

## Tekirdağ ilinde kirazda Bakteriyeel kanser hastalığına neden olan hastalık etmenlerinin karakterizasyonu<sup>1</sup>

Mustafa MİRİK<sup>2</sup>

Cansu ÖKSEL<sup>2</sup>

Merve ÖZDEMİR<sup>2</sup>

### ABSTRACT

#### Characterization of causal agents of bacterial canker on sweet cherry trees in Tekirdağ province

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is one of the most important fruit trees grown in Tekirdağ. Causal disease agent(s) of bacterial canker which reduces yield and quality of sweet cherry fruit and cause death of trees were investigated. For this purpose a survey study was conducted in 2012-2013 and 150 infected plant samples were collected from symptomatic trees. As a result of survey studies, bacterial canker was determined in all orchards, while the prevalence rate of diseases was determined as 20-57% and its severity estimated as 20-85% in surveyed orchards. As a result of isolation studies, 60 bacterial isolates of *Pseudomonas syringae* were obtained. Results obtained from LOPAT, oxidase, pectolytic activity and arginine dihydrolase revealed that all isolates were recorded as negative for oxidase, pectolytic activity and arginine dihydrolase, but were positive on tobacco and levan production. Further GATTA characters of tested isolates were found as (+ + - -) for 28 isolates identified as *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, while 32 isolates were recorded as (- - + +), identified as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Coincidentally 62-90% of selected isolates showed similarity according to fatty acid methyl ester analysis. By using specific primers, 28 isolates formed 650 bp repeatable band so identified as *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, 32 isolates formed 752 bp repeatable band so identified as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

**Keywords:** *Cerasus avium*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *cfl*, *syrB*

### ÖZ

Kiraz (*Prunus avium* L.) Tekirdağ'da yetiştirilen önemli bir meyve türüdür. Kirazda verim ve kaliteyi düşüren, ağaçları kurutan bakteriyeel kanser hastalığı etmen(ler)i bu çalışma ile

<sup>1</sup> Bu çalışma NKUBAP.00.24.AR.15 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

<sup>2</sup> Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 59000, Tekirdağ  
Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: mmirik@nku.edu.tr  
Alınış (Received): 30.06.2016, Kabul edilmiş (Accepted): 08.11.2016

araştırılmıştır. Tekirdağ ili kiraz bahçelerinde 2012-2013 yıllarında gerçekleştirilen sürvey araştırmaları sonucu 150 hasta bitki örneği belirti gösteren ağaçlardan toplanmıştır. Tekirdağ ilinde surveye dahil edilen bahçelerin tümünde hastalığın görüldüğü hastalık oranının %20-57, hastalık şiddetinin ise %20-85 oranında olduğu tespit edilmiştir. Laboratuvarında yapılan izolasyon çalışmaları sonucu, bu örneklerden 60 adet *Pseudomonas syringae* izolatu elde edilmiştir. Yapılan LOPAT testleri sonucunda izolatlar oksidaz, pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz negatif, tütünde aşırı duyarlılık ve levan pozitif olarak değerlendirilmiştir. Test edilen izolatların GATTa özellikleri, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanan 32 izolat için (+ +- -) olarak kaydedilirken *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanılanan 28 izolat için (- +- +) olarak bulunmuştur. Tesadüfen seçilen izolatlar yağ asidi analizlerine göre %62-90 oranında benzerlik göstermiştir. Moleküler testlerde kullanılan spesifik primerler ile 28 adet izolat 650 bp tekrarlanabilir bant oluşturarak *P. syringae* pv. *morsprunorum* ve 32 adet izolat 752 bp tekrarlanabilir bant oluşturması nedeniyle *P. syringae* pv. *syringae* olarak tanılanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Cerasus avium*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *cfl*, *syrB*

## GİRİŞ

Elma, armut, ayva, erik, üzüm, incir gibi meyvecilik tarımında önem kazanmış olan birçok meyve türünün yanında kirazın da anavatanı Türkiye'dir. Türkiye'nin coğrafik özelliğinden dolayı her bölgesinde kiraz üretimi yapılmakta ve ürünün çoğu taze olarak tüketilmektedir (Burak 2003).

Dünyanın coğrafik özelliklerinden dolayı kiraz üretimi farklı bölgelerine yayılmış durumdadır. Türkiye kiraz yetiştiriciliğinde üretim bakımından dünyada birinci sırada yer almaktadır (Anonymous 2014). İl bazında kiraz üretiminde ise İzmir, Manisa ve Konya ilk sıralarda bulunmaktadır. Tekirdağ ilinde 2015 yılında kiraz üretimi 2.308 ton olarak gerçekleşmiştir (Anonim 2016).

