

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**EDİRNE’de CEVİZ BAKTERİYEL YANIKLIĞI HASTALIĞININ YAYGINLIĞI ve**  
**ETMENİN TANISI**

**Seçil Hande AVCI**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Mustafa MİRİK**

**Tekirdağ 2017**

**Her hakkı saklıdır**

Doç. Dr. Mustafa MİRİK danışmanlığında, Seçil Hande AVCI tarafından hazırlanan “Edirne’de Ceviz Bakteriyel Yanıklık Hastalığının Yaygınlığı ve Etmeninin Tanısı ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Doç. Dr. Mustafa MİRİK

*İmza:*

Üye: Prof. Dr. Yeşim AYSAN

*İmza:*

Üye: Yard. Doç. Dr. Adnan KARA

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EDİRNE’de CEVİZ BAKTERİYEL YANIKLIK HASTALIĞININ YAYGINLIĞI ve  
ETMENİN TANISI

**Seçil Hande AVCI**

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Mustafa MİRİK

Ceviz (*Juglans regia* L.), besin değeri yüksek meyvesi ve mobilya endüstrisinde kullanılan ağacı dolayısıyla meyve türleri arasında büyük önem taşır. Ülkemizde ceviz üretimi son zamanlarda önemli bir seviyede artış göstermiştir. Bununla birlikte son yıllarda Trakya bölgesinde *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*’ in neden olduğu ceviz bakteriyel hastalığı epidemi yaptığı görülmüştür. Bu çalışmada bakteriizolasyonu ve tanısı 2014-2016 yıllarında Edirne ili ceviz bahçelerinden toplanan hastalıklı ceviz örneklerinden yapılmıştır. Hastalık belirtileri, yapraklarda su emmiş lekeler, yaprak ve meyvede etrafı sarı-yeşil hale ile çevrili içe çökük, koyu kahverengi-siyah nekrotik lekelerdir. Yapılan araştırmalarda, hastalığın yaygınlığı belirlenmiştir. Survey sırasında 62 adet hastalıklı bulaşık bitki örneği toplanmış ve laboratuvar çalışmaları sonucu bu örneklerden 104 adet ceviz bakteriyel yanıklık hastalığı izolatu elde edilmiştir. Ceviz bakteriyel yanıklık etmeni biyokimyasal, patojenite, morfolojik, fizyolojik yöntemlerle tanılanmıştır. Yapılan çalışmalarda Edirne ilinde gezilen ceviz bahçelerinden %28.65’inde hastalığa rastlanmış ve bu bahçelerde hastalığın yaygınlık oranı %86 olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler :** *Juglans regia*, ceviz, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, ceviz bakteriyel hastalığı, LOPAT.

2017, 50 Sayfa

## **ABSTRACT**

MSc. Thesis

### **PREVALANCE of BACTERIAL BLIGHT of WALNUT and IDENTIFICATION of AGENT in EDİRNE**

**Seçil Hande AVCI**

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Walnut (*Juglans regia* L.), has great importance in agriculture due to its high nutritional value and the usage in the furniture industry. Walnut production was increasing in significant level in Turkey. Recently, severe incidence of walnut blight disease caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in walnut orchards in Trace region of Turkey. In this study, bacterial isolation and identification from diseased walnut samples, obtained from walnut orchards in Edirne, were made in 2014- 2016 growing seasons. Disease symptoms were characterized by small water-soaked spots on the leaves turning with age into angular, sunken, deep-brown to black necrotic lesions which were often surrounded by a yellow-green halo on leaves and fruits. During the survey, prevalence of bacterial blight of walnut disease was determined. Sixty two infected plant samples were collected during the survey studies. Hundred and four bacterial isolates were obtained from diseased samples. Bacterial disease agent was identified according to biochemical, pathogenicity, morphological, physiological methods. The prevalence of bacterial blight of walnut disease was determined as 86% and the incidence ratio was 28.65% in all surveyed walnut fields.

**KeyWords :** *Juglans regia*, walnut, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, bacterial walnut blight, LOPAT.

**2017, 50 Page**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<u>Sayfa No</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	<b>v</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETLERİ</b> .....	<b>9</b>
2.1. Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Hastalığının Yaygınlığı.....	9
2.2. Hastalık Etmeninin Tanısı.....	10
2.3. Hastalığın Mücadelesi.....	13
<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>15</b>
3.1. Materyal.....	15
3.2. Metot.....	15
3.2.1. Edirne’de Hastalığın Yaygınlığının Tespiti.....	15
3.2.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması.....	16
3.2.3. Bakteriyel Yanıklık Etmeninin İzolasyonu.....	17
3.2.4. Patojen Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması.....	17
3.2.5. Patojenite Testi .....	18
3.2.6. Re-İzolasyon ve Re-İzolatların Eldesi.....	20
3.2.7. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı..	21
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b> .....	<b>25</b>
4.1. Ceviz Bakteriyel Yanıklık Hastalığının Yaygınlığı.....	25
4.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması.....	26

4.3. Bakteriyel Yanıklık Etmeninin İzolasyonu.....	29
4.4. Patojen Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması.....	31
4.5. Patojenite Testi, Re-İzolasyon ve Re-İzolatlarının Eldesi.....	31
4.6. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı...	32
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>38</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>40</b>
<b>7. TEŞEKKÜR .....</b>	<b>47</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>48</b>
<b>9.EKLER.....</b>	<b>49</b>

## ÇİZELGE DİZİNİ

## Sayfa No

Çizelge 1.1. Dünya Ceviz Üretimi (FAO, 2015).....	2
Çizelge 1.2. Türkiye’de 1992-2013 yıllarında ceviz ağaç sayısı ve üretim miktarı.....	2
Çizelge 1.3. Türkiye’de 2013 yılı verilerine göre il bazında ceviz üretimi.....	3
Çizelge 4.1. Edirne ili ve ilçelerinde bulunan ceviz bahçelerinden toplanan örnek sayısı.....	25
Çizelge 4.2. Edirne ili ve ilçelerinde surveylenen ceviz bahçeleri, toplanan örnek sayısı ve izolat isimleri.....	27
Çizelge 4.3. Edirne ili ceviz bahçelerinde hastalık yaygınlığı, oranı ve şiddeti.....	28
Çizelge 4.4. Tanı çalışmaları için seçilen ceviz izolatları.....	30
Çizelge 4.5. Bakteri izolatlarının test sonuçları.....	37

## ŞEKİL DİZİNİ

## Sayfa No

Şekil 1.1. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının dünya haritasında dağılımı.....	5
Şekil 3.1. Edirne ilinin Türkiye haritasındaki konumu.....	15
Şekil 3.2. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalık belirtilerini gösteren sürgün.....	17
Şekil 3.3. Bakteriyel süspansiyonların hazırlanması ve koloni sayımı.....	18
Şekil 3.4. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 'in yaprağa püskürtülmesi.....	19
Şekil 3.5. Ham ceviz meyvelerinin <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> ile bulaştırılması.....	20
Şekil 4.1. King B besi yerinde <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> gelişimi.....	29
Şekil 4.2. Patojenite testi sonucu yapraklarda ve ham meyvelerde oluşan hastalık belirtisi.....	31
Şekil 4.3. Şekil 4.3. KOH testi gram negatif reaksiyon.....	32
Şekil 4.4. Pektolitik Aktivite Testi sonucu çürüme görülmemiştir.....	33
Şekil 4.5. Oksidaz pozitif-negatif reaksiyon.....	34
Şekil 4.6. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> test izolatının tütün yaprağında oluşturduğu aşırı duyarlılık simptomsu.....	35
Şekil 4.7. Jelatin Testi poziti sonucu.....	35
Şekil 4.8. Nişasta Hidrolizasyon test sonucu.....	36



## 1.GİRİŞ

Bağ bahçe ürünlerinin üretim, tüketim ve ticareti yönünden önemli ülkeler arasında yer alan Türkiye, çok eski ve köklü bir meyvecilik kültürüne sahip olup birçok meyve türü yanında cevizin de yetiştirilebildiği uygun ekolojilere sahiptir. Ceviz ağacı uzun ömürlüdür; gençlik devresindeki kuvvetli büyüme gücü ve kuvvetli kökleri dolayısıyla yamaçlarda erozyona karşı ve yol kenarı ağaçlandırmalarında da kullanılır. Kuraklığa çok dayanıklı ve diğer meyve türlerine nazaran hastalık ve zararlılara daha dayanıklıdır (Ölez ve Yücel, 1974).

Ceviz (*Juglans regia* L.), botanikte Dicotyledoneae sınıfı Juglandales takımı, Juglandaceae familyası ve Juglans cinsinde yer alır. Juglans cinsi içerisinde, günümüzde özellikleri belirlenen 18 türden en önemlisi ve üstün meyve kalitesi ile ceviz denildiğinde ilk akla gelen, Anadolu cevizi, İran cevizi ve İngiliz cevizi olarak da adlandırılan *Juglans regia*'dir (Şen, 1986). Cevizin anavatanı, bazılarına göre İran'ın Ghilan bölgesi, bazılarına göre ise Çin'dir. Bunlara karşılık daha büyük bir çoğunluk ise cevizin anavatanı olarak çok daha geniş bir alanı göstermektedir. Bunu savunan gruba göre ceviz Karpat dağlarından Türkiye, Irak, İran, Afganistan, Güney Rusya, Hindistan, Mançurya ve Kore'ye kadar uzanan geniş bir bölgenin doğal bitkisidir.

Dünyada ceviz üretimi coğrafik olarak farklı bölgelere yayılmış durumdadır. Çizelge 1.1.'de görüldüğü gibi 2013 yılı verilerine göre Türkiye ceviz yetiştiriciliğinde üretim bakımından dünyada dördüncü sırada yer almaktadır (FAO 2015).

Çizelge 1.1 de'de görüldüğü gibi dünyada 2013 yılı ceviz üretimi 212.140ton olup bu üretimin yaklaşık %6'sı Türkiye' de yetiştirilmektedir.

**Çizelge 1.1. Dünya Ceviz Üretimi (FAO 2015)(Ton)**

Sıra*	Ülke	2010	2011	2012	2013
1	Çin	1.284.351	1.655.508	1.700.000	1.700.000
2	İran	433.630	389.985	450.000	453.988
3	A.B.D.	457.221	418.212	425.820	420.000
4	Türkiye	178 142	183 240	203 212	212 140
5	Ukrayna	87.400	112.600	96.900	115.800
6	Meksika	76.627	96.476	110.605	106.945
7	Şili	32.500	37.500	38.000	42.668
8	Hindistan	38.000	36.000	40.000	36.000
9	Fransa	31.737	38.314	36.476	33.716
10	Romanya	34.359	35.073	30.546	31.764
	<b>Dünya</b>	<b>2.943.573</b>	<b>3.307.729</b>	<b>3.425.834</b>	<b>3.458.046</b>

\*2013 yılı üretim miktarları göz önüne alınarak sıralama yapılmıştır.

**Çizelge 1.2. Türkiye’de 1992-2015 yıllarında ceviz ağaç sayısı ve üretim miktarı**

Yıllar	Meyve Veren Ağaç Sayısı(adet)	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı (adet)	Üretim (Ton)
2010	5.441.000	3.643.000	178 142
2011	5.594.000	4.045.000	183 240
2012	5.977.000	4.541.000	203 212
2013	6.526.000	4.878.000	212 140
2014	7.001.000	5.374.000	180 807
2015	7.596.000	5.560.000	190 000

Ülkemizde ceviz üretimi son yıllarda gerek ağaç sayısı gerekse üretim olarak sürekli artış göstermektedir. Çizelge 1.2’ de de görüldüğü gibi 2010 yılında meyve veren ağaç sayısı 5.441.000 ve meyve vermeyen ağaç sayısı 3.643.000adet iken 2015 yılında meyve veren ağaç sayısı 7.596.000ve meyve vermeyen ağaç sayısı ise 5.560.000 adet olması ülkemizde ceviz üretiminin her yıl arttığının bir göstergesi olmuştur. Aynı şekilde üretimde 2010 yılında 178 142ton üretilirken 2015 yılında 190.000ton ceviz üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2015).

Çizelge 1.3.' te de görüldüğü gibi il bazında ceviz üretiminde Bursa, Konya, Manisa ilk sıralarda yer almaktadır. Edirne ilindeki ceviz üretimi ise yıllık 1.674 ton olarak gerçekleşmektedir (TUIK 2013).

**Çizelge 1. 3.** Türkiye’de 2013 yılı verilerine göre il bazında ceviz üretimi

İller	Toplam Meyvelik Alanı (Dekar)	Meyve Veren Ağaç Sayısı	Üretim (Ton)
Bursa	21.466	177.525	6.863
Konya	9.000	145.243	5.471
Manisa	33.304	144.302	3.513
İzmir	3.122	124.289	3.340
Isparta	6.243	85.235	3.156
Amasya	3.965	61.350	2.737
Edirne	21.691	82.733	1.674
Tekirdağ	8.508	56.266	1.124

Ülkemizdeki ceviz üretimini tehdit eden pek çok bitki sorunları vardır. Fitopatolojik problemler arasında antraknoz gibi fungal hastalıkları yanında bakteriyel yanıklık (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) hastalığı hem ürün kayıplarına hem de ağaç ölümlerine neden olmaktadır.

Patojen ilk kez 1901 yılında Kaliforniya’ da Pierce tarafından izole edilmiş ve *Pseudomonas juglandis* olarak isimlendirilmiştir. Etmen daha sonraları *Bacterium juglandis*, *Phytomonas juglandis* ve *Xanthomonas juglandis* olarak isimlendirilmiştir. Etmen günümüzde fitopatojen bakteri pathovarlarının isimlendirildiği uluslararası standartlara göre *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* olarak isimlendirilmesi yapılmıştır (Dye ve ark.,1980). Vauterin ve ark (1995) filogenetik çalışmalar doğrultusunda patojenin *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* olarak isimlendirilmesini önermiştir.

