

Araştırma Makalesi

Hatay İli Zeytin Üretim Alanlarında Zeytin Dal Kanseri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) Hastalığının Belirlenmesi

Senem FİLİZ DOKSÖZ¹, İ. Adem BOZKURT^{2*}

¹Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Hatay

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Hatay

*Sorumlu yazar: iabozkurt@mku.edu.tr

Geliş Tarihi: 26.09.2019

Düzeltilme Geliş Tarihi: 15.11.2019

Kabul Tarihi: 18.11.2019

Özet

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (Psv)'nin neden olduğu zeytin dal kanseri hastalığı Hatay ili zeytin üretim alanlarındaki en önemli problemlerden birisidir. Hastalık yoğun enfeksiyonlarda özellikle genç fidanların tamamen kurummasına neden olmaktadır. Bu çalışma ile Hatay bölgesi zeytin üretim alanlarında zeytin dal kanseri hastalığının yaygınlık ve bulunma oranları belirlenmiştir. Hastalığın en yüksek yaygınlık oranı %90 ile Samandağ, İskenderun ve Arsuz ilçelerinde belirlenmiş olup, Hassa, Kırıkhan, Reyhanlı ve Kumlu ilçelerinde ise hastalık saptanmamıştır. Diğer ilçelerde ise hastalığın %15 ile %50 arasında yaygınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Hastalığın enfekteli bahçelerdeki bulunma oranları ise %4.5-75 arasında değişiklik göstermiştir. Taze urlardan izole edilen hastalık etmeninin tanısı Gram boyama, LOPAT (Levan oluşumu, Oksidaz, Patates yumuşak çürüklük testi, Arginin dehidrolaz, Tütün aşırı duyarlılık) testleri, MALDI-TOF ve moleküler yöntemler ile yapılmıştır. Yapılan testler sonucu toplam 14 izolat *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* olarak tanılanmıştır. Patojenisite testlerinde tüm izolatlar ve Ayvalık1 referans izolatu 1 yıllık Gemlik zeytin fidanlarında hastalığın tipik belirtisi olan urlara neden olmuştur.

Anahtar kelimeler: Zeytin dal kanseri, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, zeytin, MALDI-TOF, PCR.

Determination of Olive Knot Disease (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) in Olive Production Areas of Hatay Province

Abstract

Olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) is one of the most important problems in olive production areas of Hatay province. The disease causes full drying of young seedlings in intensive infections. The aim of this study was to determine the prevalence and incidence of olive knot disease in Hatay province. The highest prevalence rate of the disease was determined in Samandağ, İskenderun and Arsuz districts with 90% and no disease was detected in Hassa, Kırıkhan, Reyhanlı and Kumlu districts. In other districts, the prevalence of the disease was found to be between 15% and 50%. The incidence of the disease in infected gardens varied between 4.5-75%. The pathogenic bacteria isolated from fresh knots was identified by Gram stain, LOPAT (Levan, Oxidase, Potato pectolytic activity, Arginine dehydrolase, Tobacco hypersensitive reaction), MALDI-TOF and molecular techniques. All strains were determined as gram negative, levan negative, oxidase negative, pectolytic activity negative, arginine dehydrolase negative, but tobacco hypersensitivity reaction was positive. According to the test results, a total of 14 isolates were identified as *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*. Pathogenicity tests were performed with 14 strains and a reference strain (Ayvalık1). All isolates caused knot formation on one-year-old olive seedling (cv. Gemlik).

Key words: Olive knot, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, olive, MALDI-TOF, PCR.