*Pseudomonas syringae*'nin neden olduğu bakteriyel kanser hastalığı dünyada kiraz üretimi yapılan her yerde yaygın olarak görülmekte ve kiraz üretimini önemli ölçüde etkilemektedir. *Pseudomonas syringae* ilk olarak 1902 yılında Van Hall tarafından leylak (*Syringae vulgaris*) bitkisinden izole edilmiştir. *Pseudomonas syringae* kompleks bir patojen olup Gardan et al. (1999) 56 farklı patojenik varyetinin bulunduğunu ve Kaluzna et al. (2012) ise etmenin yaklaşık 64 patojenik varyetesinin bulunduğunu bildirmiştir. Hastalığa neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* adlı bakteri geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Başta kiraz ve kayısı olmak üzere 80 kadar meyve türünün yanı sıra pek çok otsu bitki türünde de hastalık yaparken, *Pseudomonas syringae* pv. *Morsprunorum* kiraz, erik ve bademde bakteriyel kanser hastalığına neden olmaktadır (Agrios 2005).

Hastalık etmeni ağacın kök hariç bütün toprak üstü aksamalarında hastalık belirtisi oluştururken, hastalığın karakteristik belirtileri bitki çeşidine, ağacın yaşına, bitki dokusuna, patojen izolatına ve çevresel koşullara bağlıdır (Gasic et al. 2012). Hastalığın karakteristik belirtileri çiçek demeti yanıklığı, sürgünlerde geriye doğru

ölüm, yaprak ve meyve lekeleri, odun dokularında açık yaralar (kanser) ile birlikte zamklanma ve genel olarak meyve miktarında azalmalar şeklinde ortaya çıkmaktadır (Kennelly et al. 2007).

*P. syringae* pv. *syringae* ülkemizde; Antalya, Mersin ve Adana'da turuncgillerde (Mirik ve ark. 2005), Erzurum ve ilçelerinde kayısı ağaçlarında (Görmez 2011), *P. syringae* pv. *morsprunorum* ise Marmara ve Ege Bölgesinde kirazda, aynı zamanda Ege Bölgesinde bademlerde görülmektedir (Anonim 2008).

*Pseudomonas syringae* patojenik varyetelerinin tanılama çalışmalarında, LOPAT (Levan tipte koloni oluşumu, Oksidaz reaksiyonu, Patateste pektolitik aktivite, Arginin dehidrolaz aktivitesi, Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu testi), GATTa testleri (Gelatin hidrolizi, Aesculin hidrolizi, Tyrosin ve Tartaric asit aktivitesi), karbon kaynaklarından asit oluşumu testi gibi klasik yöntemlerin yanı sıra, patojenisite ve patolojik temelli fitotoksinlerinin dikkate alındığı *in vitro*'da syringomycin üretimi ve buz çekirdeği oluşturma aktivitesinin (ice nucleation activity, INA) saptanması gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Ayrıca, moleküler yöntemlerle de izolatların tanıları desteklenmektedir (Ertimurtaş ve ark. 2014, Bülbül 2014).

Bu çalışma kapsamında Tekirdağ ilinde kiraz üretim alanlarında survey çalışmaları yürütülmüş ve hastalık şüphesiyle örnekler toplanmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen izolatlardan tesadüfi olarak seçilen 60 izolatın LOPAT, GATTa testleri ve karbon kaynaklarından asit oluşumu gibi klasik testler kullanılarak *Pseudomonas syringae* olduğu belirlenmiştir. Tanıyı desteklemek amacıyla tesadüfi olarak seçilen izolatlara yağ asit analizi ve spesifik primer dizilimleri kullanılarak yapılan moleküler testler sonucunda izolatlar patojenik varyete düzeyinde *P. syringae* pv. *syringae* ve *P. syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanılanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Sürvey

Arazi çalışması için gidilecek bahçelerdeki ağaçlar Lazarov (1961)'un metoduna göre incelenmiştir. Tekirdağ'ın Barbaros, Çanakçı, Karahisarlı, Kumbağ, Marmaraeğlisi, Merkez, Mermer, Naip ve Yeniçiftlik ilçelerinden *P. syringae* pv. *syringae* ve *P. syringae* pv. *morsprunorum* hastalık şüphesiyle örnekler toplanmıştır. Survey yapılan bölgelerdeki bahçe sayısına, hastalıklı bahçe sayısı oranlanarak hastalığın yöredeki yaygınlığı hesaplanmıştır. Ayrıca her kiraz bahçesi, çapraz olarak gezilmiş, hastalıklı ve sağlıklı ağaçların sayıları belirlenerek basit ortalama metoduna göre bahçelerdeki hastalık %'si hesaplanarak hastalığın bahçedeki yaygınlığı tespit edilmiştir.

