

**CEVİZ BAKTERİYEL YANIKLIK
HASTALIK ETMENİ *Xanthomonas arboricola*
pv. *juglandis* 'e KARŞI ANTAGONİST
BAKTERİYEL İZOLATLARIN *in vitro*
KOŞULLARDA BİYOKONTROL
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Bilgen YÖRÜK

**Yüksek Lisans Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa MİRİK
2018**

**T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CEVİZ BAKTERİYEL YANIKLIK ETMENİ *Xanthomonas arboricola* pv.
juglandis' e KARŞI ANTAGONİST BAKTERİYEL İZOLATLARIN *in*
vitro KOŞULLARDA BİYOKONTROL ETKİNLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Bilgen YÖRÜK

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DANIŞMAN : Prof. Dr. Mustafa MİRİK**

Tekirdağ 2018

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Mustafa MİRİK danışmanlığında, Bilgen YÖRÜK tarafından hazırlanan “**Ceviz Bakteriyel Yanıklık Etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e Karşı Antagonist Bakteriyel İzolatların *in vitro* Koşullarda Biyokontrol Etkinliklerinin Belirlenmesi**” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

İmza:

Üye: Prof. Dr. Soner SOYLU

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sümer HORUZ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

CEVİZ BAKTERİYEL YANIKLIK ETMENİ *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* 'e KARŞI ANTAGONİST BAKTERİYEL İZOLATLARIN *in vitro* KOŞULLARDA BİYOKONTROL ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Bilgen YÖRÜK

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis*'in neden olduğu ceviz yanıklık hastalığı, ceviz (*Juglans regia* L.) bitkilerinin üretimini etkileyen en önemli ve yaygın bakteriyel hastalıklardan biridir. Tipik semptomlar sürgün, yaprak, dişi çiçek, tomurcuk ve meyve gibi tüm sulu dokularda görülür. Enfeksiyon başlangıçta su emmiş leke şeklindeyken zamanla bu lekeler kahverengi-siyah nekrotik alanlara dönüşür. Başlangıçta sarı-yeşil bir hale ile çevrelenmiş dairesel lezyonlar genellikle noktasal olarak genişler. Bu çalışmada; enfekteli bitkilerden *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* 'in izolasyonu ve tanılanması ve potansiyel aday bakteriyel antagonistlerin *in vitro* koşullarda bakteriyel büyümeyi baskılayabilme yetenekleri ve antagonistik potansiyelleri araştırılmıştır. Bakteriyel hastalık etmeni izole edilmiş ve morfolojik ve biyokimyasal testlerle tanılandı. Sağlıklı ceviz yapraklarından seçici besi ortamları kullanılarak izole edilen 109 adet aday antagonist bakteri izolatları ile *in vitro* koşullarda ikili kültür testi yapılarak *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'i baskılama yetenekleri araştırılmıştır. Bu test sonucunda, 80 adet izolatin farklı boyutlarda (5-30 mm) engelleme alanı oluşturduğu, 38 adet izolatin ise gelişimini tamamen baskıladığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada antagonist bakterilerin *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* gelişimini önemli oranda engellemiş olması, antagonist izolatların biyolojik mücadelede kullanılabilirliğini göstermiştir. Hastalık etmenine karşı etkili bakteriyel izolatların tanılanması ve *in vivo* çalışmalarla etkinliğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler : *Juglans regia*, ceviz, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, ceviz bakteriyel yanıklık hastalığı, biyolojik mücadele, antagonist.

2018, 47 Sayfa

ABSTRACT

Master's Thesis

DETERMINATION OF *IN VITRO* BIOCONTROL POTENTIALS OF ANTAGONIST BACTERIAL ISOLATES AGAINST WALNUT BLIGHT DISEASE AGENT

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis*

Bilgen YÖRÜK

Namık Kemal University
Institute of Science
Department of Plant Protection

Thesis Advisor: Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Walnut blight disease, caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj), is one of the most important and common bacterial disease which effects production of walnut (*Juglans regia* L.) plants. Typical symptoms occur on all succulent tissues including shoots, leaves, rachis, petioles, buds, female flowers, catkins and nuts. Infection begin as translucent water-soaked areas which develop into brown to blackish greasy necrotic areas. Lesions, which are often surrounded by a yellow-green halo, are initially circular but often expand into angular spots. In this study, isolation and identification of disease agent Xaj from infected plants and antagonistic potentials of putative bacterial antagonist biological control agent were investigated for their ability to suppress bacterial growth *in vitro* conditions. Bacterial disease agents were isolated and identified according to morphological and biochemical methods. Using selective nutrient media, total of 109 putative antagonist bacterial isolates were isolated from different healthy walnut plant leaves and investigated for their ability to suppress bacterial growth *in vitro* conditions by dual culture test. From this test, eighty-one bacterial isolates were found to produce inhibition zones a varying sizes (range of 5-30 mm). Among the 80 isolates, thirty-eight isolates were able to suppress the bacterial growth completely. According to preliminary results of the significant suppression in the bacterial growth caused by antagonist bacteria, bacterial isolates could be used as possible bio-control agent against walnut bacterial blight disease. Further studies should be conducted on identification and determination of mode of actions and *in vivo* activities of the most efficient bacterial isolates against disease agent.

Key words: *Juglans regia*, walnut, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, walnut bacterial blight disease, biological control, antagonist.

2018, 47 Pages

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	9
2.1. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> ‘in Taksonomisi ve Tanınması ile İlgili Çalışmalar	9
2.2. Patojenin Morfolojiki Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	10
2.3. Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Hastalığının Yaygınlığı ve Mücadelesine Yönelik Çalışmalar.....	11
3. MATERYAL ve METOT	16
3.1. Materyal	16
3.2. Metot	16
3.2.1. Hastalık belirtisi gösteren ceviz yapraklarının toplanması.....	16
3.2.2. Ceviz yapraklarından bakteriyel etmenin izolasyonu	17
3.2.3. Elde edilen izolatların tanısı	18
3.2.4. Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığının biyolojik mücadelesine yönelik <i>in vitro</i> çalışmalar.....	20
3.2.4.1.Ceviz yapraklarından aday antagonist izolasyonu.....	20
3.2.4.2. Aday antagonistlerin <i>in vitro</i> 'da <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 'e karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi.....	21

4. BULGULAR ve TARTIŞMA	22
4.1. Hastalık Belirtisi Gösteren Ceviz Yapraklarının Toplanması... ..	22
4.2. Ceviz Yapraklarından Bakteriyel Yanıklık Etmeninin İzolasyonu.....	22
4.3. Elde Edilen İzolatların Tanısı.....	23
4.4. Ceviz Bakteriyel Yanıklık Hastalığının Biyolojik Mücadelesine Yönelik <i>in vitro</i> Çalışmalar	30
4.4.1. Ceviz yapraklarından aday antagonist izolasyonu	30
4.4.2. Aday Antagonistlerin <i>in vitro</i> 'da <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> 'e karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi.....	32
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
6. KAYNAKLAR	39
7. TEŞEKKÜR	43
8. ÖZGEÇMİŞ	44
9. EKLER	45

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1 : Dünyada 2014 yılındaki ceviz üretimi	1
Çizelge 1.2 : Türkiye’de 2011-2016 yıllarında ceviz ağaç sayısı ve üretim miktarı.....	2
Çizelge 1.3 : Türkiye’de 2016 yılı verilerine göre bölge bazında ceviz üretimi.....	3
Çizelge 4.1 : <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> re-izolatlarının klasik testlerle tanı sonuçları	28
Çizelge 4.2 : İzole edilen aday antagonistler ve özellikleri	29
Çizelge 4.3 : Antagonistlerin <i>in vitro</i> koşullarda patojene karşı oluşturduğu engelleme alanı.....	32

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.a : Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığının sürgündeki belirtisi.....	5
Şekil 1.1.b : Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığının meyvedeki belirtisi.....	5
Şekil 3.1 : Kütahya ili Domaniç ilçesine bağlı surveylerin yapıldığı köyler	17
Şekil 4.1.a : Hastalıklı bitki örneği toplanan bahçe.....	22
Şekil 4.1.a : Hastalıklı bitki örneği toplanan bahçe.....	22
Şekil 4.2 : Hastalıklı örneklerden izolasyon.....	23
Şekil 4.3 : Ham meyvede patojenite testi sonucu oluşan belirtiler.....	24
Şekil 4.4 : KOH ile Gram negatif reaksiyon	24
Şekil 4.5.a : Oksidaz testi negatif reaksiyon.....	25
Şekil 4.5.b : Oksidaz testi pozitif reaksiyon	25
Şekil 4.6 : Pektolitik aktivite testi negatif sonuç	25
Şekil 4.7.a : Arginin testi negatif kontrol	26
Şekil 4.7.b : Arginin testi negatif sonuç	26
Şekil 4.8 : Tütünde aşırı duyarlılık testi sonucu oluşan belirtiler	26
Şekil 4.9 : CP-2 izolatının nişastayı hidrolize etmesi.....	27
Şekil 4.10 : CP-2 izolatının Tween B besi yerinde oluşturduğu koloni morfolojisi.....	28
Şekil 4.11 : Farklı antagonist bakterilerin oluşturduğu engelleme alanları	32

1.GİRİŞ

Ceviz sağlık ve beslenme bakımından çok önemli bir meyve türüdür. Genel olarak cevizde %3.5 su, %15- 30 protein, %55- 77 yağ ve %5- 15 oranında da karbonhidrat (ağırlık selüloz) bulunmaktadır. Ayrıca cevizin meyvesi, Ca, P, Mg, Fe, Na, K gibi mineral maddeler bakımından zengin olduğu gibi A, B1, B2, B6, C vitaminlerini de içermektedir. Bir kg ceviz yaklaşık 7.000 kalori enerji sağlamaktadır. Üretimi yapılan ceviz çerez olarak, pasta ve bisküvi sanayinde, parfüm sanayinde, reçel, helva yapımında, boya, tanen, plastik ve kauçuk endüstrisinde, yağ olarak, ilaç sanayinde, sucuk, samsa, pestil yapımında olmak üzere çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Ayrıca ceviz kerestesi son derece kıymetli olmasından dolayı da mobilya sanayisinde aranan materyallerin başında gelmektedir. Başta Amerika Birleşik Devletleri (ABD) olmak üzere birçok ülkede son yıllarda yapılan araştırmalarda bazı kalp rahatsızlığı olan hastalara özellikle ceviz önerilmektedir. Kalp ve kolesterol bakımından bazı sağlık problemleri olan kişilere cevizin iyi gelmesi son yıllarda cevizin önemini daha da artırmıştır. Cevizin anavatanı bazılarına göre İran'ın Ghilan Bölgesi, bazılarına göre ise Çin'dir. Daha büyük bir kesim ise cevizin ana vatanının Karpat dağlarından Türkiye, Irak, İran, Afganistan, Güney Rusya, Hindistan, Mançurya ve Kore'ye kadar uzandığını savunulmaktadır (Anonim 2017 a).

Çizelge 1.1. Dünyada 2014 yılındaki ceviz üretimi (FAO 2014)

Sıra	Ülke	Üretim (Ton)
1	Çin	1.602.373
2	ABD	518.002
3	İran	445.829
4	Türkiye	180.807
5	Meksika	125.758
6	Ukrayna	102.740
7	Şili	58.909
8	Özbekistan	44.000
9	Hindistan	43.000
10	Fransa	34.767
TOPLAM	Dünya	3.462.731

Çizelge 1.1.'de görüldüğü gibi, 2014 yılında dünyadaki toplam ceviz üretimi ise, 3.462.731 ton olup;ceviz üretiminde 1. sırada Çin yer almakta bunu ABD, İran ve Türkiye takip etmektedir.

Çizelge 1.2. Türkiye’de 2011-2016 yıllarında ceviz ağaç sayısı ve üretim miktarı

Yıllar	Meyve Veren Ağaç Sayısı (Adet)	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı (Adet)	Üretim (Ton)
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
2016	8.171.000	6.873.000	195.000

Çizelge 1.2.’ de de görüldüğü gibi 2011 yılında ülkemizde meyve veren ağaç sayısı 5.594.000 ve meyve vermeyen ağaç sayısı 4.045.000 adet olarak toplam 9.639.000 adet ceviz ağacı bulunurken; 2016 yılında ise, meyve veren ağaç sayısı 8.171.000ve meyve vermeyen ağaç 6.873.000 adet olmak üzere toplam 15.044.000 ceviz ağacı bulunmaktadır. Ayrıca ceviz 2011 yılında 183.240 ton üretilirken 2016 yılında 195.000 ton üretilmiştir (TÜİK 2016).

Ülkemizde ceviz üretiminin yıldan yıla artışını görmekteyiz. Orman ve Su İşleri Bakanlığı yaklaşık 30 yıldır Özel Ağaçlandırma çalışmaları yapmaktadır. Hazine ve bozuk orman alanları kiralanarak bu alanların ağaçlandırılması ve kırsal ekonominin canlandırılması amaçlanmıştır. Meyve türü olarak badem (9.582.021 ağaç / 220.787 da) ve ceviz (3.044.857 ağaç / 150.805 da) dikilmiştir (Erdoğan 2016).