Hastalık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, 0.4-0.7 x 0.7-1.8 µm boyutlarında, Gram negatif, polar kamçılı, çubuk biçimli ve aerobik, spor oluşturmeyen bir bakteridir (Bradbury, 1986). Bakterinin gelişmesi için optimum sıcaklık 28-32 °C iken, maksimum 37°C ve minimum 5-7°C’ de gelişim göstermektedir. Katalaz pozitif olup, karbonhidratlardan asit üretmektedir. Koloniler mukoid olup, YDC agar üzerinde sarı lekeli koloniler oluşmaktadır. Suda çözünmeyen sarı renkli pigmentleri (Xanthomonadine)

karakteristiktir. Seçici besi yeri olarak modifiye Tween ortamı önerilmektedir. (Lelliott ve Stead 1987, Schaad ve ark. 2001).

Etmen, kışı enfekteli dormant gözlerde geçirmesinden dolayı hastalık her yıl artış göstermektedir. Üretim alanında ilk enfeksiyonlar ilkbaharda bakterinin bu tomurcuklarda çoğalarak sürgünlere ve meyvelere geçmesiyle oluşur. Sekonder enfeksiyonlar ise etmenin yağmur damlaları ile yayılmasıyla gerçekleşir. Hastalık etmeni bir kez bitki dokusuna girince 10-15 gün içerisinde hastalığın tipik belirtileri oluşur ve her zaman yayılma eğilimindedir.

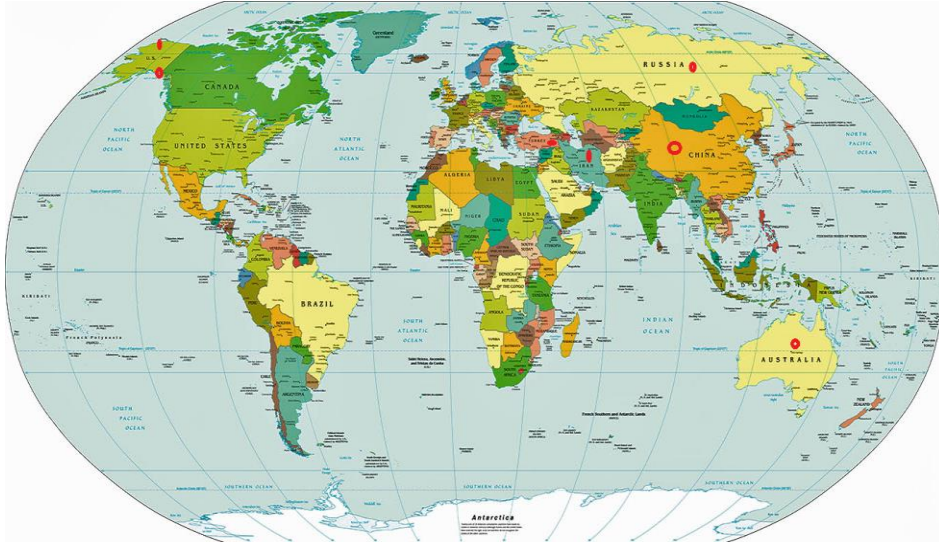
Patojen kışı uyur gözlerde geçirmekte (Miller ve Bollen, 1946; Mulrean ve Schroth, 1982), yağmur suları ve yağmurlama sulamayla yayılıp enfeksiyon yapmaktadır. İlkbaharda tomurcuk ve sürgün gelişimi sırasında, dormant gözlerin dışında bulunan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' in gözlerin iç kısımlarında ve gelişmekte olan meyvelerde enfeksiyona neden olmaktadır (Mulrean ve Schroth, 1982). Ağaçlar bütün büyüme mevsimi boyunca bakteri enfeksiyonuna duyarlıdır. Patojen, çiçekler, sürgün, yaprak, tomurcuk ve meyveleri de enfekte etmektedir (Rudolph, 1932; Miller ve Bollen, 1946). Rüzgarın sürüklediği yağmur damlaları gelişmekte olan meyvelerde önemli bir inokulum kaynağıdır (Stall ve ark 1993). Meyve enfeksiyonları büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Meyveler küçükken enfeksiyona uğrarsa önemli miktarda meyve dökümleri görülmektedir (Lang ve Evans, 2006).

Bakteriyel yanıklık etmeninin gelişimi bahar döneminde çevresel şartlara çok bağlıdır. Günlük nem oranı ve nemlilik periyodu süresince oluşan sıcaklık derecesinin birbiriyle etkileşimi çok önemlidir. Çiçeklenme sonrası meyve oluşumunu takiben 10 haftalık dönem içerisinde hastalık gelişimi için minimum 12-24 saat nem ve 15-25°C sıcaklık gereklidir. (Adaskaveg ve ark., 1994). Genellikle yeni meyve enfeksiyonları yaz döneminde görülmez (Radix ve ark., 1994).

Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığı etmeninin neden olduğu ilk belirtiler yapraklarda koyu yeşil, saydam veya su emmiş dairesel alanlar şeklindedir. Bakteri yaprağın parankima, orta damar, yan damarlar, damarcıklar ve yaprak sapı gibi bütün dokularına saldırırlar. Lezyonlar gelişip büyürken, lezyonun merkezi onu çevreleyen saydam veya su emmiş görünümde bir halka ile çevrilidir. Bu halkanın genişliği hastalığın gelişimine göre değişmektedir. Örneğin genç dokularda bu genişlik bir mm' den birkaç mm'ye varan büyüklüklerde olmaktadır. Patojen sağlıklı dokuda kolonizasyonunu durdurduğunda, bu halka tamamen ortadan kalkabilir. Yaşlanma ile lezyonlar daha derine ilerleyebilmekte ve yüksek

nem ve ayrılmış hücre içeriği ve/veya bakteri içeren su damlacıklarının varlığında lezyonlardan bakteriyel akıntı (ooze) meydana gelebilmektedir. Lezyonların boyutu ve genişliği birkaç mm'den meyve yüzey alanının yarısını kaplayacak büyüklükte olabilmektedir.

Ceviz bakteriyel yanıklığı dünya genelinde ceviz yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda ürün kaybına neden olan fitopatolojik bir sorundur. Hastalık başta Avustralya olmak üzere, Yeni Zelanda, Kuzey ve Güney Amerika, Çin, Rusya, İran, Irak, Güney Afrika, Arjantin ve cevizin yetiştirildiği birçok Avrupa ülkesinde görülmektedir (Şekil 1.1) (Bradbury 1986). Hastalığın ülkemizdeki varlığı konusunda başlangıçta bilimsel bir kayıt olmasa da Karadeniz bölgesinde bu hastalığın belirtilerinin görüldüğü belirtilmiştir (Karaca 1974). Özellikle Marmara bölgesinde kapama ceviz plantasyonlarının olduğu alanlarda hastalığın oldukça yıkıcı olduğu gözlenmiştir (Özaktan ve ark 2007).



**Şekil 1.1.** Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının dünya haritasında dağılımı

Meyve erken gelişme dönemlerinde meyve ucu nekrozu *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis*'in neden olduğu bakteriyel yanıklık hastalığı ile karıştırılabilmektedir. Erken çiçeklenme veya çiçek açma periyodunda cevizler bu patojenle enfekte olduğunda tipik lezyonlar meyve ucunda veya çiçek sapında görülmekte ve ilk gözle görülebilen belirtiler küçük su emmiş, bir yöne eğimli dairesel lekeler şeklindedir. Ceviz bakteriyel etmeni henüz olgunlaşmamış meyvelerde dökülmelere neden olmakta ve buda önemli ürün kayıplarına yol açmaktadır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda bazı araştırmacılar apikal nekrozu ceviz bakteriyel yanıklığında meydana gelen fizyolojik değişiklikler nedeniyle görüldüğünü

düşünmüşlerdir(Garcin ve Duchesne, 2001). Oysaki; yapılan son araştırmalar apikal nekroz semptomlarının bakteriyel yanıklık hastalığından farklı olduğunu ortaya koymuştur (Belisario ve ark., 2002; Moragrega ve ark., 2008). Bu nedenle, apikal nekroz ve ceviz bakteriyel yanıklılığının ayırt edilebilmesi için ceviz meyve gelişiminin erken dönemlerinde iç ve dış dokularda ayrıntılı incelemenin yapılması gerekmektedir. Araştırmacılar kahverengi apikal nekroz (BAN) hastalığında fusarium türlerinin de yer aldığı karmaşık bir hastalık olarak değerlendirilmesi gerektiğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda kahverengi apikal nekroz ile enfekteli ceviz meyvelerinden *Fusarium* türlerini yalnız veya *Alternaria* spp. ve *Colletotrichum* spp. ile izole etmişlerdir. Oysaki; *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in bu funguslarla bulaşık olmadan tek başına izole edildiğini bildirmişlerdir. (Arquero ve ark., 2005; Özaktan ve ark., 2009; Belisario ve ark.,2002; Belisario ve ark., 2002)

Meyvelerin erken gelişim dönemlerinde *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ile karıştırılan BAN için iki senelik arazi çalışmaları yapılmıştır. Yapılan bu araştırmalar sonucunda, özellikle Haziran ayında erken gelişim evrelerinde hastalık 'Hovard', 'Rendede', 'Hartley' çeşitlerinde daha fazla görülmüş ve bu çeşitlerin hastalığa daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Fakat aynı çalışma sonucunda 'Viva' ve 'Bilecik' çeşitlerinde hastalık daha az görülmüş ve bu çeşitlerin hastalığa daha dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir (Akat ve ark., 2016).

Ceviz bakteriyel yanıklılığı hastalığının etkilediği ceviz bahçelerinde %50' nin üzerinde ürün kaybına neden olduğu bilinmektedir (Moragrega ve ark 2007). Patojen sadece Juglans cinsine ait bitki türlerinde enfeksiyon yapmaktadır.

Ticari çeşitlerin çoğunun hastalığa karşı duyarlı olduğu saptanmıştır (Woesre ve ark 1992, Aleta ve Ninot 1993). Ceviz bakteriyel yanıklılığına karşı konukçu duyarlılığı yalnızca çeşitler arasında duyarlılık göstermekle kalmaz, aynı çeşidin farklı organlarının da etmene karşı farklı duyarlılık düzeyinde olduğu bilinmektedir (Mulrean ve Schroth 1982, Aleta ve ark 2001).

Birçok bakteriyel hastalığa karşı önerilen kimyasalların başında bakırlı preparatlar gelmektedir. Bakırlı preparatlarla hastalığın mücadelesi mümkün olsa da, etkililiği sınırlı kalmaktadır (Gardan ve ark., 1993; Teviotdale ve Viveros, 1999). Hastalıkla mücadele amacıyla, ceviz plantasyonlarında yoğun bakır kullanımı bakıra dayanıklı bir *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* popülasyonunun gelişmesine neden olmuştur (Gardan ve ark., 1993; Lee ve ark., 1993). Bakıra dayanıklı *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatları ilk

olarak Fransa ve Kuzey Kaliforniya da saptanmış (Gardan ve ark., 1993; Lee ve ark.,1993) ve bakıra tolerant *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatları Avustralya bahçelerinden alınan örneklerde tespit edilmiştir (Saravanan, 2007). Son yıllarda ABD ve Avrupa ülkelerinde bakıra dayanıklılık sorunu hastalıkla savaşımı daha da güç hale getirmiştir. Ayrıca, yıllardır yapılan yoğun bakır uygulamaları toprakta da bakır birikimine neden olarak çevre kirliliği de yaratmaktadır. Bu durumun bitkinin azotu metabolize etme yeteneğini azalttığı bilinmektedir (Radix ve ark., 1998). Uzun süre bakırlı kimyasalların kullanımı ile toprak mikrobiyal aktivitesinde ve ceviz bahçelerinde verimde azalma görüldüğü saptanmıştır (Radix ve Seigle-Murandi, 1993).

Kazanılan bakır dayanıklılığını kırmak amacıyla, biyolojik savaş ve bazı zararsız kimyasallar alternatif uygulamalar olarak önem taşıyabilir. Bu hastalığa karşı biyolojik savaş uygulamaları konusunda fazla bilgi bulunmamaktadır. Aktif organizması *Streptomyces lydicus* WYEC 108 nolu izolat olan Actinovate AG biyolojik preparatı cevizde bakteriyel yanıklık etmenine karşı kullanılmış ve %85'e kadar etkili bulunmuştur (Anonymus 2016b). Bu biyolojik preparat düşük dozda bakırlı preparatlarla birlikte kullanımının, bakırlı preparatların tek başına uygulanmasına göre daha etkili olduğu saptanmıştır.

Bakteriyel etmen ile entegre mücadele kapsamında son yıllarda sürdürülebilir tarım anlayışının gelişmesiyle güvenli ya da zararsız kimyasallar olarak nitelendirilen prohexadione-calcium (Apogee) gibi büyüme regülatörleriyle (Norelli ve Miller, 2004; Spinelli ve ark., 2004) ve acibenzolar-S-methyl (Actigard, Bion) gibi sistemik kazanılmış dayanıklılığı uyaran kimyasal preparatlar ile umutvar sonuçların alındığı farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Spinelli ve ark., 2004; Bazzi ve ark., 2004).

Sert çekirdekli ve sert kabuklu bitkilerde görülen bakteriyel hastalıkların önlenmesi konusunda alınabilecek önlemlerin başında karantina uygulamaları ve eradikasyon gelmektedir. Hastalıkların erken uyarı/tahmin programlarıyla epidemiyoloji yapmadan önce önlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu konuda, Kaliforniya üniversitesinde epidemiyolojik bir model olan Xanthocast erken uyarı modeli geliştirilmiştir. Sistem tamamen nemlilik oranı, süresi ve sıcaklık derecelerinin meteoroloji istasyonlarında kaydedilerek, enfeksiyon oluşumunun tahmin edilip, çiftçiyi bakır tabanlı uygulama yapmasını konusunda uyaran bir modeldir. (Anonymus 2016c). Aynı zamanda ceviz bakteriyel yanıklığına karşı geliştirilen erken uyarı/tahmin programı yardımıyla azalan bakır uygulamaları yaparak dayanıklılığın kırılması da mümkün olmuştur (Ninot ve ark., 2002).

