

**TEKİRDAĞ'DA KİRAZ DAL KANSERİ
HASTALIĞINA NEDEN OLAN
BAKTERİYEL ETMENLERİN İZOLASYONU, TANISI
ve YAYGINLIĞI**

Merve BÜLBÜL

**Yüksek Lisans Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Mustafa MİRİK
2014**

T. C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEKİRDAĞ'DA KİRAZ DAL KANSERİ HASTALIĞINA
NEDEN OLAN BAKTERİYEL ETMENLERİN İZOLASYONU,
TANISI ve YAYGINLIĞI**

Merve BÜLBÜL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Mustafa MİRİK

Tekirdağ 2014

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Mustafa MİRİK danışmanlığında, Merve BÜLBÜL tarafından hazırlanan “Tekirdağ’da Kiraz Dal Kanseri Hastalığına Neden Olan Bakteriyel Etmenlerin İzolasyonu, Tanısı ve Yaygınlığı” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof. Dr. Yeşim AYSAN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mustafa MİRİK

İmza:

Üye: Prof. Dr. Soner SOYLU

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TEKİRDAĞ'DA KİRAZ DAL KANSERİ HASTALIĞINA NEDEN OLAN
BAKTERİYEL ETMENLERİN İZOLASYONU, TANISI VE YAYGINLIĞI

Merve BÜLBÜL

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Mustafa MİRİK

Kiraz (*Prunus avium* L.) Tekirdağ' da yetiştirilen önemli bir meyve türüdür. Kirazda verim ve kaliteyi düşüren, ağaçları kurutan kiraz dal kanseri hastalığı bu çalışma ile araştırılmıştır. Tekirdağ ili kiraz bahçelerinde 2012-2013 yıllarında gerçekleştirilen sörvey araştırmaları sonucu 129 ayrı hasta bitki örneği toplanmıştır. Tekirdağ ilinde sörveylenen bahçelerin tümünde hastalık %20-57 oranında yaygın olduğu, hasta ağaçların %20-85 oranında hastalık şiddetine sahip olduğu tespit edilmiştir. Laboratuarda yapılan çalışmalar sonucu bu örneklerden 41 farklı *Pseudomonas syringae* izolatu elde edilmiştir. Yapılan klasik ve moleküler tanı testleri sonucunda 23 izolatu *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, 18 izolatu ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olduğu tanılanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Cerasus avium*, LOPAT, GATTa, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *cfl*, *syrB*.

2014, 55 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

PREVALENCE, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL CANKER PATHOGENS ON SWEET CHERRY TREES IN TEKIRDAG

Merve BÜLBÜL

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa MİRİK

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is one of the most important fruit trees grown in Tekirdağ. Bacterial canker which reduces yield and quality of sweet cherry fruit and cause death of trees were investigated. For this purpose a survey study was conducted in 2012-2013 and 129 plant tissue samples were collected from symptomatic trees. As a result of survey studies, bacterial canker was determined in all orchards and diseases prevalence rate of bacterial canker was determined as 20-57%. Severity of disease was measured as 20-85% in Tekirdağ Province depending on orchards. As a result of laboratory studies 41 bacterial isolates of *Pseudomonas syringae* were obtained. As a result of classical and molecular identification tests, 23 isolates were identified as *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and 18 out of 41 isolates were identified as a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

KeyWords: *Cerasus avium*, LOPAT, GATTa, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *cfl*, *syrB*.

2014, 55 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ÇİZELGE DİZİNİ | iv |
| ŞEKİL DİZİNİ | v |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ | 9 |
| 2. 1. Pseudomonas syringae pv. syringae ile İlgili Çalışmalar..... | 9 |
| 3. MATERYAL ve METOD | 22 |
| 3.1. MATERYAL..... | 22 |
| 3.2.1. Hastalığın Yaygınlığının Tespiti | 22 |
| 3.2.2. Hasta Bitki Materyalinin Toplanması ve Muhafazası | 22 |
| 3.2.3. Bakteriyel Kanser Etmeninin İzolasyonu..... | 23 |
| 3.2.4. Bakteri Süspansiyonun Hazırlanması..... | 23 |
| 3.2.5.Patojenite Testi..... | 23 |
| 3.2.6. Re-İzolasyon..... | 25 |
| 3.2.8. GATTa Testi | 27 |
| 3.2.9. Bakteri İzolatlarının PCR Testi İle Tanısı..... | 28 |
| 4.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi | 32 |
| 4.2. Hastalık etmeninin izolasyonu | 36 |
| 4.3. Bakteri Süspansiyonun Hazırlanması..... | 37 |
| 4.4. Patojenite testinde kullanılan bakteri popülasyonunun hesaplanması | 37 |
| 4.5. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı..... | 40 |
| 4.6. GATTa Testi | 44 |
| 4.7. Bakteri İzolatlarının PCR Testiyle Tanısı | 45 |
| 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER | 49 |
| 7. TEŞEKKÜR | 55 |
| 8.ÖZGEÇMİŞ | 56 |

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Çizelge 1.1 : Dünyada kiraz üretimi..... | 2 |
| Çizelge 1.2 : Türkiye’ de 1992-2013 yıllarında kiraz ağaç sayısı ve üretim miktarları..... | 2 |
| Çizelge 1.3 : Türkiye’ de 2013 yılı verilerine göre il bazında kiraz üretimi..... | 3 |
| Çizelge 1.4 : Sert çekirdeklielerde hastalığa neden olan <i>Pseudomonas syringae</i> pathovarlarının konukçuları..... | 4 |
| Çizelge 3.1 : PCR işleminde kullanılan reaksiyon karışımının içeriği..... | 29 |
| Çizelge 3.2 : PCR işlemi için kullanılan program..... | 29 |
| Çizelge 3.3 : PCR işlemi için kullanılan program..... | 30 |
| Çizelge 4.1 : Tekirdağ ili ve ilçelerinde bulunan kiraz bahçelerinden toplanan örnek ve elde edilen izolat sayıları..... | 30 |
| Çizelge 4.2 : Kiraz bahçelerinden elde edilen izolatların kod numaraları ve izol edildikleri yerler..... | 35 |
| Çizelge 4.3 : Tekirdağ ili kiraz bahçelerindeki hastalık yaygınlığı, oranı ve şiddeti..... | 36 |
| Çizelge 4.4 : CFLF ve CFLR primerlerinin PCR işlemi için kullanılan program..... | 37 |
| Çizelge 4.5 : Bakteri İzolatlarının Test Sonuçları..... | 47 |

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Şekil 3.1 : Sürgün ve çiçek demetlerinde bakteriyel süspansiyonunun uygulanması | 25 |
| Şekil 4.1 : Kiraz dal kanseri hastalığının neden olduğu zamklanma..... | 33 |
| Şekil 4.2 : Kiraz dal kanseri hastalığı belirtisi gösteren gövdelerdeki kabuk rengi.... | 33 |
| Şekil 4.3 : Kiraz dal kanseri hastalığından dolayı ölmüş kiraz ağacı..... | 34 |
| Şekil 4.4 : King B besi yerinde gelişim..... | 35 |
| Şekil 4.5 : İnokulasyondan sonra çiçeklerde oluşan yanıklık..... | 38 |
| Şekil 4.6 : Patojenite testinin yapraklardaki belirtileri..... | 38 |
| Şekil 4.7 : İnokulasyondan sonra meyvelerde oluşan derin siyah çukurlar..... | 39 |
| Şekil 4.8 : <i>Pseudomonas syringae</i> ' nin UV transilatör altında floresan görüntüsü | 39 |
| Şekil 4.9 : KOH testi gram negatif (solda) ve gram pozitif(sağda)..... | 40 |
| Şekil 4.10 : <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ' ninlevan tip koloni gelişimi..... | 40 |
| Şekil 4.11 : <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> ' ninlevan tip koloni gelişimi..... | 41 |
| Şekil 4.12 : <i>Pseudomonas syringae</i> izolatının patates dilimlerinde pektolitik aktivite testi..... | 41 |
| Şekil 4.13 : <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> re-izolatlarının arginin dehidrolaz testi..... | 42 |
| Şekil 4.14 : <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> izolatının tütün yaprak damar aralarında oluşturduğu tipik aşırı duyarlılık reaksiyonu..... | 42 |
| Şekil 4.15 : Jelatin testi pozitif (solda), negatif (sağda)..... | 43 |
| Şekil 4.16 : Esculin hidrolizi pozitif (solda), negatif (sağda)..... | 43 |
| Şekil 4.17 : Re-izolatların DNA izolasyonu sonucu % 1'lik agarozda jel bantlarının görünümü..... | 44 |
| Şekil 4.18 : B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR testi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jelde görünümü..... | 45 |
| Şekil 4.19 : CFLF-CFLR ve B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR testi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jelde görünümü..... | 45 |

1. GİRİŞ

Türkiye birçok meyvenin anavatanı ve meyvecilik kültürünün beşiğidir. Meyveler insan beslenmesinde eskiden beri önemli yer tutmaktadır. Çünkü meyveler sağladıkları kalori, içerdikleri tuz, asitler ve vitaminler insan beslenmesinde büyük öneme sahiptirler (Gerçekçioğlu ve ark. 2006).

Bugün meyvecilik tarımında önem kazanmış olan elma, armut, ayva, erik, üzüm, incir gibi birçok meyve türü ülkemiz topraklarında ortaya çıkmıştır. Anadolu birçok meyve türünde olduğu gibi, kirazında anavatanı sınırları içerisinde. Hazar Denizi ile Karadeniz arasındaki bölge kirazın anavatanı olarak bilinmektedir. Avrupa ve diğer kıtalara kirazın yayılması tohumların kuşlar, diğer hayvanlar ve göçmenler tarafından taşınmalarıyla olmuştur. Türkiye’de her bölgede kiraz yetiştiriciliği yapılmakta olup üretilen kirazın hemen hemen hepsi taze halde tüketilmektedir (Burak 2003).

Kiraz ağaçları iklim bakımından sıcak bir büyüme sezonu, kış mevsiminde belli bir süre dinlenme ve yağmursuz bir hasat dönemine ihtiyaç duyar. Kışın dinlenme döneminde kiraz ağaçlarının gövde ve ana dalları -26°C ’de, çiçek tomurcukları -2.4°C ’ye dayanabildiği halde çiçeklenme döneminde bu sınır -2°C ’dir. Kiraz ağaçları ılıman iklim meyve türleri içerisinde meyvelerini en erken olgunlaştıran bir türdür. Kiraz ağaçları 5-6 yaşında verime geçerler, tam ve ekonomik olarak ömürleri ise 25-30 yıldır. İklim faktörlerinden en önemlisi sıcaklık olup kirazlar gerek düşük gerekse yüksek sıcaklıklara dayanamazlar (Burak 2003).

Dünyada kiraz üretimi coğrafik olarak dünyanın farklı bölgelerine yayılmış durumdadır. Çizelge 1.1’de görüldüğü gibi 2012 yılı verilerine göre Türkiye kiraz yetiştiriciliğinde üretim bakımından dünyada birinci sırada yer almaktadır.

Çizelge 1.1’de de görüldüğü gibi dünyada 2012 yılı kiraz üretimi 2.256.519 ton olup bu üretimin yaklaşık %21.30 ’unu Türkiye, %17.04’ünü Amerika Birleşik Devletleri (ABD), %8.86 ’sını İran üretmektedir. Türkiye’ nin 2012 yılı kiraz üretimi 480.748 ton olup birinci sırada yer almaktadır. ABD 2012 yılında 384.646 tonluk üretimi ile ikinci sırada olup bunu sırasıyla İran ve İtalya izlemektedir.

Çizelge 1.1. Dünya Kiraz Üretimi (Ton) (FAO 2013)

| Sıra* | Ülke | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
|-------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | Türkiye | 398.141 | 338.361 | 417.694 | 417.905 | 438.550 | 480.748 |
| 2 | A.B.D | 281.862 | 225.073 | 401.792 | 284.148 | 303.376 | 384.646 |
| 3 | İran | 200.000 | 198.768 | 225.000 | 251.418 | 151.175 | 200.000 |
| 4 | İtalya | 106.189 | 134.407 | 116.179 | 115.476 | 112.775 | 104.766 |
| 5 | İspanya | 73.200 | 69.700 | 97.645 | 85.192 | 101945 | 98.400 |
| 6 | Özbekistan | 55.000 | 61.000 | 67.000 | 75.000 | 82.000 | 84.000 |
| 7 | Suriye | 75.034 | 48.300 | 56.886 | 58.084 | 62.195 | 82.341 |
| 8 | Ukrayna | 68.200 | 74.700 | 53.000 | 73.000 | 72.800 | 72.600 |
| 9 | Rusya | 100.000 | 73.000 | 76.000 | 66.700 | 76.000 | 72.000 |
| 10 | Romanya | 65.163 | 67.664 | 67.874 | 70.290 | 81.842 | 70.542 |
| | Dünya | 1.959.472 | 1.847.361 | 2.193.691 | 2.072.455 | 2.158.934 | 2.256.519 |

*:2012 yılı üretim miktarları göz önüne alınarak sıralama yapılmıştır.

Çizelge 1.2. Türkiye’de 1992-2013 yıllarında kiraz ağaç sayısı ve üretim miktarı (TÜİK 2014)

| Yıllar | Meyve Veren Ağaç Sayısı | Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı | Üretim (Ton) |
|--------|-------------------------|----------------------------|--------------|
| 1992 | 5.160.000 | 1.550.000 | 155.000 |
| 1993 | 5.337.000 | 1.507.000 | 155.000 |
| 1994 | 5.545.000 | 1.735.000 | 160.000 |
| 1995 | 6.050.000 | 2.100.000 | 186.000 |
| 1996 | 6.230.000 | 2.090.000 | 200.000 |
| 1997 | 6.368.000 | 1.965.000 | 215.000 |
| 1998 | 6.850.000 | 2.460.000 | 195.000 |
| 1999 | 7.150.000 | 2.525.000 | 250.000 |
| 2000 | 7.450.000 | 2.515.000 | 230.000 |
| 2001 | 7.620.000 | 2.630.000 | 250.000 |
| 2002 | 7.850.000 | 2.670.000 | 210.000 |
| 2003 | 8.400.000 | 3.200.000 | 265.000 |
| 2004 | 8.750.000 | 3.750.000 | 245.000 |
| 2005 | 9.385.000 | 4.447.000 | 280.000 |
| 2006 | 10.616.000 | 5.237.000 | 310.254 |
| 2007 | 12.048.000 | 6.434.000 | 398.141 |
| 2008 | 12.542.000 | 7.002.000 | 338.361 |
| 2009 | 13.284.000 | 6.935.000 | 417.694 |
| 2010 | 14.740.000 | 7.409.000 | 417.905 |
| 2011 | 15.836.000 | 7.553.000 | 438.550 |
| 2012 | 16.916.000 | 7.264.000 | 480.748 |
| 2013 | 17.922.000 | 7.236.000 | 494.325 |

Ülkemizde kiraz üretimi son yıllarda gerek ağaç sayısı gerekse üretim olarak sürekli artış göstermektedir. Çizelge 1.2’de de görüldüğü gibi 1992 yılında meyve veren ağaç sayısı 5.160.000 ve meyve vermeyen ağaç sayısı 1.550.000 adet iken 2013 yılında meyve veren ağaç sayısı 17.922.000 meyve vermeyen ağaç sayısı ise 7.236.000 adet olması ülkemizde kiraz üretiminin her yıl arttığının bir göstergesi olmuştur. Aynı şekilde üretimde 1992 yılında 155.000 ton üretilirken 2013 yılında 494.325 ton kiraz üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2013).

Çizelge 1.3.’ te de görüldüğü gibi il bazında kiraz üretiminde İzmir, Manisa ve Konya ilk sıralarda yer almaktadır Tekirdağ ilindeki kiraz üretimi ise yıllık 2.441 ton olarak gerçekleşmektedir (TUİK 2013).

Çizelge 1.3. Türkiye’de 2013 yılı verilerine göre il bazında kiraz üretimi

| İller | Toplam Meyvelik Alanı (Dekar) | Meyve Veren Ağaç Sayısı | Üretim (Ton) |
|----------|-------------------------------|-------------------------|--------------|
| Konya | 65.339 | 1.539.075 | 49.893 |
| İzmir | 104.262 | 2.517.826 | 41.793 |
| Manisa | 97.340 | 2.031.927 | 34.993 |
| Isparta | 51.429 | 944.555 | 31.732 |
| Bursa | 51.022 | 1.060.547 | 31.453 |
| Amasya | 21.809 | 721.850 | 28.800 |
| Tekirdağ | 2.369 | 96.392 | 2.441 |

Ülkemizdeki kiraz üretimini tehdit eden pekçok biyotik ve abiyotik sorunlar vardır. Fitopatolojik problemler arasında yaprak delen hastalığına neden olan *Stigmia carpophila*, monilya (mumya) hastalığına neden olan *Monilinia laxa*, dal yanıklığı hastalığına neden olan *Nectria galligena*, bakteriyel hastalıklardan ise bakteriyel kansere neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* gibi önemli hastalık etmenleri hem ürün kayıplarına hem de ağaç ölümlerine neden olmaktadır.