Çizelge 1.3.Türkiye ‘de 2016 yılı verilerine göre bölge bazında ceviz üretimi* (TÜİK 2016)

Bölgeler	Toplam Ağaç Sayısı (Adet)				
	2012	2013	2014	2015	2016
Ege	1.852.389	1998.679	2.148.778	2.241.949	2.914.156
Karadeniz	2.382.838	2.430.599	2.570.978	2.869.590	2.829.913
Marmara	1.819.672	2.237..902	2.535.226	2.693.743	2.512.296
Akdeniz	1.283.448	1.347.312	1.482.747	1.571.795	1.758.795
Güney Doğu Anadolu	421.736	556.369	619.804	618.419	651.523

* (Bölgeler arasında 2016 Yılı Verilerine Göre Sıralama Yapılmıştır)

Çizelge 1.3.’de görüldüğü gibi 2016 yılında en fazla ceviz ağacı sayısı Ege Bölgesi’nde olup, bunu Karadeniz, Marmara ve Akdeniz Bölgeleri takip etmektedir. Güneydoğu Anadolu bölgesi ise 2016 yılında 651.523 adet ceviz ağacı ile en az ceviz ağacının bulunduğu bölgedir.

Türkiye’de ceviz tüketimi 2016 yıllarında 235.531 ton olup, kişi başına düşen ceviz tüketimi 3 kg’dır. Bu yıllarda ceviz üretiminin yeterlilik derecesi %76.8 ‘i oluşturmaktadır (TÜİK 2017).

Cevizler kış ve ilkbahar aylarında soğuklama gereksinimini karşılayacak kadar soğuk; ilkbahar ve yaz aylarında normal büyüme ve olgunlaşmayı sağlayacak ölçüde sıcak (25-35 °C) isterler. 40 °C’ den yüksek yaz sıcaklıkları ceviz yeşil kabuğunda yanmalara ve ceviz içinde büzüşmelere yol açabilmektedir. Ceviz genelde –20 °C’den düşük sıcaklıklarda zarar görmekteyse de -40 °C’ye kadar dayanabilen çeşitler vardır. Tomurcuk döneminde –10°C, tam çiçeklenme dönemindeki –30 °C ve küçük yeşil meyve döneminde –10 °C’den düşük sıcaklıklar zararlı olabilmektedir. Soğuklardan zarar görme konusunda düşük sıcaklığın derecesi, düşme hızı, süresi gibi etkenler önemli rol oynar. Ceviz çeşitlerinin soğuklama

gereksinimi +7.2 °C'nin altında 500-2000 saat arasındadır. Düzenli bir ürün için cevizlerde soğuklama gereksiniminin karşılanması gerekmektedir. Ceviz yetiştiriciliği açısından yıllık toplam en az 500 mm yağış yeterli olmakla birlikte bu yağışın düzenli olması önemlidir. Bunun yanında çiçeklenme dönemindeki yağmurlar ve aşırı rüzgârlar özellikle tozlanma-döllenme bakımından olumsuz bir durum ortaya çıkarabilir. Ceviz 2-4 m derinliğe kadar inebilen güçlü bir kök sistemine sahiptir. Toprak derinliğinin az olduğu yerlerde sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Yetiştiricilik bakımından ileride sorunlarla karşılaşmamak için toprak derinliğinin en az 2 m olması ve toprağın geçirgen olması gerekir. Toprak pH'sı 6-7 olmalı ve toprakta alkalilik ve tuz sorunu bulunmamalıdır. Toprak iyi drenajlı, geçirgen, organik maddece zengin ve havadar olmalıdır. Toprağın su tutma kapasitesinin yüksek olması önemlidir. Toprak bakımından çok seçici bir meyve türü değildir (Kaplunan 2015).

Ülkemizde üretim, sağlık ve beslenme açısından önemli bir yere sahip olan ceviz bitkisinde fungal, bakteriyel kökenli birçok hastalık görülmektedir. *Armillaria Kök Çürüklüğü (Armillaria mellea)*, Cevizde Memeli Pas (*Gymnosporangium spp.*), Yaprak Sarı Çillenmesi (*Microstroma juglandis*) (Kurt ve ark 2003) ve Ceviz Antraknozu (*Gnomonia leptostyla*) cevizde görülen önemli fungal hastalıklardır. Ceviz Kök Boğazı Tümörü (*Rhizobium radiobacter*), Cevizde Bakteriyel Kanser ve Zamklanma (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) ve Ceviz Bakteriyel Yanıklığı (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) ise cevizde görülen önemli bakteriyel hastalıklardır. Ceviz yapraklarında karşılaşılabilecek bir viral hastalık da mevcuttur. Bu, Kiraz Yaprak Kıvrıcıklığı Virüsü (Cheery Leafroll Nepovirüs, CLRV)'nin bir ırkının cevizin aşu yeri ile anacı arasında siyah bir çizgi şeklinde belirti veren cevizde halkalı leke veya siyah çizgi hastalığıdır (Tezcan 2005).

Hastalık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*)'nin sebep olduğu ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığı, İran'da bahar aylarında hava koşullarına göre şiddetli epidemilere sebep olarak, ceviz üretim alanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olmuştur (Vauterin 2000). Ayrıca *Xaj*'nin neden olduğu bakteriyel ceviz yanıklığı hastalığının, Marmara Bölgesi'nde uygun hava koşullarında şiddetli epidemi yaptığı bildirilmiştir (Özaktan ve ark. 2007).

Hastalığın ilk belirtileri yapraklarda görülür. Bakteri yaprağın bütün dokularına (parankima, orta damar, yan damarlar, damarcıklar ve yaprak sapı) saldırır. Parankimada birkaç milimetrelik kahverengi-siyah lekeler oluşturur. Bu lekeler küçük bir nokta boyutundan damarlarla sınırlı 2-3 mm'lik köşeli lekeler dönüşür. Sayısız lekeler ve çizgi şeklindeki oluşumlar yaprak yüzeyini tamamen kaplayarak yaprakta şekil bozukluklarına ve

deformasyonlara neden olur. Genç sürgünler hastalıktan daha çok etkilenir. Bazen sürgün ucunda ölüm meydana gelir. Ancak genelde sürgün boyunca farklı büyüklükte, sürgünü sarabilen lezyonlar oluşur. Sürgünü saran bu lezyonlar yüzeysel olurlar veya öze kadar ulaşarak kanser oluştururlar. Nemli havalarda kanserlerden çıplak gözle görülmeyen, ancak inokulum kaynağı oluşturan bakteriyel akıntı çıkmaktadır. Özellikle erken ilkbahar donlarından sonra yeşil sürgün ve tomurcuklarda yanıklık belirtisi çok karakteristiktir (Şekil 1.1.a). Ceviz henüz fidan döneminde hastalığa yakalanırsa bütünüyle kuruyup ölebilir. Daha yaşlı ağaçlarda ise hastalık genç sürgünlerde kurumalara neden olur. Hastalığın görüldüğü bitkide erkek ve dişi çiçekler bütünüyle kararır ve kurur. Bu çiçeklerin bakteri ile enfekteli polenleri hastalık etmenini yayabilir. Meyveler ise oluşumlarının başında, oldukça duyarlıdır. Meyve yüzeyinde küçük, başlangıçta yağ yeşili, daha sonra siyahlaşan ve hafif çökük lekeler görülür (Şekil 1.1.b). Zamanla bu lekeler yaygınlaşarak çürüklere neden olurlar. Meyvedeki lekeler çoğu kez kabukla sınırlı kalmaz, cevizin iç kısımlarına da yayılır. Cevizin rengi değişerek tadı acılaşır. Meyveler küçükken enfeksiyona uğrarsa önemli oranda meyve dökümü gözlenir. Yaprak ve meyvelerdeki belirtiler ceviz antraknozu belirtileri ile karıştırılabilir (Anonim 2017b).



Şekil 1.1.a. Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığının sürgündeki belirtisi



Şekil 1.1.b. Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığının meyvedeki belirtisi

Bulaşık tohumlar ya da tarım sistemleri *Xanthomonas juglandis* cinsine ait bakteri türlerini yeni bölgelere yayabilirler. Yağmursuyu ya da sulama suları da aynı zamanda bakteriyi bulaşmış alanlardan komşu sağlıklı arsalar ya da hastalıklı ağaçlardan komşu bitkilere taşıyabilir. Benzer şekilde kasırgalar ve fırtınalar da etmeni su damlacıklarında birçok mil uzaklığa yayabilir. Bakteri, bitkiye stoma ve hidatod gibi doğal açıklık ve tarım aletleri ve böceklerin açtığı yaralardan bitkiye giriş yapar. Bitki içerisine giren bakteri hücreler arası boşlukta çoğalır (Anonim 2017 c). Patojen bakteri nemli havalarda sızıntı halinde yaprak yüzeyine çıkar. Hastalık bu sızıntıdaki bakterilerle yayılır (Özaktan ve ark. ,2007).

Yapılan bir çalışmada *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in Gram-negatif bir bakteri olduğu ve ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığına yol açtığı belirlenmiştir. Bakterinin; yaprak, baş, tomurcuk, salkım ve genç dallarda simptom oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Hastalık etmeninin neden olduğu yaraların küçük koyu-kahverengi noktalarla sarı haleler ile çevrili olarak başladığı ve bulaşmanın yayıldığı bölgelerin zamanla ölü ve koyu hal aldığı yapılan çalışmalarda görülmüştür (Belisario 1996). Hastalık bakırlı preparatlar ile kontrol edilebilir, fakat bakteri bakıra karşı direnç oluşturduğundan hastalığın mücadelesinde alternatif çözüm yolları araştırılmaya başlanmıştır (Gardan 1993).

Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının kültürel mücadelesinde; hastalıklı sürgün ve dallar kesilerek ve erken dönemde dökülen hastalıklı meyveler toplanarak imha edilmelidir. Yaprak ve toprak analizleri sonuçlarına göre gübreleme yapılmalı, fazla azotlu gübrelemeden kaçınılmalıdır ve hava sirkülasyonunu sağlayacak şekilde budama yapılmalıdır (Anonim 2017 b).

Bu hastalığın kimyasal mücadelesinde ise; bakırlı fungusitlerle uygulama yapmak en bilinen savaşım uygulamalarıdır. Hastalığın ilaçla önlenmesi için iki ayrı dönemde ilaç kullanılabilir.

- i. Çiçekler açmadan önce %0.5'lik Bordo bulamacı ile ilk ilaçlama yapılmalıdır.
- ii. Çiçekler döküldükten sonra %1 ve daha sonra gerekiyorsa %1.5'lük yine Bordo bulamacı uygulanabilir (Özaktan 2013).

Dünyada diğer bitki hastalıklarında olduğu gibi, ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının mücadelesinde de mevcut kontrol stratejilerinden daha ucuz, daha etkili, insan sağlığına ve çevreye daha az zararlı olan biyolojik kontrol uygulamalarına ağırlık verilmeye başlanmıştır. Biyolojik Mücadele; doğal veya genetik yapısı değiştirilmiş mikroorganizmalar ya da onların

ürettikleri metabolitler kullanılarak patojen mikroorganizmaların ortadan kaldırılması veya popülasyonlarının baskı altına alınması amacıyla yapılan bir tarımsal mücadele yöntemidir. Tarımda kimyasal gübre kullanımının azaltılması için mikroorganizmaların kullanımı önemlidir. Biyolojik gübre etmeni olarak bitki büyümesini teşvik eden bakterilerin (PGPR=Plant Growth Promoting Rhizobacteria) çok yüksek bir potansiyele sahip olduğu, çeşitli bitki, iklim ve toprak koşullarında faydalı olabileceği ve toprak patonlerine karşı baskılayıcı etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Birçok bakteri (PGPR) organik asit üretimi veya diğer mekanizmalarla inorganik ve organik fosfatın çözünürlüğünü artırmakta ve bitkiler için alınabilir forma dönüştürmektedir (Saygılı ve ark. , 2014).

Biyolojik mücadelenin biyokontrol organizma ile patojen ve çevredeki diğer mikrobiyal organizmalar arasındaki ilişkiye göre dört temel mekanizması vardır. Bunlar; 1) Antibiyosis,2) Yarışma, 3) Hiperparazitizm, 4) Sonradan Kazanılmış Sistemik Dayanıklılık [a. Çapraz Korunma (Cross Protection), b. ISR (Induced Systemic Resistance), c. SAR (Systemic Aquaried Resistance)] (Saygılı ve ark., 2014).

Patojen ve antagonist arasındaki etkileşimin bilinmesi başarılı biyolojik mücadele için gereklidir. Antagonistler antibiyotik üreterek, patojen ile besin ve/veya yer rekabetine girerek, patojen üzerinde antagonist mikroorganizma hiperparazit olarak yaşayarak patojenin gelişimini engeller veya baskılayabilir (Özaktan ve ark., 2010).

Biyolojik mücadele, hastalık etmenleriyle antagonistik organizmalar arasındaki etkileşimin bir ürünüdür. Bu etkileşim mekanizmalarından antibiyosis, antagonistlerin toksin, antibiyotik ve enzim gibi metabolik salgılarıyla patojenlerin gelişimini engelleme ya da patojeni öldürme durumudur. Yarışma, patojen ve antagonistin aynı ortamda sınırlı bulunan aynı faktöre ihtiyaç duyarak rekabet oluşması durumudur. Bu rekabet çeşitli besin maddeleri için olabileceği gibi yer için de olabilir. Bir antagonizm biçimi olan hiperparazitizmde ise, antagonist patojen fungusu parazitlemektedir. Biyolojik savaş mekanizması olarak hipovirulens ise, düşük hastalandırma yeteneği genlerinin yüksek hastalandırma yeteneğine sahip genleri taşıyan organizmalara aktarılmasıyla bu virulent patojenlerin hastalık oluşturamaz duruma gelmesine dayalı bir etkileşim mekanizmasıdır. Antagonistin bazı salgıları veya içerdiği bazı kimyasal maddeler konukçu bitkide patojene karşı dayanıklılık sistemlerinin çalışmasını sağlar. Sistemik dayanıklılık kök bakterileri tarafından uyarılmışsa Uyarılmış Sistemik Dayanıklılık (Induced Systemic Resistance-ISR) olarak ifade edilir Uyarılmış dayanıklılık, bazı kimyasallar, non-patojenler, patojenlerin avirulent formları, patojenlerin uyumsuz ırkları tarafından ya da çevre koşulları yoluyla infeksiyonun

durdurulduğu durumlarda virulent patojenler tarafından başlatılıyorsa Kazanılmış Sistemik Dayanıklılık (Systemic Acquired Resistance-SAR) olarak adlandırılır. SAR da salisilik asit (SA) ve hastalık oluşumu ile ilişkili proteinlerin (Pathogenesis related proteins-PR) birikimi söz konusudur (Aslan ve Özaktan 2005).

