



Tarım Bilimleri Dergisi

Tar. Bil. Der.

Dergi web sayfası:
www.agri.ankara.edu.tr/dergi

Journal of Agricultural Sciences

Journal homepage:
www.agri.ankara.edu.tr/journal

Marmara Bölgesinde Zeytin Dal Kanseri Hastalığının Yaygınlığı ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu

Mustafa MIRIK^a, Yesim AYSAN^b

^a Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 59030, Tekirdağ, TÜRKİYE

^b Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 01330, Adana, TÜRKİYE

ESER BİLGİSİ

Araştırma Makalesi — Bitkisel Üretim

Sorumlu Yazar: Mustafa MIRIK, e-posta: mmirik@nku.edu.tr, Tel: +90(282) 293 34 76

Geliş tarihi: 17 Mayıs 2010, Düzeltmelerin gelişi: 25 Aralık 2011, Kabul: 07 Ocak 2012

ÖZET

Marmara Bölgesinde Tekirdağ, Çanakkale, Balıkesir, Bursa ve Yalova illerindeki zeytin üretim alanlarında survey yapılarak, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin neden olduğu dal kanseri hastalığının yaygınlığı araştırılmıştır. Hastalığın yaygınlık oranı Çanakkale'de %100, Balıkesir'de %81, Tekirdağ'da %66, Bursa'da %4 oranlarında saptanırken, Yalova'da hastalığa rastlanılmamıştır. Hastalığın bahçe içindeki bulunış oranının Çanakkale'de %73, Balıkesir'de %56, Tekirdağ'da %30 ve Bursa'da %0.6 olduğu tespit edilmiştir. Marmara Bölgesinden toplanan 104 hasta bitki örneğinden King B ve PVF1 besi yerlerine yapılan izolasyonlarda, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olan 208 bakteri izolatı elde edilmiştir. Bunların içerisinde seçilen 38 bölge izolatı ve bir referans izolat (CFPB 1672) ile yapılan patojenite testlerinde bu izolatların tümünün Edremit çeşidi zeytin fidanlarında patojen olduğu saptanmıştır. Patojenite testi sonucu 88 adet re-izolat elde edilmiş ve tanı testlerinde kullanılmıştır. İzolatların tamamı gram negatif, oksidaz negatif, patates dilimlerinde pektolitik aktivite negatif, SNA besi yerinde levan olmayan tipte koloniler üretmişlerdir. Arginin dehidrolaz aktivitesi negatif ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olarak belirlenmiştir. Tanı sonuçları, BIOLOG, spesifik PCR ve yağ asit analizlerine dayanan mikrobiyal tanı sistemine (MIS) göre teyit edilmiştir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının tüm hücre yağ asitleri (FAME) kompozisyonuna göre karşılaştırıldığında, fenotipik olarak %96.7, BOX-PCR'a dayanan küme analizlerine göre genotipik olarak %97.4 oranında birbirine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Zeytin dal kanseri; PCR; BOX-PCR; BIOLOG; MIS; FAME

Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Isolates and Disease Prevalence of Olive Knot Disease in Marmara Region of Turkey

ARTICLE INFO

Research Article — Crop Production

Corresponding author: Mustafa MIRIK, e-mail: mmirik@nku.edu.tr, Tel: +90(282) 293 34 76

Received: 17 May 2010, Received in revised form: 25 December 2011, Accepted: 07 January 2012

ABSTRACT

Olive growing areas in Tekirdağ, Çanakkale, Balıkesir, Bursa, and Yalova cities of Marmara region were visited and prevalence and incidence of olive knot disease were noted. Disease prevalence was recorded as 100, 81, 66, 4 and 0% in Çanakkale, Balıkesir, Tekirdağ, Bursa and Yalova, respectively. Disease incidence was 73, 56, 30 and 0.6% in Çanakkale, Balıkesir, Tekirdağ and Bursa, respectively. Totaly 208 bacterial strains which showed positive hypersensitive reaction on tobacco leaves were isolated from 104 diseased plants on King's medium B and PVF1 medium from Marmara region. Pathogenicity tests were performed with selected 38 strains and a reference strain (CFPB 1672). All strains were pathogenic on olive plants cv Edremit. Eighty eight strains were re-isolated and used in identification tests. All strains were gram negative, oxidase negative, pectolytic activity negative, levan negative, and arginin dehidrolase negative, but hypersensitive reaction on tobacco leaves was positive. The identification of the strains was confirmed by BIOLOG, spesific-PCR and microbial identification system (MIS) based on whole cell fatty acids. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains showed phenotypic similarity as a ratio of 96.7% by whole cell fatty acid compositions. The strains were genotypically similar as a ratio of 97.4% by polymorphism in BOX-PCR.

Keywords: Olive knot; PCR; BOX-PCR; BIOLOG; MIS; FAME

© Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi

1. Giriş

Zeytin ağacı (*Olea europea* L.) Akdeniz havzasında oldukça uygun bir yetişme ortamı bulmaktadır. Tunalıoğlu (2009)'na göre dünyada Akdeniz havzası iklim özellikleri gösteren yaklaşık 40 ülkede, toplam 7,664,209 hektar alanda, 17,792,831 ton dane zeytin üretilmektedir. Dünyada zeytincilik yapılan alanların %9'u, dane zeytin üretiminin %8'i Türkiye'ye aittir (Özkaya et al 2010). Dünya zeytinciliğinin merkezi olan Akdeniz havzasının doğusunda yer alan Türkiye'de zeytin; 753 bin hektar alanda, mevcut 151,630,000 adet zeytin ağacının 106,139,000 adedi meyve veren yaşta (%70), geri kalan 45,491,000 adedi (%30) ise meyve vermeyen yaşta. Zeytin üretimi Ege Bölgesinde yapılmakta, onu sırasıyla Marmara, Akdeniz, Güneydoğu ve Karadeniz Bölgeleri izlemektedir. Türkiye'de üretilen dane zeytinin %68'i yağlık, %32'si sofralığa ayrılmaktadır.

Marmara Bölgesinde zeytin üretimi yoğun olarak Tekirdağ, Çanakkale, Balıkesir, Bursa ve Yalova illerinde yapılmaktadır. Bölgedeki ağaç sayıları incelendiğinde; Tekirdağ'da 1,142,411 adet, Balıkesir'de 11,108,261 adet, Bursa'da 9,714,854 adet, Çanakkale'de 5,017,947 adet ve Yalova'da 976,148 adet olmak üzere sürvey yapılan alanda toplam 27,959,621 adet zeytin ağacı bulunmaktadır (TÜİK 2008).