Bu tez kapsamında Edirne ili ceviz üretim alanlarında *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının varlığı ve hastalığın yaygınlığı ortaya konmuştur. 2014-2016 yıllarında gerçekleştirilen survey araştırmaları sonucu 62 ayrı hasta bitki örneği toplanmış ve laboratuvar çalışmaları sonucu bu örneklerden 104 adet izolat elde edilmiştir. İzolatların patojenitesi, LOPAT (L: Levan oluşumu, O:Oksidaz reaksiyonu, P: Pektolitik aktivite, A: Arginin dehidrolaz, T: Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu), oksidatif-fermantatif, katalaz, jelatin hidrolizi ve nişasta hidrolizi testlerini içeren klasik testlerle tanısı yapılarak bakteri izolatlarının *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* olduğu tanılanmıştır. Ayrıca Edirne ilinde ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının yaygınlığı ve gezilen bahçelerdeki bulaşıklılık oranı tespit edilmiştir.

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda, üreticinin ceviz bakteriyel yanıklık etmeni hakkında bilgi kazanması, arazide hastaık teşhisi yaparken ceviz antraknozu (*Gnomonia leptostyla*) ile karıştırılmasının önlenmesi, kahverengi apikal uç nekrozu (BAN) ile arasındaki farkların ortaya konması amaçlanmaktadır. Bu amaçlar doğrultusunda; yapılacak olacak doğru teşhis ve doğru mücadele programıyla hastalığın şiddetinin azalmasının ve geniş alanlara yayılmasının önlenebileceği düşünülmektedir.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Hastalığının Yaygınlığı

Richard ve ark., (2003), 1999-2002 yılları arasında etmenle mücadelede kullanılan bakır uygulamaları ile hastalığın %23 oranında görüldüğünü, bakır tankına maneb eklendiğinde ise hastalığın %6.72 oranında gözlendiğini belirtmişlerdir. Hastalığın kontrolünde bakır ve maneb karışımının oldukça etkili olduğu vurgulanmıştır. Hiç uygulama görmemiş alanlarda ise hastalık oranı %35 olarak saptanmıştır. Hastalığın mücadelesinde kullanılan erken uyarı sistemi (Xanthocast) ile hem ekonomik olarak kazanç sağlandığı hem de bakır/maneb uygulama sıklığının ceviz bahçelerinde azaltıldığı belirtilmiştir.

Giraud ve ark., (2010), Fransa'da önemli bir ceviz hastalığı olan ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığı ile yaptıkları çalışmada güneybatı Fransa'da etmenin populasyon dinamiklerini hastalık bulunma oranları farklılık gösteren ceviz bahçelerinde 3 yıl süresinde çalışmışlardır. Hastalıkla bulaşık sürgün, yaprak, çiçek, polen ve meyveler Nisan ayının başından Ağustos ayının sonuna kadar arazi çalışmalarıyla toplanmıştır. Laboratuvar çalışmalarında elde edilen sonuçlar neticesinde populasyon büyüklüğü yıllara göre  $10^3$ - $10^7$  cfu/g arasında değiştiği, tomurcuklanma sırasında populasyon büyüklüğü artarken çiçeklenmeden sonra populasyon büyüklüğünün sabit kaldığı belirtmişlerdir. Arazide hastalığın bulunma oranının bazı enfekteli bahçelerde daha az olduğu bazılarında ise hastalığın bulunma oranının arttığını gözlenmişlerdir. Bu artışın nedeninin bakteriyel populasyon seviyesinden ziyade mikroklimatik koşullardan etkilendiği bildirilmiştir.

Stefani (2010), dünya üzerinde farklı coğrafyalarda ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığı epidemilerinin beklenmedik bir şekilde görülmesinin nedenlerinin; bakteriyel izolatların farklı patojeniteye sahip olması, bitki türler ve çeşitleri arasındaki farklılıklar, sulama, gübreleme, budama zamanı ve sıklığı gibi yetiştirme koşulları arasındaki farklılıkların etkili olabileceğini belirtmiştir.

Lindow ve ark., (2014), Kalifornia' da ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının geniş alanlara yayılmasını iklimsel dinamikleri göz önüne alarak incelemişlerdir. Sürgünlerdeki *Xanthomonas arboricola* pv. *junlandis* populasyon yoğunluğunun tomurcuklardan daha fazla olmadığı belirtmişlerdir. Haziran ayında hastalık bulunma oranının artmasının nedeni uyur gözlerdeki *Xanthomonas arboricola* pv. *junlandis*'in populasyon büyüklüğünün Mart ayında logaritmik olarak artıyor olması ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. İnokulum

etkinliğindeki bu linear artışın yıllara göre değiştiği fakat gözlerin uyanmasını takiben yağmur yağışlarıyla arttığı tespit edilmiştir.

Akat ve ark. (2016), *X. arboricola* pv. *juglandis*' in BAN (*Fusarium equiseti*, *F. verticillioides*, *Alternaria alternata*) fungal hastalığı ile meydana getirdiği karışık enfeksiyonların tek tek % oranı hesaplamışlardır Ceviz bitkisinde *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* bir izolat hariç hepsi patojen bulunmuştur. En virulent *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ve funguslar birlikte enfeksiyon meydana getirdiklerinde hastalık yapma oranı %5-65 oranında değişmektedir. Bu çalışmada *Alternaria* patojenik bulunmamıştır. *Fusarium verticillioides*'in bir izolatı patojenik bulunmuştur. *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ve *F.equiseti* birlikte enfeksiyon yaptığında hastalık oranı %88, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ve *F.verticillioides* birlikte enfeksiyon yaptığında ise hastalık oranı %75 olarak saptanmıştır.

## 2.2. Hastalık Etmeninin Tanısı

Patojen bakteri bu güne kadar farklı isimlerle anılmıştır. Hastalık etmeni ilk olarak Pierce tarafından 1901 yılında Kaliforniya'da izole edilmiş ve *Pseudomonas juglandis* olarak isimlendirilmiştir. Etmen daha sonraları *Bacterium juglandis* (Smith, 1905), *Phytomonas juglandis* (Bergey ve ark. ,1930) ve *Xanthomonas juglandis* (Dowson, 1939) olarak farklı isimler almıştır. Etmen uzun yıllar *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Dye ve ark., 1980) olarak isimlendirilmiştir fakat günümüzde Vauterin ve ark., (1996) filogenetik çalışmalar doğrultusunda patojenin *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* olarak isimlendirilmesini önermiştir.

Bradbury (1986), ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının dünya genelinde ceviz yetiştiriciliğinin önde gelen ve ekonomik anlamda ürün kaybına neden olan fitopatolojik bir sorun olduğunu ve hastalığın başta Avustralya olmak üzere, Yeni Zelanda, Kuzey ve Güney Amerika, Çin, Rusya, İran, Irak, Güney Afrika, Arjantin ve cevizin yetiştirildiği birçok ülkede bulunduğunu bildirmiştir.

Vauterin ve Swings (1997), önceleri bakterinin sınıflandırılmasının konukçu spesifikliğine dayalı olduğu kabul edilirken, bu araştırmacılar fitopatojenik spesifikliğin sınıflandırmada cins içerisinde ayırımında etkili olmadığını ortaya koymuşlardır. Toplam genomik DNA benzerliğine dayanarak, *Xanthomonas* cinsinde yer alan türleri 20 farklı tür olarak tekrar sınıflandırılmıştır.

Scortichini ve ark., (2001), *Juglans regia* L'den elde edilen ve uluslararası kültür koleksiyonlarında bulunan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e ait 61 adet izolatın PCR, Eric-PCR Rep-PCR ve BOX-PCR primerlerine göre PCR çalışmaları yapmışlardır. Ayrıca bakıra dayanıklılık, nişastayı hidrolize etmesi ve patojenite testlerini de yaparak izolatların tanımlarını yapmıştır. Moleküler çalışmalar sonucu elde ettiği polimorfizme göre yaptığı küme analizlerinde üç temel gruba ayrıldığını saptamışlardır. İlk grup içerisinde bulunan bakteri izolatları %85 oranında genetik benzerlik göstermişlerdir. Her bir grup izole edildikleri coğrafik bölgelere göre iki alt gruba bölünmüştür. Bir ülkeden elde edilen izolatlar arasında farklı genomik grup oluşturdıkları tespit edilmiştir. Bu farklılıkların *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatlarının çevresel koşulların ve ceviz varyetelerinin farklı olması durumundan kaynaklandığı düşünülmüştür. Testlenen bütün izolatların patojen olduğu, nişastayı hidrolize ettiğini belirlemişlerdir.

Belisario ve ark., (2002), cevizde görülen *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in bitkinin tüm kısımlarını ve çiçeği enfekte ettiğini bildirmişlerdir. Genel olarak koyu kahverengi siyah nokta şeklindeki lezyonların yeni çıkan taze yapraklarda, yaprak sapında ve meyve kabuğunun apikal kısmında görüldüğünü belirtmişlerdir. Şiddetli enfeksiyonlarda çok sayıda ceviz meyvesinin olgunlaşmadan döküldüğünü saptamışlardır.

Özaktan ve ark., (2007), Hastalığın ülkemizdeki varlığı konusunda başlangıçta bilimsel bir kayıt olmasa da Karadeniz bölgesinde bu hastalığın belirtilerinin görüldüğü belirtilmiştir (Karaca, 1974). Marmara bölgesinde kapama ceviz plantasyonlarının olduğu alanlarda hastalığın oldukça yıkıcı olduğunu gözlemlemiştir.

Barionovi ve Scortichini (2008)' nin İtalya'da yaptıkları çalışmada farklı coğrafik bölgelerden izole edilen 34 adet *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ve 43 adet *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* izolatlarının gen dizilimlerinin izolatlar arasında farklılığın bulunup bulunmadığını test etmişlerdir. İzolatların genetik farklılıkları BOX-PCR ile ortaya konmuştur. İki pathovarı temsilen integras genleri *intl* ve bunun yanında bulunan *ilvD* geni klonlanmış ve dizilimleri belirlenmiştir. CLUSTALW algoritması pek çok *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatları ile *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* izolatlarının oldukça yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanında Avustralya'dan elde edilen *X. arboricola* pv. *juglandis* izolatları *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* ile oldukça benzerlik göstermiştir. BOX-PCR *Xanthomonas arboricola* pathovarları arasında bulunan farklılıklarının belirlenmesinde kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Hajri ve ark., (2010), güneydoğu ve güneybatı Fransa'daki 79 adet ceviz bahçesinde arazi çalışmaları yapmışlardır. Biyokimyasal testler sonucunda hastalıklı bitki örneklerinden *Xanthomonas arboricola*' ya ait 36 izolat, *Brenneria nigrifluens*' e ait ise 32 izolat elde edilmiştir. Kanser yaralarında bakteriyel akıntıya neden olan etmenin *Xanthomonas arboricola* olduğunu tespit etmişlerdir. *Xanthomonas arboricola*' ya ait 36 izolat çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) tekniği ile çalışılmıştır. AFLP veri analizlerine dayanarak elde edilen sonuçlara göre, cevizde bakteriyel yanıklık hastalığına neden olan *Xanthomonas arboricola* pathovarlarına yüksek bir benzerlik derecesi gösterdiği bildirmişlerdir.

Petkovsek ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ile enfeksiyondan sonra ceviz yeşil kabuğunun fenolik bileşiklerini incelemişlerdir. Araştırma sağlıklı ceviz meyvesi ve *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ile enfekteli meyveler üzerinde yapılmıştır. Denemeyi Cisco, Sampion, Fernette, Seiferdorfer çeşitlerinde ile Zdoleve Erjavec genotiplerinde yapmışlardır. Ceviz yeşil kabuğundaki gallik asit, üç hidroksisinamik asit, kateşin ve beş farklı kuersetin glikositlerinin içerik düzeyi kütle spektrometresi ile birlikte, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLCMS) ile tespit etmişlerdir. Yetiştiricilik mevsimi boyunca, fenolik bileşiklerin içeriği azalmış ve bunun analiz edilen çeşitler ile meyvenin fizyolojik aşamasıyla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Sağlıklı cevizlerde belirlenen 10 birikmiş polifenol içeriğinin çeşide bağlı olduğu ve arazide ceviz bakteriyel yanıklığı ile bu polifenol bileşiklerin içeriği arasında zayıf bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Shami ve ark., (2013), bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in İran'ın orta, batı ve kuzey bölgelerinde cevizde verimi azalmasına neden olan ana hastalıklardan biri olduğunu bildirmişlerdir. Bu hastalığın İran'da ilk olarak, Qazvin ve Mazandaran'da görüldüğü ve daha sonra buradan kuzey, orta ve batı illerine yayıldığını belirtmişlerdir. Bakteriyolojide geleneksel yöntemlere göre elde edilen pathovarlar saflaştırılmış, üç yıllık ceviz fidanı yapraklarında ve ceviz meyvesinde patojenite testi yapılmışlardır. Sarı renkli gelişen kolonilere yapılan biyokimyasal ve patojenite testleri sonucunda *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* olarak tanılamışlardır. REP-PCR analizi modelinin sonuçlarına göre, pathovarlar benzerliklerine göre üç gruba ayrılmıştır.

Kaluzna ve ark., (2014), bakteriyel yanıklık belirtileri gösteren ceviz yaprak ve meyvelerini Polonya'nın altı farklı bölgesinden örnek toplamışlardır. Koloni morfolojisi ile *Xanthomonas* cinsine benzeyen 18 bakteri izolatu agar ortamına izole edilmiştir. *Xanthomonas* cinsine özgü X1 ve X2 primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında izolatların tamamının

*Xanthomonas* cinsine ait olduğunu belirlemişlerdir. Patojenite testlerinde kullanılan ham ceviz meyvelerinde hastalığın tipik siyah nekrotik lezyonlara neden olduğu görülmüştür. Fenotipik test sonuçları izolatların *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' in özellikleri ile aynı olduğunu göstermiştir. Genetik analizler (PCR MP, ERIC-PCR, BOX-PCR ve MLSA) izole edilen izolatlarla referans olarak kullanılan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (CFBP 7179, Fransa) izolatu arasında benzerlikler olduğunu göstermişlerdir. Fakat Portekiz' den getirilen I-391 izolatu ile İngiltere'den getirilen LMG 746 izolatının farklılıklar gösterdiğini belirlemişlerdir.

Ivanović ve ark., (2015) Sırbistan'da *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* patovolarının genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Sırbistan'da farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e ait 59 izolatu moleküler benzerliklerini araştırmışlardır. Moleküler analizler, farklı popülasyonlara ait *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatları arasındaki önemli genetik çeşitlilikleri bulunduğunu belirlemişlerdir.