Kök bakterilerinin, bakteriyel hastalıklara karşı ISR ile koruma sağladığına dair örnekler verilebilir. *P. fluorescens* str97 ile fasulye tohumlarının uygulama görmesi sonucu *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*'nın neden olduğu haleli yanıklık hastalığını önlediği belirlenmiştir (Alstrom, 1991). Hıyar tohumlarının *P. putida* ve *S. marcescens* ile uygulama görmesi sonucu *Erwinia tracheiphila*'nın neden olduğu bakteriyel solgunluğu önemli düzeyde engellediği görülmüştür (Kloepper ve ark., 1993).

Bakteriyofajlarla yapılan bir çalışmada, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatları, Yeni Zelanda' nın Güney Adaları etrafındaki farklı ceviz meyve bahçelerinde yapılan surveylerde, tomurcuk, yaprak sapı, yaprak ve meyve içeren hastalıklı bitki örneklerinden *Xaj* izole edilmiştir. Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığına karşı bakteriyofajların etkilerini belirlemek için hastalıkla bulaşık ceviz bahçelerinden bakteriyofajlar izole edilmiş ve etkilerine bakılmıştır. Fajlar iki familyaya göre tanımlanmıştır. Sonuçta, Siphoviridae ailesinin üyelerinin, Podoviridae familyasına göre daha fazla plak ürettiği bulunmuştur (McNeil 2001). Daha fazla plakların genellikle daha hızlı bir absorpsiyon ve kısa latent periyotlarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Abedon 1989).

Dünyada ve ülkemizde önemli bir ürün olan cevizde *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in neden olduğu bakteriyel yanıklık hastalığı önemli bir yer tutmaktadır. Her ne kadar ilaçlı mücadelesinde bordo bulamacı kullanılsa da hastalıktan dolayı meydana gelen kayıplar tam olarak önlenememektedir. Bu çalışma ile hastalıkla mücadelede kimyasallara alternatif biyolojik mücadele olanakları *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' in Taksonomisi ve Tanılanması İle İlgili Çalışmalar

Xanthomonas cinsi içerisinde yer alan pathovar ve türlerin ayırt edilmesinde genelde biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ortaya konarak fenotipik olarak karşılaştırılmaktadır. Aynı zamanda tam protein ve yağ asit analizleri ile de ayrımları ortaya konmaktadır. *Xanthomonas* ların türlerinin özelliklerinin ortaya konarak çok fazla miktarda izolat kullanılması çalışmanın hassasiyeti için önemlidir. *Xanthomonas arboricola* (*X.a.*) türü içerisinde fındık, ceviz ve şeftalide hastalık yapan *X. a. pv. corylina*, *X. a. pv. juglandis* ve *X.a. pv. pruni* gibi pathovarlar yer almaktadır (Vauterin ve Swings 1997).

Vauterin ve ark. (1995)'in bildirdiğine göre, Pierce (1901), Kaliforniya ceviz üretim alanlarında hastalığı izole ederek *Pseudomonas juglandis* Pierce olarak isimlendirmiştir. Daha sonra Smith (1905) tarafından *Bacterium juglandis* (Pierce) Smith olarak değiştirilen isim Bergey ve ark. tarafından *Phytomonas juglandis* (Pierce) olarak isimlendirilmiştir. Dowson (1939) tarafından yapılan çalışmalar ile etmen *Xanthomonas juglandis* (Pierce) Dowson olarak isimlendirilmiştir. Dye (1978) ise hastalık etmenini pathovar olarak *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Pierce) Dye olarak isimlendirmiştir. Vauterin ve ark.(1995), patojenin günümüzde kullandığımız *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* olarak isimlendirilmesini önermiştir.

Xanthomonas cinsi önceki konukçularına ve oluşturdukları belirtilere göre farklı bir tür üzerinde sınıflandırılmıştır. Daha sonraları izolatlar fenotipik özelliklerine göre *Xanthomonas campestris* olarak tek bir tür olarak isimlendirilmiş ve pathovar olarak farklı türlere ayrılmıştır. *Xanthomonas* cinsi bakterilerin bu şekilde isimlendirilmesi günümüze kadar bir çözüm olarak gelmiştir. Hali hazırda *Xanthomonas* günümüzde 140'dan fazla tür içeren bir cins olarak sistematikte yer almaktadır (Vauterin ve ark. 2000).

Schroth ve Hildebrand (1983)'ın bildirdiğine göre, *Xanthomonas* taksonomisi ile pathovar oluşumunun ayrılmasında bazı eksiklikler bulunmuş ve ayrımın DNA hibridizasyonuna göre yapılmasını önermiştir .

Son yıllarda *Xanthomonas* cinsinde yer alan türleri pathovarlarına ayırmak için sadece biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri içeren klasik testlerin yanında protein analizleri ve yağ asit analizleri de genellikle testlerde kullanılmıştır. Geliştirilen tekniklerden olan protein analizi ve yağ asitlerinin karşılaştırılması sonucunda *Xanthomonas campestris* pathovarlarının

heterojenlik gösterdiği belirlenmiştir. *Fabaceae*, *Poaceae* ve *Brassicaceae* familyalarındaki bitkilerde pathovar *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas campestris* pv. *poinsettiicola* ve *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* aynı cins içerisinde yer almasına rağmen pathovarlar düzeyinde çok fazla tutarsızlıklar bulunduğu bildirilmiştir (Vauterin ve ark. 2000).

2.2.Patojenin Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis*, 0.4-0.7x0.7-1.8 µm boyutlarında, Gram negatif, polar kamçılı, çubuk biçimli ve aerobik bir bakteridir. Bakterinin geliştiği optimum sıcaklık 28-32 °C maksimum 37 °C, minimum 5-7 °C'dir. Etmen, kışı enfekteli gözlerde geçirir (Anonim 2017 b).

Shami ve ark. (2013), ceviz meyve ve yapraklarından izolasyon yapmış ve elde ettiği izolatları YDCA ve NA besi ortamlarında kültüre alarak biyokimyasal testlerle tanılama çalışmalarını yapmıştır. Çalışmada izolatların tamamının tütün ve geraniumda aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturduğunu belirtmiştir. Aerobik özellik gösteren izolatlar katalaz, jelatin ve esküllin hidrolizi pozitif olduğu görülürken, üreaz, oksidaz, arginin dehidrolaz, lectinaz, patatestte pektolitik çalışmaların negatif olduğu görülmüştür. İzolatlar, 35 °C'de ve %3 NaCl gelişim gösterirken % 4 NaCl bulunan ortamda gelişme göstermemiştir. İzolatların, hiçbiri %1 TTC içeren besi yerinde gelişme göstermemiştir. Karbon kaynağı olarak glikoz, sellobiyoz, maltoz, manoz, fruktoz, sitrat, dulcitol, adonitol, oksalat, surboz ve sorbitol kullanabilmektedir. Yapılan bu testin sonucunda 14 adet izolat *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* olarak tanılanmıştır.

Fransa'nın güneydoğu ve güneybatısındaki 79 ceviz bahçesinde yürütülen bir survey çalışmasında elde edilen izolatlar ile *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj)'in referans izolatı (CFBP 2528) kullanılarak Gram reaksiyonu, oksidasyon, fermentatif metabolizması, oksidaz, katalaz, jelatin, nişasta, aesculin, Tween 80 üreaz aktivitesi, indol üretimi ve nitrat indirgemesi reaksiyonlarına bakılarak tanı çalışmaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda *Xanthomonas arboricola* olarak tanılanan 36 adet izolatın 24 tanesi *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* olarak tanılanmıştır (Hajria ve ark. 2010).

2.3. Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Hastalığının Yaygınlığı ve Mücadelesine Yönelik Çalışmalar

Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığı cevizlerin yetiştiği birçok ülkede görülmektedir. Avustralya'da ilk kez Osborn & Samuel (1992) tarafından bildirilmiştir. Bakteriyel yanıklık İran'ın orta, batı ve kuzey bölgelerindeki verimi azaltan cevizin başlıca hastalıklarından biridir. İran'da ilk kez 1948'de Esfandiyari, daha sonra ise Qazvin (Amani, 1977) ve Mazandaran (Mahsoul ve ark., 1990) tarafından 1988'de İran'ın kuzeyinde, merkezinde ve batısında da (Golmohammadi ve ark. 2002) görüldüğü bildirilmiştir. İran'ın farklı bölgelerinde hastalığın nedenini saptamak için, 2011 ilkbahar-yaz dönemi boyunca hastalanmış yapraklar toplanmış ve bakteri izolatları elde edilmiştir. Elde edilen izolatlarla ceviz fidanlarından yapılan patojenite testlerine göre etmenin tanısı yapılmıştır (Shami ve ark. 2013).

Ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan ceviz çeşitlerinin ham meyvelerinde en virulent *Xaj* izolatı W7/1 kullanılarak ceviz çeşitlerinin ceviz bakteriyel yanıklığı etmenine karşı reaksiyonları ceviz meyve ve fidan testleriyle belirlenmeye çalışılmıştır. Ceviz çeşit reaksiyonu testlerine 14 ceviz çeşidi alınmış, bunlardan 6'sı ticari çeşitlerden (Franquette, Pedro, Serr, Chandler, Hartley ve Payne), 8' i ise lokal çeşitlerden (Yalova 1, Yalova 2, Yalova 3, Yalova 4, Kaman 1, Şen 1, Bilecik, Şebin) oluşmuştur. 2008 yılında yapılan meyve testlerinin sonuçlarına göre; dört lokal çeşit Yalova 1, Yalova 2, Yalova 3 ve Kaman 1 düşük ya da orta düzeyde bir duyarlılık göstermiş, lokal çeşitlerden Yalova 4, Şen 1, Bilecik ise meyve testinde yüksek düzeyde duyarlı, Şebin gibi yerel çeşitler ise çok yüksek düzeyde duyarlı bulunmuştur. Testlenen ticari çeşitlerden Franquette ceviz bakteriyel yanıklığı etmeni *Xaj*'ye karşı yüksek düzeyde tolerant bulunmuş, bunu Pedro izlemiştir. Ticari çeşitlerden Serr orta düzeyde duyarlı, Chandler, Payne, Hartley ise yüksek düzeyde duyarlılık göstermiştir. 2009 yılı meyve çeşit testlerinde 2008 yılı sonuçlarına benzer şekilde lokal çeşitlerden Yalova 1, Yalova 2, Yalova 3, Şen 1 ve Yalova 4 düşük ya da orta düzeyde bir duyarlılık göstermiş, lokal çeşitlerden Şebin, Kaman 1, Bilecik ise ham ceviz testinde yüksek düzeyde duyarlı bulunmuştur. Testlenen ticari çeşitlerden Franquette ceviz bakteriyel yanıklığı etmeni *Xaj*'ye karşı tolerant bulunmuş, bunu Pedro ve Payne izlemiştir. Ticari çeşitlerden Serr, Chandler, Hartley ise yüksek düzeyde duyarlılık göstermiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak, ceviz fidanlarıyla yapılacak çeşit reaksiyon testi ve biyolojik mücadele, entegre mücadele çalışmaları için Chandler (duyarlı ticari çeşit), Franquette (tolerant çeşit) ve Şebin (duyarlı yerel çeşit) ceviz çeşitlerinin fidanlarının kullanılması daha uygun olacaktır (Erdal 2011).