Bu kadar geniş alanlarda yetiştiriciliği yapılan zeytin ağaçlarında tek başına veya birlikte zarar yapan pek çok hastalık, zararlı ve yabancı ot bulunmaktadır. Bunlar gerek yağlık ve gerekse de sofralık zeytin üretimini azaltmaktadır. Bu hastalıklardan biri de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Smith 1908)'nin neden olduğu zeytin uru veya zeytin dal kanseri olarak isimlendirilen bakteriyel bir hastalıktır (Janse 1982). Etmen Oleaceae ve Apocynaceae familyasına ait farklı bitki türlerinin yaprak, sürgün ve gövdelerinde urlara neden olmaktadır. Etmenin konukçuları olarak zeytin (*Olea europea* L.) (Smith 1908; Young et al 1978), zakkum (*Nerium oleander* L.) (Wilson 1965), yasemin (*Jasminium officinale* L.) (Janse 1981), dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) (Janse 1981) ve forzitya (*Forsythia* sp.) (Iacobellis et al 1998) saptanmıştır.

Türkiye'de bu hastalığın zeytinlerde varlığı uzun zamandır bilinmesine rağmen; ilk çalışmalar Ege bölgesinde Azeri (1993), Aydın ve Muğla illerinde Tatlı & Benlioğlu (2004), Batı Akdeniz Bölgesinde Basım & Ersoy (2000), Doğu Akdeniz Bölgesinde ise Mirik et al (2004) tarafından yapılmıştır.

Hastalık etmeni bitkiye kültürel işlemler sırasında, sırkla zeytin hasadı nedeniyle veya olumsuz iklim faktörleri nedeniyle oluşan yaralardan giriş yapmaktadır. Bakteri tarafından

hastalandırılmış dokularda gözle görülebilir urlar oluşmaktadır (Alvarez et al 1998). Bakterinin neden olduğu urların oluşumunda en önemli faktörlerden birisi, patojen tarafından üretimi teşvik edilen hormonlardır. Bakteri tarafından üretimi teşvik edilen indol asetik asidin (IAA) ur oluşumu için gerekli olduğu belirlenmiştir (Smidt & Kosuge 1978; Surico et al 1984; Iacobellis et al 1994; Iacobellis et al 1995). Hastalık nedeniyle bitkinin besin ve su alımı engellendiğinden, zamanla bitki zayıf düşmekte ve sonunda kurumalar meydana gelmektedir (Gardan et al 1992).

Marmara Bölgesinde de zeytin üreticisinin en büyük sorunlarından biri zeytin dal kanseri hastalığıdır. Bu bölgede (Tekirdağ, Çanakkale, Balıkesir, Bursa ve Yalova illerinde) yapılan arazi çalışmaları sonucu hastalığın yaygınlığı ve bulunuş oranı ortaya konmuştur. Elde edilen zeytin izolatlarının fenotipik ve genotipik olarak benzerlikleri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Hastalık surveyi ve hasta bitki örneklerinin toplanması

Marmara Bölgesinde, Tekirdağ (Şarköy, Mürefte, Hoşköy ve Marmara Adası), Çanakkale (Alçitepe, Eceabat ve Ezine), Balıkesir (Edremit, Gömeç, Burhaniye, Ayvalık, Havran ve Cunda Adası), Bursa (Orhangazi, Mudanya, Gemlik ve İznik) ve Yalova (Merkez ilçe) illerindeki zeytin üretim alanlarında örnekleme işlemi Bora & Karaca (1970)'ya göre yapılmıştır. Hastalığın yöredeki yaygınlığı ve bahçe içerisindeki bulunuş oranları tespit edilmiştir.

Hastalıklı bitki örneklerini toplamak amacıyla arazi çıkışı öncesi laboratuvar koşullarında hazırlanmış, içerisinde 500µl steril sıvı nutrient broth bulunan ependorf tüpleri kullanılmıştır. Araziden toplanan taze urların dış kabuk kısmı bistirü ile soyulup uzaklaştırıldıktan sonra iç kısımdan alınan 1-2 mm'lik yumuşak doku parçaları %70'lik alkol ile silinerek yüzeyden dezenfekte edildikten sonra ependorf tüplerine konmuştur. Arazi çalışması süresince (yaklaşık 10-15 gün) urlar hızla sertleştiğinden taze

urlardan alınan doku örnekleri steril nutrient broth içerisinde arazi çalışması boyunca muhafaza edilmiştir. Bu tüpler seyahat esnasında buz kutusunda saklanmıştır. Arazi çalışmasının yaklaşık 10-15 gün devam ettiği düşünüldüğünde, ilk günlerde alınan taze urların arazi çalışması bitene kadar sertleşeceği göz önüne alınarak bu yöntem tarafımızdan geliştirilmiştir.

2.2. Hastalıklı bitki örneklerinden etmenlerin izolasyonu

Arazi çalışmasında toplanan 104 bahçeden örnek alınarak izolasyon işlemleri Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarında yapılmıştır. Hastalıklı bitki parçalarından bir miktar alınıp steril havan içinde ezilmiştir. Steril kabinde 15-30 dakika bekletilen homogenattan King B ve PVF1 besi yerlerine çizimler yapılmıştır. 25°C'de 2 gün inkübasyondan sonra petripler 4°C'deki buzdolabında 24 saat bekletilmiş ve gelişen koloniler incelenmiştir. İzolasyon petripleri 48 saatten fazla 25°C'deki inkübatörde bekletildiğinde, sarı renkli saprofit bir bakteri gelişerek petriyi kaplamakta ve gerçek patojenin gelişimini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle izolasyon petripleri 25°C'de 2 gün inkübasyondan sonra buzdolabına alınarak saprofit bakteri gelişimi engellenmeye çalışılmıştır. PVF1 besi yerlerinde floresan renge sahip, King B besi yerinde zayıf floresan tipte, küçük yuvarlak ve kabarık olmayan tipte gelişen koloniler seçilerek saflaştırılmıştır.

2.3. Bakteri izolatlarının patojenitelerinin testlenmesi

Marmara Bölgesinden elde edilen bakteri izolatlarından örnek alınan bölgeleri temsil edecek şekilde her bölgeden tesadüfi olarak seçilen 38 izolatın ve referans izolatın (CFPB 1672) patojenite testleri Surico et al (1984)'e göre Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parselinde bulunan cam seralarda yapılmıştır. Edremit çeşidi zeytin fidanlarının bir yaşından büyük sürgünlerinin her birine bir izolat olmak üzere, izolatlar inokule edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril su, pozitif kontrol olarak CFPB 1672

kodlu Dr. Cindy Morris'den (Fransa) elde edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatı kullanılmıştır. Patojenite testi sonucu 50-60 gün içerisinde zeytin dallarında oluşan urlardan re-izolasyonlar yapılarak 88 adet re-izolat elde edilmiştir.