Pseudomonas syringae’nin neden olduğu dal kanseri hastalığı dünyada meyve üretimi yapılan her yerde yaygın olarak görülmektedir. Hastalık mücadelesinin zor olmasından dolayı her yıl önemli kayıplara neden olmaktadır. Fidan üretim alanlarında meydana gelen sistemik enfeksiyonlar sonucunda da fidan ölümleri gerçekleşmekte ve önemli ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Hastalıktan dolayı her yıl Almanya’da ağaçların %30’u ölürken, benzer kayıplar İtalya ve diğer Avrupa ülkelerinde de görülmektedir (Kennelly ve ark. 2007).

Hastalığa neden olan etmenler *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'dur ve patojen bakteri, düz ya da eğik çubuk şeklinde, bir veya iki kamçıya sahip gram negatif hücre yapısına sahiptir. Boyutu ise, eni 0.5-1 µm, boyu 1.5-4.0 µm arısında değişmektedir. DNA' nın %58-71 mol' ü G+C içermektedir (Schaad ve ark. 2001). *Pseudomonas syringae*'nin ilk orijinal izolatu 1902 yılında Van Hall tarafından hastalıklı bir leylak (*Syringae vulgaris*) bitkisinden izole edilmiştir. *Pseudomonas syringae* kompleks bir patojen olup Gardan ve ark. (1999) önce 56 farklı pathovarlarının bulunduğunu ve DNA:DNA hibridizasyonu sonucunda izolatların 6 genomspesiese ayrıldığını belirlemiştir. Kaluzna ve ark. (2012) ise etmenin yaklaşık 64 pathovarı olduğunu bildirmiştir. Bunlar DNA:DNA hibridizasyonuna göre 3 farklı genomspesiese ayrılmıştır. Birincisi içerisinde *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, ikincisinde *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 1, üçüncüsünde ise *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2, *Pseudomonas syringae* pv. *avii* ve *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*'nin yer aldığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda bu 5 patojen *Prunus* spp. (Sert çekirdekli meyve ağaçları)'da hastalığa neden olmakta ve bu patojenlerin konukçuları Çizelge 1.4'de verilmiştir. (Kaluzna ve ark 2012).

Çizelge 1. 4.

Sert çekirdekli meyve ağaçlarında hastalığa neden olan *Pseudomonas syringae* pathovarlarının konukçuları

| Patojen | Konukçu |
|--|---|
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>avii</i> | <i>Prunus avium</i> (Yabani Kiraz) |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morspurunorum</i> | <i>Prunus</i> spp., <i>P. amygdalus</i> (Badem), <i>P. armenaca</i> (Kayısı), <i>P. avium</i> (Kiraz ve vişne), <i>P. cerasifera</i> , <i>P. cerasoides</i> , <i>P. domesticum</i> (Erik), <i>P. institia</i> , <i>P. persica</i> (Şeftali), <i>P. pissardi</i> , <i>P. triloba</i> |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i> | <i>Prunus cerasifera</i> , <i>P. persicae</i> , <i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i> (Nektarin), <i>P. salicina</i> (Japon eriği) |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> | Çok geniş konukçu dizisine sahiptir. <i>Prunus</i> spp.: <i>Prunus amygdalus</i> , <i>P. armeniaca</i> , <i>P. avium</i> , <i>P. cerasifera</i> , <i>P. cerasus</i> , <i>P. domestica</i> , <i>P. laurocerasus</i> , <i>P. mahaleb</i> , <i>P. mume</i> , <i>P. persica</i> , <i>P. persica</i> var. <i>nectarina</i> , <i>P. pumila</i> , <i>P. salicina</i> |

Hastalığa neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* adlı bakteri geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Başta kiraz ve kayısı olmak üzere 80 kadar meyve türünün yanısıra turunçgiller, armut, badem, dişbudak, ceviz, gül, leylak, zakkum, meşe, söğüt gibi çeşitli bitkilerde ve hatta pek çok otsu bitki türünde hastalık yapmakta iken; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ise sadece kiraz, erik ve badem türlerine özelleşmiştir (Agrios 2005).

Pseudomonas syringae pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* kirazlarda bakteriyel kansere neden olmaktadır. Hastalık etmeni ağacın kök hariç bütün organlarına ve yapılarına saldırır. Hastalığın tipik belirtisi çeşide, infektelenmiş ağaç yaşına, bitki dokusuna, patojen izolata ve çevresel koşullara göre değişebilir (Gasic ve ark. 2012). Hastalık belirtileri içerisinde çiçek demeti yanıklığı, sürgünlerde geriye doğru ölüm, yaprak ve meyve lekeleri, odun dokularında **açık yaralar (kanser)** birlikte zamklanma ve genel olarak meyve miktarında azalmalar şeklinde ortaya çıkmaktadır (Kennelly ve ark. 2007). Ancak en zararlı hali gövde ve dallarda görülmektedir. Kabuk, dal ve ince sürgünlerde yer alan kanserli dokulardan yaz ve ilkbaharın sonlarında bakteriyel akıntılar görülür. Kanserli dalların terminal yaprakları yaz veya sonbaharın başlarında, hastalığın ilk belirtisi bulaşık yerden itibaren dalın ucuna doğru yaprakların pörsümesi, sararması şeklinde gözlenir. Sonuçta yapraklar solar ve ölürler. Yaprak ve meyve infeksiyonları serin ve yağışlı havalarda önemli ekonomik kayıplara neden olur. Yaprak lekeleri koyu kahverengi, daireselden düzensiz şekillere kadar değişen lekeler şeklinde ve bazı zamanlarda sarı hale ile çevrilidir. Lekeler büyüyerek birleşir ve daha büyük ölü alanlar meydana getirir, lekelerin merkezler dökülerek saçma ile delinmiş bir görüntü alır (Ogawa ve ark. 1995).

Yeşil kiraz meyvelerindeki belirtileri ise su emmiş leke veya nemli bir alanla çevrilmiş kahverengi lekelerdir. İnfektelenmiş meyvelerde çökük-derin çukurlar, siyah et benzeri lekeler ve meyvenin yaşına bağlı olarak merkezi sarı-kırmızı renginde lezyonlar meydana gelir. Meyve sapsarı kahverengi ve su emmiş leke şeklinde görülür. İnfekteli yaprak ve çiçek demetleri baharda açmaz ve ölü tomurcuk olarak adlandırılan belirtiler ortaya çıkar. Bu ölü sürgünlerde küçük kanserler görülür. Diğer infekteli demetler baharda açar fakat yaz başlarında ölür, yapraklar solar ve meyveler kurur (Ogawa ve ark. 1995).

Dallarda derin yaralar şeklinde görülen kanser formu genelde ağacın zayıflamasına neden olan don olayları, yaralanma ve stres gibi faktörlerden sonra daha şiddetli gözlenir. Kanser oluşumunu don olayını teşvik eden gövdenin su içeriği, su emmiş lekeler ve büyük gövde çapları gibi faktörler teşvik etmektedir. Kanserler küçük olabildiği gibi büyük

olabilmekte ve ağacın ölümüne neden olabilmektedir. Kanserler, bakterinin kışı dormant olarak geçirdiği yerler olan çiçek demetlerinden ve tomurcuklardan odun dokusuna geçmesiyle başlamaktadır (Kennelly ve ark. 2007).

Eğer çiçek demeti infektelenirse demetin tamamı kurur. Etmen canlılığını bir üretim döneminden diğerine kanserli dokularda geçirir, sağlıklı sürgün ve iletim demetleri ile yayılır. Bakteri doku içerisinde baharda yağmurlarla beraber çoğalır ve genç yaprak ile çiçek demetlerine yağmur yardımıyla yayılır. Etmen simptom oluşturmadan epifitik olarak yaprak ve çiçeklerde bulunabilir. Bakteriyel etmen yaprakların döküldüğü taze yaralardan gövdeye giriş yapar. Bakteriyel kanserin belirtileri ilkbaharda serin, nemli bir periyot veya yaprak ve çiçeklerden rüzgar nedeniyle oluşan yaraların olması durumunda ortaya çıkmaktadır. Yapraklarda serbest su filminin ve yüksek nemin en az 24 saat devam etmesi sonucunda yaprak enfeksiyonları gerçekleşir (Jones ve Sutton 1996).

Hastalık etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'un neden olduğu hastalık belirtileri bitkinin çeşidine, ağacın yaşına, istila edilmiş bitki dokusuna, patojenin ırkına ve doğadaki iklimsel koşullara bağlıdır. Bazı konukçularda karakteristik kanser belirtileri görülmeyebilir. Hastalığın en belirgin belirtisi ağaçlarda parlak görünümlü zamk salgılanması, dallardaki ve ana gövdedeki derin çatlaklar ve yaralar şeklindeki kanser oluşumudur. Kanserlerin enfeksiyon odakları genellikle hafif çökük ve sağlamlardan daha koyu kahverengidir. Kanserli bölgedeki kabuk dokusunun rengi parlak portakal renginden kahverengiye kadar değişir. Kanserlerin altında ve üstünde dar kahverengi çizgiler oluşur. Kanser oluşumu başlangıç olarak kış sonu ya da ilkbaharda dikkati çeker. Ağaçlar kış uykusundan uyanınca kanseri çevreleyen dokulardan zamk akıntısı olur ve yüzey boyunca yayılarak gövdeden aşağı doğru akar. Bir ağacın gövdesi ya da dalı kanserle çevrildiğinde bu bölgenin üstündeki yapraklar içeri doğru bükülür, sarkar önce açık yeşil bir renk alır sonra da sararır. Bir kaç gün içinde kanser üzerindeki dal ya da tüm ağaç ölebilir. Hastalık etmeni yaşlı meyve ağaçlarını daha fazla etkiler (Ogawa ve English 1991; Saygılı ve ark. 2008).

Pseudomonas syringae pv. *syringae* ülkemizde; Antalya, Mersin ve Adana'da Turunçgillerde (Mirik ve ark. 2005), Erzurum ve ilçelerinde kayısı ağaçlarında (Görmez 2011), *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ise kirazda Marmara ve Ege Bölgesi, bademde ise Ege Bölgesinde görülebilmektedir (Anonim 2008).

Dünya çapında önemli ekonomik kayıplara neden olan *Pseudomonas syringae* (van Hall) pathovarlarının neden olduğu bakteriyel hastalığın üretim alanlarındaki mücadelesi son

derece zordur. Patojen hem genç hem yaşlı ağaçları öldürme yeteneğine sahiptir. Sistemik enfeksiyonlar ve genç ağaçların ölümü fidanlıklarda sürekli bir sorundur. Meyve yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede, sert çekirdekli meyve ağaçlarının en önemli hastalıklarından birisidir (Kennelly ve ark. 2007).

Pseudomonas syringae pathovarlarının tanılama çalışmalarında, LOPAT (Levan tipte.koloni oluşumu, Oksidase reaksiyonu, Patatete pektolitik aktivite, Arginin dehidrolaz aktivitesi, Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu testi), GATTa testleri (Jelatinin (Gelatine) hidrolizi, Aesculinin hidrolizi, Tyrosin ve Tartaric asit aktivitesi), karbon kaynaklarından asit oluşumu testi (mannitol, sorbitol, inositol, erythritol, tartaricacid, lacticacid, tyrosin) gibi klasik yöntemlerin yanı sıra; patojenisite ve patolojik temelli fitotoksinlerinin dikkate alındığı *in vitro* da syringomycin üretimi, buz çekirdeği oluşturma aktivitesinin (ice nucleation activity, INA) saptanması kullanılmaktadır. Ayrıca, moleküler yöntemlerle de yapılan çalışmalar tanıları desteklemektedir (Ertimurtaş ve ark. 2014)

Pseudomonas syringae pv. *syringae*'nin moleküler tanılanmasını kullanan *syrB* geninin primerlerinin dizilimi, (B1 5'-CTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3' ve primer B2 5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3') kullanılarak yapılır. Jele verildikten sonraki görüntüde primer uzunluğu 752-bp'ye ulaşmış ise etmen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanır (Abbasi ve ark. 2014). *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'un moleküler tanılanmasında kullanılan *cfl* genine göre dizayn edilmiş primerler (GGCGCTCCCTCGCACTT ve GGTATTGGCGGGGTGC) kullanılarak moleküler tanılanması yapılabileceği bildirilmiştir. Söz konusu primerlerin PCR ürünleri agaroz jelde 650 bp büyüklüğünde band oluşturmaktadır (Abellera ve ark. 2014). Bu primer setleri izolatların pathovar düzeyinde moleküler tanısında son derece başarılı olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında Tekirdağ ilinde kiraz üretimin yapıldığı Naip, Merkez, Kumbağ, Karahisarlı, Çanakçı, Barbaros yörelerinde 25 adet kiraz üretim alanı ziyaret edilmiş ve 129 adet ağaçtan hastalık şüphesiyle örnek toplanmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen 387 adet bakteri izolatının patojenitesi, LOPAT (L: Levan oluşumu, O: Oksidaz reaksiyonu, P: Pektolitik aktivite, A: Arginin dehidrolaz, T: Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu), GATTa (G: Jelatin hidrolizi, A: Esculin hidrolizi, T: Tyrosine kullanma, Ta:Tartarik asidi kullanma) testleri, karbon kaynaklarından asit oluşumu gibi klasik testlerle tanısı yapılarak bakteri izolatlarının *Pseudomonas syringae* olduğu tanılanmıştır. İzolatların pathovar düzeyinde tanısında *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'a spesifik olan yukarıda belirtilen iki primer seti kullanılarak PCR testleriyle moleküler düzeyde

araştırmalar yapılmıştır. Ayrıca Tekirdağ ilinde kiraz dal kanseri hastalığının yaygınlığı, gezilen bahçelerdeki bulaşıklılık oranı ve bulaşık ağaçtaki hastalık düzeyi tespit edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2. 1. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ile İlgili Çalışmalar

Patojenin isim ve taksonomisi

Gardan ve ark. (1997) *Pseudomonas syringae* türünün 57 pathovar, Gardan ve ark. (1999) yapmış olduğu bir çalışmada DNA:DNA hibridizasyonu sonucunda izolatların 9 genospecies olduğunu bildirmişlerdir. Tür düzeyinde yüksek heterojenik gösteren bu tür ile ilgili taksonomik çalışmalar halen devam etmektedir.

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

Pseudomonas cinslerinin tanı çalışmalarında kullanılan LOPAT özelliklerine göre farklı gruplar oluşturulmuştur. LOPAT olarak isimlendirilen test grubu içerisinde sükröz ortamında levan tipi koloni üretimi, oksidaz reaksiyonu, pektat jel veya patates dilimlerinde pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz aktivitesi ve tütün yaprağında aşırı duyarlılık (HR) reaksiyonunu testleri yer almaktadır. Yeşil floresan *Pseudomonas* 'ların LOPAT karakterleri Ia grubunda yer alanların (+---+) olup *Pseudomonas syringae* türü, Ib grubunda yer alanların (----+) olup *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ve *Pseudomonas delphini* türü, II grubunda yer alanların (-/+---) olup *Pseudomonas viridiflava* türü, III grubunda yer alanların (-+---) olup *Pseudomonas cichorii* türü, IVa grubunda yer alanların (++++-) olup *Pseudomonas marginalis* türü, IVb grubunda yer alanların (-++++) olup *Pseudomonas fluorescens* türü, Va grubunda yer alanların (-+---) olup *Pseudomonas tolasii*, bazı saprofitik pseudomonaslar ve Vb grubunda yer alanların (++++-) olup *Pseudomonas fluorescens* ile bazı saprofitik pseudomonaslar yer almaktadır (Lelliott ve ark. 1966, Gonzales ve ark 2003).

Kaluzna ve ark. (2012)'nin yapmış olduğu çalışmaya göre *Pseudomonas syringae* 'nin yaklaşık 64 pathovarı bulunmaktadır. Bunlar DNA:DNA hibridizasyonuna göre 3 farklı genoma sahip gruba ayrılmaktadır. Birincisi içerisinde *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*,

ikincisinde *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 1, üçüncüsünde ise *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2, *Pseudomonas syringae* pv. *avii* ve *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* yer aldığını bildirmişlerdir.

Patojenin Irkları üzerine çalışmalar

Pseudomonas syringae pv. *morspurunorum* 'nin ırk 1 ve ırk 2 izolatları sert çekirdekli meyve türlerindeki patojenite testlerine göre ayrılmaktadır (Garnett ve ark. 1966, Roos ve Hattingh 1987, Burkowicz ve Rudolph 1994). *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 1 'i coronatin fitotoksinini üreten *cft*⁺ formunda olup kirazda patojendir. *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2 ise leylak ve vişnede patojendir.

Tanı testlerinden olan GATTa testi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 1 'i ayırmada kullanılırken (Latorre ve Jones 1979) *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2 'de ise başarılı olmamıştır (Gilbert ve ark. 2009). *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 1 jelatin ve esculini hidrolize etmezken tyrosine ve tartarik asidi kullanmaktadır, ırk 2 ise jelatin ve esculini hidrolize etmiş, tyrosine üretmiş ama tartarik asidi kullanmamıştır (Bultreys ve Kaluzna 2010). Bu yüzden GATTa testinde *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 1 ve ırk 2 'yi ayırmada sadece jelatin hidrolizi kullanılabilir.

Vicente ve Roberts (2007) bazı *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2 izolatlarının GATTa test sonucunun (++--) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 'ye benzer olduğunu bildirmiştir. Bunun yanında GATTa test *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ayırmada kullanılacak bir yöntem olduğu ama *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2 için ekstra tetslerin eklenmesi gerektiğini belirtmiştir. Bu ek testler içerisinde buz çekirdeği aktivitesi, sukroz nutrient broth besi yerinde gelişim ve insitoldan asit üretimi yer almaktadır. Bu testler hızlı, kullanılabilir, ucuz ve benzer performansı gösteren testler olmasından dolayı kullanışlıdır.