Giriş

Özellikle Akdeniz ülkelerinde yoğun şekilde yetiştiriciliği yapılan zeytinin anavatanı Güney ön Asya olup Hehn, (2000) bu bölgenin günümüzde Doğu Akdeniz ile ülkemiz sınırları içerisinde yer alan Hatay, Kahramanmaraş ve Gaziantep olduğu bildirilmektedir (Dara, 2010, Kaplan ve Arıhan, 2012). Dünya zeytin üretimi 2017 yılı verilerine göre 20873000 ton olup Türkiye 2100000 ton ile İspanya, Yunanistan ve İtalya'dan sonra 4. sırada yer almaktadır (FAOSTAT, 2018). Hatay ili ise 537711 da alanda 91000 ton zeytin üretimi ile ülkemiz zeytin üretiminde önemli bir yere sahiptir (TÜİK, 2018). Gerek zeytinyağı olarak gerekse sofralık olarak tüketilen zeytin üretimini ve kalitesini olumsuz etkileyen birçok biyotik ve abiyotik faktörler bulunmaktadır. Biyotik faktörler içerisinde *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* (Smith 1908)'nin neden olduğu zeytin dal kanseri önemli bir bakteriyel hastalıktır (Janse 1981). Patojen zeytin dışında Yasemin (*Jasminium officinale* L.), Ligistrum (*Ligustrum vulgare*), Akçakesme (*Phillyrea* spp), Brezilya yasemini (*Mandevilla sander*), Forzitya (*Forsythia* spp), Murt çalısı (*Myrtle* sp.), Dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.), Cılbırtı (*Fontenesia* sp.), Zakkum (*Nerium oleander* L.) ve Nar (*Punica granatum*) gibi bitkilerde de hastalık oluşturabilmektedir (Janse, 1981, Bradbury, 1986, Etlbany ve ark., 2012, Mirik ve ark., 2011, Bozkurt ve ark., 2014). Ülkemizde hastalığın varlığı ilk olarak Ege bölgesinde Azeri (1993) tarafından bildirilmiş olup, sonraki yıllarda Aydın ve Muğla illerinde, Batı Akdeniz, Doğu Akdeniz, Marmara ve Karadeniz bölgesinde hastalığın tespit edildiği birçok çalışma bulunmaktadır (Basım ve Ersoy, 2000, Mirik ve ark., 2004, Tatlı ve Benlioğlu, 2004, Mirik ve Aysan, 2011). Patojen genel olarak zeytinlerin gövde ve dallarında belirti oluşturmakla beraber bitkinin kök boğazında, yaprak ve meyve üzerinde de ur oluşturabilmektedir. Ur ve siğiller enfeksiyonun ilk dönemlerinde yeşil renkli, üzeri düz ve sünger gibi yumuşak olup ilerleyen dönemlerde urların üzeri pürüzleşmekte ve odunlaşarak siyah renge dönüşmektedir. Hastalık özellikle genç bitkilerde ve yoğun enfeksiyonlarda bitkinin tamamen kurumasına neden olurken, yaşlı bitkilerde hastalık şiddetine bağlı olarak bitki gelişiminde gerileme ve verim kaybına neden olmaktadır (Mirik ve ark., 2019).

Ur oluşumunda bakteri tarafından üretilen ve bitki hormonu olan indol-3 asetik asit (IAA) önemli rol oynamaktadır. Bakteri tarafından IAA üretimi sonucu enfekteli alanlardaki bitki hücreleri aşırı çoğalarak büyümekte ve tipik ur veya siğil belirtilerinin meydana gelmesine neden olmaktadır (Iacobellis ve ark., 1998). Yaprak, dallar ve gövde üzerinde epifitik olarak yaşamını

sürdürebilen hastalık etmeni özellikle sıcak ve bol yağışlı dönemlerde yüksek popülasyonlara ulaşmaktadır (Qesada ve ark., 2007, Ponce ve ark., 2017). Bitkilere hasat sırasında oluşan yaralar, dolu yaraları, don çatlakları, budama sonucu oluşan yaralar, yaprakların dökülmesi ile oluşan yaralar, rüzgar sonucu dalların birbirine sürtünmesi ile oluşan yaralar ve böcek zararı sonucu oluşan yaralardan giriş yaparak hastalık oluşturmaktadır (Mirik ve ark., 2019).

Bu çalışma ile Hatay ili ve ilçelerinde zeytin dal kanseri hastalığının yaygınlık ve bulunma oranları saptanarak hastalığın özellikle son 20 yıl içerisinde zeytin alanlarının artmasına paralel olarak bölgedeki durumu hakkında güncel bilgiler elde edilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Survey çalışmaları

Survey çalışmalarında örnekleme Tarım Bakanlığı tarafından bildirilen survey talimatına göre yapılmıştır (Anonim 2017). Survey sonuçlarının sağlıklı olabilmesi için bölgeyi temsil edecek kadar bahçe incelenerek hastalığın yaygınlık oranı, her bahçenin köşegenleri doğrultusunda tesadüfî olarak ağaç sayısının en az %10'u incelenerek ise hastalığın bulunma oranları belirlenmiştir.

Enfekteli bitkilerden patojen izolasyonu

Patojen izolasyonunda 3 farklı yöntem uygulanmıştır.

