<i>GyrB</i>	<i>RpoDs</i>	<i>rpoDp</i>	<i>GltA</i>
C101	TK31	MT508572	MT521868	MT508584	MT508560
C102	BaK3	MT508573	MT521878	MT508585	MT508561
C103	ÇK5	MT508574	MT521869	MT508586	MT508562
C104	ÇK8	MT508575	-	-	MT508563
C105	ÇK12	MT508576	MT521870	MT508587	MT508564
C106	ÇK2	MT508577	MT521871	-	MT508565
C107	TK13	MT508578	MT521872	MT508588	MT508566
C108	İsK1	MT508579	MT521873	MT508589	MT508567
C109	KK3	MT508580	MT521874	-	MT508568
C110	TK2	MT508581	MT521875	MT508590	MT508569
C112	BuK10	MT508582	MT521876	MT508591	MT508570
C113	TK24	MT508583	MT521877	MT508592	MT508571

#### 4.9. Kiraz Dal Yanıklığı Hastalık Etmenine Karşı Farklı Preparatların Etkinliğinin Belirlenmesi

**İn vitro çalışmalar:** Bakıroksiklorür, bakırhidroksit, bakırsülfat, kalsiyum hidroksit bakır sülfat gibi bakırlı preparatların yanı sıra Maneb ve Mancozep preparatlarının 10, 25, 50, 100, 200, 300 ve 400 µg/ml dozları kullanılarak yapılan petri denemesinin sonuçları Ek1 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir. Her bir ilaç için 7 doz kullanılarak yapılan denemede izolatların preparatları karşı hassasiyetini belirlemek için koloni sayımları yapılmıştır. Kullanılan SAS ve SPSS istatistik programı ile bakırlı preparatların izolatlar üzerine etkisi belirlenmiştir.

Çizelge 4. 10. Bakırlı preparat, Maneb ve Mancozeb'in farklı lokasyonlardan elde edilen *P. s. pv. syringae* izolatlarının *in vitro* popülasyonu gelişimi üzerine etkisi

Kullanılan kimyasal ve dozları (µg/ml)		Lokasyon ve Bakteri Koloni sayısı (x10 <sup>6</sup> hücre/ml)					
		Balıkesir	Bursa	Çanakkale	İstanbul	Kırklareli	Tekirdağ
Bakırhidroksit	200 µg/ml	142,26±1,76a	145,45±0,67a	145,97±0,88a	145,00±1,39a	147,66±1,29a	148,07±0,94a
	300 µg/ml	137,33±1,62a	138,08±0,83a	138,41±0,64a	138,00±1,24a	143,83±0,90a	141,46±1,03a
	400 µg/ml	125,26±1,41ab	128,25±1,06ab	124,19±0,72ab	126,33±1,50ab	126,83±1,19ab	133,76±1,13a
	Kontrol	168,86±2,00abc	180,08±1,79ab	177,30±1,57ab	184,33±3,32ab	187,00±1,55a	175,22±0,97abc
Bakıroksiklorür	200 µg/ml	142,60±1,77ab	146,70±a0,80b	148,22±0,94ab	153,66±2,22a	151,33±0,68ab	149,25±1,00ab
	300 µg/ml	137,73±1,60a	139,66±0,83a	140,58±0,89a	146,33±1,28a	146,41±1,02a	143,15±1,16a
	400 µg/ml	127,26±1,33a	130,50±0,99a	129,08±1,25a	136,33±1,50a	135,58±1,37a	136,08±1,26a
	Kontrol	168,86±2,00abc	180,08±1,79ab	177,30±1,57ab	184,33±3,32ab	187,00±1,55a	175,22±0,97abc
Bakırsülfat	200 µg/ml	140,47±1,56a	144,375±0,71a	143,52±0,82a	143,00±1,29a	146,33±1,05a	144,60±0,84a
	300 µg/ml	134,33±1,40a	136,375±0,76a	136,13±0,72a	136,33±1,15a	141,41±1,06a	137,56±0,99a
	400 µg/ml	120,67±1,16ab	124,83±0,82ab	122,00±0,85ab	123,16±1,11ab	121,58±1,37ab	127,16±0,95a
	Kontrol	168,86±2,00abc	180,08±1,79ab	177,30±1,57ab	184,33±3,32ab	187,00±1,55a	175,22±0,97abc
Kalsiyumhidroksit bakırsülfat	200 µg/ml	144,53±1,83a	149,33±0,97ab	151,63±0,79a	149,33±1,76ab	149,66±01,25ab	148,52±a0,80b
	300 µg/ml	139,53±1,96a	142,08±1,02a	145,36±0,80a	141,33±1,15a	146,08±0,77a	141,34±0,95a
	400 µg/ml	132,20±1,72a	132,58±1,11a	136,72±0,93a	136,33±2,99a	137,66±1,41a	132,63±1,07a
	Kontrol	168,86±2,00abc	180,08±1,79ab	177,30±1,57ab	184,33±3,32ab	187,00±1,55a	175,22±0,97abc
Maneb	10 µg/ml	82,26±abc	86,41±ab	93,05±a	88,50±ab	96,75±a	79,53±abc
	Kontrol	168,86±abc	180,08±ab	177,30±ab	184,33±ab	187,00±a	175,22±abc
Mancozeb	10 µg/ml	89,33±a	87,25±a	90,05±a	86,16±a	92,08±a	93,18±a
	Kontrol	168,86±abc	180,33±ab	177,30±ab	184,33±ab	187,00±a	175,22±abc

Aynı satır içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Tukey Çoklu Karşılaştırma testi, P<0.05).

Çizelge 4.11. Kullanılan bakırlı preparatların *P. s. pv syringae* izolatlarının *in vitro* popülasyonu gelişimi üzerine etkisi

Bakırlı Preparatlar	Koloni sayısı
Bakırsülfat	153,74c
Bakırhidroksit	155,74b
Bakıroksiklorür	157,48a
Kalsiyum hidroksit bakırsülfat	157,61a

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Tukey Çoklu Karşılaştırma testi,  $P<0.05$ ).

Çizelge 4.12. Bakırlı preparatların farklı dozlarının *P. s. pv syringae* izolatlarının *in vitro* popülasyonu gelişimi üzerine etkisi

Doz	Koloni sayısı
Kontrol	176,77a
400	130,45h
300	140,42g
200	147,08f
100	153,47e
50	160,08d
25	166,41c
10	173,41b

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Tukey Çoklu Karşılaştırma testi,  $P<0.05$ ).

Çizelge 4.10, 4.11 ve 4.12’de bakırlı preparatların *P. s. pv syringae* popülasyonuna karşı *in vitro* koşullarda etkilerini hesaplanmıştır. Farklı lokasyonlardan izole edilen etmenin farklı bakırlı preparat içeren besi ortamındaki koloni sayımları, kontrol ile kıyaslandığında Balıkesirden elde edilen izolatların bakır uygulamalarına karşı diğer lokasyon izolatlarından daha hassas olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.11 ve 4.12’de görüldüğü üzere koloni sayısı üzerine en etkili bakırlı preparat bakırsülfat en etkili doz ise 400 µg/ml olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.9’da bakırlı preparatların, farklı lokasyonlardan elde edilen *P. s. pv syringae* izolatlarının koloni sayılarındaki etkisi kontrole göre kıyaslanarak belirlenmiştir. Bakırsülfatın 400 µg/ml dozunun Balıkesir, Bursa, Çanakkale, İstanbul, Kırklareli ve Tekirdağ lokasyonlarından elde edilen *P. s. pv syringae*’nin koloni gelişimini sırasıyla %28, %35, %31, %33, %35 ve %25 oranında azalttığı belirlenmiştir.

Çalışmada bakırlı preparatların yanı sıra Maneb ve Mancozeb preparatları da kullanılmıştır. 10 ppm doz uygulanan petrilerde bakteri gelişimi kontrole oranla neredeyse yarı yarıya iken 25 ppm doz uygulandığında izolatların gelişmediği görülmüştür (Çizelge 4.10).

**In vivo çalışmalar:** Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü Uygulama bahçesinde kurulan denemede Aliette (400 gr/100 L), Kocide (400 gr/100 L),

Göztaşı (600 gr/100 L), Bestbakır (400 gr/100 L) ve Tricopper forte (300 gr/100 Lgr/100l) kimyasalları kullanılarak tesadüf blokları deneme desenine göre her kimyasal için 7 tekerrür olacak şekilde deneme kurulmuştur. Deneme kurulduğu dönemdeki iklim verileri Ek2’de verilmiştir. Çizelge 4.13 ‘de görüldüğü gibi *P.s pv. syringae* ’nin kiraz ağaçlarında sebep olduğu belirtiler göz önünde bulundurularak hastalık şiddeti belirlenmiştir. Her bir ağaçtan rastgele alınan 50 adet sürgünden elde edilen izolatların LOPAT tanı karakteri ile tanısı yapılarak *P. s. pv. syringae* olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Farklı kimyasal preparat uygulamalarının *in vivo* hastalık şiddeti üzerine etkisi

<b>Kimyasal Preparat (etken bileşeni)</b>	<b>Hastalık Şiddeti (%)</b>	<b>Etkinlik (%)</b>	<b>Hastalığın Bulunması (%)</b>
Aliette (Fosetyl-Al)	69,84±7.47a	30,16	66,84±5,21ab
Kocide (Bakır hidroksit)	14,28±2.97b	85,72	21,72±0,99c
Göztaşı (Bakır sülfat)	19,04±2.02b	80,96	23,14±0,99c
Bestbakır (Bakır oksiklorür)	19,04±1.70b	80,96	24,58±1,80c
Tricopper forte (Bakır Tuzları + Mancozeb)	26,98±4.61b	73,02	41,72±1,84bc
Negatif kontrol (su)	19,04±2.77b	80,96	35,14±1,41c
Pozitif kontrol ( <i>Pss</i> süspansiyonu)	80,95±8.99a	19,05	68,96±5,47a

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Tukey Çoklu Karşılaştırma testi,  $P<0.05$ ).

Çizelge 4.13’de hastalık şiddetine karşı Aliette uygulamasının pozitif ve negatif kontrol ile kıyaslanması yapıldığında hastalık şiddeti üzerine istatistiksel olarak bir etkisi olmadığı görülmektedir. Aliette dayanıklılığı teşvik etme özelliğine sahip bir preparat olmasına rağmen, patojene karşı etkili olmamıştır. Bunun sebebi ise Aliette’nin uygulanma zamanı ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Patojen inokulasyonundan sonra Aliette uygulaması yapıldığında, hastalık şiddeti üzerine etkili bir preparat olmadığı görülmüştür.

Kocide, Göztaşı, Bestbakır ve Tricopper forte uygulamaları hastalık şiddeti üzerine olan etkilerine bakıldığında istatistiksel olarak aynı grupta bulunmalarına rağmen, ağaçlardan alınan dal örneklerinde hastalığın izole edilmesi sonucunda belirlenen hastalığın bulunma oranına bakıldığında Kocide, Göztaşı ve Bestbakır uygulamaları, Tricopper forte uygulamasından ayrı bir grupta yer almaktadır.

Ayrıca denemede negatif kontrol olarak sadece saf su uygulanmış olmasına rağmen Çizelge 4.13’de hastalık şiddeti %19,04 ve hastalığın bulunma oranı ise %35,14 oranında hesaplanmıştır. Denemede negatif kontrole patojen inokulasyonu yapılmamasına rağmen hastalığın görülmesinin nedeni ise, patojenin rüzgarla veya yağmurla aynı bahçe içindeki diğer ağaçlara taşınabileceği ihtimali olarak düşünülmüştür.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

*P. s. pv. syringae*'nin neden olduğu Bakteriyel kanser hastalığı, ülkemiz için önemli bir ihracat ürünü olan kirazın kalite ve veriminin düşmesine sebep olan bakteriyel hastalık etmenidir.

Ülkemizde hastalık ilk defa Karaca tarafından 1996 yılında rapor edilmiştir. Sonraki çalışmalarda etmen Antalya, Mersin ve Adana'da turunçgillerde (Mirik ve vd., 2005), Erzurum ve çevresinde kayısılarda (Görmez, 2011), Marmara ve Ege Bölgelerinde kiraz ve Ege bölgesinde bademlerde tespit edilmiştir (Ertimurtaş ve Özaktan 2014; Mirik vd., 2015)

Çalışmamızda Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarında bakteriyel kansere sebep olan hastalık etmenleri izole edilmiş, klasik, biyokimyasal ve PCR yöntemleri ile tanıları yapılmıştır. Hastalık etmeninin klasik testler ile tanısında LOPAT ve GATTa tanı karakterleri kullanılmıştır. Test sonuçları (+---+) vererek toplanan izolatlar *P. syringae* olarak tanılanmıştır. Yapılan GATTa testleri sonuçlarının (++--) olarak belirlenmiş ve izolatların *P. s. pv. syringae* olarak tanıları yapılmıştır. Elde ettiğimiz tanı sonuçları ile Bultreys ve Kaluzna (2010) tarafından yapılan çalışmalara benzerlik olduğu görülmüştür. Moleküler tanı yöntemlerinden olan klasik PCR ile izolatların tanılanmasında referans olarak Bereswill vd., (1992) ve Abbasi vd., (2013) çalışmalar kullanılmıştır. *SyrB* ve *cfl* primer setleri kullanılarak gerçekleştirilen tanı çalışmaları sonucu 82 izolattan 63 adet izolat 752 bp uzunluğunda bant oluşturarak *P. s. pv. syringae* olarak tanılanmış ve çalışmalardan elde edilen sonuçlara paralellik göstermiştir. Pozitif reaksiyon vermeyen 19 adet izolat ise kirazda patojen olarak belirlenmiş ve *Pseudomonas* karakteri göstermiştir.