Akat ve ark. (2016), *X. arboricola* pv. *juglandis*' in fungal etmenler *Fusarium equiseti*, *F. verticillioides*, *Alternaria alternata* ile karışık enfeksiyonlar oluşturmasıyla Kahverengi Öz Nekrozu (BAN) olarak adlandırılan hastalığa Marmara ceviz bahçelerinde 2010-2011 yetiştirme sezonunda yapılan araştırmalarda rastlamışlardır. Ceviz ağaçlarında meydana gelen fungal enfeksiyonlara ikincil etmen olarak BAN hastalığı da dahil olunca enfeksiyon belirtileri ve şiddetinin de arttığını bildirmişlerdir. Bu nedenle karışık enfeksiyonlarda daha yıkıcı sonuçlar gözlemlenmiştir. Arazide yapılan gözlemler sonucunda yerel çeşit olan Bilecik'in BAN' a daha dayanıklı iken; Hartley ve Howerd çeşitlerinin hastalığa en duyarlı çeşitler olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmanın sonucu bakır oksiklorit ve mancozeb' in BAN'a karşı en etkili kimyasal olduğunu ortaya koymuşlardır.

### **2.3. Hastalığın Mücadelesi**

Martins ve ark., (1994), *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e karşı farklı kimyasal uygulamaları denemişlerdir. Kocide, Bordo bulamacı, Bordo bulamacı+demir sülfat, Bordo bulamacı+Kasumin, Mart ayından itibaren birer hafta aralıklarla ceviz ağaçlarına uygulamışlar, Temmuz ve Eylül aylarında, hasattan sonra kuruyan meyvelerde hastalık şiddeti değerlerini kaydetmişlerdir. Uygulamalar arasında bir korelasyon bulunmamasına rağmen, bakırlı bileşenlerden Kocide'in diğer uygulamalara göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Uygulamalar arasında bu farklılığın, enfeksiyon sırasında kimyasalların aktivitelerinden ve

patojenin inokulasyonundan sonra hastalık gelişiminin kontrol edilemez olmasından kaynaklandığı vurgulanmaktadır.

Moragrega ve Montesinos (2002), yaptıkları bir çalışmada bakır türevlerine alternatif kimyasallar, antibakteriyel aktiviteye sahip yeni ürünler *in vitro* minimal engelleme konsantrasyonları ve *in vivo* hastalık şiddeti verilerine göre değerlendirmişlerdir. Elde edilen verilere göre *in vivo* çalışmalarda, sırasıyla en etkili kimyasalların streptomycin olduğu, bunu bakır ve metalik iyonların kombinasyonunun, fosetyl-Al, bakır+mancozeb ve son olarak bordo bulamacının izlediğini saptamışlardır. Fosetyl-Al'in bakır uygulamalarına alternatif ve ya tamamlayıcı olabileceği, *in vitro* antibakteriyel aktivitesinin olmadığı, konukçu savunma sistemini aktive ettiğini belirtmişlerdir.

Belisario ve ark., (1997), ceviz fidanlarının sürgünlerine *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* süspansiyonu ile inokule etmişlerdir. Franquette ve Hartley yüksek düzeyde tolerant bulunurken, Payne, Serr ve Sorrento çeşitleri ise yüksek düzeyde duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Soltani ve Aliabadi (2010), İran' da endemik ceviz genotiplerinde hastalığa direnç doğal kaynakları belirlemek için yaptıkları çalışmada, Hamedan bölgesinde farklı alanlardan toplanan 16 ceviz genotip örnekleri, her bir genotip için beş tekerrür olacak şekilde tesadüf bloklarında *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ile inokule etmişlerdir. İki yaşındaki fidanlara Mayıs ayında  $2 \times 10^9$  hücre/ml bakteri süspansiyonu püskürtülmüştür. Enfekteli yapraklar inokulasyondan 28 ve 42 gün sonra, lezyonların sayısı, büyüklük, dağılımına göre 0 ile 5 şiddet skalası kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan veri analizleri sonucunda genotipler arasında farklılıkların olduğunu belirlemişlerdir.

Soltani ve Aliabadi (2013) yaptıkları çalışmada, çeşitli bitki ekstraktları ve bitki uçucu yağlarının *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* üzerindeki antibakteriyel etkisini *in vitro* çalışmalar ile araştırmışlardır. Araştırmacılar, bu bakterinin biyokontrolü için doğal bakterisit kaynaklarını araştırma amacıyla 24 adet tıbbi bitkide uçucu yağları ve sulu ekstraktlarının *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* üzerindeki antibakteriyel aktivitelerini *in vitro* koşullarda incelemişlerdir. *Allium sativum*, *Datura stramonium*, *Rosmarinus officinalis*, *Peganum harmala*, *Ricinus communis*, ve *Mentha piperita* türü bitkilerde sulu ekstrakt ile yapılan çalışmada önemli antibakteriyel etkiler olduğu saptanmıştır. Bitki uçucu yağlarında ise bu etki en fazla *Allium sativum*, *Datura stramonium*, *Rosmarinus officinalis*, *Peganum harmala*, *Ricinus communis*, ve *Mentha piperita* bitkilerinde tespit etmişlerdir.



### Şekil 3.1. Edirne ilinin Türkiye haritasındaki konumu

Arazi çalışması için gidilecek bahçelerdeki ağaçlar Lazarov ve Grigorov (1961) metoduna göre incelenmiştir. Bu metoda göre 20 meyve ağacı olan bahçenin %100'ü, 21-70 meyve ağacı olan bahçede 21-30 ağaç, 151-500 meyve ağacı olan bahçede 41-80 ağaç, 501-1000 meyve ağacı olan bahçede ağaçların %15'i, 1000'den fazla meyve ağacı olan bahçede ağaçların %5' i (en az 150 ağaç) kontrol edilmiştir. Gezilen bölgedeki bahçe sayısına, hastalıklı bahçe sayısı oranlanarak hastalığın yöredeki yaygınlığı hesaplanmıştır. Her cevizbahçesi, çapraz olarak gezilerek hastalıklı ve sağlıklı ağaçların sayıları tespit edilerek basit ortalama metoduna göre bahçelerdeki hastalığın bulunma %'si hesaplanmıştır. Aynı zamanda hasta ağaçlardaki hastalık şiddeti ise hastalıklı alanın uzunluğu bitki boyunun tamamına oranlanarak hesaplanmıştır.

### 3.2.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Arazi çalışmalarında ziyaret edilen ceviz bahçelerinde bakteriyel yanıklık belirtileri gösteren ağaçlar öncelikle fotoğraflanarak ardından sürgün ve yapraklarından örnekler alınmıştır. Karakteristik olarak ceviz bakteriyel yanıklığının belirtilerini gösteren ağaçların dal ve sürgünleri simptomun bittiği kahverengi dokunun yaklaşık 15 cm altından ve 10 cm üstünden kesilerek alınmıştır (Şekil 3.2.). Bu örneklere etiketleme yapılarak gazetelere sarılmış ve polietilen torbalara konulmuştur. Polietilen torbaların ağızları kapatılarak serin yerde muhafaza edilmiştir. Örnek alınırken kullanılan makaslar her örnek alımından sonra %70'lik alkol ile dezenfekte edilmiştir. Laboratuvara getirilen örneklerden izolasyon yapılana kadar buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır





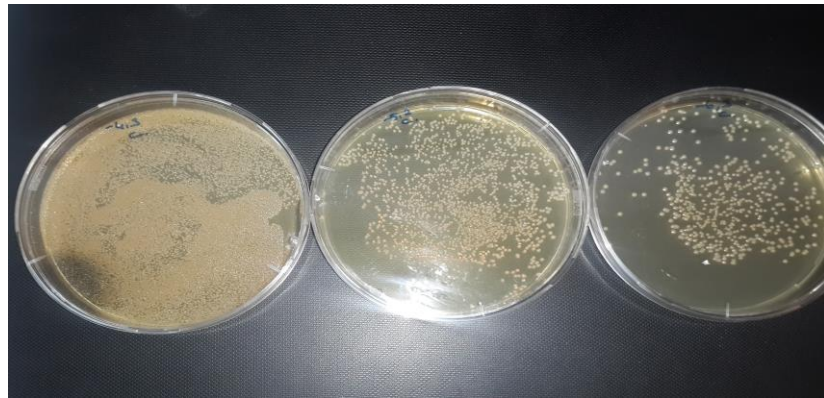
Şekil 3.2. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalık belirtilerini gösteren sürgün

### 3.2.3. Bakteriyel Yanıklık Etmeninin İzolasyonu

Cevizde bakteriyel yanıklık belirtisi gösteren örneklerin hastalıklı ve sağlıklı kısımlarını içeren 0.5 cm'lik bitki parçaları %70'lik alkol veya %1'lik NaOCl ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Parçalar steril havanda steril saline bufferda (%0.85 NaCl) homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyon 20 dakika steril kabinde bekletilmiştir. Ardından bir öze dolusu alınarak King B (20 g Proteose peptone, 1.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>3H<sub>2</sub>O, 1.5g MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 10 ml Glyscrol, 15 g agar, 1000 ml saf su, pH:7.2) ve YDCA (Yeast Extract 10.0g,Dextrose 20.0g, Calcium Carbonate 20.0g, Agar 15.0g, Distile Su 1000ml) besi yerine çizgi ekim yöntemi ile çizilmiştir. 25°C'de 48-72 saatlik inkübasyondan sonra gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik olarak hazırlanmış olan YDCA ortamına çizilmiştir. Ardından inkübatörde geliştirilerek +4°C'de buzdolabına saklanmıştır (Lelliott ve Stead ,1987).

### 3.2.4. Patojen Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik bölge izolatları ve referans kültür spektrofotometrede 600 nm 0.3 ölçüm değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlardan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml steril su bulunan tüplere koyulmuş ve bu işlem 7 kez tekrarlanmıştır. Her bir sulandırmadan içerisinde King B besi yeri bulunan petrilere 100µl süspansiyon koyulmuş ve bir baget yardımı ile besi yeri üzerine yayılmıştır. Her seyreltme için üç adet petri kullanılmıştır. 25°C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra petrilere gelişen koloniler sayılarak ml'deki bakteri hücre sayısı (koloni sayısı x örneğin seyreltme serisi x 10) hesaplanmıştır (Klement ark., 1990).(Şekil 3.3.)



### 3.2.5.Patojenite Testi

Hastalıklı ceviz dokularından izole edilen bakteri izolatlarının patojenitesi Lelliott ve Stead, (1987)'nin bildirdiğine göre yapraklara ve ham meyveye olmak üzere 2 farklı inokulasyon yöntemi kullanılarak testlenmiştir. Patojenite testlerinin tamamında çalışmalarında  $10^8$  hücre/ml ( $A_{660}:0.3$ ) inokulum yoğunluğu kullanılmıştır. Patojenite testlerinde pozitif kontrol olarak *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Ceviz 3) referans kültürü, negatif kontrol olarak ise steril su kullanılmıştır.

Hastalıklı ceviz dokularından izole edilen ve tanı çalışmasında kullanılan 26 bakteri izolatu ve referans kültür King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik bakteri izolatlarının  $7 \times 10^8$  hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonları hazırlanmıştır. Tutku fidancılıktan temin edilen sağlıklı ceviz fidanları (Chandler çeşidi) ve Keşan'da Chandler çeşidi ceviz yetiştiriciliği yapılan bahçelerden toplanan sağlıklı ham meyvelere inokulasyon yapılmış ve  $25^\circ\text{C}$  ve %70 nem içeren kontrollü koşullarda muhafaza edilmiştir. Pozitif kontrolle bulaşık bitkilerde 8-10gün sonra gözle görülür belirtiler oluşunca sürgünlerden re-izolasyon yapılmıştır. Aynı işlem inokulasyondan 2-3 gün sonra belirtiler gözlenen ham meyve denemeleri için de uygulanmıştır.

**Yapraklara Püskürtme:** Hastalıklı ceviz sürgün ve yapraklarından elde edilen bakteri izolatları ve referans kültürün süspansiyonları hazırlanmıştır. Ardından sağlıklı ceviz fidanlarının yapraklarına Şekil 3.4 'de görüldüğü gibi bir el püskürtücü yardımıyla basınçlı bir şekilde püskürtülmüştür. Yüksek nem sağlamak amacıyla ıslak polietilen torbalara içerisine alınarak 24 saat süreyle nemli ortam sağlanmıştır. Nem çemberinde 1 gün tutulan bitkiler günlük olarak belirtiler gelişimleri izlenmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Daha sonra inokulasyondan sonra  $25^\circ\text{C}$  ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarına koyularak hastalık belirtisinin ortaya çıkması için beklenmiştir. İnokulasyondan 15-20 gün sonra yapraktaki tipik leke oluşumuna göre hastalık var/yok olarak değerlendirilmiş ve izolatların patojen olup olmadığı belirlenmiştir. Oluşan lekelerden re-izolasyonlar yapılmıştır.



Şekil 3.4. *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* 'in yaprağa püskürtülmesi

**Meyveye inokulasyon:** Sağlıklı ceviz ağaçlarından ham meyveler toplanmıştır. Bu meyveler patojenite testleri yapılana kadar buzdolabında +4°C saklanmıştır. Patojenite testinde her izolat için 3 adet sağlıklı ham ceviz meyvesi kullanılmıştır. Meyveler kullanılmadan önce %3'lük NaOCl içerisinde 3 dakika bekletilmiş ve sonra 3 defa steril saf su içerisinde geçirerek yüzeyden dezenfeksiyon yapılmıştır. Dezenfekte edilen ceviz meyveleri içerisinde kurutma kağıdı bulunan petrilerin içerisine yerleştirilmiştir. Şekil 3.3'de de görüldüğü King B besi yerinde 48 saat inkübe edilmiş bakteri izolasyonlarından öze ucu ile koloniler alınarak ham cevizlerin üzerine batırılarak bulaştırılmıştır. Alt kısmına kurutma kağıdı yerleştirilen kutulara ham cevizler yerleştirilmeden önce kağıtlar nemlendirilmiştir. Ardından bakteri bulaştırılan ham cevizler nemli kutulara yerleştirilerek üstleri streç film ile hava almayacak bir şekilde kapatılmıştır. Bu kutular 25°C'deki inkübatöre konularak 48 saat bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra kahverengi lekeler gözlemlenmiş ve bu lekelerden re-izolasyonlar yapılmıştır (Van der Zwet, 1986; Klement ark., 1990 ) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Ham ceviz meyvelerinin *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ile bulaştırılması

### 3.2.6. Re-İzolasyon ve Re-izolatların Eldesi

İnokulasyon yapılan ceviz fidanlarının yapraklarında ve ham ceviz meyvelerinde meydana gelen kahverengi lekeler incelemeye alınmıştır. Lekeli olan yapraklar ve meyveler alınarak kahverengi kısımlarından küçük parçalar alınarak %70'lik alkol ile yüzeyden dezenfeksiyon yapılmıştır. Ardından bu parçalar steril havanlara konulmuştur. 2 ml steril saline buffer eklenerek süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan havanlar etiketlenerek steril kabin içerisinde 15-20 dakika bekletilmiştir. Böylece bakteriler saline buffer süspansiyonuna geçmesi sağlanmıştır. Ardından King B besi yeri bulunan petrilere üç çizgi ekim yöntemiyle süspansiyonlar çizilmiştir (Janse 2006).