İlk yöntemde, arazi koşullarında urlu örnekler %70'lik etil alkol ile steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası urlu kısmın dış yüzeyi uzaklaştırılmış ve aseptik olarak iç kısımlardan 1-2 mm'lik hastalıklı doku parçaları alınmıştır. Alınan doku parçaları 3 ml nutrient broth içeren cam tüplere konulmuş ve arazi çalışması boyunca tüpler buz kutusunda muhafaza edilmiştir (Mirik ve Aysan, 2011). Sörvey sonrası laboratuvara getirilen tüplerdeki süspansiyondan steril öze ile alınarak KB besi ortamı içeren besi yerine çizilmiştir. İkinci yöntemde ise yüzey sterilizasyonu yapılan ve steril bistüri ile dış kısmı uzaklaştırılan örneklerden alınan doku parçaları doğrudan KB besi yeri içeren steril petrilere çizilmiş ve petrilere kenarları parafilm ile kapatılmıştır. Üçüncü yöntemde ise laboratuvara getirilen taze urlar yüzey sterilizasyonu sonrası içerisinde steril saf su bulunan havan içerisinde ezilmiştir. Oluşan süspansiyondan öze dolusu alınarak KB besi yerine çizim yapılmıştır. Besi yerleri 24-26 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısı

Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısı Lelliot ve Stead (1987)

ile Schaad ve ark., (2001)'na göre geleneksel yöntemlerle yapılmıştır. Bu yöntemler içerisinde bakteri izolatlarının floresan pigment oluşumları, KOH (potasyum hidroksit) testi ile gram reaksiyonlarının belirlenmesi ve LOPAT testleri ile levan oluşumu, oksidaz testi, patates dilimlerinde pektolitik aktivitenin belirlenmesi, arginin dehidrolaz ve tütünde aşırı duyarlılık tepkimesi gibi özellikleri incelenmiştir.

Urlardan izole edilerek saflaştırılan izolatların Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight MassSpectrometry (MALDI-TOF) yöntemiyle tanısı

Tanısı yapılacak olan bakteri izolatları nutrient agar (NA) besi yerinde 27 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Besi yerinde gelişen bakteri kolonisinden steril bir kürdan ile alınarak doğrudan metal plaka üzerindeki kuyucuklara sürme işlemi ile izolatlar eklenmiş oda sıcaklığında 1-2 dk. kuruması beklenmiştir. Kuruma işlemi sonrası örneklerin üzerine 1µl formik asit (%70) eklenip kurutulmuş ve daha sonra üzerine 1µl matriks solüsyonu eklenerek tekrar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra metal plaka MALDI-TOF cihazına yerleştirilerek tanısı yapılmıştır (Pavlovic ve ark., 2012).

Bakteri izolatlarının moleküler tanısı

Tanısı yapılacak olan bakteri izolatlarından genomic DNA'ları GenJET Genomic DNA Purification (ThermoScientific) kiti ile izole edilerek saflaştırılmış ve PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

PCR çalışmaları için Psv'ye spesifik PsvF (5'-GGCGATGTTCTCAGCGGATTTG-3'), PsvR (5'-GATCAAGTGCCAAGGAAGTGAAGG-3') (Tegli ve ark., 2010) ve IAALF (5'-GGCACCAGCGCAACATCAA-3'), IAALR (5'-CGCCCTCGCAACTGC CATAC-3') (Penyalver ve ark., 2000) primerleri kullanılmıştır.

PCR aşamasında PsvF ve PsvR primerleri ile DNA amplifikasyonu Tegli ve ark. (2010), IAALF ve IAALR primerleri ile DNA amplifikasyonu ise Penyalver ve ark. (2000)'e göre yapılmıştır. PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1' lik Agaroz Jel Elektroferez işlemi yapılmıştır. Jel üzerindeki kuyucuklara yüklenen PCR ürünleri 150V elektrik akımında 50 dakika yürütülmüştür. Elektroferez işlemi sonrası jel 100 ml Ethidium Bromid (0.5 µg/ml) içerisinde 5-6 dakika bekletilerek bantların UV ışık altında görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Jel üzerinde oluşan bantlar jel görüntüleme cihazı ile fotoğraflanmıştır.

Patojenisite testleri

Patojenisite testlerinde, Hatay Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen 1

yıllık Gemlik çeşidi fidanlar kullanılmıştır. Fidanlar üzerine steril bistüri ile V şeklinde açılan yaralara 10 µl (10⁸ hücre/ml) bakteri süspansiyonu inokule edilmiştir ve inokulasyon noktaları parafilm ile kaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak Psv Ayvalık1 izolatı kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise açılan yaralara 10 µl steril saf su inokule edilmiştir. Her izolat için 3 bitki kullanılmış olup deneme 3 kez yinelenmiştir. Değerlendirmeler inokulasyondan 60 gün sonra yapılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