Sulikowska ve Sobiczewski (2008) yapmış olduğu bir çalışmada GATTa testi kullanarak yaptığı tanı çalışmaları sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (++--), *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 1 (--++) ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2 (----) şeklinde sonuçlar vererek izolatlar arasında farklılıklar olduğunu belirlemiştir.

Sukroz nutrient broth besi yerinde *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* sarı koloni, *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 1 ise beyaz koloni oluştururken *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2 değişkenlik göstermektedir (Bultrey ve Kaluzna 2010).

Patojenin konukçuları

Pseudomonas syringae polifag patojenik bakteri olarak tek ve çok yıllık 180 bitki türünde hastalık oluşturmaktadır (Bradbury 1986, Agrios 2005).

Sert çekirdeklielerde bakteriyel kanser hastalığına *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* neden olmaktadır. Bu hastalık etmenleri kiraz (*Pisum avium*), vişne (*Pisum cerasus*), erik (*Pisum domestica*), şeftali (*Pisum persica*), kayısı (*Pisum armeniaca*) ve diğer sert çekirdekli meyvelerinde önemli kayıplara neden olmaktadır (Kennelly ve ark. 2007).

Bitki patojenik *Pseudomonas*'lardan ilk olarak 1893 yılında dutta (*Malus* sp.) *Pseudomonas mori* rapor edilmiş (Boyer ve Lambert 1893), 1902 yılında ise Van Hall tarafından hastalıklı bir leylak (*Syringae vulgaris*) bitkisinden izole ederek *Pseudomonas syringae*'yi rapor etmiştir (Young 2010).

Bakteri; kiraz, erik, şeftali, kayısı ve yabani kirazda ekonomik öneme sahip hastalıklara neden olur (Scortichini ve ark. 2003, Vicente ve Roberts 2007, Renick ve ark. 2008, Gilbert ve ark. 2009, Kaluzna ve ark. 2010).

Dünyada sert çekirdeklielerde kiraz (*Pisum avium*), kayısı (*Pisum armeniaca*), vişne (*Pisum cerasus*), erik (*Pisum domestica*) ve şeftali (*Pisum persica*) *Pseudomonas syringae* pathovarları şiddetli zararlanmalara neden olmaktadır. *Pseudomonas syringae* pathovarları tarafından şiddetli zararlanmalara neden olmaktadır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Wormald) Young ve ark., sert çekirdeklielerde bakteriyel kansere neden olan iki önemli pathovardır (Scortichi 2010).

Gasic ve ark. (2012) bildirdiğine göre *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* sert çekirdeklielerde bakteriyel kansere neden olur. Belçika'da *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* genel olarak yumuşak çekirdekli ve otsu bitkilerde hastalık oluştururken (Arsenijevic 1997, Gavrilovic 2006, 2009, Gavrilovic ve ark. 2008), *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ise yaygın olarak vişne, kiraz ve erik (Hattingh ve Roos 1995) ve kayısıda (Bultreys ve Kaluzna 2010) hastalık oluşturmaktadır.

Patojenin Tanısı

Yeni moleküler analizler ve taksonomik yeni düzenlemede belirlenen rRNA grup türlerini, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas syringae* gibi diğer floresan türleri içeren filogenetik benzer gruplar *Pseudomonas* cinsi olarak isimlendirilen cinsin üyeleridir (Kerstens ve ark. 1996, Widmer ve ark. 1998). Bu yeni sınıflandırmaya 16S rRNA dizilimine bağlı moleküller taksonomi floresan grup veya tip I (grup I) olarak isimlendirilen grup *Pseudomonas* ve akrabaları olarak bilinmektedir (Widmer ve ark. 1998).

Gilbert ve ark. (2009) Belçika'da 1993-2002 yılları arasında 36 farklı şeftali, erik ve kiraz bahçelerindeki hastalıklı bitki dokularından elde ettikleri *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas viridiflava* izolatları elde etmişlerdir. Yaklaşık 356 izolatı da bu çalışmada fitotoksin, siderefor ve klasik mikrobiyolojik testleri, genetik metotlardan REP-, ERIC- ve BOX ile IS50- PCR testlerine göre 280 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 41 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1, 12 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2, 3 izolat *Pseudomonas viridiflava* ve 20 izolat ise pathovar düzeyinde tanılanamayan *Pseudomonas syringae* olarak belirlenmiştir. REP-PCR ve özellikle BOX-PCR *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2'in ayırımı için kullanışlı olduğu belirlemiştir. Genetik sonuçlarına göre *Pseudomonas syringae* pv. *avii* 'nin homogenitesine göre kıyaslandığında *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 yüksek oranda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 'den ayrılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* aynı konukçuları (armut, kiraz veya erik) homojen genetik grup içerisinde gözlenmiştir.

Ivanovic ve ark (2009) şeftali, armut, elma ve böğürtlenden izole ettikleri izolatların armut, kiraz ve limon meyveleri üzerinde yaptıkları patojenite testi sonucunda karakteristik *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* belirtilerini gözlemlemiştir. Erik ve kiraz gözleri ile vişne meyvelerinden izole ettikleri izolatların kiraz meyvelerindeki patojenite testinde ise karakteristik *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* belirtilerini gözlemlemiştir. Yapılan patojenite testlerine göre iki grup ortaya çıkmıştır. Birinci grup armut, elma, şeftali ve böğürtlenden izole edilerek *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanan izolatlar bulunurken, diğer grupta erikte ve kiraz gözlerinde ve vişne meyvelerinden izole edilerek *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanılanan izolatlar bulunmaktadır. GATTa sonuçlarına göre üç farklı grup belirlenmiştir. Birinci grup elma, armut ve şeftali izolatlarını içermektedir. Bunlar jelatin ve esculini hidrolize ederken thyrosinaz ve tartatati

kullanmamaktadır ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanmıştır. İkinci grup kiraz ve erik izolatlarını içermekte, jelatin ve esculin negatif, thyrosinaz ve tartarattan yararlanma ise pozitif olup *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanılanmıştır. Genetik çalışmalar sonucunda şeftali, armut, elma, erik vişne ve böğürtlen gibi farklı konukçulardan elde edilen izolatların konukçularına göre ayırimda özellikle BOX –PCR kullanılması ile belirlenebileceği bildirilmiştir.

Kaluzna ve ark. (2010) kiraz (*Pisum avium*), vişne (*Pisum cerasus*), erik (*Pisum domestica*), şeftali (*Pisum persica*) ve kayısıdan (*Pisum armeniaca*) 30 adet *Pseudomonas* izole etmişlerdir. 23 adedi LOPAT testlerine göre *Pseudomonas syringae* olarak tanılanmıştır. Daha sonraki GATTa ve L-lactate testlerine göre karakterize edilen izolatların 10 tanesi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1, 6 tanesi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 ve 6 tanesi de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanırken 1 izolat tanılanamamıştır. Fenotipik ve genotipik analizler sonucunda ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* özellikle syringomisin, 3tanesi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 coronatin ve 6 tanesi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 yersinibactin toksinlerin ürettiğini belirlemişlerdir. İzolatların genetik farklılıkları PCR-MP ile ortaya konmuştur. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ve ırk 2 farklı grupta yer alırken, bunlar *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ile heterojen oldukları belirlenmiştir.

Gavriloviç ve ark. (2012) Sırbistan'da kiraz üretim alanlarından elde ettiği *Pseudomonas* izolatlarının tanısını patojenite testi ve farklılığı ortaya koyan GATTa testine göre yapmış ve iki farklı grubun olduğunu belirlemiştir. Birinci grup kiraz nekrotik dallarından izole edilen kiraz, armut ve limon meyveleri, leylak yaprakları, fasulye kapsülünde nekroza neden olan, jelatin ve esculin pozitif, tyrisonas ve tartarat ise negatif (tipik *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* karakteri) olarak belirlenmiştir. İkinci grup izolatlar ise kiraz tomurcuklarındaki nekrotik alanlardan izole edilen temel patojenite testleri negatif, jelatin ve esculin negatif, tyrosine ve tartarat ise pozitif (tipik *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* karakteri) olarak saptanmıştır.

Gasic ve ark. (2012) *Pseudomonas syringae* pathovarlarının simptomolojik ve genel karakteristik özellikleri nedeniyle sert çekirdeklielerde ayırımı kolaylıkla karıştırılabilmektedir. Yapılan çalışmada hızlı ve etkili olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ve *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*'nin ayırımında kullanılabilecek bazı standart bakteriyolojik ve moleküler metodların uygunluğunu araştırmışlardır. İzolatların ayırımında LOPAT, GATTa testlerinin yanında buz çekirdeği

aktivitesi, nutrient sukroz broth'da gelişim ve çeşitli karbon kaynaklarının kullanımı gibi testler denemişlerdir. PCR metotlarında toksin üretimlerinin belirlenmesinde, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* için *syrB* ve *syrD*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 için *cfl* genlere dayalı testleri kullanmışlardır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'nin syringomisin üretiminin bioassayında *Geotrichum candidum*, *Saccaromyces cerevisiae* ve *Rhodotorula plumanae* indikatör organizma olarak kullanmışlardır. Ayrıca patojenite testlerini limon, nektarin, fasulye kapsülünde yapmışlardır.

Gasic ve ark. (2012)'nin bildirdiğine göre, gram reaksiyonu, KB'de floresan ve LOPAT testleri *Pseudomonas* türlerini birbirinden ve bazı diğer cinslerden ayırmada kullanılan testler olduğunu bildirmiştir. Özellikle KB besi yerine floresan özelliğinin olması *Pseudomonas* türlerini birbirinden ayırmada kullanılan genel bir testtir. *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* KB'de çok yavaş gelişim ve floresan pigment üretmektedir. GATTa testi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ayırmada kullanılırken (Latorre ve Jones 1979) *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2'de ise uygun olmamıştır (Gilbert ve ark. 2009). *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 jelatin ve esculini hidrolize etmiş, tyrosine üretmiş ama tartarik asidi kullanmamıştır. GATTa testi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 için uygun olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 jelatin ve esculini hidrolize etmezken tyrosine ve tartarik asidi kullanmaktadır (Bultreys ve Kaluzna 2010). Bu yüzden GATTa testinde *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ve ırk 2'yi ayırmada sadece jelatin hidrolizi kullanılabilir. Vicente ve Roberts (2007) bazı *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 izolatlarının GATTa test sonucu (+++-) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'ye benzer olduğunu bildirmiştir. Bunun yanında GATTa test *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ayırmada kullanılacak bir yöntem olduğu ama *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 için ekstra testlerin eklenmesi gerekmektedir. Bu ek testler; buz çekirdeği aktivitesi, sukroz nutrient broth besiyerinde gelişim ve insitoldan asit üretimi gibi testlerdir. Bu testler hızlı, kullanılabilir, ucuz ve benzer performansı gösteren testlerdir. Sukroz nutrient agar besi yerinde *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* sarı koloni, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ise beyaz koloni oluştururken *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 değişkenlik göstermektedir (Bultreys ve Kaluzna 2010).

Ivanovic ve ark (2012) böğürtlen, erik, kiraz, vişne, şeftali, armut ve elma ağaçlarından izole ettikleri *Pseudomonas syringae* izolatlarının moleküler analizlerini yapmışlardır. Yapılan profil çalışmaları sonucunda izolatları *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 'a benzerlik

gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca REP-PCR kullanılarak yapılan çalışmalarda *Pseudomonas syringae*'nin farklı konukçulardan izole edilen izolatlarının yumuşak çekirdekli ve sert çekirdekli ağaçları gibi farklı gruptan izole edildiklerinin ayırımının yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Kaluzna ve ark. (2012), Polonya ve İtalya'da kiraz (*Pisum avium*), vişne (*Pisum cerasus*), erik (*Pisum domestica*) ve fındık (*Corylus avellana*) konukçularda hastalık belirtisi gösteren bitki örneklerinden 33 adet bakteri izolatu elde etmişler ve izolatları klasik teknikler kullanarak fenotipik olarak tanılamışlardır. Bunlardan 16 tanesi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 12 adedi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ve 5 adedi ise *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 olarak tanılanmıştır. Tanılama toksin üretimlerine göre yapılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarından 11 adedi *syrB*, 3 *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 *cfl* ve 3 adet *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 izolatu yersiniabactin (*irp1*) genine sahip oldukları gözlenmiştir. ERIC, REP ve BOX-PCR kullanarak pathovarlar ve ırkların ayırmalarını yapmışlardır. Bunlardan ERIC ve BOX benzer sonuçlar vermiştir. *gypB*, *gapA*, *gltA* ve *rpoD* genleri kullanılarak yapılan MLST-PCR'da izolatlar *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 olmak üzere 3 kümeye ayrılmıştır.

Haghighi ve Taghavi (2014) yapmış olduğu bir çalışmada *Prunus* türleri ve şeker pancarı, armut, ayva, yulaf, buğday, arpa ve çeltik gibi diğer konukçularından elde ettikleri *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının REP-PCR ve RAPD PCR teknikleri kullanarak ayırmalarını yapmışlardır. Bu teknikler kullanılarak yumuşak çekirdekli, sert çekirdekli ve buğdaygil (tahıl) konukçuları gibi farklı konukçulardan elde ettikleri *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının ayırmada kullanılabileceğini önermişlerdir.

Ertimurtaş ve ark. (2014) *Pseudomonas syringae* pathovarlarının, LOPAT, GATTA testleri, karbon kaynaklarında asit oluşumu testi (mannitol, sorbitol, inositol, erythritol, tartaricacid, lacticacid, tyrosin) gibi klasik yöntemlerin yanı sıra, patojenisite ve patolojik temelli fitotoksinlerinin dikkate alındığı *in vitro*'da syringomycin üretiminin ve buz çekirdeği oluşturma aktivitesinin saptanması gibi tanılama yöntemleri ile tanısı yapılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* izolatlarının moleküler yöntemlerle de kesin tanısı yapmışlardır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'nin syringomycin sentezinden sorumlu *syrB* geni ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'nin coronatine sentezinden sorumlu *cfl* geninin moleküler tanısı, klasik PCR testi ile belirlemişlerdir. *Pseudomonas syringae* pathovarlarının ayırt edilmesinde kullanılan *cts*, *gapA*,

gyrB ve *rpoD* genlerinin sekans analizleri yapmışlardır. Klasik ve moleküler tanılama testleri sonucunda, testlenen 15 *Pseudomonas syringae* izolatının 9' unun *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olduğunu saptamışlardır.

Abbasi ve ark. (2012) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 'nin moleküler tanılanmasını *syrB* genine göre dizayn edilen primerin kullanıldığında 752bp baz uzunluğunda PCR ürünleri elde edilirken, Albelleria ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 'un moleküler tanılanmasında kullanılan *cfl* geninin kullanıldığı PCR çalışmalarında ise 650 bp baz uzunluğunda PCR ürünlerinin elde edildiğini bildirmişlerdir.

Hastalığın Dünyadaki ve Türkiye Durumu

Allen and Dirks (1978) Kanada'nın Ontario-Niagara Yarımadası'nda yetiştirilen kirazlardaki bakteriyel kansere *Pseudomonas* cinsinde en az iki tür veya fizyotipten kaynaklandığını belirtmişlerdir. Yaptıkları biyokimyasal testler sonucunda izolatların *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* Wormald ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall ile benzer olduğunu belirlemişlerdir.

Latorre ve Jones (1979) ABD'nin, Michigan eyaletinde vişne gözlerinde, çiçek demetlerinden yaprak meyve ve bir yaşındaki odun kısımlarından izole ettikleri 462 gram negatif, oksidaz negatif, yeşil floresan ve çubuk şeklindeki bakterileri izolatu elde etmişlerdir. İzolatların tanısını yaparken GATTa⁺'yı kullanmışlardır. GATTa⁺ ve GATTa⁻ olmak üzere iki farklı karakterde izolatların bulunduğunu saptamışlardır. Bunların tanısı yapıldığında GATTa⁺'nın *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, GATTa⁻ özellik taşıyanların ise *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olduğunu belirlemişlerdir. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'nin vişnede *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 'den daha yoğun popülasyona sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Burkowicz ve Rudolph (1994), dünyadan farklı bölgelerinden elde ettikleri 216 izolatın yapılan tanılama çalışmaları sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak belirlemişlerdir. Kiraz, vişne, erik ve kayısıdan elde edilen izolatların tamamı *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak belirlenmiştir. Elde edilen ülkeler bazında bakıldığında İngiltere ve İtalya'dan kirazdan elde edilen izolatlar *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, Macaristan ve ABD'den elde edilen kiraz izolatlarının tamamı *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* belirlenirken, Polonya ve Fransa'da ise her iki patojen belirlenmiştir. İngiltere ve Güney Afrika erik izolatlarının tamamı sadece *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, Polonya izolatları ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak

saptanmıştır. Fransa, Güney Afrika, Macaristan, Polonya, Türkiye, Yeni Zelanda ve Yugoslavya' dan elde edilen kayısı izolatlarının *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* belirlenirken, sadece İsviçre, Macaristan, Polonya ve Yugoslavya' dan elde edilen 5 izolat ise *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* olarak tanımlanmıştır.