Farklı lokasyonlardan izole edilen *P. s. pv. syringae* olarak tanılanan izolatlar arasındaki genetik karakterizasyonu ortaya koymak için ERIC-, REP- ve BOX-PCR metotlarından yararlanılmıştır. Kullanılan bu metotların izolatlar arası genetik karakterizasyonu belirlemedeki hassasiyetinin değişkenlik gösterdiği yapılan birçok çalışmalarda bildirilmiştir. Menard ve ark. (2003), kayısı ve yabani kirazdan elde ettikleri *P. s. pv. syringae* izolatların genetik karakterizasyonunu belirlemede ERIC ve BOX-PCR metodlarının etkili olduğunu belirtirken, Vicente ve Roberts (2007), yabani kiraz ve kirazdan izole ettikleri *P. s. pv. syringae* izolatlarının ayırımında ERIC- REP- ve BOX-PCR yöntemlerinin hepsinin de izolatların tür ve ırk ayırımında kullanılabileceğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda farklı lokasyonlardan izole edilen *P. s. pv. syringae* izolatların genetik karakterizasyonunu belirlemede ERIC-REP ve

BOX-PCR metotlarından her birinin hassas olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir. Birçok araştırmacının da belirttiği gibi çalışmamızda da görüldüğü gibi izolatların ayırımında ERIC-REP- ve BOX-PCR yöntemlerinin kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Ayrıca yapılan ayırım çalışmalarında izolatlar arasındaki benzerliklerin toplanılan lokasyona bağlı olmadığı belirlenmiştir. Şekil 4.5.5 ERIC ,REP- ve BOX-PCR kümülatif dendogramına göre C109, C110 ve C111 izolatları sırasıyla Kırklareli, Tekirdağ ve Bursa şehirlerinden izole edilmiş ve farklı lokasyonlardan olmalarına rağmen %100 oranında benzerlik göstermişlerdir tıpkı C102 Tekirdağ ve C101 Balıkesir izolatların birbirine yakın oranda benzerlik göstermesi gibi. Fakat C104, C105 ve C106 izolatlarının her üçü de Çanakkale'den izole edilmesine rağmen C104 izolatı C105 ve C106 izolatlarına benzerlik göstermemektedir. Çalışma sonuçlarına göre izolatların toplandığı lokasyonların, izolatların birbirlerine benzerlik oranlarıyla ilişkili olmadığı saptanmıştır.

İzolatların genetik akrabalıklarını belirlemek için yapılan çoklu gen bölgesi sekans çalışması MLSA ile farklı lokasyonlardan toplanan izolatların birbirlerine olan genetik yakınlığına bakılmıştır. Kullanılan *gyrB*, *rpoD* (*rpoDs*, *rpoDp*) ve *gltA* housekeeping genlerinin sekans sonuçları ile Neighbor-joining filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Ayrıca elde edilen izolatlar ile NCBI' da kayıtlı olan *P. syringae* izolatları kıyaslanarak izolatlar arası genetik yakınlık belirlenmiştir. MLSA sonuçlarına göre kirazdan elde edilen *P. s. pv. syringae* izolatları, *P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. atrafaciens* ve *P. avellanae* izolatları ile yakınlık göstermişlerdir. Kaluzna (2019) kızılıktan elde ettiği *P. s. pv. syringae* izolatların *P. avellanae* izolatı ile yakınlık gösterdiğini tespit etmiştir. ERIC- REP ve BOX- PCR çalışmalarımızda da belirlediğimiz gibi lokasyon farklılığının genetik yakınlık üzerine etkisi olmadığı MLSA çalışmalarımız ile desteklenmiştir. Çanakkale C106 ve Tekirdağ 110 izolatları birbirine yakınlık göstermesine rağmen C110 izolatı Tekirdağ' dan izole edilen C101 ve C107 izolatlarına yakınlık göstermemektedir. C104 Çanakkale ve C108 İstanbul izolatları birbirine yakınlık gösterirken, C104 izolatı ile Çanakkale C106 izolatı ile aynı lokasyondan olmasına rağmen birbirlerine yakınlık göstermemektedir. Bu sonuçlar aynı konukçudan elde edilen farklı lokasyona ait *P. s. pv. syringae* izolatlarının genetik yakınlığının lokasyon ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir.

İzolatlar arası genetik farklılık, moleküler varyans analizi (AMOVA) ile %96 oranında belirlenmiştir. Kullanılan housekeeping genler içerisinde *gltA* geninin çalışmamızda kullandığımız kiraz izolatları arasındaki filogenetik akrabalığın belirlenmesinde diğer genlere

göre hassas olduğu belirlenmiştir. Çalışmada farklı lokasyonlardan izole edilen izolatlar arasındaki haplotip çeşitliliğinin olmadığı belirlenmiştir. MLSA çalışmaları sonucunda elde edilen sekans sonuçları GenBankası (NCBI) veri tabanına yüklenerek erişim numaraları alınmıştır.

Moleküler olarak tanısı desteklenen 63 adet *P. s. pv. syringae* izolatı içerisinde her lokasyonu temsil edecek şekilde 12 adet izolat rastgele seçilmiştir. Seçilen izolatların MALDI-TOF ile tanımlanmasıyla izolatlarımızın *P. s. pv. syringae* olduğu desteklenmiştir. Her lokasyonu temsil eden bu izolatların genetik karakterizasyonları ve filogenetik akrabalıklarını belirlemek için ERIC-, REP- ve BOX-PCR ve *gyrB*, *rpoDs*, *rpoDp* ve *gltA* housekeeping genleri kullanılarak MLSA çalışmaları yapılmıştır. Doktora tezinin bu kısmı TÜBİTAK 2214-A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Bursu kapsamında Amerika Tennessee State University, Otis L. Floyd Nursery Research Center, Fitopatoloji laboratuvarında yapılmıştır. ERIC-, REP-, BOX-PCR çalışmalarına göre izolatlar arasındaki benzerliğin izole edildiği lokasyon ile bağlantılı olmadığı belirlenmiştir. MLSA çalışmaları ise ERIC-, REP- BOX-PCR çalışmalarını destekler nitelikte sonuç göstererek lokasyon farklılığının izolatlar arası akrabalıkta etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bunun sebebinin ise izolatların tek bir konukçudan izole edilmiş olması, Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarının iklim, toprak yapısı, kiraz varyetesi bakımından farklılık göstermemesi, kiraz fidanı temininde bölge genelinde tek bir firmadan fidanların satın alınması gibi faktörlerin etkili olabileceği düşünülmektedir.

Dünyada kiraz üretim alanlarında ciddi kayıplara sebep olan hastalık etmeni ile mücadelede, etmenin konukçusu ile olan kompleks ilişkisinden dolayı dayanıklı çeşit geliştirilmesi oldukça zordur (Kennelly vd., 2007). Etmenin mücadelesinde çeşitli gübre kullanımı ve bakırlı preparatlar önerilmektedir (Sayler ve Kirkpatrick, 2003). Marmara Bölgesinde hastalık etmenine karşı kullanılan bakırlı preparatlar *in vitro* ve *in vitro* şartlarda denenerek bakır uygulamasının hastalık üzerine etkisi belirlenmiştir. Ticari dozlarının altında uygulanan bakırlı preparatlarla yapılan petri denemesi ile hem izolatların bakıra hassasiyeti hem de önerilen doz altında preparat kullanımının popülasyon gelişimi üzerine etkisi *in vitro* çalışmalarda belirlenmiştir. Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi uygulanan dozlarda bakteri popülasyonu uygulama yapılmayan petrilere göre %50 oranında bir azalma göstermemiştir. Fakat 200, 300 ve 400 ppm dozlarında koloni miktarında azalma olduğu belirlenmiştir. Arazi denemelerin Aliette, Bestbakır, Göztaşı, Kocide ve Tricopper forte kullanımının hastalık üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Deneme sonucunda Kocide uygulanan



ağaçlarda hastalık şiddetinin %85,72 oranında engellendiği belirlenmiştir. Bazı çalışmalar hastalık etmenine karşı Kocide kullanımının etkili olduğunu bildirirken (Scheck ve Pscheidt, 1998), bazı araştırmacılar ise hastalık etmeni olan *P. s. pv. syringae*'nin bakıra karşı dayanıklılık geliştirdiğini belirlemişlerdir (Cazorla vd., 2002). Arazi denememizin sonucuna göre hastalık şiddeti üzerine Kocide kullanımının etkili olduğu belirlenmiştir. Aktepe ve Aysan (2018), elma bahçelerinde Aliette kullanımının *Erwinia amylovora* gibi hastalık etmenleriyle mücadele etkili sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda kiraz bahçelerinde Aliette kullanımının *P. s. pv. syringae*'nin sebep olduğu hastalık şiddeti üzerine etkili olmadığı tespit edilmiştir. Bunun sebebinin ise Aliette'nin uygulama zamanı ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Çalışmada Aliette tıpkı bakırlı preparatlar gibi patojen inokulasyonu yapıldıktan sonra kullanılmış ve bu sebepten dolayı hastalık şiddeti üzerine etkili bulunmamıştır. Patojen inokulasyonundan önce Aliette uygulaması yapıldığında bitki savunma sistemini aktif hale geçirerek patojen üzerinde etkili olmaktadır. Deneme kurulurken uygulamada yapılan hatadan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hastalık etmeninin bakırlı preparatlara karşı hassasiyetinin belirlenmesine yönelik *in vitro* ve *in vivo* denemeler yapılmıştır. *In vitro* çalışmalarda kullanılan bakırlı preparatların tavsiye edilen dozlar ve altındaki dozlar kullanılarak petri denemesi kurulmuştur. Bunun nedeni ise tavsiye edilen dozların altındaki dozlar kullanıldığında hastalık etmeninin gelişimi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını belirlemektir. Bakırın sıcakkanlılara ve bitkilere olan toksik etkisi göz önünde bulundurulduğunda yüksek oranda kullanılan dozların olumsuz etkileri de artmaktadır. Tavsiye edilen dozun altında kullanılacak bir dozun tespit edilmesi hem kimyasalın yan etkisini azaltacak hem de çiftçiye önerilebilecek yeni bir doz olacağı düşünülmüştür. Çalışma sonucunda 200 ppm, 300 ppm ve 400 ppm doz uygulamalarının bakteri popülasyonunun kontrole göre popülasyonu düşürdüğü fakat bu azalışın %50 oranında olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar istenilen kimyasalların EC ve ED'si belirlenecek çalışmaların yapılması yerinde olacaktır.

Çalışmanın diğer bir kısmında ise, Kocide, Bestbakır, Göztaş, Aliette ve Tricopper forte ticari isimli kimyasal preparat uygulamalarının hastalık şiddeti üzerine olan etkileri arazi şartlarında belirlenmiştir. Bu amaçla kullanılan kimyasalların önerilen dozları ile deneme kurulmuştur. Çalışma sonucunda Aliette uygulamasının hastalık şiddeti üzerinde etkili olmadığı, Kocide uygulamasının ise hastalık şiddetini %85,72 oranında engellediği görülmüştür. Genel olarak bakteriyel hastalıklar ile mücadelede Göztaş dışında ruhsatlı spesifik bir bakterisit yoktur. Ancak bakırlı preparatların bakteriyel hastalık etmenlerinin

kontrolünde kullanılabilceği önerilmektedir. Son yıllarda yapılan bazı alışmalar *P. syringae* türlerinin bakırlı preparatlara karşı dayanıklılık kazandığını tespit etmiştir. Yaptığımız alışma sonucunda bakır hidroksit (Kocide) uygulamasının kirazda bakteriyel kansere neden olan *P. s. pv. syringae* ile mücadelede kullanılabilceği belirlenmiştir.

Tez alışması kapsamında elde edilen tüm sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarında bakteriyel dal kanserine neden olan hastalık etmeni hakkında ortaya konulan sonuç ve öneriler aşağıda özetlenmiştir.

-Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarına yapılan surveyler sonucunda bakteriyel dal kanseri hastalık belirtisi gösteren ağaçlardan alınan örneklerden elde edilen izolatlar ile tanı çalışması yapılmıştır. Tanı çalışmalarında klasik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerden yararlanılmıştır. Elde edilen izolatlar *P. s. pv. syringae* olarak tanılanmıştır. 2016-2018 yılları arasında yapılan survey çalışmalarına göre Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarında bakteriyel dal kanserine *P. s. pv. syringae*'nin sebep olduğu belirlenmiştir.

- Farklı lokasyonlardan toplanan *P. s. pv. syringae* izolatları arasındaki genetik karakterizasyonu ve filogenetik akrabalığını belirlemek için belirlemek için ERIC-, REP- BOX-PCR ve MLSA alışmaları yapılmıştır. Yapılan alışmalar sonucunda farklı lokasyonlardaki kiraz üretim alanlarından izole edilen *P. s. pv. syringae* izolatları arasında lokasyonun önemli olmadığı görülmüştür. Çalışma sonucunda oluşturulan dendogramlarda aynı lokasyonlardan toplanan izolatların farklı gruplarda yer aldığı belirlenmiştir. Bunun sebebinin Marmara Bölgesi kiraz üretim alanlarına fidan temin etmek için aynı firmanın kullanılması olduğu düşünülmektedir.

- *P. s. pv. syringae* hastalık etmeni ile mücadele çalışmaları *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılmıştır. Hastalık etmeninin ekonomik kayıpları sebep olduğu kiraz bitkisi ülkemiz için önemli bir gelir kaynağıdır. Bu çalışmada bakırlı preparatlar ve Aliette, Manep ve Mancozeb gibi preparatlar arazi ve laboratuvar koşullarında denenerek etkili dozları belirlenmiştir. Petri alışmaları sonucunda bakteriyel etmenin popülasyon yoğunluğu zerine Bakırhidroksit'in diğer bakırlı preparatlara göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer yandan Manep ve Mancozeb preparatlarının 10 ppm gibi düşük bir dozda bakteri popülasyonunu yarı yarıya azalttığı 25 ppm dozda ise petri kabındaki bakteri gelişimini engellediği belirlenmiştir. Petri alışmaları, ileride Manep ve Mancozeb' in arazi denemelerindeki başarısı üzerine etkisini belirlemek için arazi denemelerinin kurulmasına n çalışma niteliğinde altyapı oluşturmuştur.

Arazi denemeleri sonucunda patojen inokulasyonundan sonra uygulanan Aliette'nin, kiraz bahçelerinde *P. s. pv. syringae*'nin sebep olduğu hastalık şiddeti üzerine etkisinin olmadığı ve Aliette kullanımının patojen inokulasyonundan önce yapılması gerektiği belirlenmiştir.

Arazi çalışmaları sonucunda Kocide kullanımının hastalık şiddetini diğer kullanılan kimyasallara göre azalttığı belirlenmiştir. Çalışma sonucuna göre kiraz bahçelerinde Kocide kullanımının *P. s. pv. syringae* ile mücadelede etkili sonuç verdiği belirlenmiştir. Genelde hastalık ile mücadelede önerilen Göztaş ile istatistiksel olarak aynı grupta olmasına rağmen sayısal olarak daha iyi sonuç veren Kocide kullanımı, göztaşının bitkinin vejetatif döneminde fitotoksositeye neden olmasından dolayı alternatif olarak önerilebileceği bu sonuçlarla ortaya konmuştur.