Hajria ve ark. (2010)'nun bildirdiğine göre, ceviz bakteriyel yanıklık hastalığı yapraklarda, salkımlarda, dallarda ve meyvelerde nekroza ve önemli ürün kaybına neden olabileceğini belirtmişlerdir. Cevizde bakteriyel lekeye ek olarak ceviz meyvesini etkileyen ve kahverengi apikal nekroza (BAN) neden olan komplike bir hastalık da bulunabilmektedir. Belisario ve ark. (2002), BAN'ın etiyolojisini araştırmış ve *Fusarium*'un bu kompleks hastalıkla ilişkili en yaygın fungus cinsi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ceviz meyvesinin apikal nekrozunun etiyolojik ve epidemiyolojik yönleri, ceviz bahçesinde Chandler, Franquette ve Hartley çeşitleri üzerinde 2007 ve 2008 yılları arasında incelenmiştir. Etkilenen ceviz ağaçlarının çiçeğinin tamamında kahverengi nekroz gözlenmiştir. Bu belirtilerin cevizin ortak fungal lezyonlarından farklı olduğu belirlenmiştir. *X. arboricola* pv. *juglandis*, büyüme mevsimi boyunca apikal lezyonlardan izole edilmiştir. Elde edilen izolatlar, laboratuvarında ham ceviz meyvelerine inoküle edildiğinde meyve bahçesindeki semptomlarla benzer semptom oluşturmuştur. Apikal nekroz hastalığı epidemiyolojisi ve bitki çeşidi duyarlılığı yönünden değerlendirildiğinde, Chandler ve Hartley türleri Franquette'den daha fazla etkilenmiştir. Apikal nekrozun, belirgin semptomları ve şiddetli erken meyve dökülmesi ile karakterize edilen, BAN'ın yeni bir belirtisi olduğunu göstermiştir. 1990'lı yılların sonundan itibaren İtalya, Fransa ve İspanya'da Fars ceviz (adi ceviz) meyve bahçelerinde önemli miktarda verim kaybına neden olan bir erken ceviz meyvesi dökülmesi gözlemlenmiştir. Benzer olarak Türkiye'de önemli bir ceviz üretim bölgesi olan Marmara Bölgesi'nde aynı belirtiler ortaya çıkmıştır. Hastalık oluş sıklığı yüksek olduğunda Tarragona'daki (İspanya'nın kuzey doğusu) bazı ceviz bahçelerinde önemli ürün kayıpları meydana gelmiştir. Bu hastalık, sadece ceviz çiçeğinin ucunda çıkan kahverengi ile koyu kahverengi yanmalardan oluşan, dökülen meyvelerdeki ve iç dokuların kahverengiden siyahımsı bir çürüklük belirtileri nedeniyle kahverengi apikal nekroz (BAN) olarak isimlendirilmiştir. Bu semptomlar, meyvelerin çiçek ucuyla sınırlı olmayan siyahımsı su emmiş lekeler şeklinde karakterize edilmiş olup ve antraknoz (*Gnomonia leptostyla*) gibi kahverengi-gri lekelerin olması ile yaygın bakteriyel leke, (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce) 'in neden olduğu belirtilerden farklıdır (Moragrega ve ark. 2011).

Meyve semptomlarını başlangıçta *Fusarium* ve *Alternaria* apikal lezyonlara neden olurken sekonder olarak *X. arboricola* pv. *juglandis*'in meydana getirdiği düşünülmektedir. *Fusarium* sp. apikal nekrozdaki rolünün belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, apikal lezyonlarda en fazla izole edilen *F. chlamydosporum* olmasına rağmen, cevizde patojen olmadığı bildirilmiştir. Bu türün gerek toprakta ve gerekse sıcak bölgelerde tahıllarda saprofit

olarak yaşadığı bilinmektedir. Birçok *Fusarium* türünde olduğu gibi farklı stres altında zayıflatılmış bitkilere saldırma yeteneğine sahip fırsatçı veya zayıf patojenlerdir. Apikal nekroza neden olan *Fusarium*'u belirlemek için yapılan testler sonucunda *F. solani* ve *F. semitectum* patojenite testleriyle siyah nekroza neden olmuştur. Bu iki tür saprofitler gibi düzenli olarak havadan, bitki organlarından (*F. solani*) veya kök ve gövde tabanından (*F. semitectum*) elde edilir. Hastalık etmenlerinin ceviz ağaçlarında ve diğer bitki türlerinde hastalıklara neden oldukları bilinmektedir. Cevizde kahverengi apikal nekroza neden olan diğer fırsatçı fungal etmenlerden biri de *Alternaria* spp.'dir. Yara oluşmuş ve apikal nekroz belirtisi gösteren meyvelerden *Alternaria* türü fungal etmenler izole edilirken, ağaç üzerinde bulunan enfekteli meyvelerde çok nadir olarak *Alternaria* izole edilebilmektedir. Elde edilen *Alternaria* izolatlarının saprofit olarak yaşam sürdürdüğü belirlenmiş olup apikal nekrozdaki rolünün ölü meyve dokularının fırsatçı kolarizasyonu ile sınırlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda *Xaj*'in apikal nekrozun birincil etmeni olduğunu ortaya koymuştur. *Fusarium* türleri hastalık oluşumundan *Xaj* ile etkileşerek şiddeti arttırırken *Alternaria* türlerinin sadece enfekte olmuş ve ölmüş meyvelerde fırsatçı olarak yaşadığı ortaya konulmuştur (Moragrega ve ark. 2011).

Erkenci çeşit olan Eureka, Payne, Ashley ve Serr; orta erkenci Hartley ve Marchette ve geçici çeşit Franquette olmak üzere yedi adet ticari ceviz çeşidinden toplanan bitki örnekleri *X. campestris* pv. *juglandis*'in varlığı açısından değerlendirilmiştir. Bitkilerden rastgele olarak seçilmiş tomurcuklardan izolasyonlar yapılmıştır. Hastalık etmeni, sağlıklı görünen bitki dokularından yapılan izolasyonlarla da tespit edilmiştir (Mulroen ve Schroth 1981).

Tsiantos ve ark. (2007) yarı *in vivo* koşullarda ceviz çeşitlerinin *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e karşı duyarlılığını araştırmıştır. Çalışma sonucunda Marbot, Milotai, Ronde de Montignac ve Sibisel gibi çeşitlerin bu hastalığa karşı daha duyarlı; Amigo, Asley, Serr, Eliana, Grand Jean gibi çeşitlerin ise *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e karşı daha az duyarlı olduğu görülmüştür.

Batı Avrupa'da, ceviz bakteriyel yanıklığı tomurcukların patlamasından başlayarak hasada dek süren bakırlı preparatların uygulanmasıyla önlenmekteydi. Ancak, son yıllarda bakıra dayanıklılık hastalıklarla savaşımı daha da güç hale getirmiştir. Ceviz bakteriyel yanıklığına karşı geliştirilen erken uyarı/tahmin programı yardımıyla, Avrupa'da azalan bakır uygulamaları yaparak dayanıklılığın kırılması mümkün olmuştur (Ninot ve ark. , 2002).

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis*'e karşı biyolojik savaş uygulamaları konusunda fazla bilgi bulunmamaktadır. Aktif organizması *Streptomyces lydicus* izolat WYEC 108 olan Actinovate AG biyolojik preparatı cevizde bakteriyel yanıklık etmenine karşı kullanılmış ve %85'e kadar etkili bulunmuştur. Bu biyolojik preparatın düşük dozda bakırlı preparatlarla birlikte kullanımının, bakırlı preparatların tek başına uygulanmasına göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Erdal 2011).

Gardan ve ark. (1993) tarafından yapılan bir çalışmada, *Xaj*'ın bakır dirençli izolatları hastalık kontrolü için kullanılan yoğun bakır kullanımının olduğu ceviz bahçelerinden izole edilmiştir. Uzun yıllar boyunca ABD'de ticari bahçelerde yoğun bakır işlemlerinin uygulanması, daha sonra çevre kirliliği ile topraklarda bakır birikmesine neden olduğu saptanmıştır. Radix ve ark. (1998)'ın yaptığı bir çalışmada, toprağın içindeki fazla bakırın, bitkinin azotu metabolize etme kabiliyetini etkileyebildiği belirlenmiştir. Ceviz bahçelerinde yoğun bakır kullanımı sonucunda yüksek bakır seviyeleri toprakta meyve verimlerini etkilediği ve meyveleri hastalıklara daha duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir.

2007 yılında İzmir'de yapılan bir çalışmada, ceviz ağaçlarının hastalıklı tomurcuklarından izole edilen *Xaj* W7 / 1 izolatı kullanılarak, 35 bakteriyel antagonistin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. Test edilen 35 antagonist bakterinin 18' i *Xaj*' ı 3-13 mm arasında değişen inhibisyon zonu oluşturduğu görülmüştür (Özaktan ve ark. ,2012).

Yapılan *in vitro* testlerde sağlıklı ceviz ağaçlarından izole edilen 28 farklı antagonist adayı bakteriden 17'si *Xaj*'e karşı 1.6-12.2 mm arasında değişen engelleme zonları oluşturmuştur. Etkili bulunan aday antagonistler ile KAMAN1 ceviz meyvelerinde *in vivo* testler yapılmış ve hastalığı birinci yıl %36-88 ve ikinci yıl %37-76 oranında engellediği belirlenmiştir. Referans olarak kullanılan *Pantoea vagans* C9/1 izolatı ise hastalığı ilk yıl %56 ikinci yıl ise %77 oranında engellediği belirlenmiştir (Erdal 2011).

Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığına karşı *in vitro* koşullarda hastalığa duyarlı Chandler, Şebin ve tolerant olan Franguette çeşitleri ile kurulan saksı çalışmalarında başarılı antagonistler Bakır oksiklorid + maneb (%37,5+20e.m.), bitki dayanıklılığını uyarıcı Acibenzolar S-Methyl (BION, SYNGENTA ve Prohexadione Ca (%10 e.m., REGALIS-BASF) gibi bir bitki büyüme düzenleyicisi, biyolojik preparat olarak da *P. vagans* strain C9/1 bu çalışmada test edilen bakteriyel antagonistler *Xaj*'ye karşı etkililikleri denenmiştir.

Deneme sonucunda aday antagonistlerin, hastalık etmeninin neden olduğu yaprak enfeksiyonlarını önlemede %46 - 71 oranında başarılı olduğu bulunmuştur (Erdal 2011).

Kök bakterileriyle yapılan bir çalışmada, hıyar tohumlarının *P. putida*, *S. marcescens* ve *Bacillus pumilis* gibi kök bakterileri ile uygulama görmesi sonucu ISR yoluyla bakteriyel köşeli yaprak lekesi hastalığının sebep olduğu toplam lezyon çapını azalttığı görülmüştür (Wei ve ark., 1996).

Bakteriyel antagonistler ve diğer bakterisidal ürünler ve SAR bileşikler içeren potansiyel alternatifler, cevizin bakteri hastalıklarının yayılmasını engellemek için önerilebilir. Ceviz bakteriyel hastalıklarının kontrolü için etkili antagonist bakteri içeren preparatların bulunmadığı ve bu konuda araştırmanın yapılması gerektiği düşünülmektedir (Özaktan ve ark., 2012).

PGPR' lar ile yapılan bir çalışmada domates öz nekrozu hastalığına karşı bitki gelişimini teşvik eden bakterilerden on farklı cinse ait (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bergeyella*, *Brevibacillus*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Salmonella* ve *Stenotrophomonas*) bakterilerdört farklı cins olan (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Agrobacterium* sp.) bakterilerine karşı toplam 132 biyoajan bakteri izolatu kullanılmıştır. Kök daldırma ve ticari mikrobiyal gübre uygulaması iletoprak üstünden biyoajan uygulamalarından oluşan K2 (MF+BA-A) ve K2 (MF+BA-B) uygulamalarında bitki gelişiminin önemli derecede arttığı ve hastalık şiddeti kontrol uygulamalarından K1 (Taşıyıcı+BA-A) ve K1 (Taşıyıcı+BA-B) uygulamalarına göre önemli derecede azalma olduğu görülmüştür (Aktaş 2015).

Özaktan ve ark.(2012) yaptığı testler, sağlıklı ceviz bitkilerinden izole edilen antagonistik bakterilerin Chandler türüne göre daha iyi uyarlanmış olabileceğini ve diğer bitki türlerinden izole edilen organizmalara kıyasla bakteri bulaşmasının daha iyi kontrol edilebileceğini belirlemiş, *P. fluorescens*'in bazı izolatlarının *Xaj* biyo-kontrol ajanlarında kullanılabileceğini göstermiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Patojen İzolat: Çalışmada kullanılan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* CP2 izolatı Kütahya iline bağlı Domaniç ilçesi Aksu köyündeki ceviz üretim alanlarından izole edilmiştir.

Aday Antagonist İzolatlar: Çalışmada kullanılan aday antagonistler Kütahya ili Domaniç ilçesine bağlı Merkez, Aksu köyü, Böçen köyü, Sarıot köyü ve Yeşilköy ceviz bahçelerinden izole edilmiştir. Ayrıca Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda bulunan Prof.Dr. Mustafa MİRİK'e ait aday antagonist bakteri izolatlarında çalışmada kullanılmıştır.

Karşılaştırma Kùltürleri: Testlerde karşılaştırma kùltürü olarak Prof.Dr. Yeşim AYSAN'ın kùltür koleksiyonunda bulunan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm 10-2), *Erwinia amylovora* (E 4-2), *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* (SRE 31-1), *Pseudomonas cichorii* (PD 1747) ve Yüksek Ziraat Mühendis' i Seçil Hande AVCI'nın *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Hacıköy) izolatı kullanılmıştır.

Besi Yerleri: Çalışmalarda patojen ve aday antagonist izolasyonu için genel besi yeri olarak Nutrient Agar (NA), aday antagonist izolasyonu için *Pseudomonas* F Agar (PSF) (Lelliott ve Stead, 1987) besi yeri kullanılmıştır. İzolatların +4 °C' de uzun süre muhafazası için Yeast Ekstrakt Kalsiyum Karbonat Agar (YDCA) (Lelliott ve Stead, 1987) besi yeri kullanılmıştır.

Alet ve Ekipman: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakùltesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarında mevcut bulunan otoklav, inkübatör, etüv, pH metre, orbital çalkalayıcı, hassas terazi, manyetik karıştırıcı, spektrofotometre, steril kabin, saf su cihazı, buz dolabı tez çalışmasında kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Hastalık belirtisi gösteren ceviz yapraklarının toplanması

2015-2017 yıllarında Mart-Haziran ayları boyunca düzenli aralıklarla Kütahya'nın Domaniç İlçesi'nde Merkez, Aksu köyü, Böçen köyü, Sarıot köyü ve Yeşilköy köylerinde bulunan 21 adet ceviz bahçesine surveyler yapılmıştır (Şekil 3.1.). Bu bahçelerden ceviz yapraklarında kahverengi-siyah lekeli ve bu lekelerin kenarları sınırlanmış olan yaprak

örnekleri toplanmıştır. Toplanan örneklerin etiketlenmesi yapılarak gazete kağıtlarına sarılıp polietilen torbalara konulmuştur.