Kavak ve Çıtır (1995) yaptıkları bir çalışmada bakteriyel kansere eden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hastalığı ile Malatya bölgesindeki üretim alanlarının %20'sinin bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

Kotan ve Şahin (2002) Erzurum, Erzincan ve Artvin illerinde ticari ve ev bahçelerinde yaptıkları sörveyler sonucunda üretim alanlarının %80'ninin *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ile bulaşık olduğunu saptamışlardır.

Vicente ve ark (2004), 2000-2001 yıllarında ormanlık alanlardan ve fidanlıklardaki kirazlarda (*Prunus avium*) sörvey yapmıştır. Sörvey yapılan 24 ormanlık alanın 20' sinde, 7 fidanlığın ise 3'ünde bakteriyel kanser belirtileri belirlenmiştir. Yabani kirazdan elde edilen izolatların çoğunluğu *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olmasının yanında *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 'un ırk 1 ve ırk 2'sinde bulunduğunu saptamışlardır.

Sulikowska ve Sobiczewski (2008) Polonya'nın farklı bölgelerinden 2007 yılında 4 sert çekirdekli meyve türünün ağaçlarından hastalıklı örneklerden yaklaşık 130 adet floresan *Pseudomonas* izolatı elde etmişlerdir. Biyokimyasal ve fizyolojik testler kullanılarak yapılan testler sonucunda 110 adedi *Pseudomonas syringae* olarak tanımlanmıştır. GATTA testi kullanıldığında 31 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk1, 37 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 ve 42 izolat ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmıştır. Yapılan GATTA testi sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (++--), *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 (--++) ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 (+---) sonuçları elde edilmiştir.

Gilbert ve ark (2009), Belçika' da 1993-2002 yılları arasında 36 şeftali, erik ve kiraz bahçesindeki hastalıklı bitki dokularından elde ettikleri *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas viridiflava* izolatları toplamışlardır. Yaklaşık 356 izolatı fitotoksin, siderefor ve klasik mikrobiyolojik testleri, genetik metotlardan REP-,ERIC- ve BOX ile IS50-PCR testlerine göre yapılan tanı çalışmaları sonucunda 280 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 41 izolat *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1, 12 izolat *Pseudomonas*

syringae pv. *morsprunorum* ırk 2, üç izolat *Pseudomonas viridiflava* ve 20 izolat ise tanılanamayan *Pseudomonas syringae* olarak belirlenmiştir.

Dönmez ve ark (2010) Malatya kayısı üretim merkezlerinde yaptıkları çalışma sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 'un bakteriyel kansere neden olduğunu belirlemişlerdir. Bölgeden topladıkları 53 izolatın 42 adedi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve 11 adedi ise *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanılamışlardır.

Gavriloviç ve ark (2012) Sirbistan'da kirazlardan karakteristik *Pseudomonas* belirtisi gösteren örneklerden bakteri izolatları elde edilmiştir. Sirbistan'ın farklı bölgelerindeki (Belgrat, Topola, Cocak, Sabac, Novi Sad) kiraz üretim alanlarında iki farklı tip simptom belirlemişlerdir. Bunlardan birincisi tomurcuk nekrozu ve ikincisi ise kiraz dallarındaki bakteriyel kanserlerdir. Yaptıkları tanı çalışmaları sonucunda birinci grup kiraz nekrotik dallarından izole edilen armut, kiraz ve limon meyveleri, leylak yaprakları ve fasulye kapsülünde nekroza neden olan jelatin ve esculin pozitif, tyrosine ve tartarat ise negatif olarak belirlenmiş ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanmıştır. İkinci grup izolatlar ise kiraz tomurcuklarındaki nekrotik alanlardan izole edilen temel patojenite testleri negatif, jelatin ve esculin negatif, tyrosine ve tartarat ise pozitif olarak belirlenmiş *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak saptanmıştır.

Gasic ve ark (2012)'in bildirdiğine göre, Belçika'da meyve bahçelerinde armutta *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* sert çekirdeklielerde *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'nun bulunduğu bildirilmiştir (Bultreys ve Gheysen 2004, Gilbert ve ark 2009,) yabani kirazlarda ise *Pseudomonas syringae* pv. *avii* 'nin varlığı Fransa'da rapor edilmiştir (Menard ve ark 2003). Belçika'da *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* genel olarak yumuşak çekirdekli ve otsu bitkilerde hastalık oluştururken (Arsenijevic 1997, Gavrilovic 2006; 2009, Gavrilovic ve ark. 2008), *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* yaygın olarak vişne, kiraz, erik (Hattingh ve Roos 1995) ve kayısıda (Bultreys ve Kaluzna 2010) hastalık oluşturmaktadır.

Abbasi ve ark (2012) tarafından İran'da yapılan bir çalışmada sert çekirdekli meyve ağaçlarında bakteriyel kansere neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* şeftali (*Prunus persica*), erik (*Prunus domestica*), kiraz (*Prunus avium*) badem (*Prunus dulcis*) ve kayısıda (*Prunus armeniaca*)'da hastalığa neden olduğunu belirlemiştir.

Görmez (2011)'in bildirdiğine göre, Erzurum il ve ilçelerindeki (İspir, Narman, Oltu, Olur, Pazaryolu, Şenkaya, Uzundere ve Tortum) hastalıklı kayısı ağaçlarından alınan bitki örneklerinden 318 izolat elde etmişlerdir. İzolatlar MIDI sistemi ile tanılanmış 104 adet *Pseudomonas* cinsine giren tür çalışmada kullanılmıştır. İzolatların 38 'inin İspir, 26 'sının Şenkaya, 19'unun Tortum, 9'unun Olur, 7 'sinin Oltu, 4 'ünün Narman ve 1 tanesinin ise Uzundere ilçesinden izole etmiştir. Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIS) tanı sonucuna göre bu türlerin 75 adedi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak belirlenmiştir. Kayısıda yapılan patojenite testleri sonucunda ise 67 izolatın patojen olduğu tespit etmiştir.

Hastalığın Epidemiyolojisi

Hastalık baharda kanser yaraları ve çiçek demetlerindeki popülasyonların gelişmesi ve kolonizasyonu ile başlamaktadır. Çiçek demetlerindeki etmenin popülasyonu 10^{4-6} arasındadır. Yanıklık simptomsunun ortaya çıkması için soğuk bir havadan sonra nemli ve serin bir havanın devam etmesi gerekmektedir. Çiçek demeti enfeksiyonlarının meydana gelebilmesi için don zararlanması sonucu oluşan yaralara ihtiyaç duymaktadır. Kanser formu genellikle budama yerlerinde patojenin kolonize olmasını takiben ortaya çıkmaktadır (Kennelly ve ark 2007). Gürcistan'da yapılan bir çalışmada budama yerlerinden Eylül-Aralık ayı döneminde yapılan inokulasyon sonucu şeftali ağaçlarının %57-100 oranında ağaç ölümleri gerçekleşirken Nisan ayında yapılan budamalardan sonra yapılan inokulasyonlarda ağaç ölümleri görülmemiştir. Bu çalışma ile budama ve budama zamanının hastalığın yayılmasında önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir (Chandler ve Daniell 1976).

Meyve ağaçlarındaki *Pseudomonas syringae* hastalıklarının gelişiminde, dondurucu soğukların etkili olduğu yapılan çalışmalarda birçok kez belgelenmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, vişne, kayısı ve şeftali dal ve yapraklarında dondurucu soğuklarda şiddeti daha fazla olmaktadır (Klement ve ark. 1984, Süle ve ark. 1987, Weaver 1978).

Latorre ve Jones (1979) topladıkları yabancı otlar ve yere dökülmüş yaprakları bir yıl süreyle belli aralıklarla izolasyonlar yapmışlar ve 54 yabancı ottan 3'ünden *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* izole ederken bitki parçalarından izole edememişlerdir. Sera denemelerinde ise vişnede nemli koşullarda kiraz meyvesine, şeftali fidanına, vişne yapraklarına ve sürgünlerine yabancı ot ve bitki parçalarından geçiş yaptığını belirlemişlerdir. Bu çalışma ile yabancı otlar ve bitki artıkları kirazda bakteriyel kanserin potansiyel inokulum kaynağı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Pseudomonas syringae pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* yanıklık belirtisi gösteren bölgelerde, hasta tomurcuk ve yapraklarda, gövdede ve bazı yabancı otlarda kışlar. Hasta tomurcuk, mahmuz dipleri, aşı yaraları ve yaralar etmenin bitkiye giriş yerleridir. Yanıklar sonbaharda hızla gelişerek soğuk havaların sona ermesi ile ortaya çıkar. Tomurcuk enfeksiyonlarında ise dış tomurcuk pullarından giriş yaparak tomurcuğu öldürmektedir (Endert ve ark. 1984).

Pseudomonas syringae pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ile infekteli sürgünlerde nekrozlar oluşumu ve patojen popülasyonu -10° C' de yoğun olurken -5° C' de ise bir artış olmamıştır (Sobiczewski ve ark. 1992).

Meyve ağaçlarındaki farklı *Pseudomonas* tür ve pathovarlarının yaşam döngülerinde farklılıklar görülebilmektedir. Otsu bitkileri infekte eden *Pseudomonas syringae* pathovarları meyve ağaçlarında yaprak, sürgün uçları ve meyveleri de hastalandırabilir. Bunun yanında meyve ağaçlarının çok yıllık olmalarından dolayı enfeksiyonlar, etmenin kışı geçirdiği infekteli yerlerden yeni enfeksiyonlar gerçekleştirirler. Enfeksiyonlar sonucu oluşan kanser yaraları dalların ölümüne neden olur. Hatta bu kanserler ağaçların tamamının dahi ölmesine neden olabilmektedir (Kennelly ve ark 2007).

Kennelly ve ark (2007) bildirdiğine göre, kirazlarda bakteriyel kanserin epidemiyolojik çalışmaları *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* 'nin epifitik ve endofitik fazlarının önemli olduğunu göstermiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* 'un sağlıklı dokularda epifitik yaşamını devam ettirdiği ilk olarak kirazlardaki çalışmada belirlenmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* 'un epifitik fazı sağlıklı tomurcuk ve yapraklarda gelişir ve canlılığının devam ettirerek üretim sezonunda sağlıklı dallara giriş yaparak hastalığı başlatmaktadır (Crosse 1959, Hirano ve Upper 2000). Sağlıklı yapraklardaki yaprakları yıkama yöntemiyle *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* popülasyonlarını saptamış ve yeni kanser oluşumları için inokulum kaynağı olarak rol oynadığı belirlemiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* 'nin epifitik fazı sağlıklı tomurcuk ve yapraklarda gelişir ve canlılığını devam ettirerek üretim sezonunda sağlıklı dokulara giriş yaparak hastalığı başlatmaktadır. Yaz ayları boyunca bakteriyel kanser patojenleri sağlıklı yaprak yüzeylerinde epifitik olarak yaşamlarını devam ettirirler ve/veya meyve ve yaprakta lekelere neden olabilir. Epifitik popülasyon yaz aylarında dışardan yağmurların arttığı ve sıcaklığını oluştuğu sonbahar aylarında tekrar artış gösterir (Sundin ve ark. 1988). Dormant tomurcuklar bakteriyel patojenler için bir kışlama yeridir (Kennelly ve ark.

2007). İngiltere’de kirazlardaki çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ’nin tomurcuklarda kışladığı Crosse (1956), yine *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ile yapılan Michigan (Sundin ve ark 1988) ve Güney Afrika’daki (Ross ve Hattingh 1986) çalışmalarda dormant tomurcuklarda hastalık etmenini belirlemişlerdir. Yaprak düşme yerlerinde çevre koşulları serin sıcak, rüzgar ve yağmur damlasını içerdiği durumlarda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* yaprak yüzeylerinden taşınarak sistemik kolonizasyonları meydana getirmektedir (Crosse 1957, Sundin ve ark 1988). Bakteri kolonizasyonu kış sonuna kadar dormant tomurcuklarda ve sistemik olarak yaprak izlerinde devam etmektedir (Sundin ve ark 1988). Birçok sebepten dolayı tomurcuktan sağlıklı görünürler fakat patojen tarafından öldürülmesi nedeniyle ölü tomurcuk simptomu olarak isimlendirir ve kanser başlangıcıdır. Sağlıklı dormant tomurcuklardaki bakteriyel popülasyon ilkbaharda çiçek demetlerinde kolonizasyonları için inokulum kaynağı olarak görev yapar.

Scortichi (2010)’nun bildirdiğine göre *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* bir mevsimden diğerine dormant tomurcuklar ve kanserlerle geçmektedir. Bahar boyunca yaprak, çiçek ve genç meyvelerde kolonize olarak epifitik olarak yaşamını devam ettirir ve bu ilk kez Crosse (1957, 1959) tarafından belirlenmiştir. Her iki patojen için epifitik faz gelişir ve canlılığını devam ettirerek sağlıklı yapraklarda üretim mevsiminde bitkiye giriş yapar (Sundin ve ark. 1988). Yaz boyunca *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* epifitik popülasyonları azalırken sonbaharda sıcaklığın azalması ve yağmurların artması ile tekrar popülasyonları artmaktadır (Crosse 1957, 1966, Sundin ve ark 1988). Her iki patojenin hastalık döngülerinde önemli dönemleri bitkilere kolonizasyonları ve yaprak döküm yerlerinden bitkiye giriş yapmalarıdır. Tomurcuklar sağlıklı görünebilir ama belli bir süre sonra patojen tarafından öldürebilmektedir. Ilık iklimlerde yaprak döküm yerleri çok az etkili olmasının yanında patojen dallar içerisinde sistemik olarak yayılmaktadır (Hatting ve ark. 1989). Ağaçlarda bütün çevresel faktörlerden meydana gelen yara ve/veya zararlanmalar bitki içerisi de patojen girişi söz konusu ve hastalık patlamasının sebebidir. Kış ve sonbahar donları, dolu yağmuru yanında budama yaraları bahçe içerisinde veya arasında *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* yayılması ve/veya penetrasyonu için uygun koşulları oluşturmaktadır. Kanser formları sonbahar veya kışın yapılan kültürel işlemler esnasında oluşan yaralarda patojen kolonize olur ve takiben kanserler görülür (Otta ve English 1970, Chandler ve Daniell 1976, Vigouroux ve Busse 1999). Bunun yanında endofit olarak yaşayan mikroorganizmalar don zararı olmadan dalların içerisinde sistemik olarak yayılabilmektedir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

Karakteristik hastalık belirtisi gösteren kiraz bitki örneklerinden izole edilen bakterilerin tanılanması çalışmalarında karşılaştırma kültürleri olarak Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden (Adana) Prof. Dr. Yeşim AYSAN temin edilen tanısı yapılmış *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatu, Tekirdağ ve çevresinden izole edilen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatları, Yalova Bahçe Kültürleri Atatürk Araştırma Enstitüsü'nde çalışan Yük. Zir.Müh. Nesrin TUNALI'dan tanısı yapılmış *Erwinia amylovora* 57 izolatu, Doç. Dr. Mustafa MİRİK'ten temin edilen tanısı yapılmış *Pseudomonas cichorii* ve *Pectobacterium caratovorun* izolatu, besi yerleri, çeşitli kimyasallar, laboratuvar malzemeleri, inkübatör, etüv, otoklav, pH metre, spektrofotometre ve PCR aleti bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

3.2. METOD

3.2.1. Hastalığın Yaygınlığının Tespiti

Arazi çalışması için gidilecek bahçelerdeki ağaçlar Lazarow (1961) metoduna göre incelenmiştir. Bu metoda göre 20 meyve ağacı olan bahçenin %100'ü, 21-70 meyve ağacı olan bahçede 21-30 ağaç, 151-500 meyve ağacı olan bahçede 41-80 ağaç, 501-1000 meyve ağacı olan bahçede ağaçların %15' i, 1000' den fazla meyve ağacı olan bahçede ağaçların %5' i (en az 150 ağaç) kontrol edilerek hasta bitki örnekleri Tekirdağ'ın Naip, Merkez, Mermer, Kumbağ, Karahisarlı, Çanakçı, Barboros ve Kumbağ ilçelerinden toplanmıştır. Gezilen bölgedeki bahçe sayısına, hastalıklı bahçe sayısı oranlanarak hastalığın yöredeki yaygınlığı hesaplanmıştır. Ayrıca her kiraz bahçesi, çapraz olarak gezilmiş, hastalıklı ve sağlıklı ağaçların sayıları belirlenerek basit ortalama metoduna göre bahçelerdeki hastalık %'si hesaplanarak hastalığın bahçedeki bulunma oranı tespit edilmiştir. Ayrıca hasta ağaçlardaki hastalık şiddeti ise gezilen bahçelerde ortalama 10 ağaçta hastalıklı kısmın ağacın % kaçını kapladığı hesaplanarak belirlenmiştir.