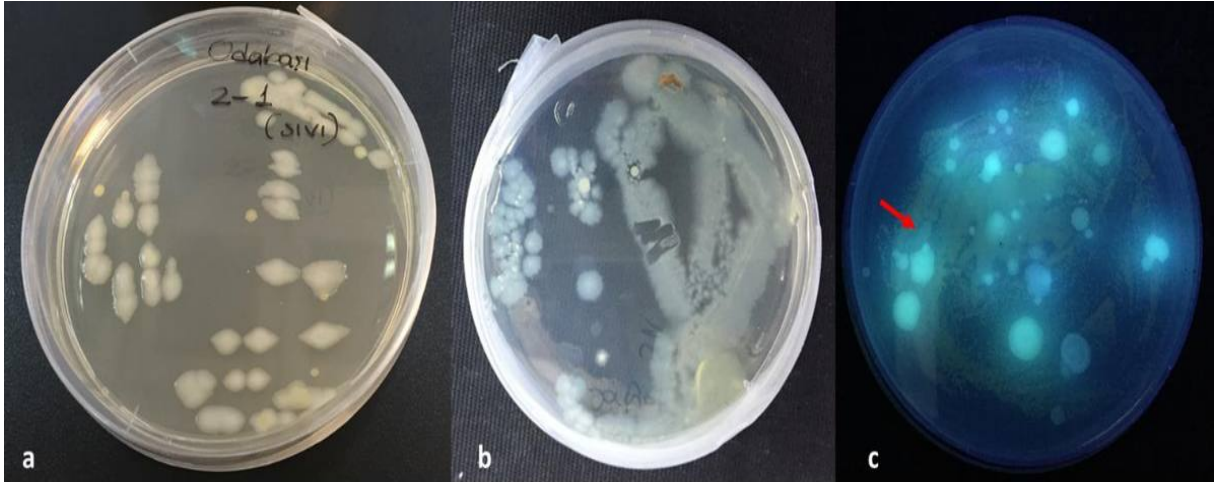
Survey ve izolasyon çalışmaları

Survey çalışmaları 2018 yılı nisan mayıs aylarında yapılmış olup toplam 447 zeytin bahçesi incelenmiştir ve 150 bahçede hastalık saptanmıştır. Hastalığın en yüksek yaygınlık oranı % 90 ile Samandağ, İskenderun ve Arsuz ilçelerinde belirlenmiş olup, Hassa, Kırıkhan, Reyhanlı ve Kumlu ilçelerinde ise hastalık saptanmamıştır. Diğer ilçelerde ise hastalığın %50 ile %15 arasında yaygınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Hastalığın enfekteli bahçelerdeki bulunma oranı incelendiğinde ise ilk sırayı Arsuz (%75) ilçesi alırken bunu sırası ile Samandağ (%68) ve İskenderun (%67,5) ilçeleri izlemektedir. Survey sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, Hatay ili zeytin üretim alanlarında zeytin dal kanseri hastalığının yüksek düzeyde yaygınlık gösterdiği saptanmış olup her üç bahçeden birinde hastalık tespit edilmiştir. Zeytin dal kanseri, zeytin üretimini olumsuz etkileyen hastalıkların başında gelmekte olup yoğun enfeksiyonlarda önemli ürün kayıplarına neden olabilmektedir. Ülkemizde zeytin üretimi yapılan birçok bölgede hastalık rapor edilmiş olup Karaca (1941) özellikle Ege ve Akdeniz bölgelerinde hastalığın daha yoğun enfeksiyonlara neden olduğunu bildirmiştir. Servi (2009), Aydın ili ve ilçelerinde yapmış olduğu çalışmada elde etmiş olduğu verilere göre, zeytin dal kanseri hastalığının il genelinde %44.9 oranında yaygınlık gösterdiğini bildirmiştir. Hatay ilinde ise bu oran yapmış olduğumuz çalışma kapsamında biraz daha düşük olup %35 olarak saptanmıştır. Sivri (2012) tarafından Gaziantep, Kahramanmaraş ve Kilis illerinde yapılan bir çalışmada ise zeytin dal kanseri hastalığının Gaziantep'in bazı ilçelerinde %100, Kilis'te %80 Kahramanmaraş'ta ise %85 oranlarında yaygınlık gösterdiği belirlenmiştir. Marmara bölgesinde ise hastalığın, Çanakkale'de %100, Balıkesir'de %81, Tekirdağ'da %66, Bursa'da %4 oranlarında yaygınlık gösterdiği saptanırken, Yalova'da zeytin dal kanseri hastalığı saptanmamıştır (Mirik ve Aysan, 2011).