### Hasta bitki materyalinin toplanması ve muhafazası

İnceleme yapılan bahçelerde karakteristik olarak bakteriyel kanser belirtilerini gösteren ağaçların dal ve sürgünleri, belirtilerin bittiği kahverengi dokunun yaklaşık

15 cm altından kesilmiş etiketli polietilen torbalara konularak paketlenmiş ve torbaların ağızları kapatılarak serin yerde muhafaza edilmişlerdir. Kesim işlemlerinde kullanılan makaslar her defasında %1'lik NaOCl veya %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Örnekler kullanılmaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

### **Bakteriyel kanser etmeninin izolasyonu**

Bakteriyel kanser belirtisi gösteren örneklerin hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içeren 0.5 cm'lik bitki parçaları %70'lik etil alkol veya %1'lik NaOCl ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Parçalar steril havanda %0.85 NaCl içeren saline buffer da homojenize edilmiştir. Elde edilen ekstraktan bir öze dolusu alınarak King B (20 g Proteose peptone, 1.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 1.5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10 ml Glycerol, 15 g Agar, 1000 ml Saf su, pH= 7.2) (King et al. 1954) besi yeri içeren petrilere çizgi ekimiyle çizilmiştir. Petrilere 25°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Gelişen krem renkli koloniler saflaştırılmış ve gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik olarak hazırlanmış YDC ortamında +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Lelliott and Stead 1987).

### **Patojenisite testinde kullanılan bakteri popülasyonunun hesaplanması**

King B besi yerinde geliştirilen 24-48 saatlik bölge izolatları ve referans kültür spektrofotometrede 600 nm 0.1 absorbans değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlardan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml steril su bulunan tüplerde 7 kez seri sulandırmalar yapılmıştır. Her bir sulandırmada içerisinde King B besi yeri bulunan petrilere 100 µl süspansiyon koyulmuş ve bir baget yardımı ile besi yeri üzerine yayılmıştır. Her seyreltmeden üç tekrerrür olacak şekilde petrilere yayılmıştır. 25°C'de 48 saat inkübasyondan sonra petrilere gelişen koloniler sayılarak ml'deki bakteri hücre sayısı (koloni sayısı x örneğin seyreltme serisi x 10) hesaplanmıştır (Klement et al. 1990).

### **Patojenisite testi**

Lelliott and Stead (1987)'e göre hastalıklı kiraz dokularından izole edilen bakteri izolatlarının patojenitesi yapılmıştır. Patojenite testlerinde 10<sup>8</sup> hücre/ml inokulum yoğunluğu kullanılmıştır. Ziraat 900 çeşidinin dikili olduğu bölgelerden çiçek demetleri alınarak patojenisite testlerinde kullanılmıştır. Patojenisite testlerinde pozitif kontrol olarak *P. syringae* pv. *syringae* referans kültürü, negatif kontrol olarak ise steril su kullanılmıştır.

**Çiçek demetlerine püskürtme:** Sağlıklı kiraz ağaçlarından 20-25 cm uzunluğundaki henüz açılmamış çiçek demetleri su içeren erlenlere konulmuştur. Hazırlanan bakteri süspansiyonu bir el pülverizatörü yardımıyla çiçek demetlerine 1 ml olacak şekilde püskürtülmüştür. Yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur. İnokulasyondan bir gün sonra bitkiler nem çemberinden alınmıştır. İnokulasyondan sonra 25 °C ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarına koyularak hastalık belirtisinin ortaya

çıkması için beklenmiştir. İnokulasyondan 8-10 gün sonra izolatların patojen olup olmadığını belirlemek için çiçekteki tipik leke oluşumuna göre hastalık var/yok olarak değerlendirilmiştir.

### Re-izolasyon

İnokulasyon yapılan açılmamış çiçek demetlerinde meydana gelen kahverengilikler ve kurumalar incelemeye alınmıştır. Örnekler küçük parçalara ayrılmış ve %70 etil alkol ile yüzeyden dezenfeksiyon edilmiştir. Porselen havan içerisine konulan örneklerle 2 ml steril saline buffer eklenerek süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bakterinin saline buffer süspansiyonuna geçmesi sağlamak için havanlar 15-20 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonunda içerisinde King B besiyeri bulunan petrilere üç çizgi yöntemine göre çizimler yapılmıştır (Janse 2006). İzolasyon petrilere 25 °C'de 48 saat süreyle inkubasyona bırakılmıştır. King B agar besi yerinde küçük yuvarlak ve kabarık tipte olmayan krem renginde gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Belirti veren bitkilerden elde edilen re-izolatlar cam tüplerde eğik olarak hazırlanmış Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agar (YDCA) besi yerine çizimleri yapılarak tanı çalışmaları yapılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

### Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısı

Yüzelli hasta bitkiden izole edilen 400 izolat içinden seçilen 60 adet re-izolat ile tanı çalışmaları yapılmıştır. Lelliott and Stead (1987) ile Schaad et al. (2001)'e göre geleneksel yöntemlerle tanısı yapılmıştır. KOH ile gram reaksiyonu ve LOPAT (**L**: levan oluşumu, **O**: oksidaz testi, **P**: patatestte pektolitik aktivite, **A**: arginin dehidrolaz aktivitesi, **T**: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu) ve GATTa (**G**: Jelatin hidrolizi, **A**: Esculin hidrolizi, **T**: Tyrosine kullanma, **Ta**: Tartarik asidi kullanma) testlerinin sonucuna göre izolatların tanıları yapılmıştır. Çalışmada *P. syringae* pv. *syringae*'nin referans kültürü ile her bir test için pozitif ve negatif sonuç veren referans bakteri kültürleri kullanılmıştır.