İzolasyon petrileri 25°C'de 48 saat inkübatörde bekletilmiştir. King B besi yerinde gelişensarı renkli bakteriler saflaştırılmıştır. Simptom veren bitkilerden re-izolasyon sonucu elde edilen re-izolatlar cam tüplerde eğik olarak hazırlanmış yeast destroz kalsiyum karbonat agar (YDCA) besi yerine çizimleri yapılarak tanı çalışmaları yapılmak üzere buzdolabına kaldırılmıştır. Bu işlemler yapılarak KOCH postulatlarının 5 basamağı adım adım izlenmiştir.

### 3.2.7. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı

Arazi çalışmaları sonucunda 62 hasta bitkiden izole edilen 104 izolat içinden seçilen 26 adet referans izolat ile re-izolat tanı çalışmaları yapılmıştır. Cevizde bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *junlandis* 'in tanılanmasında; KOH ile gram reaksiyon (Fahy ve Hayward, 1983), oksidatif-fermentatif gelişim (Sands, 1990 ), katalaz (Klement ve ark., 1990), jelatin hidrolize (Klement ve ark., 1990, Schaad, 2001), nişasta hidralizasyon testi, oksidaz reaksiyonu, TweenB ortamında gelişme, nitrat reaksiyon testleri yapılarak elde edilen bakteri izolatlarının biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Aynı koşullarda her bir test 3 kez tekrarlanmıştır.

**King B Besi Yerlerinde Koloni Gelişimi:** Elde edilen re-izolatlar King B besi yerinde sarı renkli mukoid koloni gelişimi göstermiştir.

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

**Arginin Dehidrolaz Aktivitesi:** *Xanthomonas arboricola* pv. *junlandis*, izolatları ve referans izolatla yapılan arginin dehidrolaz testi sonucunda herhangi bir renk değişimi görülmemesinden dolayı negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4).

**Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon:**Potasyum hidroksitten taze hazırlanan %3'lük solüsyondan lam üzerine bir damla damlatılmış ve Edirne ilinden elde edilen izolatlarının 48 saatlik kültüründen, sterilize yardımıyla solüsyona 5-10 saniye dairesel hareketlerle karıştırılmış ve sonra öze ile yukarı doğru yükseltildiğinde; vizkoz bir hal almış ve 0.5-2 cm veya daha yükseğe iplik gibi uzuyorsa bu izolatlar gram negatif, uzama olmuyor ve sulu bir sıvı olmuş ise bu izolatlar gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fahy ve Hayward, 1983). Kontrol olarak Prof. Dr. Yeşim AYSAN'dan alınan gram pozitif özelliğe sahip Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürü kullanılmıştır.

**Oksidatif-Fermentatif Test:** Mikroorganizmaların karbonhidratları ayrıştırmada oksidatif veya fermentatif metabolik yolu kullanma durumlarını saptamada bu testten yararlanılmaktadır. Ayrıca bakterilerin tanılanmasında da yararlanılır. Bazı mikroorganizmalar glikozu oksidatif karakterde metabolize edebilirler. Aerobik koşullarda meydana gelen bu reaksiyonda oksijen son hidrojen alıcısı olarak görev yapar. Buna karşın,

bir kısım bakterilerde de glikozu, oksijenin olmadığı durumlarda da ayrıştırma yeteneklerine sahiptirler. Bu reaksiyon anaerobik şartlarda gelişir ve hidrojen alıcısı olarak oksijenden başka diğer substanslar kullanılır. Litrede 2 g pepton, 5 g NaCl, 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g agar, 3 ml %1'lik bromothymolblue içeren ortam hazırlandıktan sonra tüplere 5'er ml konulmuştur. Otoklavdan sonra 50°C'ye kadar soğutulan tüplerin her birine soğuk sterilizasyon yapılan %10'luk glikoz solüsyonundan 0.5 ml ilave edilmiş, taze geliştirilmiş 48 saatlik *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis* izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile nokta aşılama yapılmıştır. Her izolat için 6 tüp kullanılmıştır, bu tüplerden üçüne 1 ml steril ılık vaspar (bir ölçü vaselin üç ölçü parafin karışımı ) konarak yüzeyi kapatılarak diğer üçüne hiçbir ekleme yapılmamıştır. 25°C 5-6 günlük bir inkübasyondan sonra ortam renginin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990 ).

**Pektolitik Aktivite Testi:** Patates yumruları öncelikle yüzeyden bir sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlemde patates yumruları önce deterjanlı suda fırçalanarak yıkamış ve daha sonra %1'lik NaOCI'da 3 dak. bekletilmiştir. Yumrulardaki NaOCI'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemden sonra steril bir bisturi ile kabukları soyulmuştur. Steril filtre kağıdı içeren petri içine kabuğu soyulmuş bir cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiş ve kurutma kağıtları steril saf su ile ıslatılmıştır. Bir öze dolusu bakteri kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmış ve 25°C'de iki günlük bir inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* kullanılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

**Oksidaz Testi:** YDC agar içeren besi yerine bakteriler çizilip, 24-48 saat inkübe edilmiştir. Besi yerinde bakteriler geliştikten sonra kurutma kağıdı üzerine %1'lik N; N; N; N' - tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride solüsyonu damlatılarak, platin öze veya steril kürdan ile alınan bakteri, solüsyonun damlatıldığı yere iyice sürülmüştür. Sonuçlar; 10 saniye sonra bakteri kitlesi maviye dönüşürse pozitif, 60 saniye sonra maviye dönüşürse geç pozitif, 60 saniye sonra maviye renk oluşumu gözlenmezse negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956; Janse, 2006 ). Oksidaz pozitif özellikteki *Pseudomonas cichorii* kültürü çalışmada kullanılmıştır.

**Katalaz Testi:** Litrede 23g nutrient agar ile hazırlanan ortam 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra petrilere dökülmüştür. 36-48 saatlik ceviz bakteriyel yanıklık izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile zigzag şeklinde aşılanan petrilere 25°C'de 24 saat tutulduktan

sonra üzerlerine 1ml %3'lük hidrojen peroksit dökülmüştür. Pozitif reaksiyonda birkaç saniye içinde katalaz aktivitesi sonucu açığa çıkan oksijen kabarcıkları gözle görülmüştür. Pozitif kontrol olarak *Xanthomonas vesicatoria* (GSPB 224) kullanılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

**Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi:** Tütün (*Nicotiana tabacum* cv *Samsun N*) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına ceviz bakteriyel yanıklık izolatlarının  $10^8$  hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Klement ve Goodman, 1967). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatı kullanılmıştır.

**Jelatin hidrolizi:** Jelatinin hidrolizasyonunu saptamak için bir çok besi yerleri geliştirilmiştir. Bunlardan basit olanı tüplerde uygulanmaktadır. Mikroorganizma kültürüne değerlendirilmiş öze ucu dik olarak jelatinli besi yerine daldırılır. Yeterince ekim yapıldığından emin olunmalıdır. Jelatin hidrolizi için besi yeri 5 g pepton, 3 g beefextract ve 120 g jelatin içermektedir. Karışım tartıldıktan sonra, jelatinin erimesi için 50 derecede su banyosuna konulmuştur. Tüplere 5 ml konmuş ve otoklavda 121°C'de sterilize edilmiştir. Tüplere bakteri aşılandıktan sonra 20°C'de 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kontrolde öncede 30 dakika kadar +4°C'de buzdolabında bekletilmiştir. +4°C'de buzdolabında bekletildikten sonra; tüplerdeki jelatin akıcı halde ise pozitif, tüplerdeki jelatin katı halde ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement vd. 1990, Schaad, 2001). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve negatif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* izolatları kullanılmıştır.

**Nişasta Hidralizasyon Testi:** Nişastanın hidrolizasyonu için litrede 23gr nutrient agar içeren besi yeri içerisine %2 oranında eriyebilir nişasta ilave edilmiştir. Bunun için 10-20ml distile suda eritilen nişasta ısıtılarak çözüldükten sonra nutrient agara ilave edilmiş ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilip steril petrilere dökülmüştür. Besi yerine çizilen biber bakteriyel leke izolatları ve orijinal bakteri kültürleri 7-14 gün 25°C'de inkübasyondan sonra kültürler üzerine lugol eriği (1g iyot ve 2g KI 300ml distile suda eritilmiştir) dökülmüştür. Nişastanın hidrolizasyonu şerit şeklindeki bakteri kolonisinin etrafında meydana gelen boyanmamış alanın izlenmesiyle saptanmıştır. Pozitif kontrol olarak *Xanthomonas vesicatoria* ve negatif kontrol olarak *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* kullanılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

**Tween B ortamında Koloni Gelişimi:** Tween B besi yerine (Litrede: 10.0g Peptone, 10.0g KBr, 0.25g CaCL<sub>2</sub>, 0.30g Asit, 15.0g Agar, 121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir. Ortam 50°C’ye kadar soğutularak içerisine;10.0ml Tween 80, 50.0mg Cycloheximide, 65.0mg Cephalexin, 12.0mg 5-flouracil, 0.4mg Tobramycin ilave edilmiştir.) çizilen ceviz bakteriyel yanıklığı izolatları ve orijinal bakteri kültürleri 7-14 gün 25°C’de inkübasyondan sonra dairesel, tümsek, beyaz kristalize bir alanla çevrili sarı koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (McGuire ve ark., 1986).



## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1.Ceviz Bakteriyel Yanıklık Hastalığının Yaygınlığı

Bu araştırmada ceviz bakteriyel yanıklık hastalığı etmeninin yaygınlığının belirlenmesi Edirne ili ve ilçeleri için ilk araştırma olması yönünden önem kazanmaktadır. Arazide yapılan surveylerde her ne kadar hastalık oranları düşük bulunsa da varlığı tespit edilen hastalığın uygun koşullar altında ekonomik anlamda zarara neden olması söz konusudur.

Edirne ilinde hastalığın yaygınlığı il merkezinde %11.3, Keşan'da %42.3, İpsala'da %23.07, Uzunköprü'de %19.2, Havsa'da %3.84 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1.). Araştırmada ceviz bakteriyel yanıklığı bazı köylerde daha çok görülürken, bazı köylerde ise hiç görülmediği ortaya çıkmıştır. Yapılan gözlem ve çalışmalar sonucunda hastalığın yaygınlığında görülen farklılığın bahçenin tesis aşamasında temin edilen ceviz fidanlarının hastalıkla bulaşık olmasından kaynaklandığı gözlenmiştir.

Bu araştırmada ildeki çiftçilerin ceviz bakteriyel yanıklık hastalığını tanımadıkları, zaman zaman antraknoz gibi fungal hastalıklarla karıştırdıkları ve bu nedenle hastalığa karşı bilinçsizce mücalede yaptıkları tespit edilmiştir. Bakteriyel hastalıklara karşı etkili bir mücadele yapabilmek için öncelikle hastalık etmeninin doğru teşhis edilmesi gerekmektedir.

**Çizelge 4.1.** Edirne ili ceviz bahçelerindeki hastalık yaygınlığı, oranı ve şiddeti

Mevkiler	Hastalığın yaygınlığı (%)	Hastalık bulunma oranı (%)	Hastalık şiddeti (%)
Merkez	11.3	8.57	17.6
Keşan	42.3	13.58	26.19
İpsala	23.07	13.04	18.75
Uzunköprü	19.2	1.17	8.77
Havsa	3.84	9.09	12.5
<b>Ortalama</b>	<b>21.328</b>	<b>9.09</b>	<b>16.762</b>

#### **4.2. Hasta Bitki Örneklerinin Toplanması**

Edirne ilinin Merkez, Keşan, İpsala, Uzunköprü ve Havsa ilçelerinin ceviz üretim alanları 2015-2016 yıllarında Mayıs-Temmuz aylarında haftalık olarak ziyaretler yapılmıştır. Edirne il ve ilçelerinde gezilen 16 farklı ceviz bahçesinden 62 adet hastalıklı bitki örneği toplanmıştır. Arazi çalışmaları esnasında ziyaret edilen ceviz bahçelerinde karakteristik hastalığın ilk belirtileri olan yapraklarda koyu yeşil, saydam veya su emmiş dairesel alanlar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Yaprak yüzeyinde damarlara sınırlı 2-3 mm boyutunda köşeli lekeler çevre koşulları uygun olduğu zaman birleşerek büyük lekeler ve yaprak deformasyonlarına neden olmaktadır. Meyvelerdeki belirtileri ise erken enfeksiyonlarda meyve dökümleri gözlenmiştir. Geç dönemlerdeki enfeksiyonlarda ise meyve yeşil kabuğunda siyah lekeler şeklinde başlamış zamanla iç kısma doğru ilerlemiş ve çürümelere neden olmuştur. Çizelge 4.2.'de de görüldüğü üzere Edirne'nin ilçelerinden merkezden, Keşan'dan, İpsala'dan, Uzunköprü'den ve Havsa'dan toplam 62 adet hastalıklı bitki örneği toplanmıştır.