-Çalışma kapsamında 200, 300 ve 400 ppm doz uygulamaları popülasyonu düşürdüğü belirlenmiş olmasına rağmen etkili bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda bakırlı preparatların üst dozlarının kullanıldığı bir çalışma ile popülasyona etkili dozun belirleneceği ve çiftçilere önerilmesi gerekmektedir.

-Hastalığın ortaya çıkmasında ayrıca koşulların önemli kriterlerden biri olmasından dolayı ileride bu hastalık üzerine erken uyarı sistemi çalışmalarının yapılması uygun olacaktır. Hastalığın gelişmesi için özellikle kışın belirli bir süre -2, -3 °C gibi sıcaklıkların oluşması gerekmektedir. Çalışmanın yapıldığı dönemlerde çevre koşulları Ek2'de de görüldüğü gibi hastalığın gelişmesi için uygundur.

## 6. KAYNAKLAR

- Abbasi, V., Rahminian, H., Ghanbari, M. A. T. (2012). Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* causing bacterial canker disease on stone fruits. *Eur J Plant Pathol*, 135: 225-235.
- Albelleira, A., Ares, A., Augin, O., Picoaga, A., Lopez, M. M., Mansilla, P. (2014). Current situation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae* on kiwifruit in Galicia (northwest Spain). *Plant Pathology*, 691-699.
- Agrios, G. N. (2005). Bacterial cankers. *Plant Pathology*, 667-671.
- Aktan, Z. C. ve Soylu, S. (2020). Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarında endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. *KSU Tarım ve Doğa Der.*, 23:641-654.
- Benlioğlu, K., Benlioğlu, S. (1998). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı bakır dayanıklılığı üzerinde çalışmalar. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 21-25 Eylül, Ankara.
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. ve Geider, K. (1992). Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:3522-3526.
- Bradbury, J. F. (1986). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. In guide to plant pathogenic bacteria, *CAB International Mycological Institute*, 175-177.
- Bui Thi Ngoç, L., Verniere, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chirolcu, F., Gagnevin, L. ve Pruvost, O. (2010). Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:515-525.
- Bultreys, A. ve Kaluzna, M. (2010). Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, 92(1): 21-33.
- Burak, M. (2003). *Meyvecilik-1*, 147-151.
- Cazorla, F. M., Arrebalo, E., Sesma, A., Perez-Garcia, A., Codina, J. C., Murillo, J. ve Vicente, A. (2002). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. *Phytopathology* 92:909-916.
- Chapman, J. R., Taylor, R. R. K., Weir, B. S., Romberg, M. K., Vanneste, J., Luck, J. ve Alexander, B. J. R. (2012). Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*. *Phytopathology* 102, 11: 1034-1044.

- Chandler, W. A. ve Daniell, J. W. (1976). Relation of pruning time and inoculation with *Pseudomonas syringae* van Hall to short life of peach trees growing on old peach land. *HortScience* 11:103-104.
- Crosse, J. E. (1956). Bacterial canker of stone fruits. II. Leaf scar infection of cherry. *Ann. Appl. Biol.* 47: 306-317.
- Crosse, J. E. (1957). Bacterial canker on stone fruits. III. Inoculum concentration and time of inoculation in relation to leaf scar infection of cherry. *Ann. Appl. Biol.*, 45: 19-35.
- Crosse, J. E. (1966). Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 14: 291-310.
- Çetinkaya-Yıldız, R. (2007). Domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.)' nin tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rhizobakteriler ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- De Boer, S. H. ve Ward, L. J. (1995). PCR detection of *Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, 85:854-858.
- Ertimurtaş, D. ve Özaktan, H. (2014). Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel kansere neden olan *Pseudomonas syringae* pathovarlarının tanısı. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, Antalya.
- Farhadfar, S., Keshavarzi, M., Bouzari, N., Monghadam, L. ve Soleimani, A. (2016). Susceptibility of cherries to bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) in field and laboratory. *International Journal of Agriculture and Forestry* 6:20-7.
- FAO (2018). [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org). Dünya kiraz üretimi. 29\11\2018.
- Freigoun, S. O. ve Crosse, J. E., (1975). Host relation and distribution of a physiological and pathological variant of *Pseudomonas morsprunorum*. *Annals of Applied Biology* 81: 317-330.
- Feil, E. J. ve Spratt, B. G. (2001) Recombination and the population biology of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 561–590.
- Gardan, L., Shafik, H. L. ve Grimont, P. A. D. (1997). DNA relatedness among pathovars of *P. syringae* and related bacteria. In *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. eds Rudolph K, Burr T J, Mansfield J W, Stead D, Vivian A, von Kietzell J (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands), 445–448.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F. ve Grimont, P. A. D. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 469-478

- Gasic, K., Prokic, A., Ivanovic, M., Kuzmanovic, N. ve Obradovic, A. (2012). Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pestic. Phytomed*, 27(3): 201-229.
- Gavrilovic, V., Zivkovic, S., Dolovac, N., Trkulja, N., Dolovac, E. P., Popovic, T. ve Ivanovic D. (2012). *Pseudomonas syringae*-pathogen of sweet cherry in Serbia. *Pestic. Phytomed*, 27(2): 141-149
- Gerçekçioğlu, R., Bilginer, Ş. ve Soylu, A. (2006). Genel meyvecilik (Meyve yetiştiriciliği esasları kitabı).
- Giovanardi, D., Ferrante, P., Scortichini, M. ve Stefani, E. (2016). Characterisation of *Pseudomonas syringae* isolates from apricot orchards in north-eastern Italy. *Eur J Pathol*.
- Gilbert, V., Legros, F., Maraite, H. ve Bultreys, A. (2009). Genetic analysis of *Pseudomonas syringae* from Belgian fruit orchards reveal genetic variability and isolate-host relationships within the pathovar syringae, and help identify both races of the pathovar morsprunorum. *Eur J Plant Pathol*, 124: 199-218.
- Gillis, M., Vandamme, P., Vos, P.D., Swings, J. ve Kersters, K. (2005). Polyplastic taxonomy. P.43-48: In: Bremer DJ. Krieg NR and Staley JT (eds.) Bergert's Manual of Systemic bacteriology, 2nd ed. Vol 2 part A. Springer, New York, NY.
- Gonzalez, C. F., Ackerley, D. F., Park, C. H. ve Matin, A. (2003). A soluble flavoprotein contributes to chromate reduction and tolerance by *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnol.*, 2(3): 233239.
- Görmez, A. (2011). Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit reksiyonları. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hall, S. T., Dry, I. B., Blanchard, C. L. ve Whitelaw-Weckert, M. A. (2016). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bacterial inflorescence rpt in grapevine. *Plant. Dis.* 100:607-616.
- Hall, S. T., Dry, I. B., Gopurenko, D. ve Whitelaw-Weckert, M. A. (2018). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cool climate Australian grapevine vineyards: new phylogroup PG02f associated with bacterial inflorescence rot. *Plant Pathology* 68,2.
- Hattingh, M. J., Roos, I. M. M. ve Mansvelt, E. L. (1989). Infection and systemic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. *Plant Dis.* 73:784-789.
- Hwang, M. S. H., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W. ve Guttman, D. S. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol* 71:5182-5191.

- Hirano, S. S. ve Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- A pathogen, ice nucleus and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:624-653.
- Horuz, S. (2014). Karpuzda bakteriyel meyve lekesi hastalığı etmeni *Acidovorax citrulli*'nin tanısı, moleküler karakterizasyonu ve bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadelesi. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Hulin, M. T., Mansfield, J. W., Brain, P., Xu, X., Jackson, R. W. ve Harrison, R. J. (2018). Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathology* 67: 1177-1193.
- Ilić, R., Balaž, J. ve Jošić, D. (2014): Characterization of two *Pseudomonas syringae* pathovars (*syringae* and *morsprunorum*) from sweet cherry by RAPD. Book of abstract, V Congress of the genetic society, Kladovo, Serbia, September 28th – October 2nd, Ed. Vasiljevic B., S. Mladenovic Drinic. Publisher: Serbian Genetic Society, Belgrade. p. 218.
- Ilić, R., Balaz, J., Stojsin, V. ve Josic, D. (2016). Characterization of *Pseudomonas syringae* pathovars from different sweet cherry cultivars by RAPD analysis. *Genetika*, 48 (1):285-295.
- Ivanovic, Z., Zivkovic, S., Starovic, M., Josic, D., Stankovic, S. ve Gavrilovic, V. (2009). Diversity among *Pseudomonas syringae* strains originating from fruit trees in Serbia. ..., 61(4): 863-870.
- Ivanovic, Z., Stankovic, S., Zivkovic, S., Gavrilovic, V., Kojic, M. ve Fira, D. (2012). Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* isolates from fruit trees and raspberry in Serbia. *Eur J Plant Pathol*, 134: 191-203
- Jones, A. (1971). Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Dis. Rep.* 55:961-965.
- Kaluzna, M., Ferrante, P., Sobiczewski, P. ve Scortichini, M. (2010). Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology*, 92(3): 781-787.
- Kaluzna, M., Janse, J. D. ve Young, J. M. (2012). Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts *Pseudomonas syringae* pathovars. *J Plant Pathol* 94: 117-126.
- Kaluzna, M. (2019). Characterization and phylogeny of the novel taxon of *Pseudomonas* spp., closely related to *Pseudomonas avellanae* as causal agent of a bacterial leaf blight of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* as a new bacterial pathogen of red dogwood (*Cornus sanguinea* L.). *Journal of Plant Pathology* 101:251-261.

- Kennelly, M. M., Cazorla, F. M., Vicente, A., Ramos, C. ve Sundin, G. W. (2007). *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees progress toward understanding and control. *Plant Disease*, 91,1.
- Klement, Z. ve Goodman, R. N. (1967). The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 17-44.
- King, E. O., Ward, M. K. ve Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescens. *Journal of laboratory and clinical medicine*, 44, 301-307.
- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, London, 170-173.
- Lattore, B. A. ve Jones, A. L. (1979). *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology*, 69: 335-339.
- Lee, Y. S., Koh, H. S., Sohn, S. H., Koh, Y. J. ve Jung, J. S. (2012). Genetic diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* isolates from *Prunus mume* in Korea and Japan by comparative sequence analysis of 16S rRNA gene. *Plant Pathology Journal*, 28, 295-98.
- Lelliott, R. A. ve Stead, D. E. (1987). *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Lelliott, R. A., Billing, E. ve Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29: 470-489.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. ve DeBruijn, F.J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol* 60:2286-2295.
- Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P. ve Salzberg, S. L. (2017). Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Comput. Sci.* 3:e104 10.7717/peerj-cs.104.
- Marcelletti, S. ve Scortichini, M. (2014). Definition of plant-pathogenic *Pseudomonas* genomospecies of the *Pseudomonas syringae* complex through multiple comparative approaches. *Phytopathology* 104(102):1274-1282.
- Martin-Sanz, A., Perez de la Vega, M., Murillo, J. ve Caminero, C. (2013). Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from pea are phylogenetically and pathogenically diverse. *Phytopathology*, 103,7.
- Menard, M., Sutra, L., Luisetti, J., Prunier, J. P. ve Gardan, L. (2003). *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv. nov) the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. *European Journal of Plant Pathology*, 109:565-576.



- Mirik, M., Baloglu, S., Aysan, Y., Cetinkaya-Yildiz, R., Kusek, M. ve Sahin, F. (2005). First outbreak and occurrence of citrus blast disease, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, on orange and mandarin trees in Turkey. *Plant Pathol.* 54:238.
- Mirik, M., Aysan, Y. ve Cinar, O. (2007). Copper resistant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* Dye in the eastern mediterranean region of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89(1), 153-154.
- Mirik, M., Oksel, C. ve Bulbul, M. (2015). Prevalence, isolation and identification of bacterial canker pathogens on sweet cherry trees in Tekirdağ. II. International Workshop on Bacterial Diseases of Stone Fruits and Nuts 1149:43-46.
- Moragrega, G., Llorente, I., Manceau, C. ve Montesinos, E. (2003). Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology* 109, 319-26.
- Morris, C. E., Glaux, C., Latour, X., Gardan, L., Samson, R. ve Pitrat, M. (2000). The relationship of host range, physiology and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemic in France. *Phytopathology* 90:636-646.
- Mullet, M., Lalucat, J. ve Garcia-Valdes, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12.15:1513-1530.
- Najafi Pour Haghghi, G. ve Taghavi, S. M. (2014.) Discrimination of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates from different hosts in Iran using pathogenicity tests and RAPD. *International Journal of Agricultural Sciences*, 4 (1): 16–27.
- Newberry, E. A., Jardini, T. M., Rubio, I., Roberts, P. D., Babu, B., Koike, S. T., Bouzar, H., Goss, E. M., Jones, J. B., Bull, C. T. ve Parct, M. L. (2016). Angular leaf spot of cucurbit is associated with genetically diverse *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Dis.* 100:1397-1404.
- Norman, D. J., Yuen, J. M. F., Resendiz, R ve Boswell, J. (2003). Characterization of *Erwinia* populations from nursery retention ponds and lakes infected ornamental plants in Florida, *Plant Disease* 87:193-196.
- O'Brien, H. E., Thakur, S. ve Guttman D. S. (2011). Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*; A genomics perspective. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:269-89.
- Olson, B. D., Jones, A. L. (1985). Reduction of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* in Montmorency sor cherry with copper and Dynamics of the copper residus. *Phytopathology* 73:1520-1525.

- Otta, J. D. ve English, W. H. (1970). Epidemiology of the bacterial canker Disease of French prune. *Plant Dis. Rep.* 54:332-336.
- Parkinson, N. ve Elphinstone, J. (2010). Species and infra-species phylogenetic discrimination of pseudomonad and xanthomonad pathogens of stone fruit and nuts. *Journal of Plant Pathology*, 91,1:15-19.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J. ve Elphinstone, J. (2011). Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus, *Plant Pathology* 60, 338-44.
- Penyalver, R., Garcia, A., Ferrer, A., Bertolini, E, Quesda, J. M., Carbonelli, E. A., del Rio, C., Caballero, J. M. ve Lopez, M. M. (2006). Factor affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive culture susceptibility. *Phytopathology* 96:313-319.
- Rajwar, A. ve Sahgal, M. (2016). Phylogenetic relationships of fluorescent pseudomonads deduced from sequence analysis of 16S Rna, Pseudomonas-specific and *rpoD* genes. *3 Biotech*, 6, 80.
- Rozas, J. ve Rozas, R. (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.
- Sarkar, S. F. ve Guttman, D. S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999-2012.
- Sands, D. C. (1990). Physiological criteria-determinative tests. *Methods in phyto bacteriology*, 133-143.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p.
- Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I. ve Saitou, N. (1999). Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *Journal of Molecular Evolution* 49:627-644.
- Sayler, R. J. ve Kirkpatrick, B. C. (2003). The effect of copper sprays and fertilization on bacterial canker in French prune. *Can. J. Plant Pathol.* 25:406-410.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. ve Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN., USA.
- Shahryari, F., Rabiei, Z. ve Somayeh, S. (2020). Antibacterial activity of synthesized silver nanoparticles by sumac aqueous extract and silver-chitosan nanocomposite against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Plant Pathology*.