### Bakteri izolatlarının PCR testi ile tanısı

Tekirdağ ilinden elde edilen 60 adet izolatın PCR ile tanısı yapılmıştır. İzolatlar nutrient broth sıvı besi yerinde geliştirilmiş ve De Boer and Ward (1995)'e göre saflaştırılmış genomik DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmıştır. PCR çalışmalarında *syrB* gen primer B1 (5'-CTTCCGTGGTCTTGAGG-3') ve *syrB* gen primer B2 (5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3') (Bereswill 1992) ile *cfl* gen primer CFLF (5'-GGCGCTCCCTCGACTT-3') ve *cfl* gen primer CFLR (5'-GGTATTGGCGGGGTGC-3') (Abbasi et al. 2013) primer setleri kullanılmıştır. Çalışma reaksiyon tüpüne 12.5 µl PCR master mix, 2.0 µl 20 pmole primer 1 ve primer 2, 6.5 µl H<sub>2</sub>O, 2.0 µl g-DNA içeren 25 µl hacmindeki karışımın kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. B1 ve B2 primerlerinin PCR işlemi için kullanılan program; ilk denatürasyon 94°C'de 4 dk., 35 döngü 94°C'de 1 dk., 60°C'de 1.5 dk., 72°C'de 1.5 dk., final extension 72°C'de 10 dk. olarak PCR cihazına programlanmıştır. CFLF ve CFLR primerlerinin PCR işlemi için kullanılan programı ise ilk denatürasyon 93°C'de 4 dk., 37 döngü 93°C'de 1 dk., 52°C'de 2

dk., 72°C'de 1.5 dk., final extension 72°C'de 10 dk. olarak PCR cihazına programlanmıştır. Elde edilen bakteri DNA'sının ve PCR ürünlerinin agaroz jel elektroferezine yönelik çalışmalar Sambrook et al. (1989)'a göre yapılmıştır. Bunun için 0.9 g agarose 90 ml 1 X TAE tamponuna konularak mikrodalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulan solüsyon, taraklar yerleştirilen jel tepsisine dökülmüştür. Agaroz jelin donmasından sonra jel tankı içerisine jeli örtünceye kadar 1 X TAE buffer konmuştur. Örnek koymak için kullanılan tarak dikkatlice çekilip çıkartılmış, jel çukurlarına 3 µl loading buffer ve 12 µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımı ile dikkatlice verilmiştir. Moleküler ağırlık işaretleyici (Marker) olarak 100 bp DNA işaretleyici kullanılmıştır. PCR ürünleri 100 V elektrik akımıyla yaklaşık 1 saat süre ile yürütülmüştür. Bantların görülmesi için ethidium bromür ile 10 dk. boyama yapılmış ve 15 dk. saf su ile jel yıkandıktan sonra transillüminatörde bantlar incelenmiştir.

### **Bakteri izolatlarının yağ asit profillerine göre tanısı**

Çalışmanın bu kısmı Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde (Hatay) Prof. Dr. Soner SOYLU tarafından yapılmıştır. Bakteri hücrelerinden yağ asitleri izolasyonu aşağıda belirtildiği üzere De Boer and Sasser (1986)'in yöntemine göre yapılmıştır. On beş adet Tekirdağ ili izolatının tanısında Mikrobiyal İdentifikasyon Sisteminin (MIS) bilgisayar paket programı kullanılıp (Sherlock MIS version 4.5 Microbial ID. Inc. Newark, Delaware) izolatların içerdiği yağ asit türleri ve yüzde oranları karşılaştırılarak tanı yapılmıştır.

## **SONUÇLAR VE TARTIŞMA**

### **Hastalık etmeninin izolasyonu**

Tekirdağ çevresinde bakteriyeel kanser belirtisi gösteren 150 adet bitki örneğinden hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içeren 1-2 mm'lik parçalardan King B besi yerine yapılan izolasyonlarda 2-3 gün içinde krem-beyaz renkte kolonilerden 400 adet bakteri izolatu elde edilmiş ve tanı testleri yapılmak için tesadüfi olarak 60 adet izolat kullanılmıştır. Bu izolatlar YDCA besi yerine çizimleri yapılarak tanı çalışmaları yapılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

### **Patojenisite testinde kullanılan bakteri popülasyonunun hesaplanması**

King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik izolatlar spektrofotometrede 600 nm 0.1 absorbans değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmış ve yapılan seyreltme serilerinden besi yerinde gelişen koloniler sayılarak ml'deki bakteri popülasyonu  $7 \times 10^8$  hücre/ml yoğunluğunda olduğu hesaplanmıştır (Klement et al. 1990, Bülbül 2014).