3.2.2. Hasta Bitki Materyalinin Toplanması ve Muhafazası

İnceleme yapılan bahçelerde karakteristik olarak kiraz dal yanıklığı belirtilerini gösteren ağaçların dal ve sürgünleri simptomun bittiği kahverengi dokunun yaklaşık 15 cm

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

3.2.3. Bakteriyel Kansere Etkisinin İzolasyonu

Bakteriyel kanser belirtisi gösteren örneklerin hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içeren 0.5 cm'lik bitki parçaları % 70'lik alkol veya % 1'lik NaOCl ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Parçalar steril havanda %0.85 NaCl içeren saline buffer da homojenize edilmiştir. Elde edilen ekstraktan bir öze dolusu süspansiyon alınarak King B (20 g Proteose peptone, 1.5 g K₂HPO₄·3H₂O, 1.5 g MgSO₄·7H₂O, 10 ml Glycerol, 15 g Agar, 1000 ml Saf su, pH= 7.2) besi yeri içeren petrilere çizgi ekimiyle çizilmiştir. 25°C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra gelişen krem renkli koloniler saflaştırılmış ve gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik olarak hazırlanmış YDC ortamında +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.4. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik bölge izolatları ve referans kültür spektrofotometrede 600 nm 0.1 absorbans değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlardan 100 µl alınarak içerisinde 0.9 ml steril su bulunan tüplerde 7 kez seri sulandırmalar yapılmıştır. Her bir sulandırmadan içerisinde King B besi yeri bulunan petrilere 100µl süspansiyon koyulmuş ve bir baget yardımı ile besi yeri üzerine yayılmıştır. Her seyreltme için üç adet petri kullanılmıştır. 25°C'de 48 saat inkübasyondan sonra petrilere gelişen koloniler sayılarak ml'deki bakteri hücre sayısı formüle (koloni sayısı x örneğin seyreltme serisi x 10) göre hesaplanmıştır (Klement ark. 1990).

3.2.5. Patojenite Testi

Hastalıklı kiraz dokularından izole edilen bakteri izolatları Lelliott ve Stead (1987) bildirdiğine göre 4 farklı yöntem kullanılarak yapılmıştır. Patojenite testlerinin tamamında çalışmalarında 10⁸ hücre/ml inokulum yoğunluğu kullanılmıştır. Patojenite testlerinde pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* referans kültürü, negatif kontrol olarak ise steril su kullanılmıştır. Çalışmada dört farklı inokulasyon yöntemi kullanılmıştır.

Çiçek demetlerine püskürtme: Sağlıklı kiraz ağaçlarından alınan 20-25 cm uzunluğundaki henüz açılmamış çiçek demetleri su içeren erlenlere konulmuştur. Hazırlanan bakteri süspansiyonu bir el pülverizatörü yardımıyla çiçek yanıklığı için çiçek demetlerine 1 ml olacak şekilde püskürtülmüştür. Yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur (Şekil 3.1). İnokulasyondan bir gün sonra bitkiler nem çemberinden alınmış ve günlük olarak simptom gelişimi açısından incelenmiştir. Daha sonra inokulasyondan sonra 25°C ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarına koyularak hastalık belirtisinin ortaya çıkması için beklenmiştir. İnokulasyondan 8-10 gün sonra çiçekteki tipik leke oluşumuna göre hastalık var/yok olarak değerlendirilmiş ve izolatların patojen olup olmadığı belirlenmiştir.

Sürgünlerin uç kısımlarına injeksiyon: Sağlıklı kiraz ağaçlarından alınan 20-25 cm uzunluğundaki sürgün su içeren erlenlere konulmuştur. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 100 µl olacak şekilde steril bir enjektör yardımıyla sürgün yanıklığı için sürgünlere verilmiştir. Yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur. İnokulasyondan bir gün sonra bitkiler nem çemberinden alınmış ve günlük olarak simptom gelişimi açısından incelenmiştir. Daha sonra inokulasyondan sonra 25°C ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarına koyularak hastalık belirtisinin ortaya çıkması için beklenmiştir. İnokulasyondan 8-10 gün sonra sürgündeki tipik leke oluşumuna göre hastalık var/yok olarak değerlendirilmiş ve izolatların patojen olup olmadığı belirlenmiştir.

Çeliklerin bakteri süspansiyonuna daldırılması: Sağlıklı kiraz ağaçlarından alınan 20-25 cm uzunluğundaki sürgün su içeren erlenlere konulmuştur. Hazırlanan bakteri süspansiyonu içerisine 15-20 dakika süre ile daldırılmıştır. Yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur. İnokulasyondan bir gün sonra bitkiler nem çemberinden alınmış ve günlük olarak simptom gelişimi açısından incelenmiştir. Daha sonra inokulasyondan sonra 25°C ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarına koyularak hastalık belirtisinin ortaya çıkması için beklenmiştir. İnokulasyondan 8-10 gün sonra gövdedeki tipik leke oluşumuna göre hastalık var/yok olarak değerlendirilmiş ve izolatların patojen olup olmadığı belirlenmiştir.

Meyveye inokulasyon: Sağlıklı kiraz ağaçlarından ham kiraz meyveleri toplanmıştır. Bu meyveler patojenite testleri yapılana kadar buzdolabında +4°C saklanmıştır. Patojenite testinde her izolat için üç adet ham kiraz meyvesi kullanılmıştır. Meyveler kullanılmadan önce %3'lük hipo içerisinde 3 dakika bekletilmiş ve sonra 3 defa steril saf su içerisinde

geçirerek yüzeyden dezenfeksiyon yapılmıştır. Dezenfekte edilen kiraz meyveleri içerisinde kurutma kağıdı bulunan petrilerin içerisine yerleştirilmiştir. King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik bölge izolatları steril bir kürdan yardımıyla meyveye verilmiştir. İnokulasyondan sonra petriler 25° C'deki inkübatörde hastalık belirtisi oluşturma kadar petriler kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1. Sürgün ve Çiçek demetlerine bakteriyel süspansiyonun uygulanması

3.2.6. Re-İzolasyon

İnokulasyon yapılan kiraz sürgün, açılmamış çiçek demetleri ve meyvelerinde meydana gelen kahverengilikler ve kurumalar incelemeye alınmıştır. Örnekler küçük parçalara ayrılmış ve %70 etil alkol ile yüzeyden dezenfeksiyon edilmiştir. Örnekler porselen havan içerisine konulmuş ve 2 ml steril saline buffer eklenerek süspansiyonlar hazırlanmıştır. Havanlar 15-20 dakika bekletilerek bakterinin saline buffer süspansiyonuna geçmesi sağlanmıştır. Bekleme sonunda içerisinde King B besiyeri bulunan petrilere üç çizgi yöntemine göre çizimler yapılmıştır (Janse 2006). İzolasyon petrileri 25°C'de 48 saat inkübatörde bekletilmiştir. King B agar besi yerinde floresan tipte, küçük yuvarlak ve kabarık olmayan tipte krem renğinde gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Simptom veren bitkilerden re-izolasyonlar yapılarak elde edilen re-izolatlar cam tüplerde eğik olarak

hazırlanmış yeast dekstroz kalsiyum karbonat agar (YDCA) besi yerine çizimleri yapılarak tanı çalışmaları yapılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

3.2.7. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı

129 hasta bitkiden izole edilen 387 izolat içinden seçilen 41 adet re-izolat ile tanı çalışmaları yapılmıştır. Geleneksel yöntemlerle tanısı Lelliott ve Stead (1987) ile Schaad ve ark. (2001)'e göre yapılmıştır. KOH ile gram reaksiyonu ve LOPAT (L: levan oluşumu, O: oksidaz testi, P: patateste pektolitik aktivite, A: arginin dehidrolaz aktivitesi, T: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu) testlerinin sonucuna göre izolatların tanıları yapılmıştır. Çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'nin referans kültürü ile her bir test için pozitif ve negatif sonuç veren referans bakteri kültürleri kullanılmıştır.

King B Besi Yerlerinde Koloni Gelişimi: King B (1 l distile su, 20 g Proteose pepton, 10 ml Gliserin, 1.5 g K₂HPO₄, 1.5 g MgSO₄.7H₂O, 15 g Agar, PH: 7.2) besi yerinde koloni morfolojileri değerlendirmiştir.

Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon: Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra Tekirdağ ilinden elde edilen izolatlarının 48 saatlik kültüründen steril kürdan yardımıyla alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsı bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990). Kontrol olarak Prof. Dr. Yeşim AYSAN'dan alınan gram pozitif özelliğe sahip Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürü kullanılmıştır.

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

Oksidaz Testi:Taze hazırlanan %1'lik N; N; N; N' - Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diclorid eriği steril filtre kağıdına damlatılmıştır. Marmara Bölgesi izolatlarının 48 saatlik kültürü platin öze ile ıslak kurutma kâğıdına çizildiğinde 10 saniye

içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kovaks, 1956). Oksidaz pozitif özellikteki *Pseudomonas cichorii* kültürü çalışmada kullanılmıştır.

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

ArgininDehidrolaz Testi: Thorney 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 bekletilerek steril edilmiştir. Daha sonra tüplere bakteri kültürleri aşılanmış ve üzerleri 2 ml sıvı parafinle kapatılmıştır. 7-10 gün 27°C'de inkübasyondan sonra ortamın pembe-kırmızıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi: Tütün (*Nicotiana tabacum* cv Samsun N) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına Marmara Bölgesi zeytin izolatlarının 10⁸ hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak değerlendirilmiştir (Klement ve Goodman, 1967). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas cichorii* izolatı kullanılmıştır.

3.2.8. GATTa Testi

Jelatin hidrolizi: *Pseudomonas syringae* izolatlarının jelatin hidrolizi için besi yeri 5 g pepton, 3 g beef extract ve 120 g jelatin içermektedir. Karışım tartıldıktan sonra, jelatin 50°C'de eritilmiş, pH 7-7,2 ye ayarlanmıştır. Tüplere 5 ml konmuş ve otoklavda 121°C'de sterilize edilmiştir. Tüplere bakteri aşılandıktan sonra 20°C'de 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* için tüplerdeki jelatin akıcı ve test sonuçları pozitif; *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* için tüplerdeki jelatin katı ve test sonuçları negatif olarak değerlendirilmiştir (Schaad ve ark. 2001).

Esculin hidrolizi: Bakteriyel izolatların esculin hidrolizini belirlemek için besi yerinde 10 g pepton, 1 g aesculin, 1 g sodium citrate ve 0.05 g ferric citrate içermektedir. Besi yerinin hazırlandıktan sonra pH' sı 7'ye ayarlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. Steril besi yeri tüplere 5'er ml konduktan sonra bakteri ekimi yapılmıştır. 27-28°C'de 3-4 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra besi yeri kahverengi-siyah renk alanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Tartaric acid ve Tyrosin kullanımı: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* izolatlarının ayırımında karbon kaynaklarını kullanım durumları önemlidir. Bakterilerin karbon kaynaklarından yararlanmalarını belirlemede kullanılan bazal ortamın kullanılmaktadır. Bazal ortam içerisine konulan kimyasallar (1 g NH₄H₂PO₄, 0.2 g KCl, 0.2 g MgSO₄ 7H₂O, 0.08 g Bromthymolblue, 14 g Agar) agar dışındaki kimyasallar 900 ml saf suda eritilmiş, pH: 7.0' ye ayarlanmış ve üzerine agar ilave edilerek 100°C'de eritildikten sonra tüplere 4.5 ml konmuştur. Daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Testte kullanılan karbonhidratların (tartaric acid ve tyrosin) her birinden 2 g tartılarak ve üzerine 20 ml saf su eklenerek (%10'luk) eritilmiş ve tekrar pH: 7.0 değerine ayarlanmıştır. Sonra bakteri filtresinden geçirilerek sterilize edilmiştir. Sterilize edilen karbonhidratlar otoklavdan çıkarılan ve 4.5 ml besi yeri içeren tüplere 0.5 ml ilave edilmiş ve eğik agar olarak hazırlanmıştır. Sonuç olarak karbonhidrat oranı besi yerinde %1'e ayarlanmıştır. Her bir karbonhidratın ayrı ayrı bulunduğu tüplere bakteri aşılansmış ve 24-27°C'de tüpler inkübe edilmiştir. Asit oluşan tüplerde renk değişimi olmuş (sarıya döner) ve değişim pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schaad et al. 2001).

3.2.9. Bakteri İzolatlarının PCR Testi İle Tanısı

Tekirdağ ilinden elde edilen izolatların 41 adet izolatın PCR ile tanısı yapılmıştır. İzolatlar nutrientbroth sıvı besi yerinde geliştirilerek De Boer ve Ward (1995)'e göre saflaştırılmış genomik DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonu aşamaları:

1. Bakteri izolatları 9 ml Nutrient broth sıvı besi yerine aşılansarak 24 saat geliştirilmiştir.
2. Bakteri süspansiyonundan 1ml steril ependorf tüpüne alınmış ve tüplerin ağırlıkları dengelenerek 14.000 rpm'de 20 dak. santrifüj edilmiştir.

3. Pellet alınarak süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine hücre parçalanmasını sağlamak üzere % 1'lik SDS+TAE bufferdan 100 µl eklenmiş ve tüp karıştırıcısında karıştırılmıştır.

4. Tüpler 50°C'deki su banyosunda 3 saat bekletilmiştir.

5. 7.5 M Amonyum asetat (1 ölçeğe yarım ölçek olacak şekilde) eklenerek karıştırılmıştır.

6. 14.000 rpm'de santrifüj yapılarak amonyum asetat artıklarının altta toplanması sağlanmıştır. Üste kalan DNA kesik bir pipet ucu ile alınmış (yaklaşık 130 µl) ve yeni bir ependorf tüpüne aktarılmıştır. 7. Buna eşit miktarda (yaklaşık 130 µl) derin dondurucuda soğutulmuş isopropanol eklenmiştir. Tüpler derin dondurucuda 45 dak. bekletilmiştir.

8. 10.000 rpm'de 10 dak. santrifüj yapılarak pellet alınmıştır.

9. Soğutulmuş %70'lik alkolden 100 µl ependorf tüplerine eklenmiş ve 10.000 rpm'de 10 dak. santrifüj yapılarak alkolle yıkama yapılmıştır.

10. Ependorf tüplerinden alkol dökülmüş ve steril kabinde bir saat kurumaya bırakılmıştır.

11. Ependorflar içerisine 40 µl bidistile su (ddH₂O) konarak tüp karıştırıcısında karıştırılmıştır.

12. Daha sonra bu DNA'lar %1'lik hazırlanan agarose jele verilerek izole edilip edilmedikleri tespit edilmiştir. Hazırlanan agaroz jel 70 miliamperde yarım saat yürütüldükten sonra etidyum bromid (10 mg/ml) ile boyama yapılmış ve transliminatörde bantlar incelenmiştir.

PCR çalışması (Bereswill 1992 ve Abbasi 2013)'e göre yapılmıştır. Çalışma, reaksiyon tüpü adı verilen 0.5 ml'lik ince duvarlı ependorf tüplerde toplam hacmi 25 µl olan reaksiyon karışımının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımının içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR işleminde kullanılan reaksiyon karışımının içeriği

| <u>Reaksiyon Karışımın İçeriği</u> | <u>Miktarı (µl)</u> |
|--------------------------------------|----------------------|
| PCR Master Mix (Promega, M7502) | 12.5 |
| 20pmole primer1 | 2.0 |
| 20pmole primer2 | 2.0 |
| H ₂ O (Nucleasefreewater) | 6.5 |
| g-DNA | 2.0 |
| Toplam | 25 |

Kullanılan Primerlerin dizilişleri şöyledir:

syrB gen Primer B1: 5'-CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3'

syrB gen Primer B2: 5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3'

Thermalcycler cihazında (Techne Marka) kullanılan program Çizelge 3.2.'deki gibidir.

Çizelge 3.2. B1 ve B2 primerlerinin PCR işlemi için kullanılan program

| <u>Programlandırmalar</u> | <u>Sıcaklık (°C)</u> | <u>Süre (da)</u> |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| İlk denatürasyon | 94 | 4 |
| Denatürasyon | 94 | 1.5 |
| Primerannealing | 60 | 1.5 |
| Extention | 72 | 3 |
| (2,3,4)x35 Döngü | 94 | 1.5 |
| Final extention | 72 | 10 |
| Beklemede | 4 | Süresiz |

Kullanılan Primerlerin dizilişleri şöyledir:

cfl gen Primer CFLF: 5'-GGCGCTCCCTCGCACTT-3'

cfl gen Primer CFLR: 5'-GGTATTGGCGGGGGTGC-3'

Thermalcycler cihazında (Techne Marka) kullanılan program Çizelge 3.3.'deki gibidir.