- Scheck, H. J. ve Pscheidt, J. W. (1998). Effect of copper bactericides on copper-resistant and sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Dis.* 82:397-406.
- Schneider, S., Roessli, D. ve Excoffier, L. (2000). Arlequin: a software for population genetics data analysis, 2.0 ed. Genetics and Biometry Lab. Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Scortichini, M. ve Ligouri, R. (2003). Integrated management of bacterial decline of hazelnut, by using Bion as an activator of systemic acquired resistance (SAR). *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
- Sen, Y., Aysan, Y., Mirik, M., Ozdemir, D., Meijer-Dekens, F., Visser R. G. F. Ve Heusden S. (2018). Genetic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Turkey.
- Sobiczewski, P. ve Jones, A. L. (1992). Effect of exposure to freezing temperatures on necrosis in sweet cherry shoots inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* or *P. s. morsprunorum*. *Plant Dis.*, 76: 447-451.
- Spotts, R. A., Wallis, K. M., Serdani, M. ve Azarenko, A. N. (2010). Bacterial canker of sweet cherry in Oregon-infection of horticultural and natural wounds and resistance of cultivar and rootstock combination. *Plant Disease* 93: 345-350.
- Stead, D. E., Simkins, S. A., Weller, S. A., Hennessy, J., Aspin, A., Stanford, H., Smith, N. C., ve Elphinstone, J. G. (2003). Classification and identification of plant pathogenic *Pseudomonas* species by REP-PCR derived genetic fingerprints. *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Kluwer Academic Publisher.
- Stone, A. ve Baker, B. (2010). Organic management of late blight of potato and tomato with copper products. (<https://eorganic.org/node/573>).
- Sundin, G. W., Olson, B. D. ve Jones, A. L. (1988). Overwintering and population Dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on sweet and sour cherry trees. *Can. J. Plant Pathol.*, 10: 281-288.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipki, A. ve Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:27, 252-729.
- Versalovic, J., Koeyth, T. ve Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19,6823-6831.
- Vicente, J. ve Roberts, S. (2007). Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 117:383-392.

- Vigoruroux, A. (1989). Ingress and spread of *Pseudomonas* in stems of peach and apricot promoted by frost-related water-soaking of tissues. *Plant Dis.* 73:854-855.
- Weaver, D. J. (1978). Interaction of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. *Phytopathology* 68:1460-1463.
- Weingart, H. ve Völksch, B. (1997). Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC- REP and IS50-PCR. *Journal of Phytopathology* 15:339-345.
- Whitesides, S. K. ve Spotts, R. A. (1991). Induction of pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathol.* 40:118-127.
- Wormald, H. (1932). Bacterial diseases of stone fruit trees in Britain. IV. The organism causing bacterial canker of plum trees. *Transactions of the British Mycological Society* 17, 157-69.
- Young, J. M. (1987). New plant Disease record in New Zealand: *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* from nectarine, peach and Japanese plum. *New Zealand Journal of Agricultural Research.* 30:2, 235-247.
- Young, J. M., Takikawa, Y., Gardan, L. ve Stead, D. E. (1992). Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 30: 67-105.
- Young, J. M., Saddler, G. S., Takikawa, Y., DeBoer, S. H., Vaunterin, L., Gardan, L., Gvozdyak R. I ve Stead, D. E. (1996). Name of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Review of Plant Pathology*, 75, 721-763.
- Young, J. M. (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92(1): 514.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Amasya’ da doğdu. Amasya ilinde, ilköğrenimini Atatürk İlköğretim okulu’nda, lise eğitimini Amasya Süper Lisesi’nde tamamladı. 2007 yılında başladığı lisans eğitimini 2011 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma programında tamamladı. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Prof. Dr. Mustafa MİRİK danışmanlığında başladığı yüksek lisans eğitimini 2014 yılında tamamladı ve aynı yıl doktora eğitimine başladı. Kasım 2013’ de Araştırma Görevlisi olarak atandığı Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’ndaki görevine halen devam etmektedir.

## 8. EKLER

Ek1. Bakırlı preparatlar, Manep ve Mancozeb'in farklı lokasyonlardan elde edilen *P. s. pv. syringae* izolatlarının popülasyonu üzerine etkisi

Sıra no	İzolot adı	Bakıroksiklorür Uygulanan Dozlar (ppm)							
		10	25	50	100	200	300	400	Kontrol
1	TK1	174.0±4.51 cl	179.3±3.18a	171.3±3.48ab	167.6±a2.85	167.3±1.45a	168.0±2.52a	167.33±2.73b	174.3±3.48al
2	TK2	177.0±2.00 ak	179.3±2.33a	172.6±3.71a	167.3±ac2.19	135.0±3.21a	169.3±3.76a	122.0±2.00b	165.3±3.28aı
3	TK3	169.0±3.21 dn	164.0±3.21em	164.6±2.85ah	166.0±ad1.73	164.0±1.73ac	157.0±1.73ac	155.6±2.03b	165.3±5.17gl
4	TK4	170.3±1.45 dl	168.0±1.53al	163.6±1.76ah	162.0±1.53ag	151.0±1.53ae	143.3±2.40bd	133.3±2.60b	182.6±2.03el
5	TK5	172.0±1.73 cl	170.3±1.45aj	170.3±2.60ac	169.0±a1.53	163.6±2.40ad	160.6±2.33ab	150.3±0.88b	171.3±2.19al
6	TK6	169.6 dm	168.3±1.20al	162.0±1.73aı	157.3±2.73am	145.6±4.70fn	145.6±3.48cı	137.6±1.45b	168.0±2.08el
7	TK7	178.6±0.88 aı	173.6±2.60a	166.3±1.76ah	167.0±ac2.08	149.3±2.96ek	145.0±3.61cı	143.3±2.96b	179.3±2.33al
8	TK8	162.6±1.33 jn	160.0±0.67ım	157.3±1.45ek	153.5±2.03en	149.0±1.53ek	146.3±3.18ch	140.3±0.88b	163.0±2.89ıl
9	TK10	170.0±0.58dm	164.0±2.65el	157.0±3.79ek	152.6±2.60eo	145.0±2.65go	134.6±2.60hn	132.0±1.53b	175.6±1.76al
10	TK13	182.6±1.45 af	174.6±2.96af	165.3±2.03ah	158.0±1.73al	148.6±0.88el	142.0±153dk	134.6±2.60b	186.0±2.08ag
11	TK13	153.3 ±2.85 n	151.3±2.03n	146±2.08jl	140.6±0.67oq	140.3±1.45jp	135.3±2.03gn	131.67±1.67b	161.0±1.53kl
12	TK17	171.6±1.20 dl	168.6±0.88al	161.3±0.88aı	153.3±2.03en	146.3±1.20ek	140.0±1.73dl	132.33±1.45b	174.3±0.88al
13	TK18	181.6±2.73 af	171.0±1.15aj	168.0±1.53af	159.0±2.31ak	149.6±1.76ek	137.0±2.08em	135.0±3.79b	183.6±2.73aı
14	TK19	170.3±1.20 dl	167.6±1.45al	162.6±1.45aı	157.6±1.45am	149.0±3.21ek	139.0±1.00el	132.0±1.73b	176.0±1.53al
15	TK20	174.6±2.60 bl	171.0±1.00aj	164.3±2.33ah	158.6±2.60ak	154.6±3.28bh	149.3±1.20be	128.6±2.03b	175.0±3.79al
16	TK21	182.3±1.76 af	171.0±1.53aj	164.0±2.08ah	151.3±2.03go	139.0±2.08ko	140.33±0.88dl	133.6±2.40b	180.6±4.48ak
17	TK24	161.3±1.45 kn	157.3±2.19ln	149.3±1.20il	140.0±1.15pq	132.6±1.45op	124.6±2.60mn	123.3±2.03b	161.6±2.96jl
18	TK25	179.3±1.20 ah	173.0±2.31ag	168.6±1.86af	156.6±3.28bm	146.6±1.86fm	141.0±3.79dl	129.0±2.08b	174.3±2.91al
19	TK27	183.8±2.03 ae	174.6±2.60af	165.3±1.45ah	153.3±2.03en	149.0±1.73ek	129.3±1.76kn	123.6±1.45b	182.6±3.48aj

20	TK28	154.3±2.96mn	157.6±1.76ln	144.0±2.65kl	140.6±1.20pq	135.0±3.21mo	129.6±3.76jn	122.0±2.00b	165.3±3.28gl
21	TK29	168.3±2.73 en	161.0±1.53hn	155.6±2.67el	146.3±2.33lq	136.0±3.06lp	122.3±1.86n	113.0±4.16b	173.7±2.96al
22	TK30	181.3±1.83 ag	178.0±1.73ab	172.3±4.81a	164.6±2.60ac	155.6±3.38dg	143±1.15d <sub>i</sub>	131.6±5.46b	185.0±1.15ah
23	TK31	181.3±3.93 ag	171.0±2.08aj	160.0±1.15a <sub>i</sub>	144.0±2.65	133.6±3.18np	128.3±5.90ln	123.6±3.18b	187.0±3.61af
24	TK33	182.6±1.45 af	170.0±2.89ak	168.3±2.03af	162.0±1.73ag	154.6±2.91bh	141.0±1.15dl	129.0±3.21b	182.0±1.71ak
25	TK34	191.0±1.53 a	177.3±2.19ac	164.6±2.91ah	161.3±0.88ah	149.3±3.48ek	147.0±3.79ch	138.0±2.08b	192.3±1.76a
26	TK36	168.6±1.86 en	163.6±2.33em	153.0±2.08hl	149.6±2.19ho	141.6±0.88jp	140.3±0.88dl	129.3±2.33b	169.3±4.48dl
27	TK37	171.3±0.88 dl	164.6±1.45dl	154.0±2.65gl	145.6±2.33mq	141.3±1.86jp	141.0±1.00dl	133.0±2.31b	165.6±5.93fl
28	TK38	168.0±2.52 en	162.3±1.45gn	158.3±2.40bj	153.6±2.73en	149.0±0.58ek	147.6±2.40bh	136.6±1.76b	170.3±1.45bl
29	TK40	175.0 ±2.89bl	169.6±1.20ak	160.6±5.61a <sub>i</sub>	158±2.65al	154.6±2.33bh	150.0±1.15be	136.33±2.73dk	174.0±2.65al
30	TK41	168.6±2.03 en	163.6±1.20em	156.3±1.45el	150.6±2.33go	147.3±2.19fm	144.3±2.91c <sub>i</sub>	139.3±1.76b	169.6±1.20cl
31	TK42	190.0±2.89 ab	179.0±1.15a	169.3±2.91ad	163.3±2.60ef	156.0±2.08bg	148.6±0.88bf	140.0±1.73b	190.6±2.73ad
32	TK44	180.0±2.08 ah	170.0±2.08ak	165.0±2.65ah	155.3±2.91cn	149.3±0.88ek	140.0±2.31dl	128.6±1.86b	178.3±6.12al
33	BaK2	171.3±1.86 dl	164.3±2.33dl	162.3±1.76a <sub>i</sub>	153.6±2.03en	147.3±1.45fm	142.6±1.75dj	129.3±2.60b	176.0±1.73al
34	BaK3	167.0±1.54 fn	158.33±2.60kn	155.3±2.03el	146.3±2.03lq	139.6±1.45jp	135.6±2.33fm	125.0±3.21b	163.3±3.76il
35	BaK4	172.0±2.65 cl	167.0±1.53bl	162.6±1.45a <sub>i</sub>	153.3±2.03en	147.3±1.45fm	142.3±1.76dk	130.3±2.60b	173.0±2.65al
36	BaK7	159.6±0.88 ln	152.3±1.76mn	143.3±2.60l	136.0±2.65q	131.6±1.20p	128.0±1.53ln	121.6±2.03b	159.0±2.31l
37	BaK8	170.6±1.76 dl	166.0±1.53cl	157.0±1.73ek	147.0±2.08kq	147.0±2.52fm	140.0±1.15dl	130.0±2.31b	173.0±2.08al
38	BuK1	175.3±3.48 al	168.3±2.73al	161.6±1.20a <sub>i</sub>	153.3±2.60en	144.3±2.96gp	135.6±2.03fm	125.6±2.96b	177.0±2.52al
39	BuK2	180.6±4.06 ag	171.6±2.73aj	168.6±2.03af	159.6±1.45aj	150.6±1.20ek	143.3±2.03d <sub>i</sub>	138.0±1.53b	187.0±2.31af
40	BuK3	180.3±2.03ah	172.6±1.45ah	164.6±2.60ah	157.3±2.53am	151.0±1.53dk	143.3±2.40d <sub>i</sub>	133.3±2.60b	182.6±2.03aj
41	BuK6	169.6±1.53 aj	169.6±1.45ak	159.6±1.45a <sub>i</sub>	150.6±1.20go	145.6±2.03fn	139.0±2.08el	130.0±2.08b	179.0±2.31al
42	BuK7	178.3±7.86 a <sub>i</sub>	163.0±2.08fm	157.3±2.19ek	150.6±1.76go	144.0±2.65gp	138.0±1.53el	131.0±2.08b	176.6±9.39al