2.4. Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısı

Seksen sekiz adet re-izolatın geleneksel yöntemlerle tanısı Lelliott & Stead (1987) ile Schaad et al (2001)'e göre yapılmıştır. Karşılaştırma kültürü olarak CFPB 1672 kodlu referans izolat kullanılmıştır. KOH ile gram reaksiyonu ve LOPAT (L: levan oluşumu, O: oksidaz testi, P: patatete pektolitik aktivite, A: arginin dehidrolaz aktivitesi, T: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu) testlerinin sonucuna göre izolatların tanıları yapılmıştır. Çalışmada *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin referans kültürü ile her bir test için pozitif ve negatif sonuç veren referans bakteri kültürleri kullanılmıştır.

2.5. Bakteri izolatlarının BIOLOG tanı sistemi ile tanılanması

Gram negatif bakteri izolatları için dizayn edilmiş GN2 MicroPlate (GEN II for Gram-negative bacteria) BIOLOG plate kullanılmıştır. İzolatlar çeşitli şeker, alkol, deterjan ve aminoasit olmak üzere 95 adet farklı karbon kaynağının besin olarak kullanımına dayanan BIOLOG Sistemiyle (BIOLOG, Inc., Hayward, CA, USA) (Jones et al 1993) tanılanmıştır. Marmara bölgesi izolatları içerisinde her yöreden olmak üzere tesadüfi olarak seçilen 23 adet izolatla çalışma yapılmıştır.

2.6. Bakteri izolatlarının PCR testi ile tanısı

Seçilen 23 adet izolatın PCR ile de tanısı yapılmıştır. Seçilen izolatlar nutrient broth sıvı besiyerinde geliştirilerek De Boer & Ward (1995)'e göre saflaştırılmış genomik DNA'ları PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Primer olarak IAALF (5'-GGC ACC AGC GGC AAC ATC AA-3') ile IAALR (5'-CGC CCT CGC AAC TGC CAT AC-3') primerleri (Penyalver et al 2000), PSS 1 (5'-TGG GGT GCT ACT TGT ACC CGA-3') ile PSS 2 (5'-CCG TGT ACT ACG TTC AGC GAG-3') ve PSS 3 (5'-CAG GAC TTC AGA ACC CAC GT-3') ile PSS 4 (5'-

CGG TCG ATG ATG TAG AGC AT-3') (Ersoy, 2002) primerleri kullanılmıştır.

IAALF ile IAALR primerleri kullanılarak yapılan PCR işleminde, amplifikasyonlar Penyalver et al (2000), PSS 1 ile PSS 2 primerleri ve PSS 3 ile PSS 4 primerleri kullanılarak yapılan PCR işleminde amplifikasyonlar ise Ersoy (2002)'e göre yapılmıştır. Çalışmada Techne marka thermalcycler cihazı kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde 70V elektrik akımında yaklaşık 3-4 saat süre ile yürütülmüştür. Bantların görülmesi için ethidium bromür ile (10mg ml⁻¹) 10 dakika boyama yapılmış ve bunu takiben 15 dakika saf su ile jel yıkanarak 302 nm UV ışığı yayan transiluminatörde bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Oluşan bantların tekrarlanabilir bantlar olduğunu belirtmek için çalışma 3 kez tekrarlanmıştır. Moleküler ağırlık işaretleyici (Marker) olarak 100 bp ve 1 kb kullanılmıştır.

2.7. Yağ asit analizlerine dayanan mikrobiyal tanı sistemi (MIS)

Bakteri hücrelerinden yağ asitleri izolasyonu De Boer & Sasser (1986)'in yöntemine göre yapılmıştır. Seçilen 23 adet izolatın tanısında Mikrobiyal İdentifikasyon Sisteminin (MIS) bilgisayar paket programı (Sherlock MIS version 4.5 Microbial ID. Inc. Newark, Delaware) kullanılarak tanı yapılmıştır.

2.8. Bakteri İzolatlarının tüm hücre yağ asitleri (FAME) kompozisyonuna göre fenotipik karakterizasyonu

Yukarıdaki yöntemle göre bakteri hücrelerinden izole edilen yağ asit türleri ve % oranları karşılaştırılarak istatistiksel analizler yapılmış, aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. SPSS (Statistical Package for Social Sciences 2009, 18:0 Edition for Windows)'de küme analizi yapılarak zeytin izolatları arasında fenotipik akrabalık oranları belirlenmiştir.

2.9. BOX-PCR ile izolatların genotipik karakterizasyonu

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* izolatları arasındaki genetik farklılık Louws et al (1994) ile Norman et al (2003)'a göre ortaya konmuştur. De

Boer & Ward (1995)'e göre izole edilen genomik DNA'larla BOX-1A primeri (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') kullanılarak BOX-PCR çalışmaları yapılmıştır. Amplifikasyon sonucu elde edilen PCR ürünleri %1.5'lük agaroz jele verilerek oluşan bantlar fotoğraflanmıştır. Marker olarak 1 kb'lik ve 100 bp'lik DNA ladderlar kullanılmıştır. Her bir izolatin oluşturduğu bant durumu not edilmiştir. Tüm veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences 2009, 18:0 Edition for Windows)'de analiz edilerek oluşturulan dendrogram göre genetik akrabalık oranları belirlenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Yaygın olarak yetiştirilen zeytin çeşitlerinin yörelere göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Tekirdağ, Çanakkale ve Balıkesir'de yağlık Edremit (Ayvalık) çeşidi yetiştirilirken; Bursa ve Yalova illerinde ise genellikle sofralık Gemlik çeşidinin yetiştirildiği belirlenmiştir.

Çanakkale ve Balıkesir illerinde yoğun olarak zeytinyağı üretimi için yetiştiricilik yapılmaktadır. Hasat sırkırlarla yapıldığından bitkide açılan yaralardan dolayı, bu illerde hastalığın çok yaygın olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında Tekirdağ ilinde hem zeytinyağı ve hem de sofralık zeytin için üretim yapılmaktadır. Tekirdağ'da yağlık zeytin yetiştirilen yerlerde hastalık yoğun olarak gözlenirken, sofralık zeytin yetiştiriciliği yapılan yerlerde zeytinlerin elle toplanmasından dolayı hastalığın çok az oranda olduğu gözlenmiştir. Bursa ve Yalova'da üretim alanlarının hemen hemen tümünde Gemlik çeşidi sofralık zeytin üretilmekte ve hasat elle yapıldığından hastalık pek fazla görülmemektedir. Bu çalışmayla zeytin dal kanseri hastalığının Marmara Bölgesindeki varlığı ve bulunuş oranları ortaya konmuştur.