Şekil 3.1. Kütahya ili Domaniç ilçesine bağlı surveylerin yapıldığı köyler

3.2.2. Ceviz yapraklarından bakteriyel etmenin izolasyonu

Ceviz bahçelerinden toplanan ve laboratuvara getirilen hastalıklı yapraklardan yanıklık belirtisi görülen kısımlarından, hastalıklı ve sağlıklı dokuyu içerecek şekilde yaklaşık olarak 0.5 cm'lik bitki parçaları alınmış ve %70'lik alkol veya %1'lik NaOCl kullanılarak yüzeysel dezenfeksiyonu yapılmıştır. Bitki parçaları havanda steril nutrient broth ile homojenize edilmiş ve 20-30 dakika steril kabinde bekletilmiştir. Daha sonra NA besi yeri içeren petrilere bir öze dolusu bakteri solüsyonundan alınarak çizgi ekimi yapılmıştır. Petriler 25 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Sarı koloni gelişimi gösteren petrilere saflaştırma yapıldıktan sonra eğik agara alınarak inkübe edildikten sonra +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Elde edilen izolatların tanısı

Cevizde bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in KOH ile gram reaksiyonu ve LOPAT (L: levan oluşumu, O: oksidaz testi, P:patateste pektolitikaktivite, A: arginin dehidrolaz testi, T: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu), oksidatif-fermantatif, nişasta hidrolizasyonu ile tanı testleri yapılmıştır. Ayrıca Tween B besi yerinde koloni morfolojisine bakılmıştır. Lelliott ve Stead (1987)'e göre hastalıklı bitkilerden elde edilen izolatların patojenitesi yapılmıştır.

Patojenite Testi

Patojenite çalışmaları için ham ceviz meyveleri kullanılmıştır. Meyveler %3'lük NaOCl içerisinde 3 dakika bekletildikten sonra steril su ile yıkanarak yüzeysel dezenfeksiyonu yapılmıştır. Nemli kurutma kağıtlarının bulunduğu steril kutulara her kutuda 3 adet olacak şekilde ceviz meyveleri yerleştirilmiştir. Daha sonra NA'da 48 saat inkübe edilen *Xaj* izolatları steril bir kürdan ile alınarak ham ceviz meyvesine batırılarak inokule edilmiştir. 25 °C'de 48 saat inkübe edilen kutulardaki cevizler üzerindeki belirtiler değerlendirilmiştir (Van der Zwet, 1986; Klement ve ark., 1990). Ham ceviz meyvesi üzerinde görülen siyah lekelerden re-izolasyonlar yapılmıştır. Elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmalarına geçilmiştir.

Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyonu:%3'lük taze hazırlanan potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine damlatılmıştır. Elde edilen *Xaj* izolatlarının 48 saatlik kültüründen bir öze dolusu alınarak lam üzerinde dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. Öze yukarı doğru kaldırıldığında vizkoz bir hal almış, 0.5-2 cm veya daha fazla iplik gibi uzarsa bu izolatlar gram negatif, uzamazsa ve sıvı bir hal almış ise bu izolatlar gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fahy ve Hayward 1983). Kontrol olarak gram pozitif özelliğe sahip Cmm 10-2 kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürü kullanılmıştır.

Levan Oluşumu : %5 oranında sakkaroz bulunan Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerinde sakkarozu glikoz yerine karbonhidrat olarak kullanan bakteriler bu besi yerinde beyaz renkte, kubbemsi, mukoid gelişim gösterirler. SNA besi yerine re- izolatlar çizildikten sonra, 25°C' de 2-3 gün inkübe edilmiştir. Kubbemsi, beyaz, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead 1987). Pozitif kontrol olarak E 4-2 kodlu *Erwinia amylovora* izolatu kullanılmıştır.

Oksidaz Testi: %1'lik N; N; N; N' - tetramethyl-p-phenylen diamine dihydrochloride solüsyonunundamlatıldığı steril kurutma kağıdına bir öze dolusu 48 saatlik taze bakteri

kültürü alınarak dairesel hareketlerle çizilir.10 saniye sonra kurutma kağıdı üzerinde renk maviye dönüyorsa pozitif, 60 saniye sonra maviye dönüşürse geç pozitif, 60 saniye sonra maviye dönüşüm gözlenmezse negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956; Janse, 2006). Kontrol olarak Oksidaz pozitif özellikteki *Pseudomonas cichorii* kültürü çalışmada kullanılmıştır.

Pektolitik Aktivite Testi: Test için kullanılacak patatesler suda fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra %1'lik NaOCI'da 5 dakika bekletilmiştir. Yumruları NaOCI'den arındırmak için yumrular 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra steril bir bisturi ile kabukları soyulmuştur. Steril filtre kağıdı içeren petri içine kabuğu soyulmuş ve 2-3 cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. 48 saatlik bakteri kültürü patates dilimleri üzerine bırakılmıştır. kurutma kağıtları steril saf su ile nemlendirilmiş ve 25°C'de 24-48 saatlik bir inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987). İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak SRE 31-1 kodlu *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* kullanılmıştır.

Arginin Dehidrolaz Aktivitesi: Thornley 2A (1 l distile su, 1 g peptone, 5 g NaCl, 0,3 g K₂HPO₄, 3 g Agar, 0,01 g Phenolred, 10 g L-arginine) besi yerinde tüplere 3'er ml konulmuş ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Daha sonra tüplere *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* bakteri izolatları aşılansmış ve üzerleri 2 ml parafinle kapatılmıştır. 7-10 gün 27°C'de inkübasyondan sonra ortamdaki renk değişikliğine göre tüpler değerlendirilmiştir.

Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi: Tütün (*Nicotiana tabacum* cv *Samsun N*) bitkisinin yaprak alt yüzeyinin damar aralarına 0,1 hücre/ ml (1×10^8 hücre/ml) yoğunluğunda hazırlanan *Xaj* süspansiyonu enjekte edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Klement ve Goodman, 1967). Pozitif kontrol olarak Hacıköy kodlu *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatu kullanılmıştır.

Oksidatif-Fermentatif Testi: Mikroorganizmaların karbonhidratları ayrıştırmada oksidatif veya fermentatif metabolik yolu kullanma durumlarını saptamada bu testten yararlanılmaktadır. Ayrıca bakterilerin tanılanmasında da yararlanır. Bazı mikroorganizmalar glikozu oksidatif karakterde metabolize edebilirler. Aerobik koşullarda meydana gelen bu reaksiyonda oksijen son hidrojen alıcısı olarak görev yapar. Buna karşın, 22 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 KH₂PO₄, 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. *junlandis* 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).

Nişasta Hidralizasyon Testi: Nişastanın hidrolizasyonu için litrede 23 g 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 300 ml 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 CaCl₂, 0.30g Asit, 15.0g Agar, 121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Ortam 50°C'ye kadar soğutulmuş içine;10.0 ml Tween 80, 50.0 mg Cycloheximide, 65.0 mg Cephalexin, 12.0 mg 5-flouracil, 0.4 mg 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).

3.2.4.Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığının biyolojik mücadelesine yönelik *in vitro* çalışmalar

3.2.4.1.Ceviz yapraklarından aday antagonist izolasyonu

2015-2017 yılları Mart-Haziran aylarında Kütahya ili Domaniç ilçesine bağlı Merkez, Aksu köyü, Böçen köyü, Sarıot köyü ve Yeşilköy köyü ceviz bahçelerine yapılan surveylerde, (Şekil 3.1.) sağlıklı ağaçlardan yaprak örnekleri alınmış ve kağıt torbalara konularak

laboratuvara getirilmiştir. Aday antagonist bakteri izolasyonu için PSF besi ortamı kullanılmıştır. İzolasyon için 10 g yaprak örneği tartılarak 90 ml nutrient broth içerisinde 2-3 saat süreyle 150 rpm hızla orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Daha sonra yaprak süspansiyonundan 1'er ml alınarak içerisinde 9 ml nutrient broth bulunan tüplere aktarılmıştır. Her bir örnekten ayrı ayrı seyreltme serisi hazırlanmıştır. Seyreltme serilerinin -4, -5 ve -6 'sından 100 µl alınarak 3 tekerrürlü olacak şekilde PSF içeren petrilere bağıt ile yayılmıştır. Petriler 48-72 saat 25 °C' de inkübe edilmiştir. Petrilerde gelişen farklı renk ve tipteki koloniler saflaştırılmış ve tütün testine yapılmıştır. Test için bir öze dolusu bakteri 9 ml nutrient broth ile karıştırılmış ve steril bir şırınga ile tütün yaprağının damar arasına enjekte edilmiştir. 24 saat sonra tütün yapraklarında damar arasında su emmiş leke, nekroz oluşumu gösteren izolatlar elenmiş, herhangi bir belirti göstermeyen izolatlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere YDCA besi yerinde inkübe edilip +4 °C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2. Aday antagonistlerin *in vitro*' da *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' e karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi

Aday antagonist bakteri izolatlarının *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' e karşı etkinliği ikili kültür testleri sonucunda belirlenmiştir (Krishnamurthy ve Gnanamarickam, 1998; Mirik, 2005; Küsek, 2007; Çetinkaya-Yıldız, 2007; Horuz, 2014). Çalışmada patojen bakteri olarak CP2 Aksu kodlu *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatı kullanılmıştır. Elde edilen aday antagonist izolatlar NA besiyerinde geliştirilmiş ve gelişen kültürlerin her biri petride 120 derecelik açıyla birbirinden uzak çizilmiş üç noktaya nokta ekimi yapılmıştır. Petriler 25 °C' de 24 saat inkübe edilerek aday antagonistlerin gelişimi sağlanmıştır. 24 saat sonra patojenin 1×10^8 hücre/ml konsantrasyondaki süspansiyonu eşit mesafeden petrilere püskürtülerek patojenin eşit olarak yayılması sağlanmıştır. 25 °C'de 2 gün inkübasyondan sonra petrilerde oluşan engelleme alanları ölçülerek aday antagonist izolatların etkinliği belirlenmiştir. Petri denemeleri *in vitro* koşullarda üç tekerrürlü olarak kurulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hastalık Belirtisi Gösteren Ceviz Yapraklarının Toplanması

Kütahya iline bağlı Domaniç ilçesi Merkez (3), Aksu köyü (5), Böçen köyü (5), Sarıot köyü (4) ve Yeşilköy (4) köylerinde bulunan 21 adet ceviz bahçesine 2015-2017 yılları Mart-Haziran aylarında surveyler yapılmış ve bakteriyel yanıklık belirtisi görülen yapraklardan örnekler alınmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1.a. Hastalıklı bitki örnekleri toplanan bahçe

4.2. Ceviz Yapraklarından Bakteriyel Yanıklık Etmeninin İzolasyonu

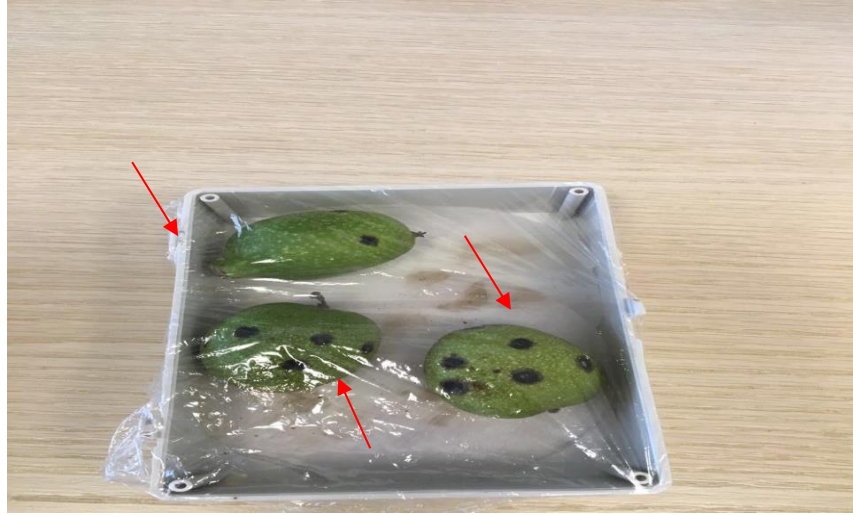
Kütahya iline bağlı Domaniç ilçesi Merkez, Aksu köyü, Böçen köyü Sarıot köyü ve Yeşilköy köyü ceviz bahçelerinden alınan yaprak örnekleri laboratuvara getirilerek izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.2.). İzolatlar NA besiyerinde sarı renkte, mukoid, yuvarlak koloni gelişimi göstermiştir. Toplamda 15 adet izolat elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Hastalıklı örneklerden izolasyon