43	BuK8	163.6±3.18 in	160.3±0.88jn	154.3±1.45gl	147.6±1.45jq	144.6±1.20go	137.0±1.73em	127.6±1.86b	169.0±2.89el
44	BuK9	165.6±3.21 gn	169.6±0.88ak	164.6±1.20ah	158.3±1.20al	146.6±2.03fm	142.6±2.40dj	130.0±1.15b	182.3±4.81ak
45	BuK10	184.6±2.91ad	176.0±2.08ad	163.3±2.33ah	156.3±2.03bm	146.6±2.03fm	138.3±1.20el	128.3±2.73b	187.0±5.13af
46	ÇK1	173.6±2.33 cl	172.3±2.03ah	162.3±2.03a1	159.6±0.88aj	155.0±3.06bh	141.6±1.76dk	127.6±1.86b	179.0±2.31al
47	ÇK2	179.3±4.70 a1	171.6±3.53 aj	163.6±2.91ah	154.0±3.06dn	154.3±2.91c1	140.0±1.15dl	126.6±3.48b	173.0±8.89al
48	ÇK4	178.6±4.10 a1	173.0±2.08ag	166.6±1.86ag	160.6±1.20a1	152.0±1.73cj	146.0±2.31ch	135.6±2.96b	179.0±5.51al
49	ÇK5	165.6±6.17 gn	160.6±1.76in	155.6±1.86el	148.6±0.88io	143.6±2.03gp	132.6±3.53in	121.6±2.73b	171.6±4.81al
50	ÇK6	164.6±2.60 hn	161.0±1.00hn	159.6±1.20a1	153.0±2.31en	148.3±3.53el	138.3±2.19el	126.0±2.08b	164.3±3.18hl
51	ÇK7	170.6±1.76 dl	166.3±1.33bl	162.6±2.60a1	158.0±1.53al	151.6±1.86ck	150.0±0.58be	143.0±2.31b	172.3±2.40al
52	ÇK8	187.8±1.45ac	175.3±0.88ad	169.0±2.65ae	160.0±0.58a1	151.0±1.15dk	142.6±2.03dj	134.6±3.18b	186.6±3.93ag
53	ÇK9	168.0±2.52 en	165.0±2.08el	160.3±0.88a1	153.0±1.73en	150.0±0.58ek	143.6±2.33d1	133.3±3.84b	173.0±7.21al
54	ÇK10	172.0±1.53 cl	170.3±3.18aj	162.3±1.45a1	154.6±2.60dn	143.0±1.15hp	140.3±1.45dl	123.3±2.85b	178.0±3.21al
55	ÇK11	180.0±1.15 ah	168.3±1.76al	158.0±1.53bj	150.6±1.76go	141.6±0.88	138.3±1.20el	128.6±4.81b	184.0±2.65ah
56	ÇK12	170.3±0.33 dl	168.3±1.45al	160.6±1.20a1	154.6±1.45dn	147.0±2.08fm	136.0±2.31fm	122.3±1.45b	182.6±5.36aj
57	ÇK13	172.3±1.45 cl	165.3±1.45dl	157.6±1.45cj	150.3±2.19ho	141.0±1.73jp	137.3±1.45em	126.0±2.52b	184.0±3.21a1
58	KK1	182.3±3.48 af	166.6±2.03bl	161.3±1.86a1	152.3±1.45go	150.0±1.73ek	145.0±2.08c1	132.6±3.84b	191.0±1.00ac
59	KK2	180.6±2.33 ag	173.6±2.03ag	167.3±1.76ag	160.0±0.58a1	152.3±1.45cj	148.0±1.53bg	135.6±3.18b	182.0±2.52ak
60	KK3	182.3±2.85 af	170±2.31ag	164.6±2.33ah	157.3±2.19am	152.0±1.53cj	148.6±2.03bf	137.0±1.73b	191.6±1.76ab
61	KK4	177.3±1.45 aj	170.3±0.88aj	162.6±1.45a1	157.6±1.45am	151.0±1.00ek	144.0±2.08c1	137.0±2.65b	183.3±2.03a1
62	İsK1	173.6±2.33 cl	166.6±2.03bl	161.6±1.20a1	158.0±2.31al	149.3±1.20ek	145.3±2.03c1	136.0±2.31b	179.3±5.49al
63	İsK2	183.0±2.53 ae	174.0±2.31ag	166.3±1.76ah	160.0±0.58a1	158.0±2.08af	147.3±1.76	136.6±2.40b	189.3±0.33ae



Sıra no	İzolot adı	Bakırhidroksit Uygulanan Dozlar (ppm)							
		10	25	50	100	200	300	400	Kontrol
1	TK1	171.33±4.98bl	176.67±1.76a	171.00±3.21ab	166.67±3.28ab	165.67±1.76ab	165.00±2.52a	163.33±1.67a	174.3±3.48al
2	TK2	175.00±1.73ak	175.00±2.65a	171.00±3.79a	166.67±1.45ac	164.67±0.88a	160.67±1.20ab	156.67±1.76ab	165.3±3.28ar
3	TK3	169.00±3.21dn	164.33±2.96em	162.00±2.52ah	159.33±1.20ad	160.00±0.58ac	150.33±2.03be	145.67±2.03be	165.3±5.17gl
4	TK4	170.67±1.20dl	169.33±1.45al	165.33±1.20ah	162.00±1.53ag	159.00±0.58ae	153.00±2.08bd	150.33±2.03bc	182.6±2.03el
5	TK5	172.00±1.73cl	169.33±0.67aj	169.67±0.67ac	167.67±1.20a	163.33±2.33ad	155.67±2.96ac	148.33±1.86bd	171.3±2.19al
6	TK6	168.67±0.88dm	167.00±1.00al	162.00±1.73ar	157.00±2.65am	146.00±4.00fk	145.33±3.53c1	138.00±1.15de	168.0±2.08el
7	TK7	178.33±0.33ar	173,66ag	163.67±0.67ah	162.00±1.00ac	148.33±2.40ej	145.00±3.00c1	136.00±2.08el	179.3±2.33al
8	TK8	160.00±1.15jn	159.33±0.33in	156.67±0.88ck	153.33±2.03en	148.00±1.15ej	146.00±2.08ch	137.33±3.28di	163.0±2.89il
9	TK10	171.00±1.53dm	164.00±3.06dl	158.00±2.65ck	151.33±2.03fo	144.33±2.19fk	134.00±1.53lr	131.33±1.86fo	175.6±1.76al
10	TK13	179.67±4.37af	171.67±2.19af	164.67±1.45ah	161.00±1.73al	151.67±2.67dh	142.33±2.40dl	136.67±2.33dj	186.0±2.08ag
11	TK13	153.33±2.85n	151.33±2.03n	146.00±2.08jl	140.67±0.67oq	140.33±2.03hl	135.33±2.03hr	131.67±1.67fn	161.0±1.53kl
12	TK17	171.67±1.20dl	168.67±0.88al	161.33±0.88ar	152.67±1.45en	148.67±0.88dj	139.33±2.73fo	129.67±1.45fo	174.3±0.88al
13	TK18	181.00±3.06af	170.67±1.45aj	166.33±1.33af	159.00±2.31ak	148.67±2.60dj	136.67±1.86hp	131.67±1.45fn	183.6±2.73ar
14	TK19	172.33±1.20dl	167,66al	161.67±0.88br	157.33±1.20am	148.00±3.21ej	138.67±0.88fp	131.33±1.20fo	176.0±1.53al
15	TK20	175.67±1.76bl	169.33±0.67aj	161.67±0.88ah	157.00±1.73ak	151.33±0.88dh	144.00±1.73dl	128.67±2.03fo	175.0±3.79al
16	TK21	177.67±3.38af	169.67±0.67aj	163.67±1.45ah	152.00±2.65gp	138.00±1.53jl	138.67±0.88fp	127.00±1.15ho	180.6±4.48ak
17	TK24	161.67±1.20kn	156.33±1.76ln	149.33±1.20il	140.00±1.15oq	131.33±0.88l	124.67±1.45rs	121.67±0.88mq	161.6±2.96jl
18	TK25	177.33±0.88ar	170.67±1.20ag	167.00±1.15af	156.67±2.73bm	145.67±1.86fk	137.67±1.45hp	127.67±3.48ip	174.3±2.91al
19	TK27	183.33±2.03ae	174.67±2.60af	165.33±1.45ah	153.33±2.03en	148.00±1.00ej	129.33±1.76ns	123.67±1.45mq	182.6±3.48aj
20	TK28	159.00±3.06mn	156.33±1.86kn	143.33±2.03kl	139.67±1.76pq	135.00±3.21kl	129.00±3.21os	120.67±0.67nq	165.3±3.28gl
21	TK29	168.67±0.88en	160.67±0.88hn	155.67±1.76fl	143.00±2.0lq	135.00±2.52kl	121.33±0.88s	111.67±3.76q	173.7±2.96al
22	TK30	180.33±0.88ag	172.33±1.45ab	165.67±1.76a	161.33±0.88ae	153.67±2.96be	142.33±0.88dl	128.33±4.06fo	185.0±1.15ah
23	TK31	180.00±2.65ag	169.67±1.43aj	159.33±0.67ar	142.67±2.73nq	130.33±1.86l	125.00±2.65qs	120.00±0.58nq	187.0±3.61af

24	TK33	177.67±2.33af	170.00±1.73ak	162.33±2.85af	159.33±1.20ag	152.33±1.20cf	139.33±0.88fo	126.67±2.03hp	182.0±1.71ak
25	TK34	188.33±0.88a	175.33±2.19ac	165.33±2.33ag	160.00±0.58ah	149.67±3.18di	143.67±2.33dl	137.00±1.53di	192.3±1.76a
26	TK36	171.67±3.76en	162.67±2.19em	154.67±2.19hl	149.00±1.53hq	140.67±0.67jl	140.00±0.58en	128.33±2.03fo	169.3±4.48dl
27	TK37	170.33±0.88dl	164.67±1.45dl	154.00±2.65gl	145.67±2.33mq	141.33±1.86jl	140.00±0.00en	133.00±2.31fm	165.6±5.93fl
28	TK38	170.00±1.73en	162.33±0.88fn	157.67±1.20bj	154.00±2.52en	148.67±0.88dj	145.67±2.33ci	136.33±1.45dk	170.3±1.45bl
29	TK40	174.67±2.33bl	168.67±1.20ak	159.67±4.10ai	156.33±2.03al	154.66±1.15dh	149.00±0.58cf	136.33±2.73dk	174.0±2.65al
30	TK41	168.67±2.03en	163.67±1.20em	156.33±1.45dl	150.67±2.33gp	147.33±2.19fj	143.33±2.19dl	139.33±1.76cg	169.6±1.20cl
31	TK42	189.33±1.76ab	177.67±0.88a	168.00±2.08ad	160.33±1.76af	153.67±2.73bf	148.67±0.88cg	140.00±1.73cf	190.6±2.73ad
32	TK44	178.67±2.19ah	168.00±2.31ak	164.00±2.65ah	154.33±2.60cn	146.00±1.53ej	138.00±1.15gp	128.00±1.53fo	178.3±6.12al
33	BaK2	172.00±1.53dl	164.33±2.03dl	160.33±1.45ai	152.00±1.53en	146.00±2.08fk	142.00±2.08el	124.67±1.20jp	176.0±1.73al
34	BaK3	165.00±2.52gn	156.33±2.33kn	154.00±2.08fl	146.00±1.73lq	139.33±1.45il	134.33±2.40kr	119.67±2.33nq	163.3±3.76il
35	BaK4	172.00±2.65cl	167.00±1.53bl	162.67±1.45ai	153.33±2.03en	147.33±1.45fj	142.33±1.76dl	130.33±2.60fo	173.0±2.65al
36	BaK7	159.67±0.88ln	152.33±1.76nm	143.33±2.60l	136.00±2.65q	131.67±1.20l	128.00±1.53ps	121.67±2.03mq	159.0±2.31l
37	BaK8	170.67±1.76dl	166.00±1.53cl	157.00±1.73ck	147.00±2.08jq	147.00±2.52fj	140.00±1.15en	130.00±2.31fo	173.0±2.08al
38	BuK1	175.00±2.89al	168.33±1.20al	160.00±0.58ai	153.67±0.58en	144.00±2.65fk	134.67±1.45jr	124.33±2.33kp	177.0±2.52al
39	BuK2	179.33±3.48agag	171.00±2.52ah	167.00±2.08af	158.67±1.45aj	150.00±1.15dj	143.00±1.15dl	137.00±1.15di	187.0±2.31af
40	BuK3	179.33±2.03ah	171.67±1.20ah	164.33±2.03ah	156.00±2.08am	149.00±0.58dk	143.00±2.08dl	131.67±1.33fn	182.6±2.03aj
41	BuK6	177.67±0.88aj	169.00±1.15ak	159.00±1.53ai	149.67±0.67gb	145.00±1.15fk	138.33±1.76fp	127.67±1.86go	179.0±2.31al
42	BuK7	179.00±4.58aj	163.67±1.45fn	157.00±1.53ck	149.00±0.58gp	144.00±1.53fk	137.67±1.33hp	127.67±1.45go	176.6±9.39al
43	BuK8	164.33±2.96in	158.67±1.33jn	153.67±1.45gl	147.00±1.53jq	143.33±0.88fk	135.00±1.53ir	126.33±2.19hp	169.0±2.89el
44	BuK9	177.33±1.76ai	168.67±0.67ak	160.33±1.76ah	154.33±2.19al	144.67±1.20fk	138.00±1.15gp	126.67±3.53hp	182.3±4.81ak
45	BuK10	183.33±2.03ad	172.00±1.53ad	156.67±1.45bh	150.33±0.33bm	143.67±2.03fk	135.00±2.65ir	124.67±3.28lp	187.0±5.13af
46	ÇK1	173.00±1.53dl	171.00±1.53ah	161.00±1.53ai	159.00±0.58aj	153.67±2.40bf	140.67±0.88em	126.67±1.45hp	179.0±2.31al
47	ÇK2	177.67±3.93ai	169.33±0.88ah	160.67±1.20bh	152.00±1.15dn	150.67±1.20di	139.00±0.58fo	124.00±1.53lp	173.0±8.89al
48	ÇK4	177.33±2.19ai	170.00±0.58ag	164.33±0.88ag	158.67±0.88ai	149.33±2.03dj	143.67±1.20dl	129.00±1.00fo	179.0±5.51al