**Çizelge 4.2.** Edirne ili ve ilçelerinde bulunan ceviz bahçelerinden toplanan örnek sayıları

İlçe	Köy	Gezilen Ceviz Bahçesi Sayısı	Toplam Üretim Alanı(da)	Toplanan Örnek Sayısı
Merkez	Merkez	6	7.5	5
Keşan	Yayla	8	3.5	5
Keşan	Karahisar	3	1	1
Keşan	Kılıçköy	5	1	2
Keşan	Erikli	6	2	3
Keşan	Merkez	5	9	5
Uzunköprü	Altinyazı	3	1	1
Uzunköprü	Balabanköy	1	2.5	2
Uzunköprü	Balabankoru	1	1	1
Uzunköprü	Kurtbey	2	1	1
Uzunköprü	Karaağaçköy	1	25	20
İpsala	İbriktepe	5	1.5	4
İpsala	Hacıköy	2	1	2
İpsala	Sarıcaali	2	1	1
İpsala	Merkez	3	3	5
Havsa	Merkez	2	1	4
TOPLAM	16	55	60	62

Çizelge 4. 2’de de görüldüğü gibi Edirne ilinden elde edilen 104 adet *Xanthomonas arboricola* pv. *junlandis* izolatının %11.53’ü Merkez, %42.3’ ü Keşan, %23.07’ si İpsala, %19.2’ si Uzunköprü’den ve %3.84’ü ise Havsa’dan elde edilmiştir.

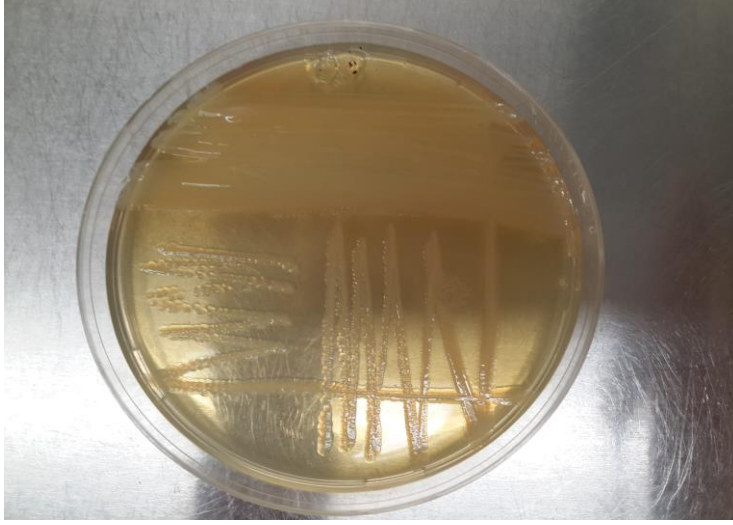
Arazi çalışmalarında ziyaret edilen bahçelerde hastalığın bulunma oranı %9.09 olarak belirlenmiştir. Edirne ili mevkilerine göre bahçelerde hastalığın bulunma oranları ise Merkez’de %8.57, Keşan’da %13.58, İpsala’da %13.04, Uzunköprü’de %1.17 ve Havsa’da %9.09 olarak saptanmıştır. Hastalık şiddeti gezilen bahçelere göre değişiklik göstermekle birlikte %9-14 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir (Çizelge 4.3.)

**Çizelge 4.3.** Edirne ili ve ilçelerinde surveylenen ceviz bahçeleri, toplanan örnek sayısı ve izolat isimleri

BAHÇE NO.	İLÇE	KÖY	TOPLANAN ÖRNEK SAYISI	İZOLAT İSMİ
1	UZUNKÖPRÜ	ALTINYAZI	1	ALTINYAZI 1
2	UZUNKÖPRÜ	ALTINYAZI	1	ALTINYAZI 2
3	UZUNKÖPRÜ	BALABANKÖY	2	BALABAN C4-1
4	UZUNKÖPRÜ	BALABANKÖY	2	BALABAN C4-2
5	UZUNKÖPRÜ	KURTBEY	1	-
6	UZUNKÖPRÜ	BALABANKORU	1	-
7	UZUNKÖPRÜ	KARAAĞAÇ	20	KARAAĞAÇ 1
8	KEŞAN	MERKEZ	5	KEŞAN C1-1
9	KEŞAN	MERKEZ	5	KEŞAN C1-2
10	KEŞAN	MERKEZ	5	KEŞAN C1-3
11	KEŞAN	MERKEZ	5	KEŞAN HANDE-YENİ
12	KEŞAN	YAYLA	5	YAYLA Cyaprak
13	KEŞAN	ERİKLİ	3	ERİKLİ C5-1
14	KEŞAN	ERİKLİ	3	ERİKLİ C5-2
15	KEŞAN	KARAHİSAR	1	KARAHİSAR C7-1
16	KEŞAN	KARAHİSAR	1	KARAHİSAR C7-2
17	KEŞAN	KILIÇKÖY	2	KILIÇKÖY C2-1
18	KEŞAN	KILIÇKÖY	2	KILIÇKÖY C2-2
19	İPSALA	MERKEZ	5	İPSALA C6-1
20	İPSALA	MERKEZ	5	İPSALA C6-2
21	İPSALA	MERKEZ	5	İPSALA C6-3
22	İPSALA	SARICAALİ	1	SARICAALİ C3-1
23	İPSALA	HACIKÖY	2	HACIKÖY
24	İPSALA	İBRİKTEPE	4	İBRİKTEPE 1
25	HAVSA	MERKEZ	4	HAVSA C8-4
26	EDİRNE	MERKEZ	5	EDİRNE C8-1
27	EDİRNE	MERKEZ	5	EDİRNE C8-2
28	EDİRNE	MERKEZ	5	EDİRNE C8-3

### 4.3.Bakteriyel Yanıklık Etmeninin İzolasyonu

Edirne ili ve ilçelerindeceviz bakteriyel yanıklık belirtisi gösteren 62 adet bitki örneğinin hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içeren parçalardan King B besi yerine yapılan izolasyonlarda 2-3 gün içinde sarı renkte (Şekil 4.1)kolonilerden 104 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlar YDCA besi yerine çizimleri yapılarak tanı çalışmaları yapılmak üzerebuzdolabında saklanmıştır.



Şekil 4.1. King B besi yerinde *Xanthomonas arboricola* pv. *junlandis* gelişimi

**Çizelge 4.4.**Tanı çalışmaları için seçilen ceviz izolatlari

<b>İZOLE EDİLDİKLERİ YER</b>	<b>İZOLATLARIN KOD ADLARI</b>
UZUNKÖPRÜ-ALTINYAZI KÖYÜ	ALTINYAZI 1
UZUNKÖPRÜ-ALTINYAZI KÖYÜ	ALTINYAZI 2
UZUNKÖPRÜ- BALABANKÖY	BALABAN 1
UZUNKÖPRÜ- BALABANKÖY	BALABAN 2
UZUNKÖPRÜ-KARAAĞAÇ KÖY	KARAAĞAÇ 1
KEŞAN-YAYLA	YAYLA C yaprak
KEŞAN-ERİKLİ	ERİKLİ C5-1
KEŞAN-ERİKLİ	ERİKLİ C5-2
KEŞAN-KARAHİSAR	KARAHİSAR C7-1
KEŞAN-KARAHİSAR	KARAHİSAR C7-2
KEŞAN-KILIÇKÖY	KILIÇKÖY C2-1
KEŞAN-KILIÇKÖY	KILIÇKÖY C2-2
KEŞAN-MERKEZ	KEŞAN C1-1
KEŞAN-MERKEZ	KEŞAN C1-2
KEŞAN-MERKEZ	KEŞAN C1-3
KEŞAN-MERKEZ	KEŞAN HANDE- YENİ
EDİRNE-MERKEZ	EDİRNE C8-1
EDİRNE-MERKEZ	EDİRNE C8-2
EDİRNE-MERKEZ	EDİRNE C8-3
HAVSA-MERKEZ	HAVSA C8-4
İPSALA MERKEZ	İPSALA C6-1
İPSALA MERKEZ	İPSALA C6-2
İPSALA MERKEZ	İPSALA C6-3
İPSALA-SARICAALİ	SARICAALİ C3-1
İPSALA-HACIKÖY	HACIKÖY 1
İPSALA-İBRİKTEPE	İBRİKTEPE 1

#### 4.4. Patojen Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik izolatlar spektrofotometrede 600 nm absorbanans değeri 0.3 ölçüm değerine ayarlanarak süspansiyonun  $7 \times 10^8$  hücre/ml yoğunluğunda hesaplanmıştır. (Klement ve ark. 1990).

#### 4.5. Patojenite testi, Re-izolasyon ve Re-izolatların Eldesi

Seçilen 26 adet bölge izolatının tümü ile patojenite testi yapılmıştır. 26 adet bölge izolatu ve referans kültür ile yapılan patojenite testlerinde tüm izolatlar inokulasyondan sonra 8-10 gün içerisinde sürgünlerde (Şekil4.2) yanıklığa neden olmuştur. Sağlıklı ham ceviz meyvelerinde yapılan inokulasyonlarda ise 2-4 gün sonra ceviz meyvelerinde kahverengi-siyah lekeler gözlenmiştir (Şekil 4.2). Negatif kontrol olarak steril su ile yapılan çiçek, sürgün ve meyve inokulasyonlarında ise herhangi bir belirti gözlenmemiştir. Simptom veren bitkilerde ve ham ceviz meyvelerinden yapılan re-izolasyonlarda izolatlar tekrar elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Patojenite testi sonucu yapraklarda ve ham meyvelerde oluşan hastalık belirtisi

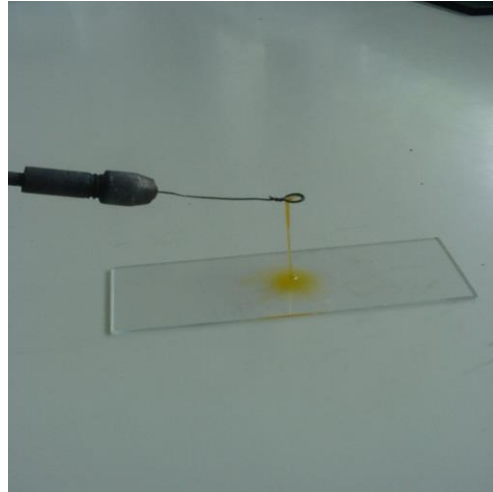
Patojenite testlerinin sonuçları hastalığı tipik belirtilerinin sağlıklı fidanlarda ve ham meyvelerde görülmesine göre değerlendirilmiştir. Patojenite testi için kullanılan 26 adet seçilen bölge izolatu ceviz fidanı ve ham meyvelerde referans kültür ile aynı belirtileri oluşturduğundan dolayı patojenite testi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

#### 4. 6. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı

**King B Besi Yerlerinde Koloni Gelişimi;** Elde edilen re-izolatlar King B besi yerinde sarı renkli koloni gelişimi göstermiştir.

**Levan Oluşumu:** Nutrient agar besi yerine %5 oranında sakkaroz (sukroz) eklenerek hazırlanan Sukroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine izolatlar çizildikten sonra, 25°C' de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Kalın, beyaz, konveks, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead 1987). İnkübasyon sonucunda sarı renkli koloniler oluşmasından dolayı levan oluşumu negatif olarak değerlendirilmiştir.

**Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi:** *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandisre*-izolatları ve referans izolatla yapılan KOH testi sonucunda özeye yapışarak viskoz bir yapı oluşturmasından dolayı gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.3.). Karşılaştırma kültürü olarak kullanılan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'de ise sümüksü bir yapı gözlenmemiş olmasından dolayı gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 4.3.** KOH testi gram negatif reaksiyon



**Oksidatif-Fermentatif Test:** Taze geliştirilmiş 48 saatlik *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis* izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile nokta aşılama yapılmıştır. Her izolat için 6 tüp kullanılmıştır, bu tüplerden üçüne 1 ml steril ılık vaspar (bir ölçü vaselin üç ölçü parafin karışımı) konarak yüzeyi kapatılmış diğer üçüne hiçbir ekleme yapılmamıştır. 25°C’de 5-6 günlük bir inkübasyondan sonra ortam renginin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilir (Çizelge 4.5).

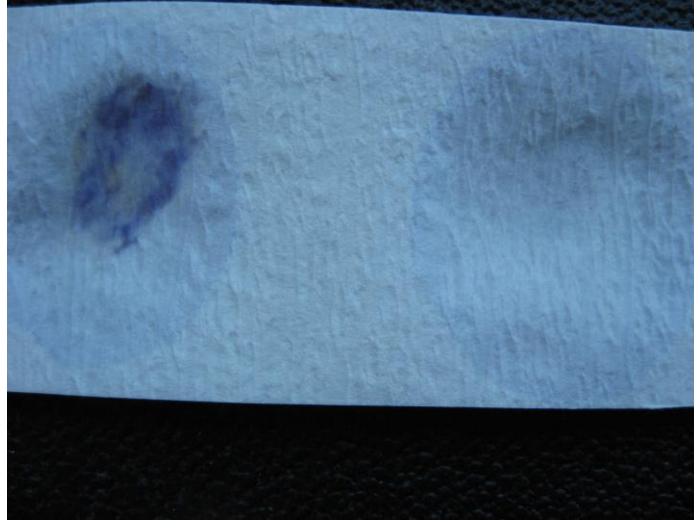
*Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis* izolatlarıyla yapılan oksidatif-fermantatif test sonuçlarında vasparlı tüplerde sarı renk oluşumu görülmemiştir. Bu nedenle oksidatif-fermantatif test sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir. Bunun sebebi ise *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis*’in aerobik bir bakteri olmasıdır. Kısacası vaspar ile hava teması kesilen tüplerde ceviz bakteriyel yanıklık etmeni gelişim yapamadığından karbonhidrat ayrışması gerçekleşmemiştir.

**Pektolitik Aktivite Testi:** *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis* re-izolatları ve referans izolatların tamamı patates dilimlerinde pektolitik enzim üretmediği ve dolayısıyla patates dilimlerinde herhangi bir çürüme görülmemiştir (Çizelge 4.5). İzolatların patatesteki pektolitik aktivitesi negatif olup, pozitif kontrol olarak kullandığımız referans izolat *Pectobacterium caratovorum* çalışmada patates dilimlerini çürütmüş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.).