Çizelge 3.3. CFLF ve CFLR primerlerinin PCR işlemi için kullanılan program

| <u>Programlandırmalar</u> | <u>Sıcaklık (°C)</u> | <u>Süre (da)</u> |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 İlk denatürasyon | 93 | 2 |
| 2 Denatürasyon | 93 | 1 |
| 3 Primerannealing | 52 | 2 |
| 4 Extention | 72 | 2 |
| 5 (2,3,4)x37 Döngü | 93 | 1 |

| | | | |
|---|-----------------|----|---------|
| 6 | Final extention | 72 | 10 |
| 7 | Beklemede | 4 | Süresiz |

Elde edilen bakteri DNA'sının ve PCR ürünlerinin Agarose jel elektroforezine yönelik çalışmalar Sambrook ve ark. (1989)'a göre yapılmıştır. Bunun için 0.9 g agarose 90 ml 1 X TAE tamponuna konularak mikrodalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulan solüsyon, taraklar yerleştirilen jel tepsisine dökülmüştür. Agaroz jelin donmasından sonra jel tankı içerisine jeli örtünceye kadar 1XTBEbuffer konmuştur. Daha sonra örnek koymak için kullanılan tarak dikkatlice çekilerek çıkarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan agaroz jel çukurlarına 3 µl loading buffer ve 12 µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımı ile dikkatlice verilmiştir. Moleküler ağırlık işaretleyici (Marker) olarak 100 bp DNA işaretleyici (Marker, Fermentas SM 0623) kullanılmıştır. Elektroforez tankında agaroz jeldeki örnek hücrelerin bulunduğu yer güç kaynağının negatif (-) kutbuna denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve PCR ürünleri 100 V elektrik akımında yaklaşık 1 saat süre ile yürütülmüştür. Bantların görülmesi için ethidium bromür ile (10 mg/ml) 10 dak. boyama yapılmış ve bunu takiben 15 dak. saf su ile jel yıkanarak transilluminatörde (302 nm) bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi

Tekirdağ ilinde7 farklı yörede Naip, Merkez, Mermer, Kumbağ, Karahisarlı, Çanakçı, Barboros kiraz üretim alanlarına 2012 ve 2013 yılının Mart-Haziran aylarında periyodik olarak ziyaretler yapılmış ve ziyaret edilen kiraz bahçelerinde bakteriyel kanserin neden olduğu karakteristik hastalık belirtileri olan çiçek demeti yanıklığı, sürgünlerde geriye doğru ölüm, yaprak ve meyve lekeleri ile odun dokularında kanserle birlikte zamklanma belirtileri gözlenmiştir. Hastalık etmeninin neden olduğu yaprak lekeleri koyu kahverengi, daireselden düzensiz şekillere kadar değişen lekeler şeklinde ve bazı zamanlarda sarı hale ile çevrilidir. Lekeler büyüyerek birleşmekte ve daha büyük ölü alanlar meydana getirmekte, lekelerin merkezler dökülerek saçma ile delinmiş bir görüntü almaktadır. İnfekteli ağaçlarda yaprak ve çiçek demetleri baharda açılmamakta ve ölmektedir. Eğer enfeksiyon üretim sezonunda meydana gelirse çiçek demetleri baharda açmakta fakat yaz başlarında ölmekte, yapraklar solmakta ve meyveler kurumaktadır. Hastalığın en belirgin belirtisi ise ağaçlarda parlak görümlü zank salgılanması ve kanser yapılarıdır (Şekil 4.1). Kanserli dokular hafif çökük ve sağlamlardan daha koyu kahverengi olduğu görülmüştür. Kanserli bölgedeki kabuk dokusunun rengi parlak portakal renginden kahverengiye kadar değişir (Şekil 4.2). Kanserlerin altında ve üstünde dar kahverengi çizgiler oluşur. Bir ağacın gövdesi ya da dalı kanserle çevrildiğinde bu bölgenin üstündeki yaprakların içeri doğru büküldüğü, aşağı doğru sarkarak önce açık yeşil daha sonra ise sarardığı görülmüştür. Ağır enfektelenmiş ağaçlarda ölümler görülmüştür (Şekil 4.3). Kiraz meyvelerinde lekeler başlangıçta su emmiş leke şeklinde olduğu belirlenmiştir. Hastalıktan etkilenmiş olan meyvelerin yüzeylerinde çukurlar meydana getirmiştir. Bağlı olarak merkezi sarı-kırmızı renginde lekeler meydana getirmiş, meyve sapları ise kahverengi ve su emmiş leke şeklinde görülmüştür.



Şekil 4.1. Kiraz dal kanseri hastalığının neden olduğu zamklanma



Şekil 4. 2. Kiraz dal kanseri hastalığı belirtisi gösteren gövdelerdeki kabuk rengi



Şekil 4. 3. Kiraz dal kanseri hastalığından dolayı ölmüş kiraz ağacı

Çizelge 4.1.'de de görüldüğü üzere Tekirdağ ilinin Naip mevki'nden 45, Mermer' den 12, Merkez'den 23, Kumbağ' dan 13, Karahisarlı'dan 12, Çanakçı'dan 5, Barbaros'tan 14, Avşar'dan 5 adet olmak üzere Tekirdağ ilinden toplam 129 adet hastalıklı bitki örneği toplanmıştır.

Çizelge 4.1. Tekirdağ ili ve ilçelerinde bulunan kiraz bahçelerinden toplanan örnek ve elde izolat sayıları

| Örneklerin Toplandığı Mevkiler | Toplam Örnek Sayısı |
|--------------------------------|---------------------|
| Avşar | 5 |
| Barboros | 14 |
| Çanakçı | 5 |
| Karahisarlı | 12 |
| Kumbağ | 13 |
| Merkez | 23 |
| Mermer | 12 |
| GENEL TOPLAM | 129 |

Çizelge 4.2'de de görüldüğü gibi Tekirdağ ilinden elde edilen 41 adet *Pseudomonas syringae* izolatının %39.1'i Naip, %9.7' si Mermer, %9.7' si Merkez, %12.2' si Kumbağ, %7.3' ü Karahisarlı, %2.4' ü Çanakçı, 19.5' i Barboros'tan elde edilmiştir.

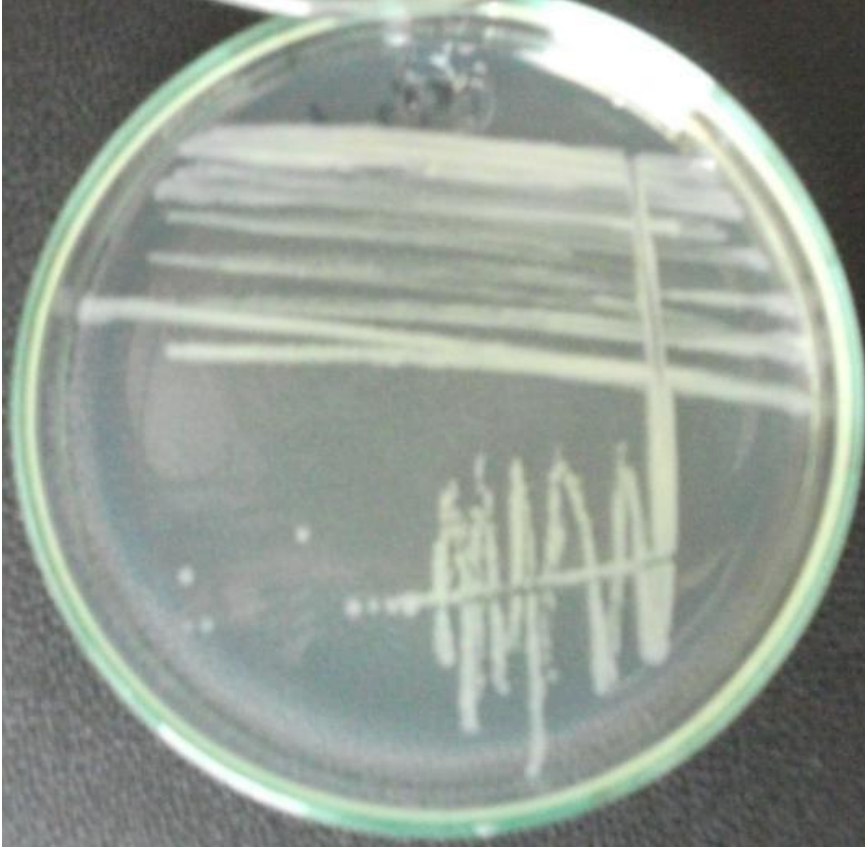
Arazi çalışmalarında ziyaret edilen bahçelerde hastalığın bulunma oranı %100 olarak belirlenmiştir. Tekirdağ ili mevkilerine göre bahçelerde hastalığın bulunma oranları ise Naip'te %35.6, Mermer'de %33.3, Merkez'de %17.4, Kumbağ'da %38.5, Karahisarlı'da %25.0, Çanakçı'da %20.0, Barboros' ta %57.1 olarak saptanmıştır. Hastalık şiddeti gezilen bahçelere göre değişiklik göstermekle birlikte %28.5-50.7 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Tekirdağ ili kiraz bahçelerindeki hastalık yaygınlığı, oranı ve şiddeti

| Mevkiler | Hastalığın yaygınlığı (%) | Hastalık bulunma oranı (%) | Hastalık şiddeti (%) |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------|
| Barbaros | 100 | 57.1 | 35.0-45.0 |
| Çanakçı | 100 | 20.0 | 10.0-20.0 |
| Karahisarlı | 100 | 25.0 | 15.0-25.0 |
| Kumbağ | 100 | 38.5 | 40.0-85.0 |
| Mermer | 100 | 33.3 | 40.0-70.0 |
| Merkez | 100 | 17.4 | 20.0-35.0 |
| Naip | 100 | 35.6 | 40.0-75.0 |
| Ortalama | 100 | 32.8 | 28.5-50.7 |

4.2. Hastalık etmeninin izolasyonu

Tekirdağ çevresinde bakteriyel kanser belirtisi gösteren 129 adet bitki örneğinin hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içeren parçalardan King B besi yerine yapılan izolasyonlarda 2-3 gün içinde krem-beyaz renkte (Şekil 4. 4) ve floresan tipte kolonilerden 387 adet bakteri izolatu elde edilmiş ve tanı testleri yapılmak için tesadüfi olarak Çizelge 4.3’de de listelenen 41 adet izolat kullanılmıştır. Bu izolatlar YDCA besi yerine çizimleri yapılarak tanı çalışmaları yapılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 4.4. King B besi yerinde gelişim

Çizelge 4. 3. Tanı çalışmaları için seçilen kiraz izolatları

| İzolatların Kod Adları | İzole edildiği yer | İzolatların Kod Adları | İzole edildiği yer |
|------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|
| Naip 1/1 | Naip-Tekirdağ | Merkez 2/1 | Merkez-Tekirdağ |
| Naip 2/1 | Naip-Tekirdağ | Merkez 3/1 | Merkez-Tekirdağ |
| Naip 3/1 | Naip-Tekirdağ | Merkez 4/1 | Merkez-Tekirdağ |
| Naip 4/1 | Naip-Tekirdağ | Kumbağ 1/1 | Kumbağ-Tekirdağ |
| Naip 5/1 | Naip-Tekirdağ | Kumbağ 2/1 | Kumbağ-Tekirdağ |
| Naip 6/1 | Naip-Tekirdağ | Kumbağ 3/1 | Kumbağ-Tekirdağ |
| Naip 7/1 | Naip-Tekirdağ | Kumbağ 4/1 | Kumbağ-Tekirdağ |
| Naip 8/1 | Naip-Tekirdağ | Kumbağ 5/1 | Kumbağ-Tekirdağ |
| Naip 9/1 | Naip-Tekirdağ | Karahisarlı 1/1 | Karahisarlı-Tekirdağ |
| Naip 10/1 | Naip-Tekirdağ | Karahisarlı 2/1 | Karahisarlı-Tekirdağ |
| Naip 11/1 | Naip-Tekirdağ | Karahisarlı 3/1 | Karahisarlı-Tekirdağ |
| Naip 12/1 | Naip-Tekirdağ | Çanakçı 1/1 | Çanakçı-Tekirdağ |
| Naip 13/1 | Naip-Tekirdağ | Barbaros 1/1 | Barbaros-Tekirdağ |
| Naip 14/1 | Naip-Tekirdağ | Barbaros 2/1 | Barbaros-Tekirdağ |
| Naip 15/1 | Naip-Tekirdağ | Barbaros 3/1 | Barbaros-Tekirdağ |
| Naip 16/1 | Naip-Tekirdağ | Barbaros 4/1 | Barbaros-Tekirdağ |
| Mermer 1/1 | Mermer-Tekirdağ | Barbaros 5/1 | Barbaros-Tekirdağ |
| Mermer 2/1 | Mermer-Tekirdağ | Barbaros 6/1 | Barbaros-Tekirdağ |
| Mermer 3/1 | Mermer-Tekirdağ | Barbaros 7/1 | Barbaros-Tekirdağ |
| Mermer 4/1 | Mermer-Tekirdağ | Barbaros 8/1 | Barbaros-Tekirdağ |
| Merkez 1/1 | Merkez-Tekirdağ | | |

4.3. Bakteri Süspansiyonun Hazırlanması

King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik izolatlar spektrofotometrede 600 nm 0.1 absorbans değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmış ve yapılan seyreltme serilerinden besiyerinde gelişen koloniler sayılarak ml' deki bakteri popülasyonu 7×10^8 hücre/ml yoğunluğunda olduğu hesaplanmıştır (Klement ve ark. 1990).

4.4. Patojenite testinde kullanılan bakteri popülasyonunun hesaplanması

Hastalıklı kiraz dokularından izole edilen ve tanı çalışmasında kullanılan 41 bakteri izolatu ve referans kültür King B besi yerinde geliştirilen 24 saatlik bakteri izolatlarının 7×10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonları hazırlanmıştır. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe bitkileri Demonstrasyon Kiraz bahçesinde toplanan çiçek, sürgün ve meyvelere inokülasyon yapılmış ve 25°C ve %70 nem içeren sera bölmesinde muhafaza edilmiştir. Pozitif kontrolle bulaşık bitkilerde dıştan gözle görülür belirtiler oluşunca yaklaşık çiçek ve sürgünler 8-10 gün sonra meyve denemeleri ise 5-7 gün sonra değerlendirme yapılmıştır (Janse 1981).

Seçilen 41 adet bölge izolatu ve referans kültür ile yapılan patojenite testlerinde tüm izolatlar inokulasyondan sonra 8-10 gün içerisinde kiraz çiçek (Şekil 4. 5) yanıklığa neden olmuştur. Sürgün demetlerinde yapılan inokulasyonlar sonucunda 10-15 gün içerisinde sürgün

yapraklarında kahverengileşme, içe doğru kıvrılma ve yanıklık belirtileri ortaya çıkmıştır. neden olmuştur (Şekil 4. 6). Ham meyvelere yapılan inokulasyonlardan 8-10 gün sonra ham meyve kiraz meyvelerinde derin siyah çukurluklar gözlenmiştir (Şekil 4. 7). Patojenite testinde kullanılan 4 farklı yöntemlerde oluşan belirtilerin gözlenmesi ve zamanları çizelge 4.4’de verilmiştir. Negatif kontrol olarak steril su ile çiçek, sürgün ve meyve inokulasyonlarında ise herhangi bir belirti gözlenmemiştir.

Çizelge 4.4. Patojenite testinde kullanılan yöntemlerin belirti oluşum zamanları

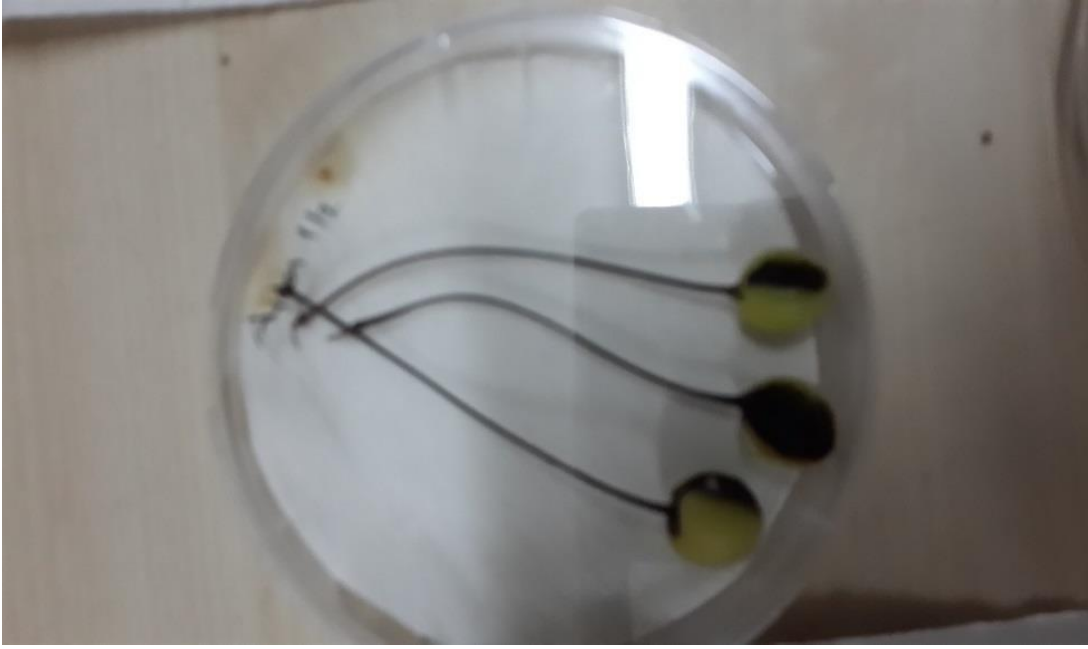
| Yöntem | Belirti oluştuğu gün | Oluşan belirti |
|---|----------------------|---|
| Çiçek demetlerine püskürtme | 2 | Su emmiş leke |
| | 3 | Çiçeklerde kahverengileşme, yapraklarda sararma |
| | 5 | Çiçeklerde solma, yapraklarda kahverengileşme |
| | 6 | Taç yaprakların dökülmesi, yapraklarda içeri doğru kıvrılma |
| | 8 | Çiçek yanıklığı, yapraklarda kuruma ve dökülme |
| Sürgünlerin uç kısımlarından İnjesiyon | 2 | Uç kısımlarda hafif kahverengileşme |
| | 3 | Uç kısımlarda kahverengileşme |
| | 7 | Sürgünlerde geriye doğru koyu kahverengi lekeler |
| | 15 | Sürgünlerde geriye doğru hafif kuruma |
| | 30 | Sürgünlerde yanıklık |
| Çeliklerin bakteri süspansiyonuna daldırılması | 2 | Su emmiş lekeler |
| | 3 | Çeliklerde kahverengileşme |
| | 5 | Çeliklerde koyu kahverengi lekelerin genişlemesi |
| | 10 | Çeliklerde yanıklık |
| Meyveye inokulasyon | 2 | Meyvede su emmiş lekeler |
| | 3 | Meyvede kahve-siyah lekeler |
| | 5 | Meyvede siyah lekeler |
| | 6 | Meyvede siyah lekelerin genişlemesi, hafif çukurlaşma |
| | 10 | Meyvede siyah çukur şeklinde lekeler |



Şekil 4.5. İnokulasyondan sonra çiçeklerde oluşan yanıklık



Şekil 4.6. Patojenite testinin yapraklardaki belirtileri



Şekil 4.7. İnokulasyondan sonra meyvelerde oluşan derin siyah çukurlar

İnokulasyon yapılan çiçek, sürgünlerde ve meyvede meydana gelen yanıklık belirtilerinin hastalıklı ve sağlıklı dokuların her ikisinin de bulunduğu bölgelerden örnekler incelemeye alınmış ve tipik hastalık simptome gösteren bitkilerden yapılan re-izolasyonlar sonucu seçilen 41 re-izolat tekrar izole edilmiş ve tanı testlerinde kullanılmıştır.