Survey çalışmaları kapsamında enfekteli bitkilerden yapılan izolasyon çalışmalarında 3 farklı yöntem denenmiştir. Yüze sterilizasyonu sonrası,

urlu dokudan alınan doku parçalarının doğrudan besi yerine ekildiği ve steril sıvı besi yeri içeren tüplere aktarılan urlardan yapılan izolasyon yöntemlerinde, inkübasyon sonrası daha saf koloniler elde edilmiştir (Şekil 1 a, b). Steril havan içerisinde ezme yöntemi ile yapılan izolasyonlarda ise inkübasyon sonrası besi yerinde kısa sürede sarı koloniler oluşturan *Pantoea agglomerans* bakterisi gelişmiştir. Bu bakterinin kısa sürede gelişmesi Mirik ve Aysan (2011) tarafından da bildirildiği üzere patojen bakterinin saflaştırılmasını zorlaştırmıştır (Şekil 1c). Araştırmacıların geliştirmiş olduğu bir yöntem olan süspansiyonun petrilere yayılmasını takiben petrilere 25 °C'de 24 saat inkübasyonu ve daha sonrasında 2 gün buzdolabında bekletilmesi ile patojen bakterilerin saf olarak elde edilebileceğini bildirmişlerdir (Mirik ve Aysan 2011). Epifitik bir bakteri olan *Pantoea agglomerans*'ın zeytin ve zakkum üzerinde *Psv*'nin neden olduğu urlar

içerisinde kolonize olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Surico ve Lavermicocca, 1989; Azad ve Cooksey, 1995; Fernandes ve Marcelo, 2002). Marchi ve ark. (2006) zeytin dal kanseri etmeni ile ilgili yapmış oldukları çalışma da izolasyon sonrası nutrient sukroz agar (SNA) üzerinde sık sık sarı renkli koloniler geliştiğini ve bu kolonilerin yoğun olduğu durumlarda *Psv* kolonilerinin saflaştırılmasının çok zor olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı aynı bakterinin Savastano (1886) ve Peglion (1905) tarafından zeytin ve zakkumlarda oluşan urlar içerisinde *Psv* ile birlikte bulunduğunu saptadıklarını ve bu nedenle o dönemlerde *Pantoea agglomerans*'ın (*Ascobacterium luteum*= *Bacterium (Erwinia) herbicola*) zeytin ve zakkumlarda oluşan urların nedeni olabileceği gibi bir yanılgıya düştüklerini belirtmiştir.



Şekil 1. Yüze sterilizasyonu sonrası urlu dokuların sıvı besi yerinde bekletildikten sonra (a), doğrudan besiyerine ekimi (b) ve havan içerisinde ezilmesi (c) gibi üç farklı izolasyon yöntemi sonrası KB besi yerinde gelişen *Psv* kolonileri ve ezme ile izolasyon sonrası *Psv* kolonileri etrafında gelişen sarı renkli *P. agglomerans* kolonileri (ok).

İzolasyonlar sonucu 5 tanesi Antakya ilçesini (Karaali, Karaksı, Gülderen, Ekinci, Odabaşı) ve 9 tanesi diğer ilçeleri temsil edecek şekilde toplam 14 izolat saflaştırılmış ve tanı testleri bu izolatlar ile yapılmıştır. Tanı testlerinde referans izolat olarak Prof. Dr. Mustafa MİRİK'ten temin edilen Ayvalık1 izolatı kullanılmıştır.

Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısı

Bakteri izolatlarının UV ışık altında pigment üretimleri incelendiğinde, KB besi yerinde geliştirilen 14 izolattan 8 tanesi floresan pigment üretirken 6 izolat ise pigment üretmemiştir. Potasyum hidroksit (KOH) testleri sonucu ise tüm izolatların Gram negatif karakterde olduğu saptanmıştır. LOPAT testlerinde, tüm izolatlar Levan negatif, Oksidaz negatif, Patates dilimlerinde

pektolitik aktivite negatif, Arginin dehidrolaz negatif, Tütün yapraklarında aşırı duyarlılık pozitif olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Lelliot ve Stead (1987), Sands (1990) ve Schaad ve ark., (2001) ile benzerlik göstermiştir.

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight MassSpectrometry (MALDI-TOF) yöntemiyle tanı

MALDI-TOF cihazı tarafından seçilen 14 izolatın tanısı firma tarafından önerilen değerlere göre yapılmıştır. Teşhis sonucunda ortaya çıkan skor değeri 2.30-3.0 aralığında ise tanının tür düzeyinde oldukça güvenilir olduğu; 2.00-2.299 aralığında kesin cins düzeyinde güvenilir, tür düzeyinde yüksek güvenilir olduğu; 1.70-1.999 arasında tanının cins düzeyinde güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde olduğu; 1.7 değerinden aşağı olan değerler ise