**Şekil 4.4.** Pektolitik Aktivite Testi sonucu çürüme görülmemiştir.

**Oksidaz Testi:** Re-izolatlar ve referans kültür oksidaz testi için kurutma kağıdı üzerine %1'lik tetramethyl-p-phenylendiamine dihydrochloride solüsyonu emdirilmiş filtre kağıdına öze ile alınan bakteri izolatları zigzaglar şeklinde çizimler sonucunda renk değişimi görülmemesinden dolayı oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.5). Oksidaz pozitif özellikteki *Pseudomonas cichorii* kültürü çalışmada kullanılmıştır ve mor renkte bir değişime neden olmuştur.



Şekil 4.5. Oksidaz pozitif-negatif reaksiyon

**Arginin Dehidrolaz Aktivitesi:** *Xanthomonas arboricola* pv. *junlandis* ,izolatları ve referans izolatla yapılan arginin dehidrolaz testi sonucunda herhangi bir renk değişimi görülmemesinden dolayı negatif olarak değerlendirilmiştir(Çizelge 4.5).

**Katalaz Testi:** Besi yerine aşılama yapıldıktan 24 saat sonra %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> döküldüğünde birkaç saniye içerisinde gaz kabarcıkları gösteren orijinal kültür ve bölge izolatları pozitif olarak kabul edilmiştir (Çizelge 4.5).

**Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi:** İnokulasyondan 24-36 saat sonra *Xanthomonas arboricola* pv. *junlandis* izolatların tümü ve referans kültür tütün yapraklarında tipik aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmuştur (Çizelge 4.5, Şekil 4.6).



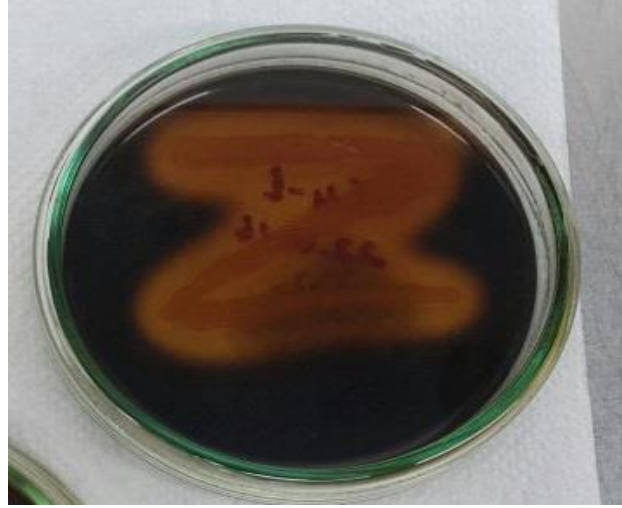
**Şekil 4.6.** *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* test izolatının tütün yaprağında oluşturduğu aşırı duyarlılık simptomu

**Jelatin hidrolizi:** *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* re-izolatları ve referans izolat tüplere aşılandıktan sonra 20°C’de 7–14 gün inkübasyona bırakılmıştır ve tüplerdeki jelatinin akıcı hale gelmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. 14. gün sonunda değerlendirilen *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatlarının tümünde jelatin hidrolizi test sonucu akışkanlık gözlemlendi ve sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5. Şekil 4.7.).



**Şekil 4.7.** Jelatin testi pozitif sonucu

**Nişasta Hidralizasyon Testi:**Nişasta besi yerine çizilen ceviz bakteriyel yanıklık izolatları ve referans kültürler 7-14 günlük inkübasyon sonunda üzerine lugol eriği döküldüğünde koloni çevresinde referans kültürde belirgin parlak bir alan gözlenirken bölge izolatlarında bu alan zayıf olarak belirlenmiştir (izelge 4.5, şekil 4.8). Bölge izolatları nişastayı hidrolize ettiklerinden pozitif olarak değerlendirilmiştir.



**şekil 4.8.** Nişasta Hidralizasyon Testi Sonucu

**Tween B ortamında Koloni Gelişimi:** Bölgeden izole edilen *Xanthomonas arboricola* pv. *junglandis* izolatları ve orijinal kültürler Tween B besi yerinde yuvarlak, sarı tümsek ve çevresinde temiz haleli koloniler geliştirmiştir (izelge 4.4, şekil 4.9).

**Çizelge 4.5.** Bakteri izolatlarının test sonuçları

İzolat Adı	Gram Reaksiyon	Oksidatif-Fermentatif reaksiyon	L	O	P	A	T	G	N	TWEEN ORTAM
ALTINYAZI1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ALTINYAZI2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
İBRİKTEPE 1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
HACIKÖY	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KEŞAN C1-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KEŞAN C1-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KEŞAN C1-3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KILIÇKÖY C2-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KILIÇKÖY C2-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
SARICAALİ C3-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
BALABAN C4-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
BALABAN C4-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ERİKLİ C5-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ERİKLİ C5-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
İPSALA C6-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
İPSALA C6-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
İPSALA C6-3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KARAHİSAR C7-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KARAHİSAR C7-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
EDİRNE C8-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
EDİRNE C8-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
EDİRNE C8-3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
HAVSA C8-4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
YAYLA CYAPRAK	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
HANDE YENİ	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
KARAAĞAÇ 1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

\*L: Levan oluşumu, O: Oksidaz reaksiyonu, P: Pektolitik aktivite, A: Arginin dehidrolaz, T: Tütünda aşırı duyarlılık reaksiyonu, G: Jelatin hidrolizi, N: Nişasta hidrolizi

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizde ceviz yetiştiriciliği her geçen gün artmaktadır. Ülkemiz sert çekirdekli meyve üretimi açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Üretimin her geçen gün arttığı bir sektörün hastalıklar yönünden en az zararlanmasını sağlayacak, yeni yöntem ve tekniklerin uygulanmasına zemin hazırlayacak çalışmaları yapmak bizim birinci görevimizdir. Bu düşünceden hareketle, bu çalışmada Edirne ili ve çevresindeki ceviz ağaçlarında cevizde bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *junglandis* 'in tanısı yapılmış ve bu hastalığın bölgedeki ceviz ağaçlarındaki yaygınlığı belirlenmiştir.

Edirne ilinin 4 farklı ilçesinin (Keşan, İpsala, Uzunköprü, Havsa ) 12 farklı köyünden (Kılıçköy, Erikli, Yayla, Karahisar, Hacıköy, Sarıcaali, Karaağaç, İbriktepe, Kurtbey, Balabanköy, Balabankoru, Altınyazı) ve 16 farklı ceviz bahçesinden 62 adet hastalıklı bitki örneği toplanmıştır. Elde edilen 104 izolat yapılan biyokimyasal testler (KOH ile gram reaksiyonu belirleme, oksidatif-fermentatif gelişim, katalaz, jelatin hidrolize, nişasta hidralizasyon testi, oksidaz reaksiyonu, tween ortamı, nitrat reaksiyon testi, arginin dehidrolaz aktivitesi, levan oluşumu), fizyolojik, morfolojik ve patojenite testleri sonucunda *Xanthomonas arboricola* pv. *junglandis* olarak tanılanmıştır.

Yapılan arazi çalışmalarıyla, Edirne ilinde hastalığın yaygınlığı il merkezinde %11.3, Keşan'da %42.3, İpsala'da %23.07, Uzunköprü'de %19.2, Havsa'da %3.84 olarak belirlenmiştir. Edirne ilinde gezilen ceviz bahçelerinden %28.65'inde hastalığa rastlanmıştır. Araştırmada ceviz bakteriyel yanıklığı bazı köylerde daha çok görülürken, bazı köylerde ise hiç görülmediği ortaya çıkmıştır.

Çiftçilerle yapılan görüşmeler sonucunda ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının sıklıkla fungal bir hastalık olan antraknoz ile karıştırıldığı tespit edilmiştir. Hatta zaman zaman kahverengi uç nekrozu ile meydana gelen karışık enfeksiyonlarda erken meyve dökümlerinin görüldüğü çiftçiye açıklanmalıdır. Tüm bu enfeksiyonlardan farklı olarak, ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığında simptomların kabuktan meyve içine doğru yayılması, meyve tadında acılaşmaya neden olması ve gövdede kanser oluşumu etmeninin doğru teşhis edilmesinde önem kazanabilmektedir. Bakteriyel hastalıklarla mücadelede öncelikle doğru teşhis yapılması ve ardından doğru bir ilaçlama programı uygulanması önemlidir. Aksi takdirde önemli ekonomik kayıpların oluşabileceği bilinmektedir.

Survey yapılan alanlarda üreticilerle yapılan görüşmeler sonucunda, bazı çiftçilerin bakteriyel etmenle mücadele etmek için ülkemizde yasaklı olmasına rağmen yurt dışından antibiyotik getirterek kullandıkları öğrenilmiştir. Çiftçilerin antibiyotik kullanımının zamanla bakteriyel etmenlerde dayanıklılık oluşturacağı açıklanmalıdır. Ayrıca antibiyotik kullanımının insan, hayvan ve çevre sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği anlatılmalıdır.

Tüm bitki hastalıklarında olduğu gibi hastalıklarıyla mücadelede olduğu gibi cevizde bakteriyel yanıklık ile mücadelede de temiz üretim materyalinin kullanımı alınacak tedbirlerden birisidir. Geçmiş yıllarda bölgede bu kadar yaygın olmayan bu hastalık her geçen gün artış göstermektedir. Bunun en büyük sebebi ise etmenle bulaşık ceviz fidanlarının alınarak dikimin yapılmasıdır. Çiftçi ile yapılan sohbetlerde çabuk gelişim gösteren fakat pek çok hastalığa daha duyarlı olan Chandler çeşidinin fazla tercih edildiği öğrenildi.

Yeni bir bahçe kurulurken kültür bitkisine uygun toprak özelliği ve dreneja sahip olan bölgelerin seçilmesine dikkat edilmelidir. Azotlu gübreler, Bitkilerin özellikle yeşil aksamının büyümesini teşvik etmesinden dolayı hastalıklara karşı duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle aşırı azotlu gübrelemeden kaçınılmalıdır.

Hastalık ile mücadelede yöntemlerden biri de hastalıklı sürgünleri, dalları ve taze filizleri budayarak temizlemektir. Budama makasları, bakterilerin yayılmaması için her seferinde dezenfektan bir maddeye batırılmalıdır.

Afitler, karıncalar, sinekler ve arılar olmak üzere pek çok zararlının hastalığı yaydığı göz önüne alındığında böcek mücadelesine de önem verilmeli ancak meyve tutumunda tozlayıcı böceklerin etkililiğine zarar verilmemelidir.

Bitkisel üretimde hastalık ve zararlılarda mücadelede ilaçlamanın gerekli olup olmadığına karar vermek, en uygun ilaçlama zamanını saptayarak üreticileri uyarmak ve kullanılan kimyasalların çevre ve insan sağlığına yaptığı zararı en aza indirmek amacıyla erken tahmin ve uyarı sistemlerinin uygulanmasına önem verilmelidir.

Hastalığın mücadelesinde büyük önemi olan kültürel mücadeleye daha fazla önem verilmesi sağlanmalıdır. Cevizde bakteriyel yanıklıklığında Edirne ilinde henüz fazla yaygınlığı gözlenmemiştir. Bu hastalığın yayılmasını engelleme için yukarıda bahsedilenler dikkate alınırca üreticimiz için faydalı olacaktır. Gerekli önlemler ve erken tahminler yapılarak hastalığın yayılması engellenebilir ve de hastalıklı ağaçlarımız tedavi

edilebilmektedir. Hastalığın önüne geçerek üretim miktarı arttırılabilir. Böylece çiftçilerimiz maddi manevi rahatlığa kavuşacaklardır ve ceviz üretimi daha da teşvik edilebilir.

## 6. KAYNAKLAR

Anonim, <http://rapory.tuik.gov.tr/-148668666713602087021667818132.html>. Son erişim tarihi: 16-01-2017

Anonymus 2016a, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Son erişim tarihi: 12/10/2016

Anonymus 2016b, [www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides](http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides). Son erişim tarihi : 14/09/2016

Anonymus 2016c, [www.walnutresearch.ucdavis.edu](http://www.walnutresearch.ucdavis.edu). Son erişim tarihi: 15/10/2016

Adaskaveg, J. E, Kirkpatrick, B. C., Buncher, R., Olson, B., 1994, Epidemiology and management of walnut blight, Walnut Annual Reports, 1994, Walnut Marketing Board of California, Sacramento, CA.

Akat, S., Özaktan, H., Yolageldi, L., 2016, Studies on the etiology and control of brown apical necrotics (BAN) of walnut fruits in Turkey. University of Ege, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 35100, Bornova-İzmir, Turkey.

Aleta, N. Ninot A, 1993, Variedades de nogal. Fructicultura Profesional 54, 93100.

Aleta, N, Ninot, A., Moragrega, C., 2001, Llorente, I., Montesinos, E., Blight sensitivity of juglans regia l. spanish selections, Acta Horti, 544, 353-362.

Arquero O., Lovera M., Rodriguez R., Salguero A., Trapero A., 2005. Characterization and development of necrotic lesions of walnut tree fruits in southern Spain. Acta Horticulturae 705: 457-461.

Bazzi, C, Biondi, E., Gianati, P., Brunelli, A., 2004, Efficacy of bioagents and chemicals against Pear Shoot Blight, 10th Int. Workshop on Fire Blight Bologna-Italy, 5th-9th July, Pp:77.

Belisario, A, Are, M., Palangio, C.S., Zoina, A., 1997, Walnut Blight Resistance in the Genus Juglans, ISHS Acta Horticulturae, III International Walnut Congress, Pp: 442.

Belisario, A, Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V., ve Valier, A. 2002. Occurrence and Etiology of Brown Apical Necrosis on Persian (English) Walnut Fruit. Plant Dis. 86:599- 602.