Çizelge 1'de görüldüğü gibi, araştırma yapılan zeytin üretim alanlarından elde edilen değerler incelendiğinde bu hastalığın yaygınlık oranının

Çizelge 1-Örnekleme yapılan zeytin üretim alanları ve hastalığın yaygınlık ve bulunuş oranları

Table 1-Prevalence and incidence of olive knot disease and number of olive plantations sampled on survey area

| Örnekleme yapılan yer | Örneklenen zeytin üretim alanı sayısı | Hastalığın yaygınlığı, % | Hastalığın bulunuş oranı, % |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Tekirdağ | 25 | 66.3 | 30.1 |
| Şarköy | 8 | 25.0 | 20.0 |
| Mürefte | 5 | 80.0 | 15.0 |
| Hoşköy | 5 | 60.0 | 15.0 |
| Marmara Adası | 7 | 100.0 | 70.3 |
| Çanakkale | 21 | 100.0 | 72.9 |
| Merkez | 6 | 100.0 | 99.0 |
| Türközü | 5 | 100.0 | 60.0 |
| Alçitepe | 5 | 100.0 | 59.8 |
| Eceabat | 3 | 100.0 | 70.0 |
| Ezine | 2 | 100.0 | 75.5 |
| Balıkesir | 33 | 81.0 | 56.0 |
| Edremit | 9 | 100.0 | 49.6 |
| Ayvalık | 8 | 100.0 | 98.8 |
| Gömeç | 4 | 100.0 | 99.3 |
| Burhaniye | 4 | 100.0 | 75.3 |
| Havran | 4 | 100.0 | 50.5 |
| Cunda Adası | 3 | 66.7 | 18.3 |
| Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu | 1 | 0.0 | 0.0 |
| Bursa | 19 | 4.0 | 0.6 |
| Gemlik | 5 | 0.0 | 0.0 |
| Orhangazi | 5 | 20.0 | 3.0 |
| Mudanya | 4 | 0.0 | 0.0 |
| Zeytinbağı | 2 | 0.0 | 0.0 |
| İznik | 3 | 0.0 | 0.0 |
| Yalova | 6 | 0.0 | 0.0 |
| Merkez | 6 | 0.0 | 0.0 |

Tekirdağ'da %66, Çanakkale'de %100, Balıkesir'de %81, Bursa'da %4 olduğu, Yalova'da ise incelenen zeytinliklerin hastaliksız olduğu belirlenmiştir. İncelenen zeytinliklerde, hastalığın bulunuş oranı %73 ile en fazla Çanakkale'deki zeytinliklerde saptanmıştır. Balıkesir'de bahçe içerisindeki yaygınlık oranı %56 iken; Tekirdağ'da %30 ve Bursa'da %0.6 olarak belirlenmiştir.

Marmara Bölgesinde beş ilde yapılan arazi çalışmasında 104 zeytinlik incelenmiş ve hasta bitki örnekleri toplanmıştır. Hastalık etmeninin izolasyonunda King B ve PVF1 besi yerleri kullanılmıştır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin besi yerlerinde 3 günden sonra koloni gelişimi gözlenmektedir. Bu arada besi yerini sarı renkli bir saprofit bakteri kaplamakta ve gerçek patojeni saflaştırmak zorlaşmaktadır. Bu nedenle, izolasyon petripleri 48 saat 25°C'de inkübe edildikten sonra buzdolabına alınmıştır. 4°C'de patojenin gelişimi devam etmekte buna karşın sarı renkli saprofitin gelişimi baskılanmaktadır. Bu inkübasyon yöntemi *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolasyonunda başarı getirmiştir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* kolonileri izolasyon petrisinde (özellikle King B) floresan olmayan tipte gelişmişlerdir. King B besi yerinde 5 günden sonra, UV ışığı altında kolonilerin zayıf floresan pigment ürettikleri belirlenmiştir. PVF1 besi yerinde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* kolonileri beyazımsı krem, mukoid ve yuvarlak, UV ışığı altında açık mavi-yeşil renkte floresan özellik göstermesinden dolayı King B besi yerine göre daha seçici olduğu saptanmıştır. Surico & Lavermicoca (1989), Penyalver et al (2000) ve Azad & Cooksey (1995) yapmış oldukları çalışmada özellikle gram negatif bakterilerin yoğun olduğu durumlarda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolasyonunda King B yerine PVF1 besi yerinin tercih edilmesini önermişlerdir.

Marmara Bölgesinden toplanan 104 bitki örneğinden 208 bakteri izole edilmiştir. Tütünde yapılan HR testinde tamamı pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. İzole edilen 208 adet izolattan

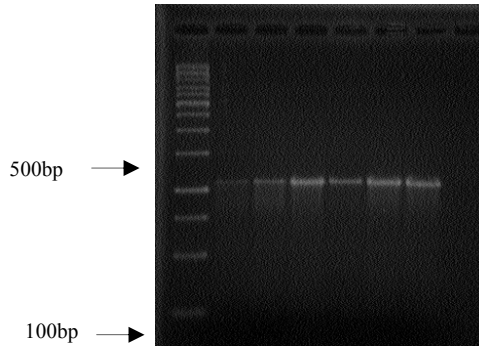
tesadüfi olarak seçilen 38 bölge izolatu ve CFPB 1672 kodlu referans izolatuyla yapılan patojenite çalışmasında, pozitif kontrolde ur gelişimi 8 hafta sonra gözlenmiş ve detaylı değerlendirme yapılmıştır. Çalışmada kullanılan 38 bölge izolatuğunun tümü Edremit çeşidi zeytin fidanlarının dallarında ur oluşturmuşlardır ve bu nedenle bu izolatların hastalık yapma yeteneğinde oldukları saptanmıştır. Negatif kontrolde hastalık gözlenmemiştir. Uurlardan yapılan re-izolasyonlarda 88 adet re-izolat elde edilmiş ve tanı çalışmalarında kullanılmıştır. Çizelge 2'de görüldüğü gibi izolatların hepsi gram negatif, oksidaz negatif, patates dilimlerinde pektolitik aktivite negatif, SNA besi yerinde levan olmayan tipte koloniler üretmişler, arginin dehidrolaz aktivitesinin negatif ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu pozitif olarak belirlenmiştir. Yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda elde edilen sonuçlarla Schaad et al (2001) ile Lelliot & Stead (1987) benzerlik göstermektedir. Ayrıca, yapılan BIOLOG, spesifik PCR ve yağ asit analizlerine dayanan mikrobiyal tanı sistemine göre izolatların *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olduğu teyit edilmiştir.