4.5. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı

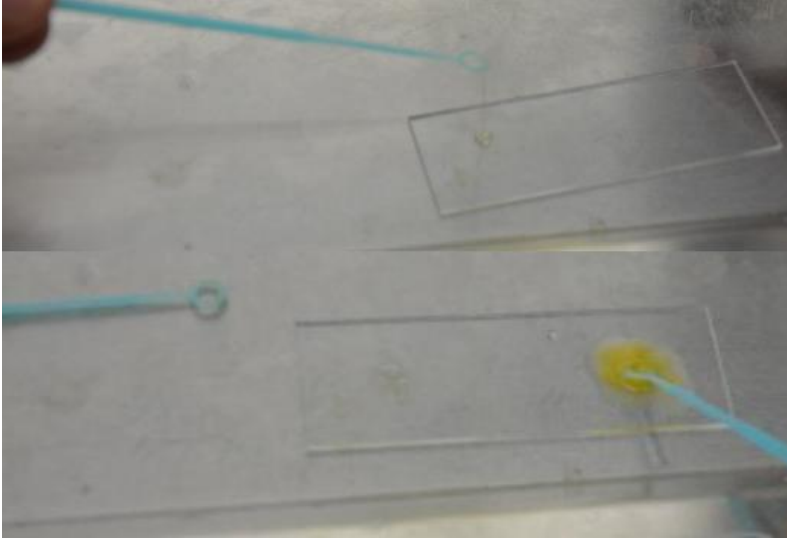
Hastalık belirtisi gösteren kiraz bahçelerinden izole edilen 41 adet bölge izolatu ve bir referans izolat olmak üzere 42 adet re-izolatla yapılan tanı çalışmaları sonucunda tüm izolatların koloni morfolojilerinin benzer olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.5).

King B Besi Yerlerinde Koloni Gelişimi: Elde edilen re-izolatlar King B besi yerinde krem renkli floresan koloni gelişimi göstermiştir (Şekil 4. 8).



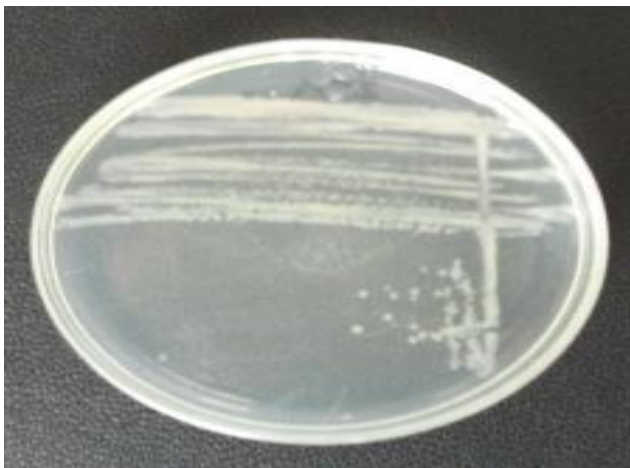
Şekil 4.8. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'nin UV transmilatör altında floresan görüntüsü (sağda)

Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* re-izolatları ve referans izolatla yapılan KOH testi sonucunda özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturmasından dolayı gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.9.). Karşılaştırma kültürü olarak kullanılan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'de ise sümüksü bir yapı gözlenmemiş olmasından dolayı gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9. KOH testi gram negatif (üstte) ve gram pozitif (altta)

Levan Oluşumu: SNA besi yerine çizimi yapılan kiraz re-izolatları ve referans kültürde levan tipi beyaz, mukoid, tümsek şeklinde koloni oluşmuştur (Çizelge 4.5, Şekil 4.10). Pozitif kontrol olarak *Erwinia amylovora* 57 izolatının kolonileri bu besi yerinde inci gibi beyaz ve tümsek şeklinde gelişmiştir.



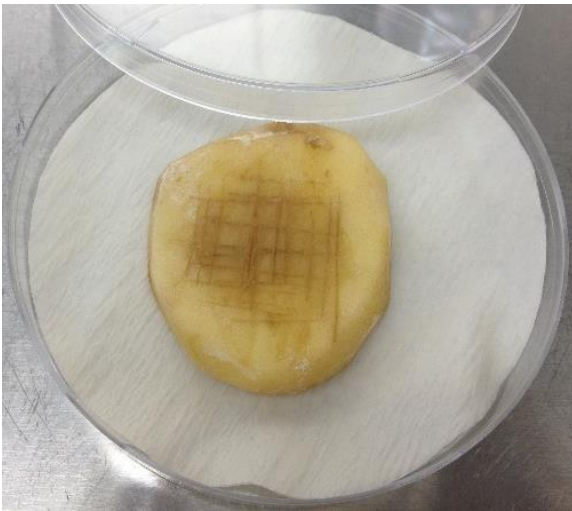
Şekil 4.10. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* nin levan tip koloni gelişimi

Oksidaz Testi: Re-izolatlar ve referans kültür oksidaz test solüsyonu emdirilmiş filtre kağıdına çizilen zigzaglar sonucunda hiçbir renk değişimi meydana getirmediğinden oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.11). Oksidaz pozitif özellikteki *Pseudomonas cichorii* kültürü çalışmada kullanılmıştır ve mor renkte bir değişime neden olmuştur.



Şekil 4.11. Oksidaz testi pozitif reaksiyon (solda), negatif reaksiyon (sağda)

Pektolitik Aktivite Testi: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* re-izolatları ve referans izolatın hiçbiri pektolitik enzim üretmediğinden patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük belirtisi oluşturmamıştır (Çizelge 4.5, Şekil 4.12). İzolatların patatesteki pektolitik aktivite negatif olup, kontrol olarak kullandığımız referans izolat *Pectobacterium caratovororum* çalışmada kullanılmış ve patates dokularında çürümeye neden olmuştur.



Şekil 4.12. *Pseudomonas syringae* izolatının patates dilimlerinde pektolitik aktivite testi

Arginin Dehidrolaz Testi: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* re-izolatları ve referans izolatın ekim yapılan tüplerin üzerine 1 ml mineral yağ ile kapatılmış ve 7-15 gün inkübatörde bekletildikten sonra tüplerde herhangi bir renk değişimi gözlenmemesinden dolayı negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* re- izolatlarının arginin dehidrolaz testi

Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* re- izolatları ve referans izolatın tütün yapraklarının damar aralarında 24 saat sonra su emmiş alanlar ve 48 saat sonra nekroz oluşturduğundan aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas cichorii* izolatı kullanılmıştır (Çizelge 4.5., Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatının tütün yaprak damar aralarında oluşturduğu tipik aşırı duyarlılık reaksiyonu

4.6. GATTa Testi

Jelatin hidrolizi: *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* re- izolatları ve referans izolat tüplere aşılandıktan sonra 20°C’de 7–14 gün inkübasyona bırakılmıştır ve tüplerdeki jelatinin akıcı hale gelmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Jelatin testi pozitif (solda), negatif (sağda)

Esculin hidrolizi: *Pseudomonas syringae* pv.*syringaere*- izolatları ve referans izolat steril besi yerine ekilmiştir. 27-28°C’de 3-4 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra besi yeri kahverengi-siyah renk alanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Esculin hidrolizi pozitif (solda), negatif (sağda)

4. 7. Bakteri İzolatlarının PCR Testiyle Tanısı

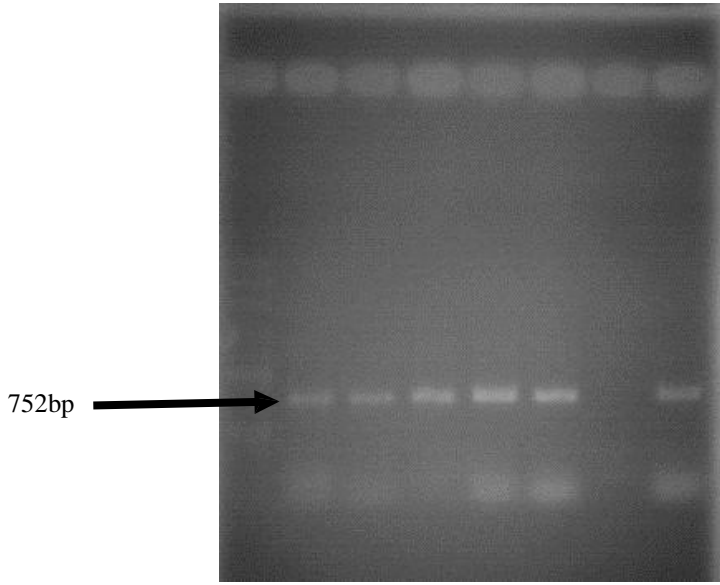
DNA izolasyonu işleminden sonra elde edilen genomik DNA'lar Şekil 4. 17'de görüldüğü gibi %1'lik agaroz jelle verildiğinde oluşan bantlar oluşmasına göre değerlendirilmiştir.



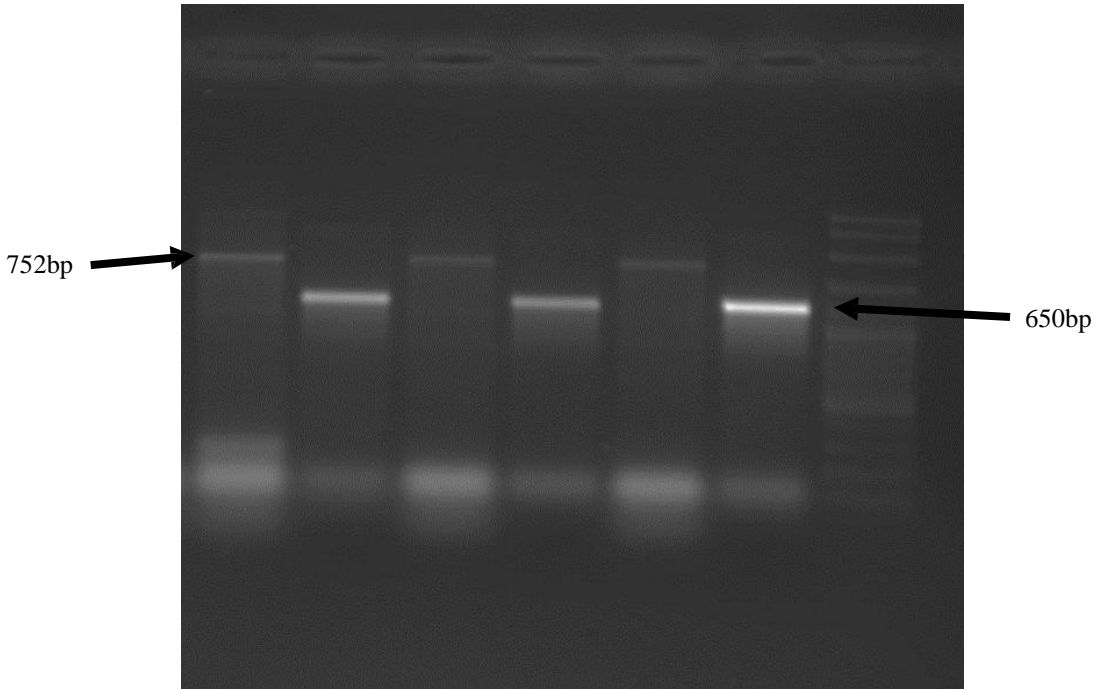
Şekil 4. 17. Re-izolatların DNA izolasyonu sonucu %1'lik agarozda jel bantlarının görünümü

Saflaştırılan genomik DNA'lar ile yapılan B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR testlerinde 18 re-izolatın (Naip1/1, Naip 2/1, Naip3/1, Naip 4/1, Naip5/1, Naip 6/1, Naip7/1, Mermer 1/1, Mermer 2/1, Mermer 3/1, Mermer 4/1, Barboros 1/1, Barboros 2/1, Barboros 3/1, Barboros 4/1, Barboros 5/1, Barboros 6/1, Barboros 7/1) %1.5 agaroz jel üzerinde oluşturdukları 752 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur. Moleküler ağırlık işaretleyicisi olarak kullanılan 100 bp'lik marker PCR ürününün 752 bp büyüklüğünde olduğu Şekil 4. 18'de görülmektedir. B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 18 adet izolatın *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* olduğu belirlenmiştir. CFLF-CFLR primerleri ile yapılan PCR çalışmasında ise re-izolatların 23 adedi (Naip 8/1, Naip 9/1, Naip 10/1, Naip 11/1, Naip 12/1, Naip 13/1, Naip 14/1, Naip 15/1, Naip 16/1, Merkez 1/1, Merkez 2/1, Merkez 3/1, Merkez 4/1, Kumbağ 1/1, Kumbağ 2/1, Kumbağ 3/1, Kumbağ 4/1, Kumbağ 5/1, Karahisarli 1/1, Karahisarli 2/1, Karahisarli 3/1, Çanakçı 1/1, Barboros 8/1) %1.5 agaroz jel üzerinde Şekil4.19'da görüldüğü gibi 650 bp baz uzunluğunda oluşturarak *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanımlanmıştır.

CFLF-CFLR primerleri ile yapılan PCR çalışmasında ise re-izolatların 23 adedi %1.5 agaroz jel üzerinde Şekil 4.19'da görüldüğü gibi 650 bp baz uzunluğunda oluşturarak *Pseudomonas syringae* pv.*morsprunorum* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4. 18. B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR testi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jelde görünümü. Çukur 1: 100 bp DNA marker, Çukur 2: Naip 1/1 , Çukur 3: Naip 7/1, Çukur 4: Mermer 3/1, Çukur 5: Barboros 6/1



Şekil 4. 19. CFLF-CFLR ve B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR testi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jelde görünümü. Çukur 1: 100 bp DNA marker, Çukur 2: Naip 4/1, Çukur 3:Naip 11/1 , Çukur 4:Mermer 4/1 , Çukur 5:Karahisarlı 3/1 , Çukur 6:Barboros 3/1

Çizelge 4.4’de de görüldüğü üzere izolatların tanılama çalışmalarında kullanılan klasik yöntemlerden LOPAT karakterizasyonuna göre izolatların tamamı +,-,-,-,+ özellikler göstererek *Pseudomonas syringae* olduğu ortaya konulmuştur.

Elde edilen re-izolatların tanımlanmasında mutlaka GATTa testinin kullanılması gerektiği bu çalışma ile de ortaya konmuştur. Re-izolatların yapılan GATTa testi sonucunda iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup içerisinde yer alan 23 izolatın GATTa sonuçları -, -, +, + olarak belirlenmiş ve bunların *Pseudomonas syringae* pv.*morsprunorum* olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 23 izolatın ise GATTa sonuçları +, +, -, - olarak saptanmış izolatların *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* olarak tanımlanmıştır. Benzer olarak Ivanovic ve ark (2009), Kaluzna ve ark (2010), Gavriloviç ve ark (2012) ve Ertimurtaş ve ark., (2014) gibi bir çok araştırmacıda izolatlarının tanısında GATTa testinin kullanılmasının uygun olacağını belirtmişler ve elde ettiğimiz sonuçlar bu araştırmacılar çalışmalarını ile paralellik göstermektedir.