- Bergey D.H, Harrison F.C., Breed R.S., Hammer B.W., Huntoon F.M., 1930. Manual of Determinative Bacteriology, 5th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA
- Bradbury J.F, 1986. Guide to plant Pathogenic Bacteria. CAB International Publications, UK, 332p
- Barionovi, D. ve Scortichini, M.,2008. Integron variability in *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains. Federation of European Microbiological Societies. 288: 19- 24.
- Dowson W.J, 1939. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Abteilung II 100: 177-193.
- Dye D W.,Bradbury J.F., Goto M., Hayward A.C., Lelliot R.A., Schroth M.N., 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Review of Plant Pathology 59: 153-168.
- Fahy, P. C. And A.C. Hayward, 1983. Media and Methods for Isolation and Diagnostic Tests. In: Plant Bacterial Diseases, Fahy, P. C. And G. J., Persley (eds), Academic Press, Australia, pp:378.
- Garcin A., Duchesne D., 2001. Walnut blight and apical necrosis. Acta Horticulturae 544: 379-387.
- Gardan, L, Braut, T., Germain, E., 1993, Copper Resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in French Walnut Orchards and Its Association with Conjugative Plasmids, Acta Hort 311, Pp : 259-265.
- Giraud, M., Prunet, J.P., Chevallier, A., Romain, S., Thiriaud, V., Santrac, I. and Bray, O. 2010. STUDY OF *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS* POPULATION DYNAMICS IN FRENCH WALNUT ORCHARDS OVER THREE YEARS. Acta Hort. (ISHS) 861:439-444
- Hajri A, Meyer D., Delort F., Guillaumès J., Brin C., Manceau C., 2010. Identification of a genetic lineage within *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* as the causal agent of vertical oozing canker of Persian (English) walnut in France. Plant Pathology. 59: 1014.

- İvonovic, Z., Popovic, T., Janse, J., Kojic, M., Stankovic, S., Gavrilovic, V., Fira, D., 2015. Molekuler assesment of genetic diversity of *Xanthomonas arborcola* pv. *juglandis* strain from Serbia by various DNA fingerprinting techniques. 141:133-145.
- Janse J. D., 2006, *Phytopacteriology., Principles and Practice.* Wallingford., UK and Oxford Press, New York., 208-209.
- Jenkins T.A, Marsh C., Lang M.D., Vanestre J., Walter M., Obonor F., 2010, Walnut blight sustainable management researh in New Zeland. ISHS Acta Horticulturae 861: VI International Walnut Symposium, Melbourne-Avustralya, Pp: 861-868.
- Karaca İ. 1974. Sistematik Bitki hastalıkları, Cilt 4. EÜ Ziraat Fakültesi Yayınları No:217
- Kaluźna, M, J. Pulawska, M. Waleron, P. Sobiczewski, 2014. The genetic characterization of *Xanthomonas arboricolapv.juglandis*, the causal agent of walnut blight in Poland. *Plant Pathology.* 63: 1404- 1416.
- Klement Z., Rudolf K., Sands D. C., 1990., *Methods in Phytopacteriaology,* Akademia Kiado, Budapest, XIV+568p.
- Klement Z., and Goodman R. N., 1967., The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Rewiew of Phytopathology,* 5: 17-44.
- Kovacs N. 1956, Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature,* London, 170-173.
- Lang M.D, Evans K.J., 2006, Preliminary studies towards managing walnut blight in Tasmania, *Acta Horticulturae,* Pp:705, 451-456.
- Lee Y.-A, Schroth, M. N., Hendson, M., Lindow, S. E., Wang, X.-L., Olson, B., Buchner, R. P., and Teviotdale, B., 1993, Increased toxicity of iron-amended coppercontaining bactericides to the walnut blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. *Phytopathology* 83:1460-1465.
- Lelliot, R.A, Stead, D.E., 1987. *Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants,* blackwell scientific publications, pp: 216 p.
- Lindow S., Olson W., Buchner R., 2014, Colonization of Dormant Walnut Buds by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* is Predictive of Subsequent Disease. 1163-74
- Lazarov, A. and Grigorov, P. 1961. *Karantina na Rastenijata.* Zemizdat. Sofia. p. 258.

- Meguire, R. G., J. B. Jones and M. Sasser, 1986. Tween media for semi-selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Disease*, 70: 887-889.
- Martins, J.M. S, Pinto De Abreu C., Gomes Pereira J. A., 1994. Chemical control of bacterial blight on walnut. *Acta Hort.* 442:367-372.
- Miller P.W, Bollen W.B., 1946. Walnut bacteriosis and its control. Technical Bulletin of the Oregon Agricultural Experiment Station 9: 1-107
- Moragrega, C, Montesinos, E., 2002, New products for chemical control of bacterial blight (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) of walnut. ([www.cost873.ch/\\_uploads/\\_files/Moragrega\\_ChemicalControlWalnutBlight.pdf](http://www.cost873.ch/_uploads/_files/Moragrega_ChemicalControlWalnutBlight.pdf))
- Moragrega, C, Montesinos, E., Santamaria, G., Matias, J., Rovira, M., Aleta, N., 2007, Infectious Biology and Population Dynamics of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Spanish Walnut Orchards, Diagnostic and Monitoring of Bacterial Disease of Stone Fruits and Nuts, Jointed meeting of WG 1 and 2 of COST Action 873, Angers, France, Pp:19.
- Moragrega C., Aletà N., Rovira M., Matias J., 2008. Disease progress and microorganisms associated to brown apical necrosis of walnut. Files of the COST 873 WG1-4 Meeting: Active research to combat bacterial diseases of stone fruits and nuts. Athens 2008. Available from: [http://www.cost873.ch/\\_uploads/\\_files/Moragrega\\_BANSpain.pdf](http://www.cost873.ch/_uploads/_files/Moragrega_BANSpain.pdf).
- Mulrean E.N, Schroth M.N., 1982. Ecology of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* on Persian (English) walnuts. *Phytopathology* 72: 434-438.
- Ninot, A, Aleta N., Moragrega C., Montesinos E., 2002. Evaluation of Reduced Copper Spraying Program to Control Bacteria Blight of Walnut. *Plant Disease* 86:583-587.
- Norelli, J., Miller, S.L., 2004, Using prohexadione-calcium (apogee) to control fire blight in young apple trees, 10th Int. Workshop on Fire Blight, Bologna, ITALY, 5th-9th July, Pp: 49.
- Olson B., Buchner R., Miller S., Lindow S., Adaskaveg J., 2001. When to apply the first walnut blight treatment. Annual Walnut Report, 2001, Walnut Marketing Board of California, Sacramento, CA.

- Ölez, H, Yücel, A., 1974. Türkiye’de Ceviz Yetiştiriciliğinin Sanayii-Ticareti ve Problemleri, Yalova Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- Özaktan, H. Uslu A, Erdal M., Akköprü A., Bozkurt A., 2007. Determination of Bacterial Diseases on Peach in Aegean and on Walnut in Western Anatolian Regions of Turkey. Diagnostic and Monitoring of Bacterial Disease of Stone Fruits and Nuts. Joined meeting of WG 1 and 2 of COST Action 873, Angers, France:23.
- Özaktan H., Akat S., AkköprüA., Yavas M., 2009. Etiological approach to Brown apical necrosis on walnut fruits in Turkey. Files of the COST 873 WG1-4 Meeting: Active re-search to combat bacterial diseases of stone fruits and nuts resistance and Control strategies against bacterial diseases of stone fruits and nuts. Cetara 2009.
- Pierce N.B, 1896. Bacteriosis of walnuts. California Fruit Grower 19: 243.
- Pierce N.B, 1901. Walnut bacteriosis. Botanical Gazette 31: 272-273.
- Radix, P, Seigle-Murandi, F., Charlot G., 1994, Walnut Blight : Development of Fruit Infection In Two Orchards, Crop Protection, 13 (8): 629-631.
- Radix, P, Bastien, C., Jay-Allemand, C., Charlot, G., Seigle-Murandi, F., 1998, The influence of soil nature on polyphenols in walnut tissues, a possible explanation of differences in the expression of walnut blight, 18: 627-637.
- Richard, P. B, Olson W. H., Adaskaveg J., Lindow S., Pickel, C., Gilles, C. K., Walton J., Zane L., 2003, Walnut blight control investigations, [http://walnutresearch.ucdavis.edu/2003/2003\\_381.pdf](http://walnutresearch.ucdavis.edu/2003/2003_381.pdf).
- Richard, P. B, Lindow S., James E. A., Gilles, C. K., Kari L. R., and Koutsoukis R., 2006, Walnut blight control investigations tehama 2006, [http://walnutresearch.ucdavis.edu/2006/2006\\_237](http://walnutresearch.ucdavis.edu/2006/2006_237).
- Sands D. C., 1990, PHYsiological criteria-determinative tests. Methods in phytobacteriology, 133-143.
- Saravanan U, 2007, Copper sensitivity in Tasmanian populations of the walnut blight pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Msc. Thesis. University of Tasmania, Hobart, Australia.

- Schaad N.W, Vidaver A.K., Lacy G.H., Rudolph K., Jones J.B., 2000. Evaluation of proposed amended names of several psuedomonads and xanthomonads and recommendations. *Phytopathology* 90: 208-213
- Schaad, N.W, Jones J.B., Lacy G.H., 2001. *Xanthomonas* In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition.
- Scortichini,M, U. Marchesi, P. Di Prospero, 2001. Genetic Diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. Campestris* pv. *juglandis*; *X. Juglandis* pv. *juglandis*) Strains from Different Geographical Areas shown by Repetitive Polymerase Chain Reaction Genomic Fingerprinting. *J. Phytopathology*. 149: 325-332.
- Shami, M.A, Ghasemi;A. Alizade Ali-Abadi;A. Eskandari, 2013. Genetic Diversity and Phylogenetic Study of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* the Causal Agent of Walnut Bacterial Blight Disease. *Journal of Nuts*. 4(4): 57-62.
- Smith E.F, 1905. *Bacteria in Relation to Plant Diseases*. Carnegie Institute, Washington DC, US.
- Spinelli, F, Vanneste, J., Cornish, D., Voyle, D., Yu, J., Costa, G., 2004, Growth-regulating Acycychlohexanediones, Trinexapac-ethyl and Prohexadione-calcium, Decrease Blossom Blight Incidence in Pome Fruits, 10th Int. Workshop on Fire Blight, Bologna, ITALY, 5th-9th July, Pp: 61.
- Stall R.E, Gottwald T.R., Koizumi M., Schaad N.C., 1993. Ecology of plant pathogenic xanthomonads. In: Swings J.G., Civerolo E.L. (eds). *Xanthomonas*, pp. 265-290. Chapman and Hall, London, UK
- Stefani, E. 2010. Economic significance and control of bacterial spot/cancer of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Plant Pathol.* 92(S1):99-103.
- Soltani, J. Ve Aliabadi A.A., 2010. Genetic resistance to bacterial blight disease in Persian walnut. *J. Plant Pathol* 128:65-70.
- Soltani, J. Ve Aliabadi A.A., 2013. Antibacterial effects of Several Plant Extracts and Essential Oils on *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in vitro. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 16-4, 461-468.
- Şen, S.M. 1986. Ceviz yetiştiriciliği. Ondokuzmayıs Üniv.Ziraat Fak., Samsun.

- Tsiantos, J, Vagelas I.K., Rumbos C., Chatzaki A., Rouskas D., Gravanis F.T., 2008, Evaluation of resistance of cultivated walnut varieties and selections to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Greece, Current research to combat bacterial diseases of stone fruits and nuts. COST 873 WG1-4 meeting in Athens, Greece, 20-23 October 2008: 26-27.
- Van der Zwet, T., Thomson, S.V., Covey, R.P. and Bonn, W.G. (1986) Endophytic *Erwinia amylovora* not recovered from core tissues of apples from apparently healthy trees (Abstract). *Phytopathology***76**: 1140 pp.
- Vauterin L, Hoste B., Kersters K., Swings J., 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 472-489.
- Vauterin L. and J Swings 1997. Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (1997) 19, 77–82.
- Woeste, K. E, Mc Granahan, G.H., Schroth, M.N., 1992. Variation among Persian walnuts in response to inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 117:527-531.

## 7. TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilgi ve anlayışıyla bana yol gösteren, örnek olan ve bana “Edirne’de Ceviz Bakteriyel Yanıklık Hastalığının Yaygınlığı ve Etmenin Tanısı” konulu Yüksek Lisans Tezini veren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa MİRİK’e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek Lisan Tez Jüri üyeleri Sayın Prof.Dr. Yeşim AYSAN ve Sayın Yard. Doç. Dr. Adnan KARA yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda buldukları için sonsuz teşekkürler.

Bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Bitki Koruma Bölümü Bölüm Başkanlığı’na ve maddi desteklerinden dolayı Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkür ederim.

Hem laboratuvar çalışmalarında hem de yazım aşamasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. İrem ALTIN’a ve Araş.Gör. Cansu ÖKSEL’e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana destek olan maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen babam Mehmet AVCI, annem Emine AVCI, ablam Hafize AVCI’ ya teşekkür ediyorum.

## **8. ÖZGEÇMİŞ**

1991 yılında Edirne'nin Keşan ilçesinde doğmuştur. İlk, orta ve lise öğreniminin Keşan'da tamamladıktan sonra 2009 yılında yerleştirildiği Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden 2013 yılında mezun olmuştur. 2013 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesinde başladığı yüksek lisansa başladı.



## 9.EKLER

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

Yeast Extract	10.0g
Dextrose	20.0g
Calcium Carbonate	20.0g
Agar	15.0g
Distile Su	1000ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

### **Nutrient Agar (NA) Besi Yeri** (Lelliott ve Stead, 1987)

Nutrient Agar	13.0g
Distile Su	1000ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

### **Tween B Besi Yerinde** (McGuire ve Jones, 1986)

Peptone	10.0g.
KBr	10.0g
CaCL <sub>2</sub> .	0.25g
Borik Asit	0.30g
Agar	15.0g
Distile Su	1000ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Ortam 50°C'ye kadar soğutularak içerisine aşağıdaki kimyasallar ilave edilmiştir.

Tween 80	10.0ml
Cycloheximide	50.0mg
Cephalexin	65.0mg
5-flouracil	12.0mg
Tobramycin	0.4mg

**SNA Besi Yeri** (Lelliot ve Stead, 1987)

Nutrient Agar	13.0g
Sukroz	50.0g
Distile Su	1000ml

121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir.

**Nutrient Broth Sıvı Besi Yeri** (Lelliot ve Stead 1987)

Nutrient broth	8g
Distile Su	1000ml

121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir.

**King B Besi Yeri** (King ve ark 1954)

Proteose Peptone	20.0g
Gliserin	10.0ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5g
Agar	15.0g
Distile Su	1000ml

121°C’de 15 dakika otoklav edilmiştir.