### **Patojenisite testi**

Seçilen 60 adet bölge izolatu ve referans kültür ile yapılan patojenisite testlerinde tüm izolatlar inokulasyondan sonra 8-10 gün içerisinde kiraz çiçek yanıklığına neden

olmuştur. Sürgün demetlerinde yapılan inokulasyonlar sonucunda 10-15 gün içerisinde sürgün yapraklarında kahverengileşme, içe doğru kıvrılma ve yanıklık belirtileri ortaya çıkmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan steril su ile yapılan çiçek inokulasyonlarında ise herhangi bir belirti gözlenmemiştir.

### Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısı

Hastalık belirtisi gösteren kiraz bahçelerinden izole edilen 60 adet bölge izolatu ve bir referans izolat olmak üzere 61 adet re-izolatla yapılan tanı çalışmaları sonucunda tüm izolatların koloni morfolojilerinin benzer olduğu saptanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Bakteri izolatlarının test sonuçları

İzolat Adı	Gram Reaksiyon	F	L	O	P	A	T	G	A	T	Ta	PCR		Tanı Sonucu
												<i>cfl</i>	<i>syfB</i>	
Naip 1/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 1/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 1/3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 1/4	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 2/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 2/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 2/3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 2/4	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 2/5	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Naip 3/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 3/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 3/3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 4/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 4/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 5/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 5/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 6/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 6/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Naip 6/3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Mermer 1/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Mermer1/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Mermer 1/3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Mermer 1/4	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Mermer 1/5	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Merkez 1/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Merkez 1/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Merkez 2/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Merkez 2/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Merkez 2/3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Kumbağ 1/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Kumbağ 1/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Kumbağ 2/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Kumbağ 3/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm

Çizelge 1. Bakteri izolatlarının test sonuçları (devamı)

İzolat Adı	Gram Reaksiyon	F	L	O	P	A	T	G	A	T	Ta	PCR		Tanı Sonucu
												<i>efl</i>	<i>syrB</i>	
Kumbağ 3/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Karahisarlı 1/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Karahisarlı 1/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Karahisarlı 1/3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Çanakçı 1/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Çanakçı 1/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Barbaros 1/1	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Barbaros 1/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 1/3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 1/4	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 1/5	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 2/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 2/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 2/3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 3/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 3/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 3/3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 3/4	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 3/5	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Kumbağ 2/2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Kumbağ 2/3	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
Kumbağ 2/4	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm
M.ereğlisi 1/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
M.ereğlisi 1/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Yeniçiftlik 1/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Yeniçiftlik 1/2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss

F: Floresan pigmentasyon, L: Levan oluşumu, O: Oksidaz reaksiyonu, P: Pektolitik aktivite, A: Arginin dehidrolaz, T: Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu, G: Jelatin hidrolizi, A: Esculin hidrolizi, T: Tyrosine kullanma, Ta: Tartarik asidi kullanma, Pss: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Psm: *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*

Çizelge 1'de de görüldüğü üzere tanı çalışmaları esnasında yapılan LOPAT karakterizasyonuna göre seçilen izolatların tamamı +,-,-,-,+ özellik göstererek *Pseudomonas syringae* olduğu ortaya konulmuştur. Bu test sonuçları Lelliott and Stead (1987) ile Schaad et al. (2001) tarafından da desteklenmektedir. Ayrıca elde edilen re-izolatların tanımlarının yapılmasında GATTa testinin mutlaka yapılması gerekmektedir. Re-izolatlar GATTa testi sonuçlarına göre iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup içerisinde yer alan 28 adet (Naip 3/1, Naip 3/2, Naip 3/3, Naip 4/1, Naip 4/2, Naip 5/1, Naip 5/2, Naip 6/1, Naip 6/2, Merkez 1/1, Merkez 1/2, Merkez 2/1, Merkez 2/2, Merkez 2/3, Kumbağ 1/1, Kumbağ 1/2, Kumbağ 2/1, Kumbağ 3/1, Kumbağ 3/2, Karahisarlı 1/1, Karahisarlı 1/2, Karahisarlı 1/3, Çanakçı 1/1, Çanakçı 1/2, Barbaros 1/1, Kumbağ 2/2, Kumbağ 2/3, Kumbağ 2/4) izolat -, -, +, + sonuç