İzolatlar; Tween 40, L-Arabinose, D-Arabitol, Gentioise, Maltose, D-Mannitol, D-Mannose, D-Sorbitol, Sucrose, Succinic Asit Mono-Methyl-Ester, Cis-Aconitic Asit, Citric Asit, Formic Asit, D-Gluconic Acid, α -Keto Valeric Acid, Propionic Acid, D-Saccharic Acid, Succinic Acid, Bromosuccinic Acid, L-Alanine, L-Asparagine, L-Aspartic Acid, L-Glutamic Acid, Glycyl-L-Glutamic Acid, L-Ornithine ve L-Serine'i karbon kaynağı olarak kullanmışlardır. BIOLOG sistemine göre izolatları %21-78 benzerlik oranıyla *Pseudomonas savastanoi* olduğu saptanmıştır.

Türe spesifik olarak yapılan PCR'da üç farklı primer seti (IAALF&IAALR, PSS1&PSS2 ve PSS3&PSS4) kullanılmış ve sırasıyla 454 bp (Şekil 1), 684 bp (Şekil 2) ve 1064 bp (Şekil 3)'lük bantlar elde edilmiş ve izolatlar moleküler olarak PCR'la tanılanmıştır. Palvender et al (2000) ve Ersoy (2002) ile paralellik göstermektedir.

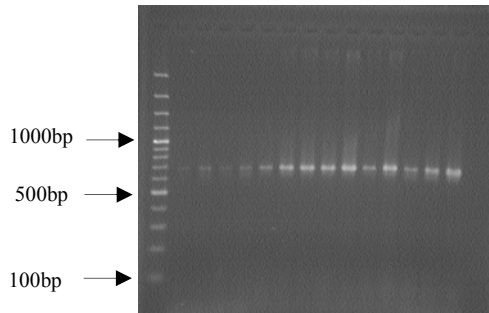
Çizelge 2-Marmara bölgesi re-izolatlarının çeşitli testlerdeki biyokimyasal reaksiyonları*Table 2-Biochemical reactions in identification tests of Marmara region's re-isolates*

| Testler | CFPB 1672 referans izolat | Zeytin izolatları |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Gram reaksiyonu | - | - |
| Floresanslık özelliği | + | Zayıf [±] |
| Levan | - | - |
| Oksidaz reaksiyonu | - | - |
| Pektolitik aktivite | - | - |
| Arginin dihidrolase aktivitesi | - | - |
| Tütünde HR | + | + |
| Patojenite testi | + | + |



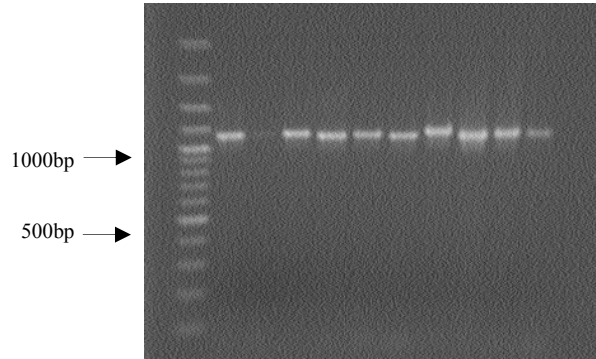
Şekil 1-Marmara Bölgesi izolatlarının IAALF ve IAALR primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin jelde görünümü. Çukur 1: 100bp DNA ladder Marker; Çukur 2: CFPB 1672; Çukur 3: Marmara Adası 1; Çukur 4: Çanakkale 2b; Çukur 5: Şarköy Zeytin 4b; Çukur 6: Şarköy Zeytin 4d; Çukur 7: Alçitepe 1; Çukur 8: Negatif Kontrol (steril saf su)

Figure 1-PCR amplification of IAALF and IAALR primer Lane1 100-bp molecular marker, Lane2: CFPB 1672, Lane3 Marmara Adası 1, Lane4 Çanakkale 2b, Lane5 Şarköy Zeytin 4b, Lane6 Şarköy Zeytin 4d, Lane7 Alçitepe 1, Lane8 Negative Control (sterile distilled water)



Şekil 2-Marmara Bölgesi izolatlarının PSS1 ve PSS2 primeri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen ürünlerin jelde görünümü. Çukur 1: 100bp DNA ladder Marker; Çukur 2: CFPB 1672; Çukur 3: Marmara Adası 1; Çukur 4: Şarköy Zeytin 4a; Çukur 5: Ayvalık 1; Çukur 6: Çanakkale 1; Çukur 7: Alçitepe 2; Çukur 8: Havran 2b; Çukur 9: Edremit 3; Çukur 10:Cunda Adası 1c, Çukur 11: Orhangazi 1; Çukur 12: Orhangazi 3; Çukur 13: Gömeç 2a; Çukur 14: Marmara Adası 2A; Çukur 15: Edremit 2; Çukur 16: Negatif Kontrol (steril saf su)

Figure 2-PCR amplification of PSS1 and PSS2 primer Lane1 100-bp molecular marker, Lane2: CFPB 1672, Lane3 Marmara Adası 1, Lane4 Şarköy Zeytin 4a, Lane5 Ayvalık 1, Lane6 Çanakkale 1, Lane7 Alçitepe 2, Lane8 Havran 2b, Lane9 Edremit 3, Lane 10 Cunda Adası 1c, Lane 11 Orhangazi 1, Lane12 Orhangazi 3, Lane 13 Gömeç 2a, Lane 14 Marmara Adası 2A, Lane 15 Edremit 2, Lane16 Negative Control (sterile distilled water)



Şekil 3-Marmara Bölgesi izolatlarının PSS3 ve PSS4 primeri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen ürünlerin jelde görünümü. Çukur 1: 100bp DNA ladder Marker; Çukur 2: CFPB 1672; Çukur 3: Şarköy Zeytin 1; Çukur 4: Türközü 1; Çukur 5: Ayvalık 1; Çukur 6: Çanakkale 1c; Çukur 7: Ayvalık 2; Çukur 8: Havran 2b; Çukur 9: Edremit 3; Çukur 10:Cunda Adası 1c, Çukur 11: Orhangazi 1; Çukur 12: Orhangazi 3; Çukur 13: Gömeç 2a; Çukur 14: Marmara Adası 2A; Çukur 15: Edremit 2; Çukur 16: Negatif Kontrol (steril saf su)

Figure 3-PCR amplification of PSS3 and PSS4 primer Lane1 100-bp molecular marker, Lane2: CFPB 1672, Lane3 Şarköy Zeytin 1, Lane4 Türközü 1, Lane5 Ayvalık 1, Lane6 Çanakkale 1c, Lane7 Ayvalık 2, Lane8 Havran 2b, Lane 9 Edremit 3, Lane10 Cunda Adası 1c, Lane11 Orhangazi 1, Lane 12 Orhangazi 3, Lane13 Gömeç 2a, Lane14 Marmara Adası 2A, Lane15 Edremit 2, Lane16 Negative Control (sterile distilled water)