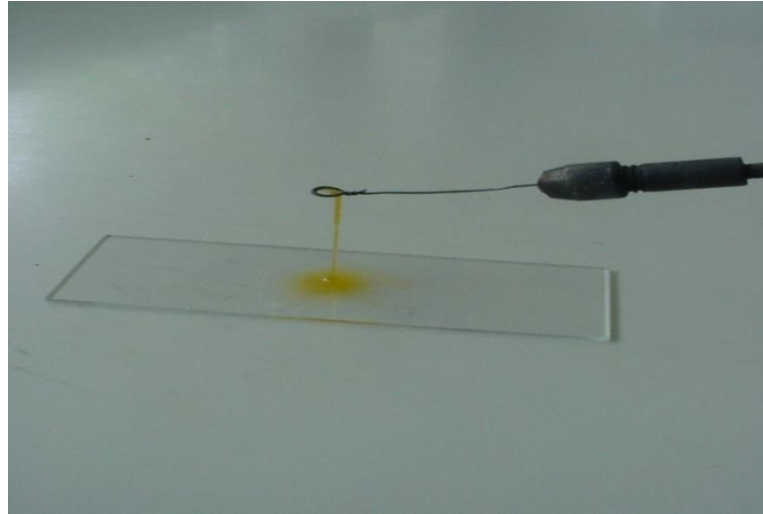
4.3.Elde Edilen İzolatların Tanısı

Patojenite Testi:Elde edilen *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* izolatlarının patojenite testi sonucunda ham ceviz meyvelerinde 2-4 gün sonra kahverengi-siyah lekeler gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak steril su ile yapılan meyve inokulasyonlarında ise herhangi bir belirti gözlenmemiştir. İzolatlar ham meyvelerde referans kültür olarak kullanılan Hacıköy izolatı ile aynı belirtileri gösterdiğinden patojenite testi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3.). Patojenite testi sonucu elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 4.3. Ham meyvede patojenite testi sonucu oluşan belirtiler

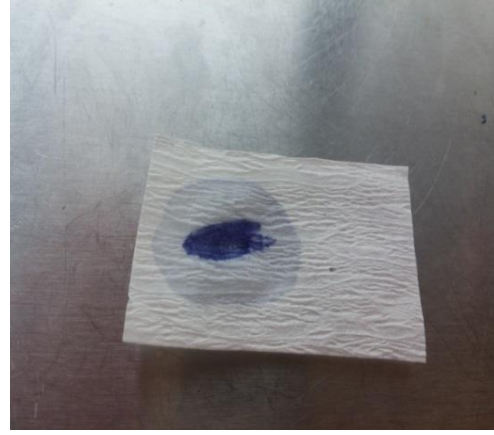
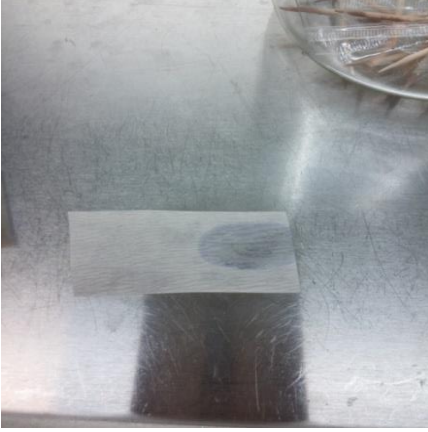
Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyonu: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* re-izolatları ile yapılan gram reaksiyonu sonucunda, özeye yapışarak viskoz bir yapının oluşmasından dolayı izolatlar Gram (-) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4), (Çizelge 4.1.). *Cmm* 1-2 kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatı ise uzama göstermemiştir.



Şekil 4.4. KOH testi ile Gram negatif reaksiyon

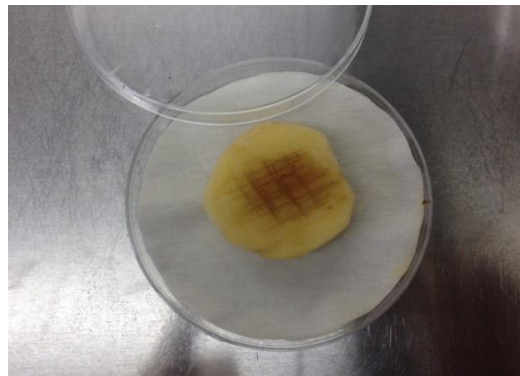
Levan Oluşumu: SNA besiyerine çizimi yapılan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* re-izolatlarının tamamında levan oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 4.1). *E* 4-2 kodlu *Erwinia amylovora* izolatı ise SNA besiyerinde beyaz, kubbemsi, mukoid koloni gelişimini göstermiştir.

Oksidaz Testi : Re-izolatlar oksidaz test solüsyonu emdirilmiş filtre kağıdına çizilen zigzaglar sonucunda hiçbir renk değişimi olmadığından oksidaz testi negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5.a), (Çizelge 4.1). Oksidaz pozitif özellikteki *Pseudomona scichorii* kültürü çalışmada kullanılmıştır ve mavi- mor renkte bir değişime neden olmuştur (Şekil 4.5.b).



Şekil 4.5.a. Oksidaz testi negatif reaksiyon Şekil 4.5.b. Oksidaz testi pozitif reaksiyon

Pektolitik Aktivite Testi: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* re-izolatları pektolitik enzim üretmediğinden patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük belirtisi oluşturmamıştır (Şekil 4.6.). İzolatların patatesteki pektolitik aktivite testi negatif olup (Çizelge 4.1), kontrol olarak kullandığımız SRE 31-1 kodlu *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* izolatı çalışmada kullanılmış ve patates dokularında çürümeye neden olmuştur.



Şekil 4.6. Pektolitik Aktivite testi negatif sonuç

ArgininDehidrolaz Testi: Thornley 2A besi yerine inokule edilen re-izolatlar ve Hacıköy izolatu besi yerinde renk değişimine neden olmamıştır (Şekil 4.7.a.), (Şekil 4.7.b.), (Çizelge 4.1).



Şekil 4.7.a. Arginin testi negatif kontrol

Şekil 4.7.b. Arginin testi negatif sonuç

Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* re- izolatları ve Hacıköy izolatu tütün yapraklarının damar aralarında 24 saat sonra su emmiş alanlar ve 48 saat sonra nekroz oluşturduğundan aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.8.), (Çizelge4.1)



Şekil 4.8. Tütünde aşırı duyarlılık testi sonucu oluşan belirtiler

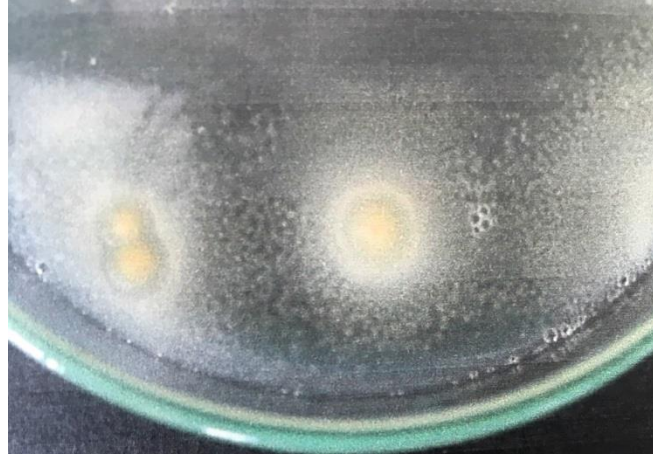
Oksidatif - Fermentatif Test: Taze geliştirilmiş 48 saatlik *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis* izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile nokta aşılama yapılmıştır. Her izolat için 6 tüp kullanılmıştır, bu tüplerden üçüne 1 ml steril ılık vaspar (bir ölçü vaselin üç ölçü parafin karışımı) 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 4.1). *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis* izolatlarıyla yapılan oksidatif-fermantatif test sonuçlarında vasparlı tüplerde sarı renk oluşumu görülmemiştir. Bu nedenle oksidatiffermantatif 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.

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 (Çizelge 4.1, Şekil 4.9). Bölge izolatları nişastayı hidrolize ettiklerinden pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9. CP-2 izolatının (solda) nişastayı hidrolize etmesi

Tween B ortamında Koloni Gelişimi: Bölgeden izole edilen *Xanthomonas arboricola* pv. *junghlandis* izolatları Tween B besi yerinde yuvarlak, sarı tümsek ve çevresinde temiz haleli koloniler geliştirmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.10).



Şekil 4.10. CP-2 izolatının Tween B besi yerinde oluşturduğu koloni morfolojisi

Çizelge 4.1. *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* re-izolatlarının biyokimyasal testlerle tanı sonuçları

İzolat Adı	Alındığı Yer	Bitki Materyali	NA'daki Koloni Gelişimi	Gram Reak.	L	O	P	A	HR	N	T	O-F
CP-1	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-2	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-3	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-4	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-5	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-6	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-7	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-8	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-9	Kütahya/ Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-10	Kütahya/ Böçen köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-11	Kütahya/ Böçen köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-

	Böçen köyü											
CP-12	Kütahya/Sarıot köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-13	Kütahya/Yeşilköy	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-14	Kütahya/Yeşilköy	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-15	Kütahya/Merkez	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Hacık öy	Edirne/Hacık köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-

L: levan tipte koloni gelişimi; **O:** oksidaz testi; **P:** patatestte pektolitik aktivite; **A:** arginin dehidrolaz aktivitesi; **HR:** tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu; **N:** nişasta hidrolizasyonu; **T:** Tween B besi yerinde gelişim; **O-F:** oksidatif-fermantatif testi

4.4.Ceviz Bakteriye Yanıklık Hastalığının Biyolojik Mücadelesine Yönelik *in vitro* Çalışmalar

4.4.1.Ceviz yapraklarından aday antagonist izolasyonu

2015-2016 yılları arası Nisan-Temmuz aylarında Kütahya ilinde bulunan ceviz üretim alanlarına surveyler yapılmıştır. Bu amaçla gezilen 21 ceviz bahçesinden yaprak örnekleri alınmıştır. PSF besi yerine yapılan izolasyonlarda farklı renk ve tipte gelişen koloniler saflaştırılarak tütün bitkisinde HR testine tabi tutulmuştur. HR reaksiyonu sonucunda tütün yaprak aralarında su emmiş leke ve kurumalara sebep olmayan 69 adet izolat aday antagonist olarak seçilmiştir. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, çeşitli kültür bitkilerinin topraklarından alınmış ve NBRIP besi ortamı kullanılarak izole edilen 40 adet aday antagonist de bu çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. İzole edilen aday antagonistler ve özellikleri

No	İzolat Adı	Alındığı Yer	Bitki Materyali	Morfolojik Koloni Gelişimi	Tütün HR Reaksiyonu
1	CA-1	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
2	CA-2	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mukoid Beyaz	Negatif
3	CA-3	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
4	CA-4	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
5	CA-5	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
6	CA-6	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Koyu Krem	Negatif

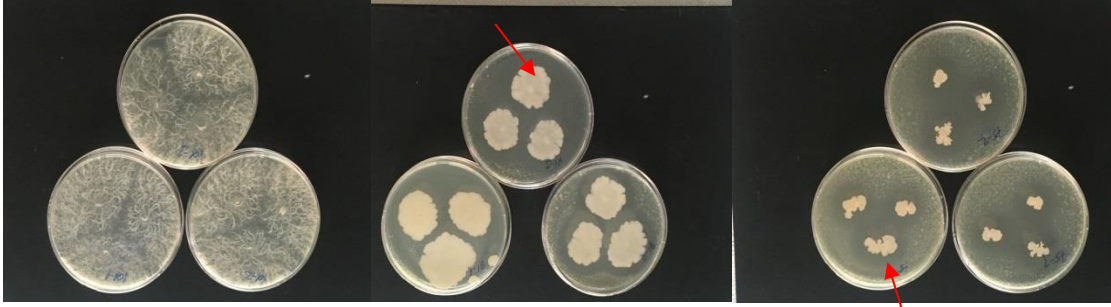
7	CA-7	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
8	CA-8	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
9	CA-9	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Krem	Negatif
10	CA-10	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
11	CA-11	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Sarı	Negatif
12	CA-12	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
13	CA-13	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
14	CA-14	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Krem	Negatif
15	CA-15	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
16	CA-16	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
17	CA-17	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Krem	Negatif
18	CA-18	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
19	CA-19	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
20	CA-20	Kütahya/Domaniç Aksu köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
21	CA-21	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
22	CA-22	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Krem	Negatif
23	CA-23	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
24	CA-24	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
25	CA-25	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Krem	Negatif
26	CA-26	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Mukoid Beyaz	Negatif
27	CA-27	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Mat Krem	Negatif
28	CA-28	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
29	CA-29	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Mukoid Sarı	Negatif
30	CA-30	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
31	CA-31	Kütahya/Domaniç Böçen köyü	Yaprak	Krem	Negatif
32	CA-32	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
33	CA-33	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
34	CA-34	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Krem	Negatif
35	CA-35	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
36	CA-36	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
37	CA-37	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
38	CA-38	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
39	CA-39	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
40	CA-40	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Beyaz	Negatif
41	CA-41	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Krem	Negatif
42	CA-42	Kütahya/Domaniç Sarıot köyü	Yaprak	Mukoid Beyaz	Negatif
43	CA-43	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Beyaz	Negatif
44	CA-44	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Beyaz	Negatif
45	CA-45	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Beyaz	Negatif
46	CA-46	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Beyaz	Negatif
47	CA-47	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
48	CA-48	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Beyaz	Negatif
49	CA-49	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
50	CA-50	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Beyaz	Negatif
51	CA-51	Kütahya/Domaniç Merkez	Yaprak	Beyaz	Negatif
52	CA-52	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
53	CA-53	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
54	CA-54	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
55	CA-55	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
56	CA-56	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
57	CA-57	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif

58	CA-58	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Krem	Negatif
59	CA-59	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
60	CA-60	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
61	CA-61	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Mat Beyaz	Negatif
62	CA-62	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
63	CA-63	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
64	CA-64	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
65	CA-65	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
66	CA-66	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Mukoid Beyaz	Negatif
67	CA-67	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
68	CA-68	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
69	CA-69	Kütahya/Domaniç Yeşilköy	Yaprak	Beyaz	Negatif
70	MMA-1	Antalya	Toprak	Beyaz	Negatif
71	MMA-2	Çanakkale	Toprak	Beyaz	Negatif
72	MMA-3	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
73	MMA-4	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
74	MMA-5	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
75	MMA-6	Tekirdağ	Toprak	Krem	Negatif
76	MMA-7	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
77	MMA-8	Edirne/Uzunköprü	Toprak	Beyaz	Negatif
78	MMA-9	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
79	MMA-10	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
80	MMA-11	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
81	MMA-12	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
82	MMA-13	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
83	MMA-14	Tekirdağ	Toprak	Beyaz	Negatif
84	MMA-15	Şanlıurfa	Toprak	Beyaz	Negatif
85	MMA-16	Şanlıurfa	Toprak	Beyaz	Negatif
86	MMA-17	Edirne	Toprak	Beyaz	Negatif
87	MMA-18	Edirne	Toprak	Beyaz	Negatif
88	MMA-19	Adana	Toprak	Mat Beyaz	Negatif
89	MMA-20	Edirne/Uzunköprü	Toprak	Beyaz	Negatif

90	MMA-21	Çanakkale	Toprak	Turuncu	Negatif
91	MMA-22	Edirne	Toprak	Beyaz	Negatif
92	MMA-23	Edirne	Toprak	Beyaz	Negatif
93	MMA-24	Edirne	Toprak	Beyaz	Negatif
94	MMA-25	Edirne/Uzunköprü	Toprak	Beyaz	Negatif
95	MMA-26	Edirne/Uzunköprü	Toprak	Beyaz	Negatif
96	MMA-27	Edirne/Uzunköprü	Toprak	Beyaz	Negatif
97	MMA-28	Çanakkale	Toprak	Beyaz	Negatif
98	MMA-29	Edirne/Uzunköprü	Toprak	Beyaz	Negatif
99	MMA-30	Tekirdağ/Malkara	Toprak	Beyaz	Negatif
100	MMA-31	Tekirdağ/Malkara	Toprak	Beyaz	Negatif
101	MMA-32	Tekirdağ/Malkara	Toprak	Beyaz	Negatif
102	MMA-33	Tekirdağ/Malkara	Toprak	Beyaz	Negatif
103	MMA-34	Tekirdağ/Malkara	Toprak	Beyaz	Negatif
104	MMA-35	Edirne	Toprak	Krem	Negatif
105	MMA-36	Edirne	Toprak	Beyaz	Negatif
106	MMA-37	Edirne	Toprak	Beyaz	Negatif
107	MMA-38	Şanlıurfa	Toprak	Beyaz	Negatif
108	MMA-39	Şanlıurfa	Toprak	Krem	Negatif
109	MMA-40	Çanakkale	Toprak	Sarı	Negatif

4.4.2. Aday antagonistlerinin *in vitro*' da *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e karşı etkinliğinin belirlenmesi

Aday antagonist bakterilerin patojene karşı etkinliğinin belirlenmesi için ikili kültür testleri yapılmıştır. 1×10^8 yoğunluğundaki *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e etkisinin *in vitro* petri denemeleriyle araştırıldığı çalışmada 109 adet aday antagonistin engelleme alanları ölçülmüştür (Şekil 4.9.). Aday antagonist izolatların 38 adeti ikili kültür testi sonucunda *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in gelişimini tamamen engellediği, 42 adedi ise 3,6-16 mm aralığında değişen engelleme alanı oluşturduğu ve 29 adet aday antagonist izolatın ise patojene karşı hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.3.).



Şekil 4.11.Farklı antagonist bakterilerin oluşturduğu engelleme alanları

Çizelge.4.3.Antagonistlerin *in vitro* koşullarda patojene karşı oluşturduğu engelleme alanı

No	İzolat Adı	Engelleme Alanı (mm)											
		Tekerrür 1			ORT	Tekerrür 2			ORT	Tekerrür 3			ORT
1	CA-1	5.0	6.0	5.0	5.3	7.0	6.0	4.0	5.6	6.0	4.0	4.0	4.6
2	CA-2	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.00	30.0	30.0	30.0
3	CA-3	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
4	CA-4	6.0	6.0	5.0	5.6	13.0	11.0	16.0	13.3	13.0	12.0	10.0	11.6
5	CA-5	10.0	7.0	8.0	8.3	10.0	9.0	10.0	9.6	14.0	10.0	10.0	11.3
6	CA-6	19.0	16.0	19.0	18.0	19.0	12.0	15.0	15.3	10.0	11.0	11.0	10.6
7	CA-7	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
8	CA-8	8.0	8.0	9.0	8.3	7.0	10.0	10.0	9.0	7.0	6.0	8.0	7.0
9	CA-9	11.0	10.0	9.0	10.0	12.0	11.0	11.0	11.3	10.0	10.0	10.0	10.0
10	CA-10	10.0	11.0	8.0	9.6	11.0	7.0	10.0	9.3	10.0	10.0	10.0	10.0
11	CA-11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12	CA-12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13	CA-13	3.0	6.0	4.0	4.3	8.0	8.0	7.0	7.6	5.0	5.0	5.0	5.0
14	CA-14	10.0	7.0	10.0	9.0	5.0	7.0	5.0	5.6	12.0	10.0	8.0	10.0
15	CA-15	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
16	CA-16	10.0	10.0	9.0	9.6	11.0	9.0	9.0	9.6	12.0	10.0	9.0	10.3
17	CA-17	12.0	13.0	10.0	11.6	14.0	13.0	14.0	13.6	13.0	11.0	15.0	13.0
18	CA-18	13.0	10.0	8.0	10.3	13.0	15.0	5.0	11.0	15.0	13.0	10.0	12.6
19	CA-19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20	CA-20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21	CA-21	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
22	CA-22	12.0	9.0	11.0	10.6	12.0	9.0	12.0	11.0	11.0	10.0	10.0	10.3
23	CA-23	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
24	CA-24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25	CA-25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
26	CA-26	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

27	CA-27	10.0	9.0	9.0	9.3	5.0	8.0	7.0	6.6	9.0	9.0	9.0	9.0
28	CA-28	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
29	CA-29	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
30	CA-30	10.0	13.0	10.0	11.0	13.0	12.0	10.0	11.6	13.0	13.0	14.0	13.3
31	CA-31	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
32	CA-32	7.0	4.0	5.0	5.3	5.0	6.0	6.0	5.6	6.0	5.0	5.0	5.3
33	CA-33	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
34	CA-34	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
35	CA-35	10.0	18.0	10.0	12.6	10.0	10.0	14.0	11.3	12.0	10.0	10.0	10.6
36	CA-36	11.0	10.0	15.0	12.0	16.0	15.0	15.0	15.3	14.0	15.0	15.0	14.6
37	CA-37	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
38	CA-38	11.0	9.0	10.0	10.0	9.0	8.0	7.0	8.0	9.0	9.0	9.0	9.0
39	CA-39	10.0	6.0	4.0	6.6	5.0	8.0	4.0	5.6	8.0	5.0	9.0	7.3
40	CA-40	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
41	CA-41	13.0	11.0	12.0	12.0	9.0	11.0	12.0	10.6	13.0	13.0	12.0	12.6
42	CA-42	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
43	CA-43	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
44	CA-44	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
45	CA-45	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
46	CA-46	6.0	9.0	7.0	7.3	5.0	10.0	8.0	7.6	5.0	10.0	9.0	8.0
47	CA-47	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
48	CA-48	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
49	CA-49	11.0	10.0	6.0	9.0	6.0	9.0	7.0	7.3	7.0	9.0	8.0	8.0
50	CA-50	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
51	CA-51	12.0	12.0	10.0	11.3	10.0	12.0	10.0	10.6	12.0	12.0	9.0	11.0
52	CA-52	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
53	CA-53	7.0	4.0	5.0	5.3	5.0	6.0	6.0	5.6	6.0	5.0	5.0	5.3
54	CA-54	7.0	10.0	12.0	9.6	10.0	10.0	11.0	10.3	6.0	10.0	10.0	8.6
55	CA-55	5.0	4.0	5.0	4.6	5.0	6.0	6.0	5.6	6.0	5.0	4.0	5.0
56	CA-56	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
57	CA-57	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
58	CA-58	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
59	CA-59	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
60	CA-60	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
61	CA-61	9.0	5.0	9.0	7.6	8.0	7.0	5.0	6.6	7.0	8.0	10.0	8.3
62	CA-62	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
63	CA-63	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
64	CA-64	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
65	CA-65	5.0	5.0	6.0	5.3	5.0	7.0	7.0	6.3	8.0	6.0	7.0	7.0
66	CA-66	13.0	11.0	11.0	11.6	9.0	10.0	10.0	9.6	8.0	7.0	7.0	7.3
67	CA-67	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
68	CA-68	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
69	CA-69	15.0	15.0	17.0	15.6	15.0	10.0	10.0	11.6	13.0	10.0	15.0	12.6

70	MMA-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
71	MMA-2	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
72	MMA-3	6.0	6.0	9.0	7.0	5.0	5.0	5.0	5.0	10.0	10.0	7.0	9.0
73	MMA-4	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
74	MMA-5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
75	MMA-6	10.0	8.0	7.0	8.3	11.0	7.0	10.0	9.3	10.0	7.0	12.0	9.6
76	MMA-7	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
77	MMA-8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
78	MMA-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
79	MMA-10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
80	MMA-11	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
81	MMA-12	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
82	MMA-13	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
83	MMA-14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
84	MMA-15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
85	MMA-16	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	6.0	5.3
86	MMA-17	10.0	6.0	5.0	7.0	8.0	7.0	8.0	7.6	10.0	6.0	8.0	8.0
87	MMA-18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
88	MMA-19	11.0	20.0	10.0	13.6	8.0	16.0	10.0	11.3	13.0	10.0	17.0	13.3
89	MMA-20	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
90	MMA-21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
91	MMA-22	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
92	MMA-23	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
93	MMA-24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
94	MMA-25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
95	MMA-26	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
96	MMA-27	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
97	MMA-28	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
98	MMA-29	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
99	MMA-30	15.0	15.0	15.0	15.0	16.0	15.0	17.0	16.0	14.0	12.0	17.0	14.3
100	MMA-31	5.0	6.0	5.0	5.3	5.0	6.0	7.0	6.0	6.0	5.0	10.0	7.0
101	MMA-32	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
102	MMA-33	6.0	10.0	10.0	8.6	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	7.0	9.0
103	MMA-34	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	3.0	30.0	30.0
104	MMA-35	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
105	MMA-36	6.0	10.0	5.0	7.0	5.0	5.0	4.0	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0
106	MMA-37	5.0	4.0	5.0	4.6	4.0	4.0	3.0	3.6	3.0	3.0	3.0	3.0
107	MMA-38	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
108	MMA-39	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
109	MMA-40	6.0	5.0	5.0	5.3	8.0	3.0	4.0	5.0	10.0	5.0	6.0	7.0

Bakteriyel hastalıklara karşı antagonist bakterilerle biyolojik mücadele çalışmaları kısıtlıdır. Bu tez çalışmasında antagonist bakterilerin ceviz bakteriyel yanıklık hastalığına sebep olan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e olan etkilerine bakılmıştır. Sonuçta *Xaj* etmenini 38 tanesi tamamen baskıladığı, 42 tanesi farklı inhibisyon alanı (3.16-16 mm) oluşturduğu, 29 tanesi ise hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Bacillus izolatları ile yapılan çalışmada patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri agar difüzyon metoduna göre araştırılmıştır. Sonuç olarak 38 izolat *B. cereus* grubu üyesi, 7 izolat *B. thuringiensis*, 10 izolat *B. megaterium*, 6 izolat *B. pumilis* ve 12 izolat *Bacillus* sp. olarak tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatları test edilen mikroorganizmaların gelişmelerini değişik oranlarda engellemiştir. Dokuz izolatin oluşturduğu inhibisyon zonlarıyla yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır. *Bacillus* izolatlarının çalışmada kullanılan indikatör bakterilerden *Staphylococcus epidermidis*, *Xanthomonas axonopodis*, *Pseudomonas syringae* ve *Micrococcus luteus*'a karşı antibakteriyel aktivitelerinin olmadığı görülmüştür (Katı ve ark, 2016). Çalışmamızda da farklı bakteri izolatlarının farklı özellikleri göstermesi bu çalışmaya paralellik göstermektedir.

Horuz (2014) *Acidovorax citrulli*' ye karşı aday antagonistlerin etkinliğini belirlemek için *in vitro* ve *in vivo* da yaptığı çalışmaları sonucunda; *in vitro* ortamda kurduğu ikili kültür deneme sonucunda antagonistlerin oluşturduğu engelleme alanlarını 0-6 skalasına göre değerlendirmiştir. Bu skalaya göre 9 antagonist 1 skala değeri, 11 antagonist 2 skala değeri, 13 antagonist 3 skala değeri, 7 antagonist 4 skala değeri ve 1 antagonistte 5 skala değerinde yer almıştır. Benzer olarak 109 farklı bakteri izolatu kullanılan çalışmada da bu çalışmaya paralel olarak etki göstermiştir.

Yapılan çalışmalar ve yaptığımız çalışma sonucunda farklı bakteriyel hastalıklara karşı antagonistlerin etkinliği önemsenmeyecek kadar fazladır. Kimyasal mücadelenin bakırlı ve bazı fungusitlerle sınırlı olduğu bakteriyel hastalıklara karşı mücadelede antagonistlerin kullanım oranının arttığı görülmektedir. Yapılan bu çalışmada önceki çalışmalarla paralellik göstererek ceviz bakteriyel yanıklık hastalık etmenine karşı biyolojik mücadelede yararlı bakterilerin kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Cevizlerde bakteriyel yanıklığa sebep olan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* önemli kalite ve kantite kayıplarına sebep olmaktadır. Ceviz üretiminin ülkemizde artış göstermesinden dolayı son yıllarda bakteriyel yanıklıkla mücadele konusu dikkat çekmektedir. Bu amaçla aday antagonistlerin hastalığa karşı etkinliğinin belirlenmesine yönelik yapılan tez çalışmasında ümit vaat edici sonuçlar elde edilmiştir.