vermiş ve bu şekilde reaksiyon verenler *P. syringae* pv. *morspurunorum* olarak tanılanmıştır. Geriye kalan 32 adet (Naip 1/1, Naip 1/2, Naip 1/3, Naip 1/4, Naip 2/1, Naip 2/2, Naip 2/3, Naip 2/4, Naip 2/5, Naip 6/3, Mermer 1/1, Mermer 1/2, Mermer 1/3, Mermer 1/4, Mermer 1/5, Barbaros 1/2, Barbaros 1/3, Barbaros 1/4, Barbaros 1/5, Barbaros 2/1, Barbaros 2/2, Barbaros 2/3, Barbaros 3/1, Barbaros 3/2, Barbaros 3/3, Barbaros 3/4, Barbaros 3/5, Marmaraereğlisi 1/1, Marmaraereğlisi 1/2, Yeniçiftlik 1/1, Yeniçiftlik 1/2, Yeniçiftlik 2/1) izolat ise GATTa sonuçları +, +, -, - olarak belirlenmiş ve *P. syringae* pv. *syringae* olarak tanılanmıştır. Benzer olarak Ivanovic et al. (2009), Kaluzna et al. (2010), Gavrilovic et al. (2012) ve Ertimurtaş ve ark. (2014) gibi birçok araştırmacı da izolatlar arasındaki farkların ortaya konması ve tanılanması çalışmalarında GATTa testinin kullanılmasının uygun olacağını belirtmişler ve elde ettiğimiz sonuçlar bu araştırmacıların çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

### **Bakteri izolatlarının PCR ve yağ asit metil ester testleriyle tanısı**

DNA izolasyonu işleminden sonra elde edilen genomik DNA'lar %1'lik agaroz jele verildiğinde bantların oluşmasına göre değerlendirilmiştir. Saflaştırılan genomik DNA'lar ile B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR testlerinde Çizelge 1'de de görüldüğü üzere 32 re-izolatın (Naip 1/1, Naip 1/2, Naip 1/3, Naip 1/4, Naip 2/1, Naip 2/2, Naip 2/3, Naip 2/4, Naip 2/5, Naip 6/3, Mermer 1/1, Mermer 1/2, Mermer 1/3, Mermer 1/4, Mermer 1/5, Barbaros 1/2, Barbaros 1/3, Barbaros 1/4, Barbaros 1/5, Barbaros 2/1, Barbaros 2/2, Barbaros 2/3, Barbaros 3/1, Barbaros 3/2, Barbaros 3/3, Barbaros 3/4, Barbaros 3/5, Marmaraereğlisi 1/1, Marmaraereğlisi 1/2, Yeniçiftlik 1/1, Yeniçiftlik 1/2, Yeniçiftlik 2/1) %1 agaroz jel üzerinde 752 bp baz uzunluğunda oluşturarak *P. syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmıştır. CFLF-CFLR primerleri ile yapılan PCR çalışmasında ise re-izolatların 28 adedi (Naip 3/1, Naip 3/2, Naip 3/3, Naip 4/1, Naip 4/2, Naip 5/1, Naip 5/2, Naip 6/1, Naip 6/2, Merkez 1/1, Merkez 1/2, Merkez 2/1, Merkez 2/2, Merkez 2/3, Kumbağ 1/1, Kumbağ 1/2, Kumbağ 2/1, Kumbağ 3/1, Kumbağ 3/2, Karahisarlı 1/1, Kirahisarlı 1/2, Karahisarlı 1/3, Çanakçı 1/1, Çanakçı 1/2, Barbaros 1/1, Kumbağ 2/2, Kumbağ 2/3, Kumbağ 2/4) %1 agaroz jel üzerinde 650 bp baz uzunluğunda oluşturarak *P. syringae* pv. *morspurunorum* olarak tanımlanmıştır. Klasik testler sonucu elde edilen bulgularla PCR sonucu elde edilen tanı sonuçları birbiri ile benzerlik göstermektedir. Çalışmalarda elde ettiğimiz gerek tanı ve gerekse karakterizasyon bulgularımız Abbasi et al. (2013), Albelleria et al. (2014) ve Bülbül (2014) gibi araştırmacıların sonuçlarını desteklemektedir. Sekiz adet bölge izolatı ile yapılan tüm hücre yağ asit analizlerine göre izolatların %62-90 arasında değişen oranlarda *P. syringae* pv. *syringae* oldukları belirlenmiştir. Marmara bölgesinde kirazlarda bakteriyel kanser hastalığına neden olan *P. syringae* izolatlarından 36 adet farklı yağ asidi elde edilmiştir. İzole edilen yağ asitleri Çizelge 2'de de görüldüğü gibi doymuş (10:0, 11:0, 12:0, 13:0, 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, ve 19:0), doymamış (16:1 w5c, 17:0 w8c, 18:1 w5c, 18:1 w7c 11-methyl20:1 w7c ve 20:4 w6, 9, 12, 15c), hidroxy asit (10:2OH, 10:0 3OH, 11:0 2OH, 11:0 3OH, 12:0 2OH, 12:0 3OH ve 15:0 2OH), methyl branched (11:0 ISO 3OH, 13:0 ISO, 16:0 ISO, 17:0 ISO, 17:0 ANTEISO ve 18:0