Tüm hücre yağ asit analizine dayanan MIS ile tanımlanan izolatlar %44-80 benzerlik oranıyla *P. s. pv. savastanoi* olarak tanımlanmıştır. Çizelge 3’de Marmara Bölgesinden zeytin izolatları ve bir referans izolatın içerdiği yağ asidi kompozisyonu görülmektedir. Zeytinde ur oluşumuna neden olan hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’den 14 farklı yağ asidi izole edilmiştir. İzole edilen yağ asitleri; doymuş (12:0, 16:0 ve 18:0), doymamış (18:1 w7c ve 11 methyl 18:1 w7c), hidroxy asit (10:0 3OH, 12:0 2OH ve 12:0 3OH), methyl branched (15:0 ISO, 15:0 ANTAISO, 17:0 ANTEISO, cyclopropane (17:0 cyclo) ve 2 tane Sum in features (3, 7) olmak üzere 6 grup olduğu saptanmıştır. 10:0 3OH, 12:0 OH, 12:0 3 OH, Sum in feature 3 (16:1 w7c/15 ISO 2OH), 16:0, 18:0 ve 18:1 w7c yağ asitlerinin tüm izolatlarda bulunduğu belirlenmiştir. Diğer yağ asitleri açısından değişen oranlarda farklılıklar elde edilmiştir. Bunların bulunuşları ve miktarları göz önüne alınarak yapılan küme analizlerinde izolatlar 2 ana küme oluşturmuşlardır (Şekil 4). Birinci grup içerisinde (Marmara Adası 2A, Orhangazi 1, Türközü 1, Türközü 2, Gömeç 3a, Gömeç 2a, Cunda Adası 3a, CFPB 1672, Zeytin Şarköy 4c, Zeytin Şarköy

3e, Ayvalık 1, Zeytin Şarköy 4a, Ayvalık 2, Ayvalık 4, Cunda Adası 1c, Çanakkale 3b, Edremit 2, ve Orhangazi 3 kodlu izolatlar) 18 adet izolat yer alırken, ikinci grup içinde (Çanakkale 1c, Alçıtepe, Havran 2b, Edremit 3, Havran 3 ve Edremit 4 kodlu izolatlar) 6 adet izolat yer almıştır. İzolatların yağ asitlerine dayanan küme analizlerine göre, birbirinden en uzak türün %97 oranında fenotipik olarak benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Yağ asit analizleri kullanılarak MIS ile *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının tanımlanması yapılan gerek yaptığımız çalışma ve gerekse de Wells et al (1991) tarafından da ortaya konmuştur. 10:0 3OH, 12:0, 12:0 OH, 12:0 3 OH, Sum in feature 3 (16:1 w7c/15 ISO 2OH), 16:0, 18:0 ve 18:1 w7c yağ asitlerinin tüm *P. s. pv. savastanoi* izolatlarında bulunduğu belirlenmiştir. Wells et al (1991) ile Marchi et al (2005) yaptıkları çalışmada bu yağ asitlerinin *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarında bulunduğunu belirtmişler ve bizim sonuçlarımızla paralellik göstermiştir.

İzolatların genotipik karakterizasyonunda BOX-PCR’da oluşan polimorfizmden faydalanılmıştır. Şekil 5 ve Şekil 6’da görüldüğü

Çizelge 3-Marmara Bölgesi zeytin izolatlarından elde edilen yağ asidi kompozisyonu

Table 3-Fatty acid compositions of olive isolates from Marmara Region

| Yağ asidi | İzolat sayısı | Dağılım aralığı | Ortalama | Standart sapma |
|--------------------|-------------------------|-----------------|----------|----------------|
| 10:0 3OH | 24 | 2.66-3.52 | 3.09 | 0.21 |
| 12:0 | 24 | 4.47-5.28 | 4.78 | 0.29 |
| 12:0 2OH | 24 | 2.20-2.95 | 2.64 | 0.17 |
| 12:0 3OH | 24 | 3.03-3.93 | 3.58 | 0.21 |
| 15:0 ISO | 1 | 0.83 | 0.83 | - |
| 15:0 ANTEISO | 2 | 0.92-4.98 | 2.95 | 2.87 |
| Sum In Future 3 | 24 | 31.52-38.65 | 35.15 | 2.04 |
| 16:0 | 24 | 22.92-25.76 | 24.30 | 0.83 |
| 17:0 ANTEISO | 1 | 0,69 | - | - |
| 17: CYCLO | 16 | 0.68-2.73 | 1.60 | 0.54 |
| 18:1 w7c | 24 | 20.21-27.05 | 23.57 | 2.21 |
| 18:0 | 24 | 0.72-1.64 | 1.09 | 0.29 |
| 11 methyl 18:1 w7c | 10 | 0.48-0.86 | 0.63 | 0.14 |
| Sum In Future 7 | 6 | 0.81-1.22 | 0.98 | 0.18 |
| Summed Feature 3 | 16:1 w7c /15 ISO 2OH | | | |
| Summed Feature7 | Unknown 18.846/19:1 w6c | | | |