49	ÇK5	161.33±3.76gm	159.67±1.20m	154.33±1.45el	147.67±0.67ip	139.33±2.19il	131.00±2.52ms	118.33±0.88pq	171.6±4.81al
50	ÇK6	163.67±1.76hn	159.00±0.58hn	156.67±2.03ar	150.33±0.88en	146.33±2.40fk	137.67±1.86hp	121.67±0.88mq	164.3±3.18hl
51	ÇK7	169.00±1.53dl	164.67±1.20bl	160.33±2.03ar	157.00±1.15al	148.33±3.18ej	140.33±0.33em	126.33±1.76hp	172.3±2.40al
52	ÇK8	182.67±1.45ac	170.33±0.88ae	167.33±1.20ad	155.67±2.40ar	147.67±2.40ej	138.33±1.20fp	130.33±0.88fo	186.6±3.93ag
53	ÇK9	166.67±2.40en	164.00±2.08el	158.67±0.88ar	148.67±1.33en	148.00±1.00ej	141.67±0.88em	127.00±1.53hp	173.0±7.21al
54	ÇK10	171.33±0.88cl	166.67±1.20aj	161.00±1.00ar	154.33±2.33dn	141.33±0.88jl	140.00±1.53en	120.00±0.58nq	178.0±3.21al
55	ÇK11	178.67±0.88ah	164.33±1.76al	154.00±2.08bj	148.00±0.58gp	141.33±1.20jl	136.00±1.73hp	125.33±1.76ip	184.0±2.65ah
56	ÇK12	172.33±1.20dl	167.67±0.88al	158.00±1.53ar	151.33±2.33dn	146.00±1.73fk	135.67±2.03hq	122.33±1.45mq	182.6±5.36aj
57	ÇK13	170.67±1.20ck	163.67±0.88dl	160.67±4.26cj	147.47±1.20gp	139.67±0.88il	137.00±1.15hp	119.33±2.73oq	184.0±3.21ar
58	KK1	179.67±2.03af	163.33±2.03bl	158.00±1.53ar	149.00±2.08fo	143.33±2.03fk	143.33±2.03dl	126.00±2.65hp	191.0±1.00ac
59	KK2	179.00±0.58ag	171.00±1.00ag	165.67±1.20ag	158.67±0.88ar	151.33±1.20dh	146.00±1.53ch	125.67±2.60ip	182.0±2.52ak
60	KK3	179.33±2.40af	169.00±1.00ag	161.00±1.53ah	151.67±0.88am	149.67±1.45di	144.67±1.45dl	125.33±2.73ip	191.6±1.76ab
61	KK4	173.33±2.03aj	164.00±1.15aj	156.00±2.08bi	149.33±0.67am	146.33±3.18fk	141.33±1.86em	130.33±1.20fo	183.3±2.03ar
62	İsK1	169.33±0.67dl	163.00±1.73bl	155.00±4.51ar	156.67±3.53al	145.33±2.73fk	138.67±2.03fp	126.00±2.31hp	179.3±5.49al
63	İsK2	177.67±1.45ae	167.67±1.86ag	159.67±1.76ah	150.00±0.58ar	144.67±1.45fk	137.33±1.76hp	126.67±2.40hp	189.3±0.33ae

Sıra no	İzolot adı	Bakırsülfat Uygulanan Dozlar (ppm)							
		10	25	50	100	200	300	400	Kontrol
1	TK1	166.67±2.40is	166.67±4.06al	164.33±2.19ac	161.33±0.88ac	159.00±2.31a	159.67±1.67a	149.00±2.31a	174.3±3.48al
2	TK2	172.33±1.45bp	168.33±1.20ak	163.67±1.76ad	157.67±1.86ag	151.33±0.88ag	146.33±3.18be	136.67±1.76ad	165.3±3.28ar
3	TK3	168.00±1.53gs	160.00±0.58hq	157.33±1.45ar	158.33±0.67af	156.00±2.08ac	146.67±1.45bd	135.67±2.03af	165.3±5.17gl
4	TK4	162.67±1.45ot	163.67±0.88ao	161.67±0.88af	155.33±1.86al	149.00±0.58cj	145.33±3.28bf	137.00±4.04ac	182.6±2.03el
5	TK5	170.67±1.20cq	163.00±1.53bo	163.67±1.76ad	166.00±1.76a	158.67±0.88ab	151.00±3.21ab	141.67±4.84ab	171.3±2.19al

6	TK6	165.00±2.52lt	162.00±3.06bo	155.33±2.03ai	152.00±3.06bo	147.33±1.45ck	139.67±1.45bj	129.67±2.03bj	168.0±2.08el
7	TK7	178.33±0.33aj	170.67±1.76af	163.67±0.67ad	162.00±1.00ab	148.33±2.40cj	145.00±3.00bg	131.67±4.33bh	179.3±2.33al
8	TK8	158.33±2.03rt	156.00±1.53mq	153.33±2.73ck	146.67±2.03it	144.33±2.73dn	139.33±1.45bj	127.33±2.73bj	163.0±2.89il
9	TK10	168.00±1.53gs	160.33±0.88fp	154.67±1.20aj	144.67±2.03mt	137.67±1.20lp	130.67±2.60hm	126.33±3.18bj	175.6±1.76al
10	TK13	176.33±3.53am	168.33±1.20ak	158.67±0.88ah	154.33±2.03al	148.33±0.67cj	139.00±5.29bj	125.33±3.18cj	186.0±2.08ag
11	TK13	153.33±2.85t	151.33±2.03pq	146.00±2.08ik	140.67±0.67ru	140.33±1.45io	135.33±2.03dl	131.67±1.67bh	161.0±1.53kl
12	TK17	168.00±1.53gs	162.00±2.52bo	153.67±1.76bk	145.00±2.89lt	140.33±0.33io	136.67±1.45cl	126.33±3.48bj	174.3±0.88al
13	TK18	177.67±0.67ak	168.00±1.15ak	161.67±1.20af	155.67±1.76ak	142.00±1.53gn	132.00±1.00hm	125.00±2.08cj	183.6±2.73ai
14	TK19	165.00±1.53lt	161.00±1.00ep	157.67±2.40ai	149.00±0.58ds	140.33±2.03io	134.33±2.19dl	124.67±2.19cj	176.0±1.53al
15	TK20	172.67±1.45ap	164.00±2.31ao	159.33±1.20ag	153.67±2.03bn	149.33±0.88bi	141.67±1.20bi	125.33±2.03cj	175.0±3.79al
16	TK21	171.67±2.19bp	160.00±0.58gq	160.33±2.33ag	148.33±0.88es	137.33±1.45mq	133.67±2.03fl	123.67±2.40ck	180.6±4.48ak
17	TK24	159.00±0.58qt	151.33±1.20pq	148.67±0.88gk	136.67±3.53ut	129.33±1.20oq	118.00±2.08n	114.00±1.53jk	161.6±2.96jl
18	TK25	173.00±1.73ap	165.33±1.86an	157.33±1.45ai	152.00±1.73bp	144.00±2.08en	127.67±1.45jn	121.33±0.88ck	174.3±2.91al
19	TK27	177.00±2.08al	168.33±1.67ak	162.00±2.08af	150.00±1.73dr	148.00±1.00ck	125.33±2.40kn	117.00±3.79hk	182.6±3.48aj
20	TK28	158.67±2.96qt	154.33±2.33oq	142.67±1.45k	139.33±1.45su	131.67±1.20oq	125.67±2.19kn	114.00±3.06jk	165.3±3.28gl
21	TK29	158.67±2.96qt	154.33±2.33ip	142.67±1.45dk	139.33±1.45ru	131.67±1.20oq	125.67±2.19mn	114.00±3.06k	173.7±2.96al
22	TK30	180.33±0.88af	172.33±1.45ac	165.67±1.76a	161.33±0.88ac	153.67±2.96ad	142.33±0.88bh	128.33±4.06bj	185.0±1.15ah
23	TK31	178.00±1.15ak	169.67±1.45ah	157.33±1.76ai	141.33±1.45ru	128.00±0.58q	124.33±2.03ln	116.33±3.18hk	187.0±3.61af
24	TK33	177.67±2.33ak	170.00±1.73ag	162.33±2.85af	159.33±1.20ad	152.33±1.20ae	139.33±0.88bj	126.67±2.03bj	182.0±1.71ak
25	TK34	183.00±1.53ab	173.67±1.76a	164.33±1.76ac	156.67±3.38ai	149.00±2.65cj	142.67±1.45bh	130.33±1.86bi	192.3±1.76a
26	TK36	169.67±1.45es	161.67±1.76dp	152.33±1.45dk	145.33±1.76kt	139.67±0.33jo	138.67±0.80bj	121.67±2.03ck	169.3±4.48dl
27	TK37	167.67±1.76hs	161.67±0.88dp	147.33±1.20hk	143.67±2.73nt	139.67±0.33jo	133.67±2.73fl	123.00±3.46ck	165.6±5.93fl
28	TK38	164.33±2.96mt	161.67±1.45dp	154.33±2.19ak	150.00±0.58dr	146.67±1.45cm	142.33±4.33bi	131.00±1.53bi	170.3±1.45bl
29	TK40	174.67±2.33ao	168.67±1.20aj	159.67±4.10af	156.33±2.03aj	151.66±0.67af	149.00±0.58ac	136.33±2.73ae	174.0±2.65al
30	TK41	166.00±1.53ks	158.00±1.53kq	153.33±1.76ck	147.00±1.15ht	140.67±1.20io	136.67±1.20cl	129.33±1.76bj	169.6±1.20cl

31	TK42	181.67±3.84ae	164.33±2.73ao	163.33±2.85ae	155.00±1.15bl	147.00±2.52cl	145.33±2.73bf	133.33±2.03ag	190.6±2.73ad
32	TK44	172.00±3.21cp	166.67±1.76al	160.67±1.20af	151.00±1.53cr	144.67±1.86	134.67±2.40dl	121.33±4.26ck	178.3±6.12al
33	BaK2	172.00±1.53bp	164.33±2.03ao	160.33±1.45ag	152.00±1.53bp	146.00±2.08dn	138.67±1.45bj	121.33±4.26ck	176.0±1.73al
34	BaK3	162.67±1.45ot	155.33±2.73nq	150.67±2.33fk	142.67±2.03ru	137.00±1.73nq	131.00±1.15hm	116.33±1.45hk	163.3±3.76il
35	BaK4	168.67±0.88fs	159.67±2.03hq	156.33±3.18ai	150.00±1.73dr	144.00±2.08en	140.67±1.20bi	120.33±2.60fk	173.0±2.65al
36	BaK7	157.67±2.40st	149.67±0.33q	143.33±2.60jk	132.67±2.19u	131.67±1.20oq	128.00±1.53jn	120.00±2.00fk	159.0±2.31l
37	BaK8	166.00±1.15ks	159.33±3.18hq	153.67±2.03ck	145.67±1.76kt	143.67±0.88en	133.33±2.40fl	123.33±1.76ck	173.0±2.08al
38	BuK1	174.33±2.33ap	165.00±2.65an	156.67±2.85ai	153.33±2.33bn	140.67±1.20io	134.67±1.45dl	121.00±2.08dk	177.0±2.52al
39	BuK2	176.00±2.08am	167.67±0.88al	158.33±4.18ah	152.00±2.08bp	146.67±2.40cm	138.67±0.88bj	123.67±2.40ck	187.0±2.31af
40	BuK3	173.00±1.73ap	167.33±1.76al	161.00±1.73af	155.33±2.03bl	149.00±0.58cj	141.67±0.88bi	127.00±3.06bj	182.6±2.03aj
41	BuK6	173.67±1.86ap	167.67±1.76al	158.33±1.45ah	148.00±1.53fs	142.67±1.45fn	135.00±2.31dl	124.00±2.31ck	179.0±2.31al
42	BuK7	174.67±1.45ap	162.33±0.88bo	154.00±2.31ak	145.67±2.85kt	142.33±0.33fn	132.67±1.86gl	124.33±2.33cj	176.6±9.39al
43	BuK8	163.33±2.40nt	158.33±1.20jq	151.67±1.20ek	146.00±1.15kt	141.67±0.88hn	135.00±1.53dl	125.00±1.73cj	169.0±2.89el
44	BuK9	180.00±1.15ag	168.67±1.76aj	159.33±1.20ag	153.00±1.73bo	145.33±1.86dn	138.33±1.45bj	127.67±2.60bj	182.3±4.81ak
45	BuK10	184.67±3.53a	172.67±1.86ab	158.67±0.88ah	151.33±0.88cq	146.67±1.45cm	135.00±2.65dl	126.00±2.52bj	187.0±5.13af
46	ÇK1	175.33±1.45an	172.00±1.73ad	161.67±1.20af	158.67±0.88ae	151.33±1.86ag	138.67±1.45bj	123.33±2.33ck	179.0±2.31al
47	ÇK2	177.67±3.93ak	169.33±0.88ah	160.67±1.20af	152.00±1.15bp	150.67±1.20ah	139.00±0.58bj	124.00±1.53ck	173.0±8.89al
48	ÇK4	178.67±2.03ai	169.00±1.53ai	161.33±0.88af	158.00±0.58ag	148.33±1.20cj	142.67±2.03bh	128.67±0.88bj	179.0±5.51al
49	ÇK5	167.33±3.48hs	162.33±2.60bo	153.67±2.03ck	146.33±1.76ht	140.00±0.58io	130.00±2.31in	115.33±2.60ik	171.6±4.81al
50	ÇK6	162.33±1.20pt	155.67±2.85nq	151.33±1.20fk	143.67±1.86nt	138.67±1.86kp	134.33±2.60dl	120.33±0.88fk	164.3±3.18hl
51	ÇK7	167.67±1.45hs	162.23±1.20bo	159.67±1.45ag	154.33±2.19bm	145.00±1.53dn	139.00±1.53bj	123.00±3.46ck	172.3±2.40al
52	ÇK8	179.33±1.20ah	169.00±0.58ai	162.33±1.76af	151.33±1.45cq	144.33±2.40dn	136.00±1.73dl	127.00±3.61bj	186.6±3.93ag
53	ÇK9	164.33±2.33mt	157.33±2.19lq	148.67±0.88gk	142.00±2.00ru	140.33±1.33io	134.33±2.96dl	122.33±1.45ck	173.0±7.21al
54	ÇK10	167.67±1.45hs	158.00±1.53kq	154.33±2.96ak	147.67±1.45gs	140.67±1.45io	134.00±2.65el	116.67±3.38hk	178.0±3.21al
55	ÇK11	174.67±1.20ao	166.33±2.73am	158.00±1.53ah	147.00±1.00ht	138.67±0.88kp	133.33±1.45fl	120.67±2.60ek	184.0±2.65ah