Ayrıca elde edilen re-izolatların tanısında moleküler yöntemlerle desteklenmesinin gerektiği birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir. İki farklı primer dizilimleri kullanılarak yapılan PCR çalışmaları sonucunda elde edilen re-izolatların iki farklı tür olduğu saptanmıştır. İzolatların 23 tanesi *cfl* genine göre dizayn edilen primerlere reaksiyon verirken 18 adet izola ise *syrB* genine göre dizayn edilen primerlerle reaksiyon vermiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda elde edilen veriler GATTa testinden elde edilen sonuçlar benzerlik göstermiştir. Şekil 4.17 ‘de de görüldüğü üzere *Cfl* genine göre reaksiyon veren ve 650 bp baz uzunluğunda ürün veren izolatların *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanımlanırken, *syrB* genine reaksiyon veren ve 752bp baz uzunluğunda tekrarlanabilen bantlar oluşturan izolatlar ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar ile Abbasi ve ark (2012) ve Albelleria ve ark (2014) çalışmalarına benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.5. Bakteri izolatlarının test sonuçları

| İzolat Adı | Gram Reaksiyon | Flouresan Pigmentasyon | L | O | P | A | T | G | A | T | Ta | PCR | | Tanı |
|-----------------|----------------|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|------------|-------------|--------|
| | | | | | | | | | | | | <i>Cfl</i> | <i>syrB</i> | Sonucu |
| Naip 1/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Naip 2/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Naip 3/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Naip 4/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Naip 5/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Naip 6/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Naip 7/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Naip 8/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Naip 9/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Naip 10/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Naip 11/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Naip 12/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Naip 13/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Naip 14/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Naip 15/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Naip 16/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Mermer 1/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Mermer 2/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Mermer 3/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Mermer 4/1 | - | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Merkez 1/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Merkez 2/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Merkez 3/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Merkez 4/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Kumbağ 1/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Kumbağ 2/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Kumbağ 3/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Kumbağ 4/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Kumbağ 5/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Karahisarlı 1/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Karahisarlı 2/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Karahisarlı 3/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Çanakçı 1/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |
| Barbaros 1/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Barbaros 2/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Barbaros 3/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Barbaros 4/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Barbaros 5/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Barbaros 6/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Barbaros 7/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Barbaros 8/1 | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | Psm |

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

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında Tekirdağ ilinde kiraz üretimin yapıldığı Naip, Merkez, Kunbağ, Karahisarlı, Çanakçı, Barbaros yörelerinde 25 adet kiraz alanı ziyaret edilmiş ve 129 adet ağaçtan hastalık şüphesiyle örnek toplanmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen 387 adet bakteri izolatının elde edilmiştir.

Tekirdağ ili kiraz bahçelerinde yapılan surveyler sonucunda bakteriyel kanser hastalığının bahçelerde yaygınlığı % 100, hastalık bulunma oranı ise % 17.4- 57.1, hastalık şiddeti ise %28.5-50.7 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir.

Elde edilen izolatların patojenitesi, LOPAT ve GATTa testleri, karbon kaynaklarından asit oluşumu gibi klasik testlerle tanısı yapılarak bakteri izolatlarının *Pseudomonas syringae* olduğu tanılanmıştır.

İzolatların pathovar düzeyinde tanısında *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'a spesifik olan *syrB* ve *cfl* genlerine göre dizayn edilen primerler (B1, B2, CFLF, CFLR) ile tanıları desteklemiştir. Yapılan tanı çalışmaları sonucunda. Patojenin PCR ile tanılanmasında *syrB* ve *cfl* genleri kullanılarak 41 izolatın 18 tanesi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 23 tanesi ise *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak belirlemiştir.

Tekirdağ ilinde kiraz dal yanıklığına neden olan hastalık etmeni olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* bilinmesine karşın yapılan bu çalışma sonucunda hastalık etmeni olarak *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'un *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'den daha yaygın olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca bu yüksek lisans tezi Tekirdağ ilinde kiraz dal yanıklığı hastalığıyla ilgili olarak yapılan ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Sonuç olarak Tekirdağ bölgesinde kiraz üretim alanlarında hastalıklı ağaçlar yok edilerek inokulum kaynakları ortadan kaldırılmalıdır. Yeni bahçe tesisi yapılacağı zaman yer seçimi esnasında hastalığın bulunma bölgeleri göz önüne alınarak tercih edilmelidir. Çevredeki inokulum kaynakları yok edilmeden yeni bahçe tesisine gidilmemelidir.

6. KAYNAKLAR

- Abbasi V, Rahminian H, Ghanbari M A T (2012). Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* causing bacterial canker disease on stone fruits. *Eur J Plant Pathol*, 135: 225-235.
- Abbasi V, Rahimian H and Tajick-Ghanbari M A (2013). Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. *European journal of plant pathology*, 135: 225-235.
- Abelleira A, Ares A, Augin O, Picoaga A, Lopez M M, Mansilla P (2014). Current situation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae* on kiwifruit in Galicia (northwest Spain). *Plant Pathology*, 691-699.
- Agrios G N (2005). Bacterial cankers. *Plant Pathology*, 667-671.
- Allen W R, Drks V A (1978). Bacterial canker of sweet cherry in the niagara peninsula of ontario *pseudomonas* pss involved and cultivar susceptibilities. *Canadian Journal of Plant Science*, 58(2): 363-370.
- Anonim (2008). Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel yanıklık hastalığı. *Zirai Mücadele Teknik Talimatları*, Ankara, Cilt 4, 66-68.
- Anonim (2014). www.faostat.fao.org. Dünya kiraz üretimi. 23\07\2014.
- Arsenijevic M (1997). Bakterioze biljaka. S-print, Novi Sad.
- Bereswill S, Pahl A, Bellemann P, Zeller W, Geider K (1992). Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:3522-3526.
- Bradbury J F (1986). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* . In guide to plant pathogenic bacteria, CAB International Mycological Institute, 175-177.
- Bultreys A, Gheysen I (2004). Diversity among *Pseudomonas syringae* strains from Belgian orchards. *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Biology and genetics. Kluwer Academic Publishers, 69-78.
- Bultreys A, Kaluzna M (2010). Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, 92(1): 21-33.
- Burak M (2003). Meyvecilik-1, 147-151.
- Burkowicz A, Rudolph K (1994). Evaluation of pathogenicity and of cultural and biochemical tests for identification of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *morsprunorum* and *persicae* from fruit trees. *J. Phytopathology*, 141: 59-76.
- Chandler W A, Daniell J W (1976). Relation of pruning time and inoculation with *Pseudomonas syringae* van Hall to short life of peach trees growing on old peach land. *HortScience*, 11: 103-104.
- Crosse J E. (1956). Bacterial canker of stone-fruits. II. Leaf scar infection of cherry. *J. Hortic. Sci.*, 31: 212-224.
- Crosse J E (1957). Bacterial canker on stone fruits. III. Inoculum concentration and time of inoculation in relation to leaf scar infection of cherry. *Ann. Appl. Biol.*, 45: 19-35.
- Crosse J E (1959). Bacterial canker on stone fruits. IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Ann. Appl. Biol.*, 47: 306-317.
- Crosse J E (1966). Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 14: 291-310.

- De Boer S H, Ward L J (1995). PCR detection of *Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, 85:854-858.
- Dönmez M F, Karlıdağ H, Eskiten A (2010). Identification of resistance to bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) disease on apricot genotypes grown in Turkey. *Eur J Plant Pathol*, 126: 241-247.
- Endert E, Ritchie D F (1984). Detection of pathogenicity, measurement of virulence, and determination of strain variation in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Dis.*, 68: 677-802.
- Ertimurtaş D, Özaktan H (2014). Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel kansere neden olan *Pseudomonas syringae* pathovarlarının tanısı. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, Antalya.
- Gardan L, Shafik H L, Grimont P A D (1997). DNA relatedness among pathovars of *P. syringae* and related bacteria. In *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. eds Rudolph K, Burr T J, Mansfield J W, Stead D, Vivian A, von Kietzell J (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands), 445–448.
- Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont P A D (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 469-478.
- Garrett C M E, Panagopoulos C G, Crosse J E (1966). Comparison of the plant pathogenic *Pseudomonads* from fruit trees. *J. Appl. Bacteriol*, 29: 342-356.
- Gasic K, Prokic A, Ivanovic M, Kuzmanovic N, Obradovic A (2012). Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pestic. Phytomed*, 27(3): 201-229.
- Gavrilovic V (2006). Patogene i biohemijsko fizioloske karakteristike bakterija roda *Pseudomonas* parazita vocaka. *Zastita bilja*, 255-258: 5-55.
- Gavrilovic V (2009). *Pseudomonas syringae* – patogen vocaka u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 24: 153-163.
- Gavrilovic V, Zivkovic S, Trkulja N I, Ivanovic M (2008). Karakteristike sojeva bakterija roda *Pseudomonas* izolovanih iz obolelih grana sljive. *Pesticidi i fitomedicina*, 23: 25-31.
- Gavrilovic V, Zivkovic S, Dolovac N, Trkulja N, Dolovac E P, Popovic T, Ivanovic D (2012). *Pseudomonas syringae*-pathogen of sweet cherry in Serbia. *Pestic. Phytomed*, 27(2): 141-149.
- Gerçekçioğlu R, Bilginer Ş, Soylu A (2006). Genel meyvecilik (Meyve yetiştiriciliği esasları kitabı).
- Gilbert V, Legros F, Maraite H, Bultreys A (2009). Genetic analysis of *Pseudomonas syringae* from Belgian fruit orchards reveal genetic variability and isolate-host relationships within the pathovar *syringae*, and help identify both races of the pathovar *morsprunorum*. *Eur J Plant Pathol*, 124: 199-218.
- Gonzalez C F, Ackerley D F, Park C H, MATIN A (2003). A soluble flavoprotein contributes to chromate reduction and tolerance by *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnol.*, 2(3): 233-239.
- Görmez A (2011). Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit rekasyonları. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Haghighi N P G, Taghavi S M (2014). Discrimination of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates from different hosts in Iran using pathogenicity tests and RAPD. *International Journal of AgriScience*, 4(1): 16-27.
- Hattingh M J, Roos I M M, Mansvelt E L (1989). Infection and systemic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. *Plant Dis.*, 73: 784-789.
- Hattingh M J and Roos I M M (2005). Bacterial canker. In: Compendium of Stone Fruit Diseases (Ogawa J M, El Zehr G W, Bird D F, Ritchie K, J Uriu J., Uyemoto K, eds), APS Press, St Paul, USA.
- Hirano S S, Upper C D (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64 (3): 624-653.
- Ivanovic Z, Zivkovic S, Starovic M, Josic D, Stankovic S, Gavrilovic V (2009). Diversity among *Pseudomonas syringae* strains originating from fruit trees in Serbia. *Arch. Biol. Sci.*, 61(4): 863-870.
- Ivanovic Z, Stankovic S, Zivkovic S, Gavrilovic V, Kojic M, Fira D (2012). Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* isolates from fruit trees and raspberry in Serbia. *Eur J Plant Pathol*, 134: 191-203.
- Janse J D (1981). The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. II. Etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology*, 11: 425-38.
- Janse J D (2006). *Phytopathology. Principles and Practice*. Wallingford, UK and Oxford Press, New York, 208-209.
- Jones A L and Sutton T B (1996). Diseases of tree fruits in the East. Northcentral Regional Bulletin 45, Michigan State University.
- Jones A L, Sutton T B (2006). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. West Virginia University, 1-3.
- Kaluzna M, Ferrante P, Sobiczewski P, Scortichini M (2010). Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology*, 92(3): 781-787.
- Kaluzna M, Janse J D, Young J M (2012). Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of cost 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology*, 94(1): 117-126.
- Kavak H, Çıtır A (1995). Malatya ili merkez ilçede kayısılarda görülen hastalıkların tanıları ve yaygınlık oranları üzerine araştırmalar. 7. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 531-534, Adana.
- Kennely M M, Cazorla F M, Vicente A, Ramos C, Sundin G W (2007). *Pseudomonas syringae* disease on fruit trees. *Plant Disease*, 91(1).
- Kerstens K, Ludwig M, Vancanneyt P De Vos, Gillis M, Schlefer K H (1996). Recent changes in classification of pseudomonads. *Syst. Appl. Microbiol.*, 19: 465-477.
- Klement Z, and Goodman R N (1967). The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 17-44.
- Klement Z, Rozsnyay D S, Balo E, Prileszky G (1984). The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiol. Plant Pathol.*, 24: 237-246.
- Klement Z, Rudolph K, Sands D C (1990). *Methods in Phytopathology*, Akademia Kiado, Budapest, XIV+568p.

- Kotan R, Şahin F (2002). First record of bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, on apricot trees in Turkey. *New Disease Reports*, 5: 5.
- Kovacs N (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, London, 170-173.
- Lattore B A, Jones A L (1979) . *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology*, 69: 335-339.
- Lelliott R A, Billing E, Hayward A C (1966). A determinative cheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29: 470–489.
- Lelliott R A, Stead D E, (1987). *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Menard M, Sutra L, Prunier J P, Luisetti J, gardan L (2003). *Pseudomonas sayringae* pv. *avii* (pv. Nov.) the casual agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109: 565-576.
- Mirik M, Baloğlu S, Aysan Y, Çetinkaya Yıldız R, Küsek M and Şahin F (2005). First outbreak and occurrence of citrus blast disease, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on orange and mandarin trees in Turkey. *Plant Pathology*, 54 (2): 238.
- Ogawa J W, English H (1991). Disease of temperature zone tree fruit and nut crops. Publ. 3345. University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, 461.
- Ogawa J M, Zehr E L, Bird G W, Ritchie D F, Uriu K and Uyemoto J K (1995). Compendium of stone fruit diseases, 78-87.
- Otta J D, English W H (1970). Epidemiology of the bacterial canker disease of French prune. *Plant Dis. Rep.*, 54: 332-336.
- Renick L J, Cogal A G, Sundin G W (2008). Phenotypic and genetic analysis of epiphytic *Pseudomonas syringae* populations from sweet cherry in Michigan. *Plant Disease*, 92: 372-378.
- Ross I M M, Hattingh M J (1986). Pathogenic *Pseudomonas* spp. in stone fruit buds. *Phytophylactica*, 18: 7-9.
- Ross I M M, Hattingh M J (1987). Pathogenicity and numerical analysis of phenotypic features of *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit trees. *Eur J Plant Pathol.*, 126: 263-277.
- Sambrook, J, Fritsch E F and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p.
- Sands D C (1990). Physiological criteria-determinative tests. *Methods in phytobacteriology*, 133–143.
- Saygılı H, Şahin F, Aysan Y (2008). Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel yanıklık hastalığı. *Bitki Bakteri Hastalıkları Kitabı*, 101-103.
- Schaad N W, Jones J B. and Chun W (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN., USA.
- Schaad N W, Jones J B, Chun W. *Gram negative bacteria. Plant Pathogenic Bacteria* , 84.
- Scortichini M, Marchesi M, Dettori M T, Rossi M P (2003). Genetic diversty, presence of the *syr B* gene, host prefence and aggressivenness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plants. *Plant Pathology*, 52: 277-286.

- Scortichini M (2010). Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. *Journal of Plant Pathology*, 92(1): 73-78.
- Sobiczewski P, Jones A L (1992). Effect of exposure to freezing temperatures on necrosis in sweet cherry shoots inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* or *P. s. morsprunorum*. *Plant Dis.*, 76: 447-451.
- Sulikowska M, Sobiczewski P (2008). *Pseudomonas* spp. Isolated from Stone fruit trees in Poland. *Zemdirbyste-Agriculture*, 95 (3): 166–170.
- Sundin G W, Olson B D, Jones A L (1988). Overwintering and population Dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on sweet and sour cherry trees. *Can. J. Plant Pathol.*, 10: 281-288.
- Süle S, Seemüller E (1987). The role of ice formation in the infection of sour cherry leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology*, 77: 173-177.
- TÜİK 2013. www.tuik.gov.tr. Türkiye’ de kiraz ağaç sayısı ve üretim miktarı. 23\07\2014.
- Vicente J G, Roberts S J (2007). Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolated from sweet and wild cherry using rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 117: 383-392.
- Vicente J G, Roberts S J, Russell K, Alves J P (2004). Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. *Eur. J. Plant Pathol.*, 110: 337–351.
- Vigouroux A and Busse C (1999). Indirect influence of pruning on bacterial canker of the apricot tree the probable involvement of tree water content in winter. *Acta Hort. (ISHS)*, 488:715-718.
- Weaver D J (1978). Interaction of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. *Phytopathology*, 68. 1460-1463.
- Widmer F, Ramon J S, Patrick M G, Lidia S W, George D Di Giovanni (1998). A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (*Sensu stricto*) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(7): 2545.
- Young J M (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92(1): 5-14.

7. TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana ‘Tekirdağ’da Kiraz Dal Kanseri Hastalığına Neden Olan Bakteriyel Etmenlerin İzolasyonu, Tanisi ve Yaygınlığı’ konulu Yüksek Lisans Tezini veren danışman hocam Sayın Doç.Dr. Mustafa MİRİK’ e teşekkür ediyorum.

Yüksek Lisans Tez Jüri üyelerinden Sayın Prof.Dr. Yeşim AYSAN ve Sayın Prof.Dr. Soner SOYLU’ya yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda buldukları için sonsuz teşekkürler.

Labaratuvar çalışmalarım sırasında emeği geçen sevgili hocalarım Prof.Dr. Ahmet ÇITIR ve Prof.Dr. Havva İLBAĞI’na, çok değerli arkadaşlarım Araş.Gör. Cansu Öksel’e ve Zir.Yük.Müh. Harun Özdemir’ e çok teşekkür ederim.

Manevi desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiğim ve benim için sonsuz motivasyon kaynağı olan sevgili aileme sonsuz teşekkürler...

8.ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Gölcük'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gölcük'te tamamladı. 2005 yılında başladığı Trakya Üniversitesi Sosyal Bilimler Meslek Yüksekokulu Seramik Bölümü'nden 2007 yılında mezun oldu.2007 yılında başladığı Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği Programı'ndan 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans'a başladı. 2012 yılında Türkiye Tarım Kredi Kooperatifleri Tekirdağ Bölge Birliğine bağlı olan 1688 Sayılı Ulaş Tarım Kredi Kooperatifinde Ziraat Mühendisi olarak göreve başladı. Halen aynı kuruluşta Ziraat Mühendisi olarak görevine devam etmektedir.