ISO), cyclopropane (17:0 CYCLO ve 19:0 CYCLO w8c) 6 tane Sum in features (2, 3, 5, 6, 7, 8) olmak üzere 6 grup olduğu belirlenmiştir. Genelde izolatların yağ asidi çeşidi ve miktarı açısından büyük benzerlikte olduğu görülmektedir. 10:012:0, 12:0 2OH, 12:0 3OH, 14:0, 16:0, 16:0 ISO, 16:1 w5c, 17:0, 17:0 ISO, 17:0 CYCLO, 17:0 w8c, 18:1 w5c Sum in Feature 3 (16:1 w7c/16:1 w6c) yağ asitlerinin tüm izolatlarda bulunduğu belirlenmiştir. Diğer yağ asitleri açısından değişen oranlarda farklılıklar elde edilmiştir.

Çizelge 2. Tekirdağ ili kiraz izolatlarından elde edilen yağ asidi kompozisyonu

Yağ Asidi	Dağılım Aralığı	Ortalama	Standart Sapma
10:0	0.13-0.17	0.15	0,01
10:0 2OH	0.06-2.72	0.45	1.00
10:0 3OH	2.62-3.21	2.80	0.19
11:0	0.05-0.06	0.06	0.01
11:0 2OH	0.06-0.09	0.08	0.01
11:0 ISO 3OH	0.06-0.19	0.10	0.05
11:0 3OH	0.11-0.19	0.16	0.03
12:0	4.91-6.09	5.27	0.35
12:0 2OH	2.93-3.46	3.10	0.17
12:0 3OH	4.61-5.62	4.90	0.32
13:0	0.09-0.13	0.11	0.01
13:0 ISO	0.04-0.12	0.07	0.03
14:0	0.23-0.30	0.27	0.02
15:0 2OH	0.07	-	-
16:0	21.90-25.42	23.33	1.12
16:0 ISO	0.10-0.21	0.16	0.04
16:1 w5c	0.09-0.10	0.09	0.00
17:0	0.36-0.50	0.43	0.05
17:0 ISO	0.16-0.82	0.45	0.29
17:0 ANTEISO	0.16-0.23	0.17	0.06
17:0 CYCLO	2.08-3.14	2.56	0.38
17:0 w8c	0.19-0.24	0.22	0.02
18:0	0.61-1.23	0.97	0.20
18:0 ISO	0.06-0.10	0.08	0.02
18:1 w5c	0.08-0.10	0.09	0.01
18:1 w7c 11-Methyl	0.18-0.59	0.32	0.14
19:0	0.05-0.07	0.06	0.01
19:0 CYCLO w8c	0.11-0.16	0.13	0.02
20:1 w7c	0.06-0.10	0.08	0.02
20:4 w6, 9, 12, 15c	0.06-0.09	0.07	0.01
Sum In Feature 2	0.05	-	-
Sum In Feature 3	32.81-36.75	34.49	1.19
Sum In Feature 5	0.04-0.07	0.06	0.01
Sum In Feature 6	0.04-0.04	0.04	0.00
Sum In Feature 7	1.02-1.53	1.23	0.16
Sum In Feature 8	15.34-19.85	18.22	1.46
Summed Feature 2	12:0 ALDEHYDE/unknwn 10.9525		
Summed Feature 3	16:1 w7c/16:1 w6c		
Summed Feature 5	18:0 ANTE/18:2 w6,9c		
Summed Feature 6	19:1 w11c/19:1 w9c		
Summed Feature 7	19:1 w7c/19:1 w6c/19:1 19cy		
Summed Feature 8	18:1 w7c		

Bu çalışma kapsamında Tekirdağ ilinde kiraz üretiminin yapıldığı Naip, Merkez, Mermer, Marmaraeğlisi, Yeniçiftlik Kumbağ, Karahisarlı, Çanakcı, Barbaros yörelerinde 23 adet kiraz alanı ziyaret edilmiş ve 150 adet ağaçtan hastalık şüphesiyle örnek toplanmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu 400 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Elde edilen izolatların *Pseudomonas syringae* olduğu LOPAT, patojenite, GATTa testleri gibi klasik tanı testleri yapılarak belirlenmiştir.

İzolatların patojenik varyete düzeyinde tanısı *syrB* ve *cfl* genlerine göre dizayn edilen primerler (B1, B2, CFLF, CFLR) kullanılarak desteklenmiştir. Yapılan tanı çalışmaları sonucunda patojenin PCR ile tanılanmasında *syrB* ve *cfl* genleri kullanılarak 60 izolatın 32 tanesi *P. syringae* pv *syringae*, 28 tanesi ise *P. syringae* pv. *morsprunorum* olarak belirlenmiştir.