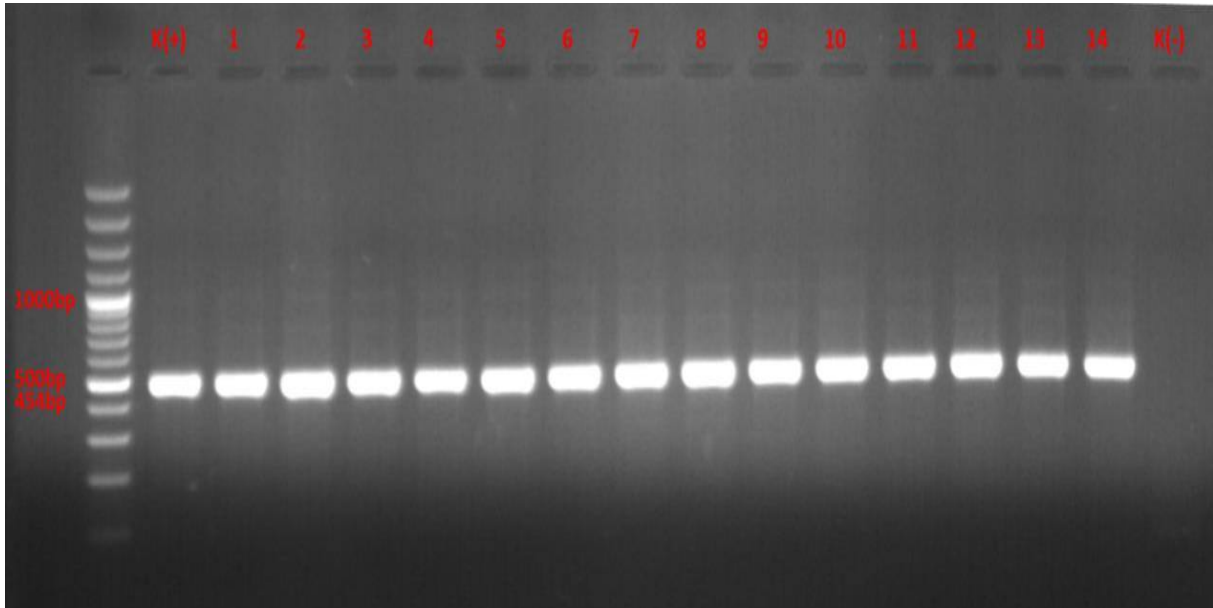
güvensiz tanı olarak kabul edilmiştir. Tanı sonucunda 13 izolat 2 ve üzeri benzerlik indeksi ile, 1 izolat ise 1.89 benzerlik indeksi değeri ile

Pseudomonas savastanoi pv *savastanoi* olarak tanılanmıştır. MALDI-TOF tanı sonuçları Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. MALDI-TOF ile tanısı yapılan izolatlar ve benzerlik indeksi değerleri.

| İzolat | Bakteri tür ismi | MALDI-TOF benzerlik indeksi |
|-------------------|---|-----------------------------|
| Karaali (HZP6) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 1.89 |
| Odabaşı (HZP4) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.09 |
| Karakısı (HZP12) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.57 |
| Gülderen (HZP10) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.14 |
| Ekinci (HZP7) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.57 |
| Altınözü (HZP2) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.22 |
| Arsuz (HZP5) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.09 |
| Belen (HZP3) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.32 |
| Defne (HZP11) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.21 |
| Dörtyol (HZP14) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.31 |
| Erzin (HZP9) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.00 |
| İskenderun (HZP8) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.42 |
| Samandağ (HZP1) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.31 |
| Yayladağı (HZP13) | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.40 |
| Ayvalık1 | <i>P. savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i> | 2.42 |