Tez kapsamında Kütahya iline bağlı Domaniç ilçesinde ceviz bahçelerine surveyler yapılmış olup hastalıklı ve sağlıklı ceviz yapraklarından izolasyonlar yapılmıştır. Hastalıklı yapraklardan izole edilen izolatların patojenitesi yapılarak re-izolatlar elde edilmiştir. Re-izolatlara KOH ve LOPAT, oksidatif-fermantatif, nişasta hidrolizasyonu ile tanı testleri yapılarak ayrıca Tween B ortamında koloni gelişimine bakılarak *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* olarak tanılanmıştır.

Sağlıklı örneklerden elde edilen izolatlar tütün bitkisinde HR testine tabi tutulmuş ve test sonucunda 69 adet izolatın patojen olmadığına karar verilmiştir. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarında daha önce yapılan ve çeşitli patojenlere karşı etkili sonuçlar veren 40 adet aday antagonist bakteri izolatıda ceviz bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' e karşı denenmek üzere gençleştirilmiştir.

Toplamda 109 adet aday antagonist izolatın *in vitro*' da *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' e karşı etkinliğinin belirlenmesi için ikili kültür denemesi kurulmuştur. Petri kabında aday antagonistlerin patojen gelişimini baskılaması sonucunda oluşan engelleme alanları ölçülmüştür. 38 adet antagonistin patojen *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' in gelişimini tamamen baskıladığı, 42 adet antagonist izolatın ise 3,6-16 mm çapında engelleme alanı oluşturduğu ve geriye kalan 29 adet aday antagonistin patojen üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Bakteriyel hastalıklarla mücadelede kimyasal kullanımının olmaması ve antibiyotik kullanımının ülkemizde yasak olmasından dolayı, bakteriyel hastalıklarla mücadelede alternatif yöntemlerin araştırılmasını gerekli kılmıştır. Bu amaçla yapılan tez çalışmasında bakteriyel yanıklığa karşı mücadelede aday antagonistlerin *in vitro*' da patojenin gelişimini

tamamen engelleyecek kadar etkili sonuçlar verdiğini ve antagonistlerin ümit vaat eden mücadele yöntemi olabileceğini göstermiştir. Etkili bulunan bu antagonistlerin *in vivo* da etkileri araştırılarak antagonist izolatların türleri belirlenmelidir.

6. KAYNAKLAR

- Abdon S (1989) Selection for bacteriophage latent period length by bacterial density: the oretical examination. *Microb Ecol*,18:79–88
- Aktaş S (2015). Domates Öz Nekrozuna Neden Olan Etmenlere Karşı PGPR ve Biyoajan Bakterileri Kullanılarak Kontrollü Koşullarda Biyolojik Mücadele İmkanlarının Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi Bitki Koruma AnaBilim Dalı
- Alstrom, S (1991). Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 37: 495-501.
- Anonim (2017 a). Ceviz Hakkında. <http://ceviz.ksu.edu.tr>.(erişim tarihi,10.03.2017)
- Anonim (2017 b). Ceviz Bakteriyel Yanıklığı. <https://bku.tarim.gov.tr/Zararlı/KayakDetay/808> .(erişim tarihi, 16.03.2017)
- Anonim (2017 c). *Xanthomonas* bacteria. www.bspp.org.uk. (erişim tarihi, 07.04.2017)
- Aslan E, Özaktan H (2005). Kök Bakterileri Tarafından Konukçu Bitkide Hastalıklara Karşı Sistemik Dayanıklılığın Uyarılması . *Anadolu, J. of Aarı*, 15:84-100.
- Belisario A, Palagio C, Zoina A (1996) Control of a bacterial disease of walnut in nurseries. *Informatore Agrario*,52:71–72.
- Belisario, A, Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V., ve Valier, A. 2002. Occurence and Etiology of Brown Apical Necrosis on Persian (English) Walnut Fruit. *Plant Dis.*86:599- 602.
- Çetinkaya-Yıldız, R. 2007. Domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)’ nin tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakterler ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı
- Erdal M (2011). Batı Anadolu’da Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*’in Tanısı ve Entegre Mücadele Olanakları Üzerine Bir Araştırma. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi Bitki Koruma AnaBilim Dalı
- Erdoğan V (2016). Hazine ve Bozuk Orman Arazilerinde Badem ve Ceviz Bahçe Tesisleri. *Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*,1:242-247.
- FAO 2014. www.fao.org. Dünyada 2014 Yılındaki Ceviz Üretimi.(erişim tarihi,21.09.2017)
- Gardan L, Brault T, Germain E, (1993). Copper resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in French walnut orchards and its association with conjugative plasmids. *Acta Horticulturae*,311: 259-265.

- Hajria A, Meyer D, Delort F, Guillaumes 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, 59:1014-1018.
- Horuz S (2014). Karpuzda bakteriyel meyve lekesi hastalığı etmeni *Acidovorax citrulli*'nin tanısı, moleküler karakterizasyonu ve bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadele. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, sayfa 117.
- Katı H, Karaca B, Gülşen Ş (2016). Toprakтан izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 20: 281-290.
- Kapluhan E (2015). Ziraat Coğrafyası Açısından Bir İnceleme: Kaman İlçesinde (Kırşehir) Ceviz Üretim Faaliyetleri. Marmara Coğrafyası Dergisi, 32:147-170.
- Kloepper, J W, Tuzun S, Liu L, Wei G(1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. In: Lumsden, R.D. and J.L. Waugh (Eds.), Pest Management: Biologically Based Technologies. American Chemical Society Boks, Washington, DC, pp. 156-165.
- Kovacs N (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, London, 170-173.
- Kurt S, Soylu E M, Soylu S (2003). First report of downy leaf spot of walnuts caused by *Microstroma juglandis* in Turkey. Plant Pathology, 52:409.
- Lelliot, R.A. and Sted, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. 216 pp.
- 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.
- Mc Neil D, Romero S, Kandula J, Stark C, Stewart A, Lansen S (2001). Bacteriophages: a potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*). N Z Plant Prot 54:220–224.
- Moregraga C, Matias J, Aleta N, Montesinos E, Rovira M (2011). Apical Necrosis and Premature Drop of Persian (English) Walnut Fruit Caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Institute of Food and Agricultural Technology-Cidsav- Xarta, University of Girona, Spain, 95:1565-1570.
- Mulroen E, Schroth N (1981). Ecology of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* on Persian (English) Walnuts. Department of Plant Pathology University of California Berkeley 94720, 72:434-435.
- Ninot A, Aleta N, Moragrega C, Montesinos E (2002). Evaluation of a Reduced Copper Spraying Program to Control Bacterial Blight Of Walnut. Plant Disease, 86:583-587.
- Özaktan H, Uslu A, Erdal M, Akköprü A (2007). Determination of Bacterial Diseases on peach in Aegean and on Walnut Western Anatolian Regions of Turkey. Diagnostic and Monitoring of Bacterial Disease of Stone Fruits and Nuts. Joined meeting of WG 1 and 2 of COAST Action 873, Angers, France:23.
- Özaktan H, Aysan Y, Yıldız F, Kınay P (2010). Fitopatolojide Biyolojik Mücadele. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 1:61-78.

- Ozaktan H, Erdal M, Akkopru A, Aslan E (2012). Biological Control of Bacterial Blight of Walnut By Antagonistic Bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 94: 54-56.
- Özaktan H (2013). Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Hastalığı. *Bitki Bakteri Hastalıkları*, Ed: Hikmet Saygılı, Fikrettin Şahin, Yeşim Aysan. Meta Basım, İzmir, 167-168.
- 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. *Agronomie* 18: 627-637.
- Romera-Suarez S, Jordan B, Heinemann J (2012). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight disease. *World J Microbiol Biotechnol*, 28: 1917-1918.
- Sands D. C., 1990, PHYsiological criteria-determinative tests. *Methods in phytobacteriology*, 133-143.
- Saygılı H, Aysan Y, Şahin F, Soylu S, Mirik M, Kotan R (2014). *Fitobakteriyoloji 1*. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Baskı Yayın No.19, 145-149, Tekirdağ.
- Schroth M N, Hildebrand D C (1983). Toward a sensible taxonomy of bacterial plant pathogens. *Plant Dis.* 67:128.
- Shami M, Ghasemi A, Alizade Ali-Abadi A, Eskandari A (2013). Genetic Diversity and Phylogenetic Study of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* The Casual Agent of Walnut Bacterial Blight Disease. *Journal of Nuts*, 4:57-62.
- Tezcan H (2005). Bazı Önemli Ceviz Hastalıkları ve Bunlara Karşı Bir Entegre Mücadele (IPM) Yaklaşımı. *Bahçe Dergisi*, 34:187-192.
- Tsiantos, J., Vagelas, I., Rumbos, C., Chatzaki, A., Rouskas, D., Gravanis, F. (2007). Evaluation of resistance of cultivated walnut varieties and selections to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Greece. COST 873, WG3/WG4 Joint Meeting, Murcia (23-25 October 2007).
- TÜİK 2016. www.tuik.gov.tr. Türkiye’de 2014,2015 ve 2016 Yıllarındaki Ceviz Üretimi. (erişim tarihi, 15.06.2017).
- TÜİK 2016. www.tuik.gov.tr. Türkiye’de 2011-2016 Yıllarında Ceviz Ağaç Sayısı ve Üretim Miktarı. (erişim tarihi, 22.09.2017).
- TÜİK 2016. www.tuik.gov.tr. Türkiye’de 2016 Yılı Verilerine Göre Bölge Bazında Ceviz Üretimi. (erişim tarihi, 22.09.2017)
- TÜİK 2017. www.tuik.gov.tr. Türkiye’deki 2015-2016 Yıllarındaki Ceviz Tüketimi. (erişim tarihi, 21.09.2017)
- Wei L, Kloepper J W, Tuzun S (1996). Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, 86: 221-224.
- Vauterin L, Hoste B., Kersters K., Swings J (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 472

Vauterin L. and J Swings (1997). Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1997) 19, 77– 82.

Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology 90:677-682.

7. TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince yardımcı olan ve bana “Ceviz Bakteriyel Yanıklık Hastalık Etmeni *Xanthomonas arboricola* pv, *juglandis*'e Karşı Antagonist Bakteriyel İzolatların *in vitro* Koşullarda Biyokontrol Etkinliklerinin Belirlenmesi” konulu Yüksek Lisans Tezini veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa MİRİK'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında ve yazım aşamasında bana destek veren Araş. Gör. Cansu ÖKSEL'e ve Araş.Gör. İrem ALTIN'a çok teşekkür ederim.

Manevi desteğiyle her zaman yanımda olan ve Yüksek Lisansım boyunca beni motive eden sevgili aileme sonsuz teşekkürler.

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 Yılında Eskişehir’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Eskişehir’de tamamladı. 2004 Yılında başladığı Trakya Üniversitesi Ziraat Mühendisliği Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. 2013 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’na bağlı olarak Elazığ’da göreve başladı. 2014 yılında aynı bakanlığa bağlı olarak Kütahya’da göreve başladı. 2015 yılında Namık Kemal Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. Halen Kütahya’da çalışmaya devam etmektedir.

9. EKLER

EK 1: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Tanısı İçin Kullanılan Besi Yerleri

Nutrient Agar (NA) Besi Yeri (Lelliot ve Stead ,1987)

Nutrient Agar 20.0 g
Saf su 1000 ml
121⁰C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

- ❖ Aday antagonistlerin *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e karşı etkilerini belirlemek için kurulan ikili kültür denemelerinde de Nutrient Agar (NA) besiyeri kullanılmıştır.

Nutrient BrothSıvı Besi Yeri (Lelliot ve Stead ,1987)

Nutrient Broth 8 g
Saf Su 1000 ml
121⁰C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

SNA Besi Yeri (Lelliot ve Stead, 1987)

Nutrient Agar 13.0g
Sukroz 50.0g
Saf Su 1000ml
121⁰C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

Nişasta Besi Yeri (Lelliot ve Stead, 1987)

Nutrient Agar 23.0 g
Nişasta % 2
Saf Su 1000 ml
121⁰C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

Tween B Besi Yeri (McGuire ve ark. , 1986)

Pepton	10.0 g
KBr	10.0 g
CaCL ₂ .	0.25 g
Borik Asit	0.30 g
Agar	15.0 g
Distile Su	1000 ml

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

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

EK 2 :Aday Antagonistlerin İzolasyonu İçin Kullanılan Besi Yerleri

PSF Besi Yeri (Lelliot ve Stead, 1987)

Proteose Pepton	10.0 g
Tryptone	10.0 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g
Agar	15.0 g (3.5 g her şişe için)
Saf Su	1000 ml
Gliserin	10 ml

pH 7.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

NBRIB Besi Yeri (Nautiyal, 1999)

Glikoz	10.0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
NH ₄ SO ₄	0.1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.25 g
KCL	0.2 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	5.0 g
Saf Su	1000 ml

pH 7.0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

EK 3 : Patojen ve Aday Antagonistlerin +4 °C'de Saklanması İçin Kullanılan Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat (YDC) Agar Besi Yeri (Lelliot ve Stead, 1987)

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

121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.