56	ÇK12	175.67±1.20am	168.00±1.15ak	158.67±0.88ah	152.00±1.73bo	144.67±0.88dn	135.33±2.03dl	123.33±0.88ck	182.6±5.36aj
57	ÇK13	170.67±1.20cq	163.67±0.88ao	160.67±4.26af	147.67±1.20gs	139.67±0.88jo	137.00±1.15ck	119.33±2.73gk	184.0±3.21ai
58	KK1	182.67±1.45ac	164.67±1.86ao	159.67±0.33ag	150.00±1.15dr	144.67±1.20dn	143.00±2.31bh	125.33±2.19cj	191.0±1.00ac
59	KK2	179.33±2.03ah	171.00±1.15ae	164.67±0.88ab	157.00±1.15ah	148.00±2.65ck	139.67±1.76bj	122.00±1.53ck	182.0±2.52ak
60	KK3	182.00±2.65ad	169.00±0.58ai	159.67±0.33ag	150.67±0.67dr	148.67±0.88cj	143.00±2.08bh	118.67±0.88ad	191.6±1.76ab
61	KK4	175.33±2.91an	164.33±1.45ao	155.67±1.76ai	147.67±1.45gs	144.00±2.65en	140.00±2.65bj	120.33±4.63fk	183.3±2.03ai
62	İsK1	170.33±0.33dr	164.00±1.00ao	156.00±4.04ai	154.00±2.31bm	142.00±2.52gn	136.00±2.08dl	122.67±1.76ck	179.3±5.49al
63	İsK2	178.33±1.33aj	168.67±0.88aj	158.67±0.88ah	150.33±0.88dr	144.00±1.00en	136.67±1.45cl	123.67±1.67ck	189.3±0.33ae

Sıra no	İzolot adı	Kalsiyumhidroksit bakır sülfat Uygulanan Dozlar (ppm)							
		10	25	50	100	200	300	400	Kontrol
1	TK1	168.33±3.28fl	172.67±3.53af	167.67±1.20ad	162.00±1.53ac	162.00±1.00a	158.00±1.53a	154.67±2.60a	174.3±3.48al
2	TK2	174.33±2.33bg	170.33±0.88ag	164.33±2.33ai	161.00±1.53ae	158.00±2.52ae	155.33±2.73ab	151.33±2.40ab	165.3±3.28ai
3	TK3	169.00±2.08el	165.33±2.91ck	161.00±1.53aj	159.67±0.88ah	159.67±0.33ad	151.00±1.53ad	141.33±1.20af	165.3±5.17gl
4	TK4	168.00±1.53gl	168.67±0.88ci	163.67±1.76aj	158.00±2.65ai	155.67±2.85af	148.67±0.88af	145.33±2.73ac	182.6±2.03el
5	TK5	172.00±1.73dl	169.33±0.67cj	169.67±1.20ad	167.67±1.20a	163.33±2.33ab	155.67±2.96ac	148.33±1.86ac	171.3±2.19al
6	TK6	168.67±0.88dl	167.00±1.00ck	162.00±1.73aj	157.00±2.65cj	146.00±4.00fl	145.33±3.53cm	138.00±1.15cl	168.0±2.08el
7	TK7	180.33±0.80af	173.33±1.76ae	164.67±0.88ah	161.67±0.88ac	150.00±1.73cl	144.33±3.88bk	132.67±2.33do	179.3±2.33al
8	TK8	162.00±1.15il	159.00±1.00jn	155.33±0.88gl	151.00±1.00dk	147.00±0.58el	144.00±1.53ck	138.67±2.03ck	163.0±2.89il
9	TK10	171.67±1.67bj	165.00±2.08dk	157.00±1.73fl	150.67±2.19ek	141.00±2.65jn	132.00±1.53mq	124.67±2.60jp	175.6±1.76al
10	TK13	182.00±3.21ad	173.00±1.73ae	164.00±1.00ai	160.00±0.58ag	149.33±0.33cl	141.33±1.45cm	133.33±2.96cn	186.0±2.08ag
11	TK13	158.67±2.03kl	155.33±1.45ln	147.67±1.45lm	142.00±1.15kn	139.33±0.67ln	132.00±1.73mq	128.33±1.67dp	161.0±1.53kl
12	TK17	171.00±1.53bj	167.33±1.45cj	159.67±0.88aj	151.00±1.00dk	145.33±2.73fl	138.00±2.08fn	125.33±2.73hp	174.3±0.88al

13	TK18	179.67±2.91ag	170.00±1.73ag	163.67±0.88aj	157.33±1.20ai	147.67±1.86el	133.33±3.18ko	121.67±4.33mp	183.6±2.73ai
14	TK19	171.33±1.76bj	162.67±1.45gm	160.00±1.15aj	155.67±1.45cj	148.00±1.00el	137.67±1.20fn	128.33±1.20dp	176.0±1.53al
15	TK20	173.33±2.03bj	168.67±0.33ci	161.33±0.67aj	157.00±2.08ai	151.00±1.00ak	142.33±0.88cm	126.67±2.73fo	175.0±3.79al
16	TK21	181.00±2.08ae	170.00±0.58ag	164.67±0.67ah	153.00±2.65bj	141.33±1.33in	137.33±1.45gn	125.00±3.06ip	180.6±4.48ak
17	TK24	161.33±1.33jl	155.00±1.15mn	149.00±1.00km	140.00±1.53ln	130.67±0.67n	121.33±3.48q	118.33±3.28op	161.6±2.96jl
18	TK25	173.67±1.86b1	170.00±1.53ag	163.33±1.67aj	155.67±3.48cj	144.33±1.45gl	136.33±0.88ho	125.00±2.89ip	174.3±2.91al
19	TK27	179.67±0.33ag	172.33±1.45af	165.33±0.88af	155.00±1.15bj	148.33±0.67el	132.67±1.76lo	125.00±2.65op	182.6±3.48aj
20	TK28	158.67±2.96kl	154.33±2.33mn	142.47±1.45m	139.33±1.45mn	131.67±1.20mn	125.67±2.19oq	114.00±3.06q	165.3±3.28gl
21	TK29	169.67±0.33el	165.33±2.03ck	158.00±1.53dk	150.00±3.51gl	145.00±4.02fl	124.67±4.18pq	119.00±3.21np	173.7±2.96al
22	TK30	179.00±2.08ag	174.00±0.58ac	167.00±2.00ae	161.33±0.88ad	154.33±2.33ag	145.67±3.28b1	125.67±2.40gp	185.0±1.15ah
23	TK31	182.00±2.52ad	169.00±2.08bh	160.00±1.15aj	149.33±0.88hm	140.33±1.86kn	131.67±1.20mq	120.00±1.53mp	187.0±3.61af
24	TK33	177.67±2.33ag	170.00±1.73ah	162.33±2.85aj	159.22±1.20ai	152.33±1.20ai	139.33±0.88em	126.67±2.03fp	182.0±1.71ak
25	TK34	187.67±1.45a	178.67±1.20a	168.33±1.20ab	162.00±1.53ac	153.67±0.88ah	145.33±1.45bj	139.67±0.33b1	192.3±1.76a
26	TK36	170.67±0.67ck	164.00±1.73fl	157.33±1.45el	151.67±0.88ck	149.33±0.33cl	148.00±1.00af	136.67±6.01cl	169.3±4.48dl
27	TK37	170.33±0.88dl	164.67±1.45ek	154.00±2.65jl	145.67±2.33jn	141.33±1.86in	140.00±0.00dm	137.67±2.91ck	165.6±5.93fl
28	TK38	169.33±2.33el	162.67±1.33gm	158.67±0.88bk	155.33±2.03bj	150.00±0.58cl	149.67±0.33ae	139.67±0.33b1	170.3±1.45bl
29	TK40	175.00±0.58bg	169.67±0.88	163.00±1.53aj	157.67±1.45ai	153.33±0.33ah	149.67±0.33ae	139.33±0.67bj	174.0±2.65al
30	TK41	170.33±1.45dl	164.47±0.88ek	158.33±1.20ck	154.00±2.08bj	149.67±0.33cl	146.67±1.20b1	140.33±0.88ag	169.6±1.20cl
31	TK42	189.33±1.76a	177.67±0.88ab	168.00±2.08ac	160.33±1.76ag	153.67±2.73ah	148.67±0.88ae	140.00±1.73ah	190.6±2.73ad
32	TK44	179.67±2.91ag	169.00±1.53bh	164.67±2.19ah	156.67±1.45b1	152.67±2.03ah	147.33±2.19ah	140.33±0.88ag	178.3±6.12al
33	BaK2	174.00±2.31b1	166.00±1.15ck	161.00±1.00aj	154.67±3.18bj	146.67±2.03fl	142.00±2.08cm	133.33±2.33cn	176.0±1.73al
34	BaK3	164.33±2.33hl	158.33±0.88kn	155.00±1.15kl	149.33±0.33hm	148.00±1.00el	137.67±3.53fn	134.00±2.89cl	163.3±3.76il
35	BaK4	171.00±2.08cj	167.67±1.20cj	163.00±1.15aj	154.67±1.20bj	148.67±0.88dl	148.33±1.20ag	138.00±4.04ck	173.0±2.65al
36	BaK7	158.33±2.19l	152.33±1.76n	143.33±2.60m	136.00±2.65n	131.67±1.20mn	128.00±1.53nq	122.33±1.45lp	159.0±2.31l
37	BaK8	172.67±1.86bj	165.33±0.88ck	159.00±1.00bj	150.33±1.45fl	147.67±2.19el	141.67±1.45cm	133.33±1.76cn	173.0±2.08al

38	BuK1	174.33±2.33bh	169.00±0.58bh	162.67±2.19aj	158.33±0.67ai	150.57±1.20bk	141.33±4.70cm	130.67±2.19do	177.0±2.52al
39	BuK2	179.00±2.08ag	170.67±1.76ag	169.00±0.58a	162.00±2.08ac	150.33±1.45cl	143.67±0.67cl	138.67±0.88ck	187.0±2.31af
40	BuK3	179.00±1.53ag	173.67±2.03ad	167.00±1.53ae	160.a33±0.88ag	151.00±2.08ak	148.33±0.88ag	137.67±2.40ck	182.6±2.03aj
41	BuK6	178.33±1.20ag	169.33±1.20ah	162.33±1.86aj	154.67±2.96bj	149.67±1.76cl	142.67±3.18cl	133.00±2.08do	179.0±2.31al
42	BuK7	180.67±2.96ae	168.33±1.20c1	162.00±3.00aj	154.33±2.33bj	149.33±1.45cl	138.67±0.88en	129.00±2.08do	176.6±9.39al
43	BuK8	165.00±2.89hl	161.00±1.00hn	154.67±0.88kl	149.00±0.58im	142.67±1.45hm	135.67±0.88io	127.00±5.57ep	169.0±2.89el
44	BuK9	177.33±3.84ag	170.33±1.45ag	166.33±1.76ae	160.33±0.88ag	152.00±4.36aj	144.67±2.40bj	133.33±2.40cn	182.3±4.81ak
45	BuK10	181.00±2.08ae	172.67±1.45af	162.00±2.52aj	156.67±3.38b1	149.67±4.84cl	141.67±2.19cm	131.33±0.88do	187.0±5.13af
46	ÇK1	174.33±2.33bh	171.33±1.33af	164.33±2.60ai	160.67±1.20af	155.67±0.67af	145.00±2.31bj	137.67±1.86ck	179.0±2.31al
47	ÇK2	182.00±2.08ad	170.00±0.58ag	165.33±1.86af	156.33±3.18b1	151.33±0.88ak	149.33±0.88ae	141.67±2.67ae	173.0±8.89al
48	ÇK4	177.33±2.19ae	170.00±0.58af	164.33±0.88ag	158.67±0.88af	149.33±2.03ah	143.67±1.20b1	129.00±1.00cl	179.0±5.51al
49	ÇK5	161.33±3.76bh	159.67±1.20bh	154.33±1.45aj	147.67±0.67fl	139.33±2.19jm	131.00±2.52jo	118.33±0.88kp	171.6±4.81al
50	ÇK6	163.67±1.76fl	159.00±0.58in	156.67±1.03el	150.33±0.88gl	146.33±2.40fl	137.67±1.86en	121.67±0.88do	164.3±3.18hl
51	ÇK7	169.00±1.53dl	164.67±1.20ck	160.33±2.03aj	157.00±1.15ai	148.33±3.18aj	140.33±0.33b1	126.33±1.76b1	172.3±2.40al
52	ÇK8	182.67±1.45ab	170.33±0.88af	167.33±1.20ad	155.67±2.40ai	147.67±2.40cl	138.33±1.20bj	130.33±0.88cl	186.6±3.93ag
53	ÇK9	166.67±2.40ck	167.66±2.19cj	158.67±0.88aj	148.67±1.33bj	148.00±1.00cl	141.67±0.88ck	127.00±1.53b1	173.0±7.21al
54	ÇK10	171.33±0.88ag	166.67±1.20ah	161.00±1.00ai	154.33±2.33ag	141.33±0.88ac	140.00±1.53ae	120.00±0.58ck	178.0±3.21al
55	ÇK11	178.67±0.88ag	164.33±1.76ag	154.00±2.08aj	148.00±0.58af	141.33±1.20ak	136.00±1.73ag	125.33±1.76bj	184.0±2.65ah
56	ÇK12	172.33±1.20ag	167.67±0.88ag	158.00±1.53aj	151.33±2.33ai	146.00±173ai	135.67±2.03ag	122.33±1.45ck	182.6±5.36aj
57	ÇK13	170.67±1.20ae	163.67±0.88af	160.67±4.26ac	147.67±1.20ab	139.67±0.88ag	137.00±1.15af	119.33±2.73bj	184.0±3.21ai
58	KK1	179.67±2.03ac	163.33±2.03af	158.00±1.53aj	149.00±2.08bj	143.33±2.03el	143.33±2.03cl	126.00±2.65do	191.0±1.00ac
59	KK2	179.00±0.58ag	171.00±1.00af	165.67±1.20af	158.67±0.88ag	151.33±1.20cl	146.00±1.53ag	125.67±2.60bj	182.0±2.52ak
60	KK3	179.33±2.40ae	169.00±1.00ag	161.00±1.53af	151.67±0.88b1	149.67±1.45ah	144.67±1.45ah	125.33±2.73ad	191.6±1.76ab
61	KK4	173.33±2.03ag	164.00±1.15ah	156.00±2.08aj	149.33±0.67bj	146.33±3.18el	141.33±1.86b1	130.33±1.20cl	183.3±2.03ai
62	İsK1	169.33±0.67bj	163.00±1.73ck	155.00±4.51aj	156.67±3.53ai	145.33±2.73aj	138.67±2.03cm	126.00±2.31do	179.3±5.49al