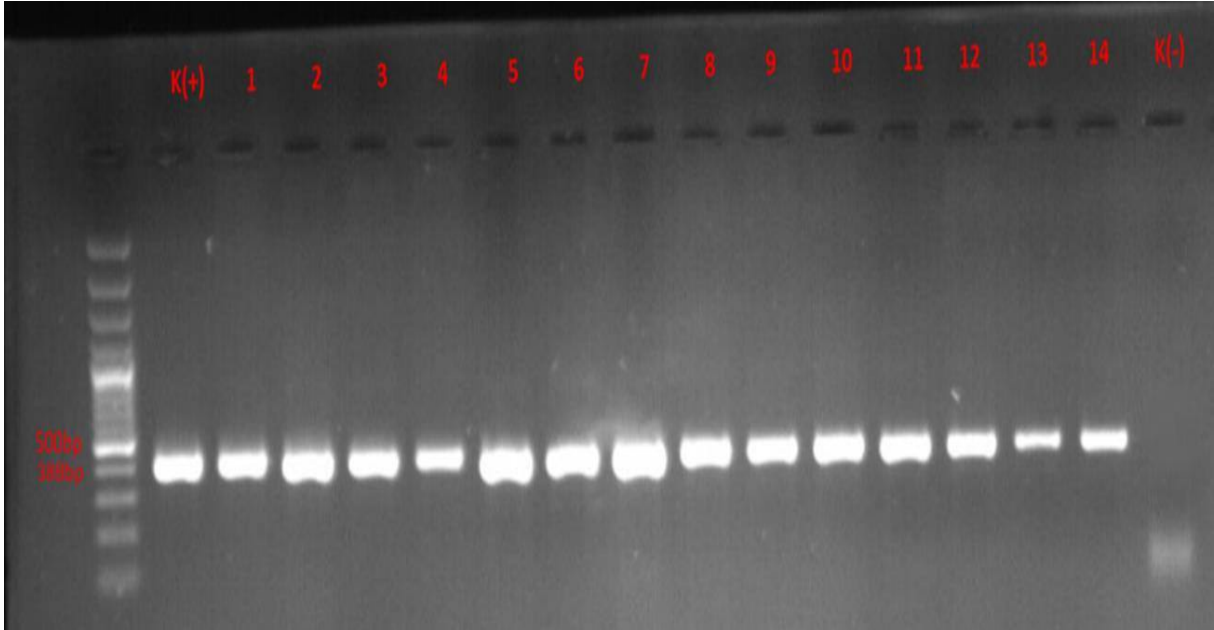
Bakteri izolatlarının moleküler tanısı



Şekil 2. Hatay ili zeytin izolatlarının IAALF ve IAALR primerleri kullanılarak yapılan moleküler tanısında agaroz jel üzerinde oluşan bantlar. K(+): *Psv* Ayvalık1, 1:HZP1, 2:HZP2, 3:HZP3, 4: HZP4, 5:HZP5 6:HZP6, 7:HZP7, 8:HZP8, 9:HZP9, 10: HZP10, 11:HZP11, 12: HZP12, 13:HZP13, 14:HZP14, K(-): Steril saf su.

Biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik testler ve MALDI-TOF ile tanı yöntemi ile elde edilen sonuçları teyit etmek amacı ile bakteri izolatları 2 farklı primer çifti kullanılarak moleküler olarak tanılanmıştır. IAALF ve IAALR primerleri ile yapılan PCR çalışmalarında 454 bp’lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 2). *Psv*’nin IAALF ve IAALR primerleri

kullanılarak moleküler tanısıyla ilgili birçok çalışmada benzer şekilde bantlar elde edilmiştir (Penyalver ve ark., 2000, Mirik ve Aysan, 2011). Bir diğer primer çifti olan *PsvF* ve *PsvR* ise *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ye spesifik bir primer olup 388 bp’lik bant profili (Şekil 3) ile Tegli ve ark. (2010) ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3. Hatay ili zeytin izolatlarının PsvF ve PsvR primerleri kullanılarak yapılan moleküler tanısında agaroz jel üzerinde oluşan bantlar. K(+): *Psv* Ayvalık1, 1:HZP1, 2:HZP2, 3:HZP3, 4: HZP4, 5:HZP5 6:HZP6, 7:HZP7, 8:HZP8, 9:HZP9, 10: HZP10, 11:HZP11, 12: HZP12, 13:HZP13, 14:HZP14, K(-): Steril saf su.

Patojenisite testleri

Patojenisite testlerinde değerlendirmeler inokulasyondan 60 gün sonra yapılmıştır. Kontrol pozitif ve bölge izolatlarının tümü inokulasyon noktalarında hastalığın tipik belirtisi olan gallere neden olmuştur. Steril saf su inokule edilen alanlarda ise herhangi bir hastalık belirtisi görülmemiştir (Şekil 4). Patojenisite testleri sonrası oluşan urlardan tekrar izolasyonlar yapılmış ve elde edilen reizolatlar *Psv* olarak tanılanmıştır. Patojenisite testleri birçok bitki patojeni ile yapılan çalışmalarda önemli bir aşamadır. Koch postulatı

(Koch, 1884) kapsamında, herhangi bir bitkiden izole edilen bitki patojeninin tanısı sonrası son aşamada mutlaka ilk izole edildiği konukçuya inokule edilmesi ve inokulasyon sonrası hastalığın tipik belirtilerinin gözlenerek yeniden izole edilebilmesi gerekmektedir. Yapılan bu çalışma ile de tanı testlerinde *Psv* olarak tanılanan izolatlar patojenisite testleri ile hastalığın orijinal konukçusu olan zeytin fidanlarına inokule edilmiştir. İnokulasyon sonrası fidanlarda hastalığın tipik belirtileri gözlemlenmiş ve bu alanlardan patojen bakteri tekrar izole edilerek *Psv* olarak tanılanmıştır.