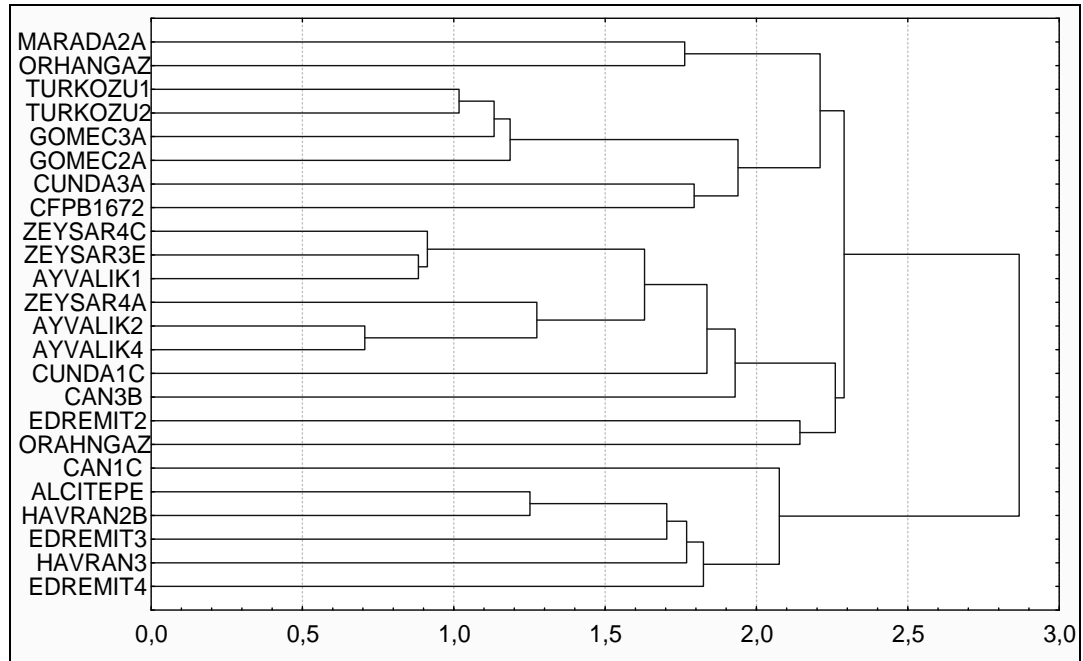
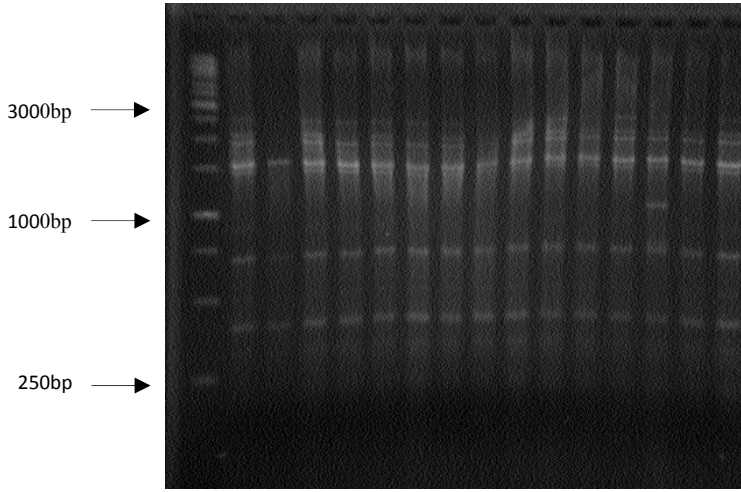
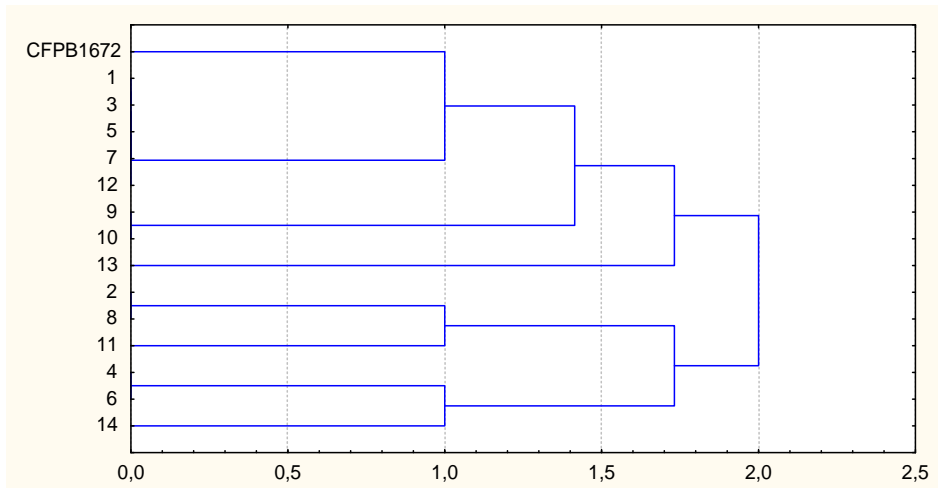
**Şekil 4-Marmara Bölgesi zeytin izolatlarının tüm hücre yağ asidi içeriğine göre oluşturduğu fenotipik farklılık**

Figure 4-Phenotypic differences of fatty acids of olive strains of Marmara Region



Şekil 5-Marmara Bölgesi zeytin izolatlarının BOX-PCR'da elde edilen ürünlerin jelde görünümü. Çukur 1: 1kb DNA ladder Marker; Çukur 2: CFPB 1672; Çukur 3: Şarköy Zeytin 4b; Çukur 4: Türközü 1; Çukur 5: Ayvalık 1; Çukur 6: Çanakkale 1; Çukur 7: Ayvalık 2; Çukur 8: Havran 2; Çukur 9: Edremit 3; Çukur 10: Cunda Adası 1; Çukur 11: Orhangazi 1; Çukur 12: Orhangazi 3; Çukur 13: Gömeç 2; Çukur 14: Marmara Adası 2; Çukur 15: Edremit 2; Çukur 16: Alçitepe 3

Figure 5-PCR amplification of BOX-PCR primer Lane1 1kb molecular marker, Lane2: CFPB 1672, Lane3 Şarköy Zeytin 4b, Lane4 Türközü 1, Lane5 Ayvalık 1, Lane6 Çanakkale 1, Lane7 Ayvalık 2, Lane8 Havran 2, Lane 9 Edremit 3, Lane10 Cunda Adası 1, Lane11 Orhangazi 1, Lane12 Orhangazi 3, Lane13 Gömeç 2, Lane14 Marmara Adası 2, Lane15 Edremit 2



Şekil 6-Marmara Bölgesi zeytin izolatlarının BOX-PCR'a göre oluşturduğu genotipik farklılık. 1: Şarköy Zeytin 4b; 2: Türközü 1; 3: Ayvalık 1; 4: Çanakkale 1; 5: Ayvalık 2; 6: Havran 2; 7: Edremit 3; 8: Cunda Adası 1; 9: Orhangazi 1; 10: Orhangazi 3; 11: Gömeç 2; 12: Marmara Adası 2; 13: Edremit 2; 14: Alçitepe 3

Figure 6-Genotypic differences of PCR amplification of BOX-PCR Lane1 Şarköy Zeytin 4b, Lane2 Türközü 1, CFPB 1672, Lane3 Ayvalık 1, Lane4 Çanakkale 1, Lane5 Ayvalık 2, Lane6 Havran 2, Lane7 Edremit 3, Lane8 Cunda Adası 1, Lane 9 Orhangazi 1, Lane10 Orhangazi 3, Lane11 Gömeç 2, Lane12 Marmara Adası 2, Lane13 Edremit 2, Lane14 Alçitepe 3

gibi, BOX-PCR çalışmalarında, izolatların tümünde 400, 750 ve 1500 bp'lik bantlar elde

edilmiştir. 1000 bp'lik bir bant sadece Edremit 2 kodlu izolatta saptanmıştır. 1400 ve 2100 bp'lik bantlar 10 izolatta tespit edilirken, 2000 ve 2500 bp'lik bantlar da 9 farklı izolatta tespit edilmiştir. Şekil 6'daki dendograma göre, Zeytin Şarköy 4b, Ayvalık 1, Ayvalık 2, Edremit 3 ve Marmara Adası 2 izolatları aynı yerde bant oluşturarak aynı grup içinde yer almışlardır. Türközü 1 ve Cunda Adası 1 kodlu izolatlar aynı bantları oluşturarak genetik olarak benzer oldukları görülmüştür. Çanakkale 1 ve Havran 2 kodlu izolatlar da birbiri ile benzer bulunmuştur. Aynı şekilde, Orhangazi 1 ve Orhangazi 3 izolatları da birbiriyle aynı bantları oluşturmuşlardır. CFBP 1672, Gömeç 2, Edremit 2 ve Alçıtepe 3 izolatları hiçbir izolatomuzla benzer bant oluşturmayarak ayrılmışlardır. Marmara Bölgesi izolatlarının BOX-PCR'a dayanan küme analizlerine göre, birbirinden en uzak türün %97.4 oranında genotipik olarak benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