Bülbül (2014), Tekirdağ ili bahçelerinde yaptığı sürveyler sonucunda bakteriyel kanser hastalığının bahçelerde yaygınlığını %100, hastalık bulunma oranını %17.4-57.1, hastalık şiddetini ise %28.5-50.7 arasında değişen oranlarda belirlemiştir. Bölge için önemli bir hastalık olan bakteriyel kanserin yapılan çalışmada da bahçelerde önemli kayıplara neden olduğu görülmüştür.

Kiraz bahçelerinde yapılan sürveylerde, budanan hastalıklı dalların bahçe içerisinde bırakıldığı görülmüştür. Bahçedeki hastalıklı dalların etmenin bir sonraki döneme taşınmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan sürvey sonucu elde edilen izolatların çeşitli testlerle tanısı yapılmış ve bölgede hastalığa neden olan *P. syringae* pv. *syringae* ve *P. syringae* pv. *morsprunorum* patojenik varyetelerinin varlığı tespit edilmiştir.

Hastalıkla mücadele için Tekirdağ ilinde kiraz üretim alanlarında hastalıklı ağaçlar yok edilerek inokulum kaynakları ortadan kaldırılmalıdır. Yeni bahçe tesisi esnasında hastalığın bulunma bölgeleri göz önüne alınarak yer seçimi yapılmalıdır. Çevredeki inokulum kaynakları yok edilmeden yeni bahçe tesisine gidilmemelidir.

## TEŞEKKÜR

Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (NKUBAP.00.24.AR.15)'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Abbasi V., Rahimian H. and Tajick-Ghanbari M.A. 2013. Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 225-235.
- Albelleira A., Ares A., Augin O., Picoaga A., Lopez M.M. and 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 The American Phytopathological Society, St. Paul, MN., USA.
- Anonim 2008. Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel yanıklık hastalığı. *Zirai Mücadele Teknik Talimatları*, Ankara, Cilt 4, 66-68.
- Anonim 2016. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Anonymous 2014. [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org). Dünya kiraz üretimi. (Erişim tarihi: 20.03.2016)
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W. and Geider K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 3522-3526.
- Bülbül M. 2014. Tekirdağ' da kiraz dal kanseri hastalığına neden olan bakteriyel etmenlerin izolasyonu, tanısı ve yaygınlığı. Yüksek lisans tezi, N.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 55 s.
- Burak M. 2003. Meyvecilik-1. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Teşkilatlanma ve Destekleme Genel Müdürlüğü Çiftçi Eğitim ve Yayın Serisi. Sert çekirdekli meyveler, 147-151. Semih ofset matbaacılık yayıncılık ve ambalaj, Türkiye.
- De Boer S.H. and Sasser M. 1986. Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* on the basis of cellular fatty acid composition. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, 796-800.
- De Boer S.H. and Ward L.J. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, 85, 854-858.
- Ertimurtaş D. and Özaktan H. 2014. Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel kansere neden olan *Pseudomonas syringae* pathovarlarının tanısı. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya, 194 s.
- Gardan L., Shafik H., Belouin S., Broch R., Grimont F. and 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. and Obradovic A. 2012. Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pesticides and Phytomedicine*, 27 (3), 201-229.
- Gavrilovic V., Zivkovic S., Dolovac N., Trkulja N., Dolovac E.P., Popovic T. and Ivanovic D. 2012. *Pseudomonas syringae* pathogen of sweet cherry in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine*, 27 (2), 141-149.

- Görmez A. 2011. Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit rekasyonları. IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş, 328 s.
- Ivanovic Z., Zivkovic S., Starovic M., Josic D., Stankovic S. and Gavrilovic V. 2009. Diversity among *Pseudomonas syringae* strains originating from fruit trees in Serbia. Archives of Biological Science, 61 (4), 863-870.
- Janse J.D. 2006. Phytobacteriology. Principles and Practice. Wallingford, UK and Oxford Press, New York, 208-209.
- Kaluzna M., Ferrante P., Sobiczewski P. and 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. and 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. Journal of Plant Pathology, 94 (1), 117-126.
- Kennely M.M., Cazorla F.M., Vicente A., Ramos C. and Sundin G.W. 2007. *Pseudomonas syringae* disease on fruit trees. Plant Disease, 91 (1), 4-17.
- King E.O, Ward M.K. and Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Clin. Med. 44, 301-307.
- Klement Z., Rudolph K. and Sands D.C. 1990. Methods in Phytobacteriology, Akademia Kiado, Budapest, XIV+568p.
- Lazarov A., 1961. Karantina na rastenijata Zemizdat, Sofia. 207-213 p.
- Lelliot R.A. and Stead D.E. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Mirik M., Baloğlu S., Aysan Y., Çetinkaya Yıldız R., Küsek M. and Şahin F. 2005. First outbreak and occurrence of citrus blast disease, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on orange and mandarin trees in Turkey. Plant Pathology, 54 (2), 238.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p.
- Schaad N.W., Jones J.B. and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN., USA.