63	İsK2	177.67±1.45af	167.67±1.86af	159.67±1.76ai	150.00±0.58bj	144.67±1.45fl	137.33±1.76dm	126.67±0.33bh	189.3±0.33ac
----	------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	--------------

Sıra no	İzolat adı	Maneb Kullanılan Dozlar (ppm)			Mancozep Kullanılan Dozlar (ppm)		
		10	25	Kontrol	10	25	Kontrol
1	TK1	78.67±2.33c <sub>1</sub>	0.00	174.33±3.48a <sub>l</sub>	85.00±3.61c <sub>f</sub>	0.00	174.33±3.48a <sub>l</sub>
2	TK2	74.33±2.33g <sub>1</sub>	0.00	183.67±2.73a <sub>1</sub>	97.67±5.36a <sub>e</sub>	0.00	183.67±2.73a <sub>1</sub>
3	TK3	69.00±2.08 <sub>1</sub>	0.00	165.33±5.17g <sub>l</sub>	89.00±2.08a <sub>f</sub>	0.00	165.33±5.17g <sub>l</sub>
4	TK4	71.67±2.19 <sub>h</sub>	0.00	168.00±1.53e <sub>l</sub>	108.00±4.36a	0.00	168.00±1.53e <sub>l</sub>
5	TK5	93.33±2.60d <sub>1</sub>	0.00	171.33±2.19a <sub>l</sub>	93.33±2.60a <sub>f</sub>	0.00	171.33±2.19a <sub>l</sub>
6	TK6	107.00±3.06e <sub>h</sub>	0.00	168.00±2.08e <sub>l</sub>	107.00±3.06a <sub>b</sub>	0.00	168.00±2.08e <sub>l</sub>
7	TK7	80.33±0.88b <sub>1</sub>	0.00	179.33±2.33a <sub>k</sub>	99.00±5.13a <sub>e</sub>	0.00	179.33±2.33a <sub>k</sub>
8	TK8	75.33±3.53e <sub>h</sub>	0.00	163.00±2.89 <sub>l</sub>	105.33±2.40a <sub>c</sub>	0.00	163.00±2.89 <sub>l</sub>
9	TK10	71.67±1.67 <sub>h</sub>	0.00	175.67±1.76a <sub>l</sub>	84.00±4.58d <sub>f</sub>	0.00	175.67±1.76a <sub>l</sub>
10	TK13	82.00±3.21b <sub>1</sub>	0.00	186.00±2.08a <sub>g</sub>	88.67±3.84a <sub>f</sub>	0.00	186.00±2.08a <sub>g</sub>
11	TK13	81.67±5.04b <sub>1</sub>	0.00	161.00±1.53k <sub>l</sub>	95.33±6.89a <sub>f</sub>	0.00	161.00±1.53k <sub>l</sub>
12	TK17	76.33±4.10d <sub>1</sub>	0.00	174.33±0.88a <sub>l</sub>	104.33±5.17a <sub>d</sub>	0.00	174.33±0.88a <sub>l</sub>
13	TK18	79.57±2.91b <sub>1</sub>	0.00	183.67±2.73a <sub>1</sub>	84.00±2.65d <sub>f</sub>	0.00	183.67±2.73a <sub>1</sub>
14	TK19	74.67±2.91 <sub>f</sub>	0.00	176.00±1.53a <sub>l</sub>	88.00±3.46a <sub>f</sub>	0.00	176.00±1.53a <sub>l</sub>
15	TK20	75.33±1.20e <sub>h</sub>	0.00	175.00±3.79a <sub>l</sub>	76.67±3.76e <sub>f</sub>	0.00	175.00±3.79a <sub>l</sub>
16	TK21	81.00±2.08b <sub>1</sub>	0.00	180.67±4.48a <sub>k</sub>	87.67±1.45a <sub>f</sub>	0.00	180.67±4.48a <sub>k</sub>
17	TK24	73.67±1.45g <sub>1</sub>	0.00	161.67±2.96j <sub>l</sub>	90.33±3.76a <sub>f</sub>	0.00	161.67±2.96j <sub>l</sub>
18	TK25	83.67±4.48b <sub>1</sub>	0.00	174.33±2.91a <sub>l</sub>	103.33±4.41a <sub>d</sub>	0.00	174.33±2.91a <sub>l</sub>
19	TK27	82.33±2.85b <sub>1</sub>	0.00	182.67±3.48a <sub>1</sub>	82.00±2.52e <sub>f</sub>	0.00	182.67±3.48a <sub>1</sub>
20	TK28	70.00±2.31d <sub>1</sub>	0.00	165.33±3.28g <sub>l</sub>	97.67±5.36a <sub>f</sub>	0.00	165.33±3.28g <sub>l</sub>
21	TK29	82.33±5.33b <sub>1</sub>	0.00	173.67±2.96a <sub>l</sub>	84.00±4.51d <sub>f</sub>	0.00	173.67±2.96a <sub>l</sub>
22	TK30	79.00±2.08c <sub>1</sub>	0.00	185.00±1.15a <sub>h</sub>	91.00±4.51a <sub>f</sub>	0.00	185.00±1.15a <sub>h</sub>
23	TK31	87.00±4.62a <sub>1</sub>	0.00	187.00±3.61a <sub>f</sub>	99.67±2.67a <sub>e</sub>	0.00	187.00±3.61a <sub>f</sub>
24	TK33	81.67±1.45b <sub>1</sub>	0.00	182.00±1.73a <sub>k</sub>	89.67±4.81a <sub>f</sub>	0.00	182.00±1.73a <sub>k</sub>
25	TK34	87.67±1.45a <sub>1</sub>	0.00	192.33±1.76a	94.67±2.40	0.00	192.33±1.76a
26	TK36	80.67±3.18b <sub>1</sub>	0.00	169.33±4.48d <sub>l</sub>	93.33±4.10a <sub>f</sub>	0.00	169.33±4.48d <sub>l</sub>
27	TK37	85.00±3.56a <sub>1</sub>	0.00	165.67±5.93f <sub>l</sub>	89.67±2.33a <sub>f</sub>	0.00	165.67±5.93f <sub>l</sub>
28	TK38	76.00±2.08e <sub>h</sub>	0.00	170.33±1.45b <sub>l</sub>	89.33±2.33a <sub>f</sub>	0.00	170.33±1.45b <sub>l</sub>
29	TK40	78.67±2.33c <sub>1</sub>	0.00	174.00±2.65a <sub>l</sub>	100.00±2.65a <sub>e</sub>	0.00	174.00±2.65a <sub>l</sub>
30	TK41	92.00±3.06a <sub>h</sub>	0.00	169.67±1.20c <sub>l</sub>	98.67±0.67a <sub>e</sub>	0.00	169.67±1.20c <sub>l</sub>
31	TK42	96.00±5.03a <sub>e</sub>	0.00	190.67±2.73a <sub>d</sub>	99.33±1.76a <sub>e</sub>	0.00	190.67±2.73a <sub>d</sub>

32	TK44	79.67±2.91b <sub>1</sub>	0.00	178.33±6.12a <sub>1</sub>	93.00±4.16a <sub>f</sub>	0.00	178.33±6.12a <sub>1</sub>
33	BaK2	79.33±0.88c <sub>1</sub>	0.00	176.00±1.73a <sub>1</sub>	87.00±5.69b <sub>f</sub>	0.00	176.00±1.73a <sub>1</sub>
34	BaK3	82.67±5.93b <sub>1</sub>	0.00	163.33±3.76i <sub>1</sub>	87.67±5.36b <sub>f</sub>	0.00	163.33±3.76i <sub>1</sub>
35	BaK4	83.00±4.36b <sub>1</sub>	0.00	173.00±2.65a <sub>1</sub>	91.00±2.08a <sub>f</sub>	0.00	173.00±2.65a <sub>1</sub>
36	BaK7	77.00±1.73d <sub>1</sub>	0.00	159.00±2.31i <sub>1</sub>	91.67±1.20a <sub>f</sub>	0.00	159.00±2.31i <sub>1</sub>
37	BaK8	89.33±2.60a <sub>1</sub>	0.00	173.00±2.08a <sub>1</sub>	89.33±2.60a <sub>f</sub>	0.00	173.00±2.08a <sub>1</sub>
38	BuK1	83.67±3.48b <sub>1</sub>	0.00	177.00±2.52a <sub>1</sub>	84.33±3.48d <sub>f</sub>	0.00	177.00±2.52a <sub>1</sub>
39	BuK2	88.00±3.79a <sub>1</sub>	0.00	187.00±2.31a <sub>f</sub>	85.00±1.73c <sub>f</sub>	0.00	187.00±2.31a <sub>f</sub>
40	BuK3	86.33±3.48a <sub>1</sub>	0.00	182.67±2.03a <sub>j</sub>	95.67±3.18a <sub>f</sub>	0.00	182.67±2.03a <sub>j</sub>
41	BuK6	81.33±1.86b <sub>1</sub>	0.00	179.00±2.31a <sub>1</sub>	88.33±4.63a <sub>f</sub>	0.00	179.00±2.31a <sub>1</sub>
42	BuK7	88.33±2.40a <sub>1</sub>	0.00	176.67±9.39a <sub>1</sub>	90.67±2.96a <sub>f</sub>	0.00	174.33±3.48a <sub>1</sub>
43	BuK8	85.33±7.97a <sub>1</sub>	0.00	169.00±2.89e <sub>1</sub>	80.67±3.48e <sub>f</sub>	0.00	183.67±2.73a <sub>1</sub>
44	BuK9	87.33±2.19a <sub>1</sub>	0.00	182.33±4.81a <sub>k</sub>	90.67±4.63a <sub>f</sub>	0.00	165.33±5.17g <sub>1</sub>
45	BuK10	91.00±3.79h <sub>1</sub>	0.00	187.00±5.13a <sub>f</sub>	82.67±1.45d <sub>f</sub>	0.00	168.00±1.53e <sub>1</sub>
46	ÇK1	97.67±5.36a <sub>d</sub>	0.00	179.00±2.31a <sub>1</sub>	86.00±2.08c <sub>f</sub>	0.00	171.33±2.19a <sub>1</sub>
47	ÇK2	88.67±3.48a <sub>1</sub>	0.00	173.00±8.89a <sub>1</sub>	87.33±1.45b <sub>f</sub>	0.00	168.00±2.08e <sub>1</sub>
48	ÇK4	93.67±4.37a <sub>g</sub>	0.00	179.00±5.51a <sub>1</sub>	88.00±1.53a <sub>f</sub>	0.00	179.33±2.33a <sub>k</sub>
49	ÇK5	87.67±1.45a <sub>1</sub>	0.00	171.67±4.81a <sub>1</sub>	91.00±2.08a <sub>f</sub>	0.00	163.00±2.89i <sub>1</sub>
50	ÇK6	99.00±3.06a <sub>c</sub>	0.00	164.33±3.18h <sub>1</sub>	91.67±2.40a <sub>f</sub>	0.00	175.67±1.76a <sub>1</sub>
51	ÇK7	93.33±3.28a <sub>g</sub>	0.00	172.33±2.40a <sub>1</sub>	88.00±2.08a <sub>f</sub>	0.00	186.00±2.08a <sub>g</sub>
52	ÇK8	94.33±5.21a <sub>g</sub>	0.00	186.67±3.93a <sub>f</sub>	90.00±2.89a <sub>f</sub>	0.00	161.00±1.53k <sub>1</sub>
53	ÇK9	93.67±3.76a <sub>g</sub>	0.00	173.00±7.21a <sub>1</sub>	90.67±2.33a <sub>f</sub>	0.00	174.33±0.88a <sub>1</sub>
54	ÇK10	91.33±4.10a <sub>h</sub>	0.00	178.00±3.21a <sub>1</sub>	91.33±1.86a <sub>f</sub>	0.00	183.67±2.73a <sub>1</sub>
55	ÇK11	101.33±2.96a <sub>b</sub>	0.00	184.00±2.65a <sub>h</sub>	92.33±2.91a <sub>f</sub>	0.00	176.00±1.53a <sub>1</sub>
56	ÇK12	85.33±5.04a <sub>1</sub>	0.00	182.67±5.36a <sub>j</sub>	92.00±5.57a <sub>f</sub>	0.00	175.00±3.79a <sub>1</sub>
57	ÇK13	90.67±3.84a <sub>h</sub>	0.00	184.00±3.21a <sub>h</sub>	97.67±1.45a <sub>e</sub>	0.00	180.67±4.48a <sub>k</sub>
58	KK1	106.00±5.69a <sub>1</sub>	0.00	191.00±1.00a <sub>b</sub>	89.33±1.86a <sub>f</sub>	0.00	161.67±2.96j <sub>1</sub>
59	KK2	95.67±1.45a <sub>f</sub>	0.00	182.00±2.52a <sub>k</sub>	91.33±2.40a <sub>f</sub>	0.00	174.33±2.91a <sub>1</sub>
60	KK3	75.00±3.38a <sub>g</sub>	0.00	191.67±1.76a <sub>b</sub>	92.00±2.65a <sub>f</sub>	0.00	182.67±3.48a <sub>1</sub>
61	KK4	91.67±8.19a <sub>h</sub>	0.00	183.33±2.03a <sub>1</sub>	95.67±6.77a <sub>f</sub>	0.00	165.33±3.28g <sub>1</sub>
62	İsK1	94.00±4.16a <sub>g</sub>	0.00	179.33±5.49a <sub>1</sub>	86.33±2.60c <sub>f</sub>	0.00	173.67±2.96a <sub>1</sub>
63	İsK2	83.00±1.73b <sub>1</sub>	0.00	189.33±0.3a <sub>e3</sub>	86.00±3.00c <sub>f</sub>	0.00	185.00±1.15a <sub>h</sub>

Ek2.Tekirdağ iline ait 2018/2019 dönemi iklim verileri

Aylar	Aylık Toplam Yağış (mm)	Sıcaklık °C		
		En düşük	En yüksek	Ortalama
Ekim 2018	48,2	6,7	23,1	16,7
Kasım 2018	48,2	2,2	20,1	12,0
Aralık 2018	88,3	-8	18	8,4
Ocak 2019	63,9	-4,1	13,8	5,6
Şubat 2019	44,8	-3,0	14,8	5,8
Mart 2019	29,0	0,5	20,9	9,3
Nisan 2019	42,9	3,8	25,2	11,6
Mayıs 2019	31,2	8,4	28,0	17,9
Haziran 2019	7,5	15,6	34,2	24,1