4. Sonuç

Zeytin üretim alanlarında hastalığın yaygınlık oranı Çanakkale'de %100, Balıkesir'de %81, Tekirdağ'da %66, Bursa'da %4 oranlarında saptanırken, Yalova'da hastalığa rastlanılmamıştır. Hastalığın bahçe içindeki bulunış oranının Çanakkale'de %73, Balıkesir'de %56, Tekirdağ'da %30 ve Bursa'da %0.6 olduğu tespit edilmiştir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının tüm hücre yağ asitleri (FAME) kompozisyonuna göre karşılaştırıldığında, fenotipik olarak %96.7, BOX-PCR'a dayanan küme analizlerine göre genotipik olarak %97.4 oranında birbirine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Teşekkür

Çalışmamıza maddi destek veren TÜBİTAK'a, Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN ve çalışma ekibine, Referans izolatımızı sağlayan Dr. Cindy Moris'e (Department Health of plants and the environment', INRA-France) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Alvarez F, Garcia de los Rios J E, Jimenez A, Rojas A, Reche P & Troya M T (1998). Phenotypic variability in different strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* isolated from different hosts. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 603-609
- Azad H R & Cooksey D A (1995). A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic population of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. *Phytopathology* **85**: 740-745
- Azeri T (1993). Research on olive leaf spot, olive knot and verticillium wilt of olive in Turkey. *EPPO Bulletin* **23**: 437-440
- Basim H & Ersoy A (2000). Batı Akdeniz Bölgesinde zeytin ağaçlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tarafından oluşturulan bakteriyel dal kanseri hastalığının yayılışı ve hastalık etmeninin tanısı. *Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu* 310-315. 6-9 Haziran 2000, Bursa
- Bora T & Karaca İ (1970). Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi, Bornova, Ege Üniversitesi Matbaası
- De Boer S H & Sasser M (1986). Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *E. carotovora* ssp. *atroceptica* on the basis of cellular fatty acid composition. *Canadian Journal of Microbiology* **32**: 796-800
- De Boer S H & Ward L J (1995). PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* **85**: 854-858
- Ersoy A (2002). Batı Akdeniz Bölgesinde Zeytin Ağaçlarında Görülen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Neden Olduğu Bakteriyel Dal Kanseri Hastalığının Yayılışı, Etmenin Moleküler Tanısı, İzolatlarının Elde Edilmesi ve Moleküler Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Gardan L, David C, Morel M, Glickmann E, Abu-Gorrah M, Petit A & Dessaux Y (1992). Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1780-1783
- Iacobellis N S, Caponero A & Evidente A (1998). Characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* strains isolated from ash. *Plant Pathology* **47**: 73-78
- Iacobellis N S, Contesini A M & Surico G (1995).

- Bacteriosin production by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Phytopathology Meditterreanean* **34**: 15-22
- Iacobellis N S, Sisto A, Surico G, Evidente A & Di Maio E (1994). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* mutants defective in phytohormone production. *Journal Phytopathology* **140**: 238-248
- Janse J D (1981). The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*) caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*, II etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology* **11**: 425-438
- Janse J D (1982). *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. Nov., nom. Rev., the bacterium causing excrescences on *Oleacea* and *Nerium oleander* L. *International Journal of Systemic Bacteriology* **23**: 166-169
- Jones J B, Chase A R & Haris G K (1993). Evaluation of the Biolog GN microplate system for identification of some plant pathogenic bacteria. *Plant Disease* **77**: 553-558
- Leliott R A & Stead D E (1987). Diagnostic procedures for bacterial plant diseases In: *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. p:58-59. Blackwell Scientific Publications
- Louws F J, Fulbright D W, Stephens C T & DeBruij F J (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2286-2295
- Marchi G, Viti C, Giovannetti L & Surico G (2005). Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology* **112**: 101-112
- Mirik M, Aysan Y, Cinar O & Sahin F (2004). Türkiye'de çeşitli bitkilerden izole edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatlarının fenotipik karakterizasyonu. *Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi* 139. 8-10 Eylül 2004, Samsun
- Norman D J, Yuen M F, Resendiz R & Boswell J (2003). Characterization of Erwinia populations from nursery retention ponds and lakes infected ornamental plants in Florida. *Plant Disease* **87**: 193-196
- Ozkaya M T, Tunalioglu R, Eken Ş, Ulaş M, Tan M, Danacı A, İnan N & Tibet U (2010). Türkiye Zeytinciliğinin Sorunları ve Çözüm Önerileri. *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi* 515-537, 11-15 Ocak 2010, Ankara
- Penyalver R, Garcia A, Ferrer A, Bertolini E & Lopez M M (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2673-2677
- Schaad N W, Jones J B & Lacy G H (2001). Gram negative bacteria, *Pseudomonas*. p:84-117. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition)*. APS Press. St. Paul, Minnesota
- Smidt M & Kosuge T (1978). The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **13**: 203-214
- Surico G, Comai L & Kosuge T (1984). Pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* and their indolacetic acid-deficient mutants on olive and oleander. *Phytopathology* **74**: 490-493
- Surico G & Iacobellis N S (1992). Phytohormones and olive knot diseases. *Molecular Signals*. s:209-227. In *Plant-Microbe Communications*. FRSC, CRC Press
- Surico G & Lavermicocca P (1989). A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi*. *Phytopathology* **79**: 185-190
- Tatlı B & Benlioglu K (2004). Aydın ve Muğla illeri zeytin alanlarında zeytin ağacı uru hastalığı (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) üzerine çalışmalar. *Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi*. 147. 8-10 Eylül 2004, Samsun
- TUIK (2008). www.tuik.gov.tr
- Wells J M, Casana F J & Surico G (1991). Fatty acid composition of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Journal of Phytopathology* **133**: 152-162
- Wilson E E 1965. Pathological histogenesis in oleander tumors induced by *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopathology* **55**: 1244-1249
- Young J M, Dye D W, Bradbury J F, Panagopoulos C G & Robbs C F (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **21**: 153-177