Şekil 4. Patojenisite testi amacıyla yapılan inokulasyonlar sonrası Pozitif kontrol (*Psv* Ayvalık1), HZP14 (Dört Yol) ve Negatif kontrol uygulamalarında oluşan belirtiler.

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak bu çalışma ile zeytin dal kanseri hastalığının Hatay ili zeytin üretim alanlarındaki mevcut durumu belirlenmiştir. Elde edilen veriler hastalığın bölgemizde son derece yaygın olduğunu ve daha fazla yayılma göstermemesi için hem mevcut bahçelerde hem de yeni tesis edilmesi düşünülen bahçelerde gerekli önlemlerin alınmasının son derece önemli olduğunu göstermektedir. Patojen enfekteli zakkum ve narlardan zeytin bitkisine geçiş yapabildiği için, özellikle yeni tesis edilecek bahçelerin *Psv* ile enfekteli zakkum ve nar bahçelerinden uzak alanlara kurulması önemlidir.

Kaynaklar

Anonim, 2017. (<https://www.tarimorman.gov.tr>) (Erişim Tarihi: 20.05.2019).

Azad, H.R., Cooksey, D.A. 1995. A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic populations of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. *Phytopathology* 85, 740–5.

Azeri, T. 1993. Research on olive leaf spot, olive knot and Verticillium wilt of olive in Turkey. *EPPO Bulletin* 23: 437-440.

Basim, H., Ersoy, A. 2000. Batı Akdeniz Bölgesinde zeytin ağaçlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tarafından oluşturulan bakteriyel dal kanseri hastalığının yayılışı ve hastalık etmeninin tanısı. *Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu* 310-315. 6-9 Haziran 2000, Bursa.

Bozkurt, A., Soylu, S., Mirik, M., Ulubas Serce, C., Baysal, Ö. 2014. Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: A new host of the pathogen. *Letters in Applied Microbiology* 59 (5):520–27.

Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Moreno-Pérez, A., Pintado, A., Ramos, C. Knots untie: molecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts. *Front Plant Sci.* 2017;8:1089.

Bradbury, J.F. 1986. *Guide to the Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew, UK.

Dara, R. 2010. *Sofralara Geldi Bahar Baharatlar-Kokulu Otlar Yerel ve Evrensel Tatlar*. İstanbul: Yapı Kredi Yayınları.

Eltlbany, N., Prokscha, Z-Z, Castaneda-Ojeda, MP, Krögerrecklenfort, E., Heuer, H., Wohanka, W., Ramos, C., Smalla, K. 2012. A new bacterial disease on Mandevilla sanderi, caused by *Pseudomonas savastanoi*: Lessons

learned for bacterial diversity studies. *Appl Environ Microbiol* 78:8492–8497.

FAOSTAT, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim tarihi:25.09.2019).

Fernandes, A., Marcelo, M. 2002. A possible synergistic effect of *Erwinia* sp. on the development of olive knot symptoms caused by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* in *Olea europaea*. *Acta Horticulture* 586, 729–31.

Hehn, V. 2000. *Zeytin Üzüm ve İncir- Kültür Tarihi ve Eskizleri*. çev. Necati Aça Ankara: Dost Kitabevi Yayınları.

Iacobellis, N S., Caponero, A., Evidente, A. 1998. Characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* strains isolated from ash. *Plant Pathology*, 47: 73-78.

Janse, JD. 1981. The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*) caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. II. Etiology and taxonomic considerations. *Eur. J. For. Pathol.*, 11: 425-438.

Kaplan, M., Arıhan, K. Seda. (2012). “Antik Çağdan Günümüze Bir Şifa Kaynağı: Zeytin ve Zeytinyağının Halk Tıbbında Kullanımı”, Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi 52:2, 41-56.

Koch, R. 1884. *Die Aetiologie der Tuberkulose*. *Mitt Kaiser Gesundh.* 2, 1–88. (Google Scholar).

Leliott, R. A., Stead, D. E. 1987. Diagnostic procedures for bacterial plant diseases In: *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. p:58-59. Blackwell Scientific Publications.

Marchi, G., Sisto, A., Cimmino, A., Andolfi, A., Cipriani, M.G., Evidente, A., Surico, G. 2006. Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology* 55: 61.

Mirik, M., Aysan, Y., Cinar, O., Sahin, F. 2004. Türkiye’de çeşitli bitkilerden izole edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatlarının fenotipik karakterizasyonu. *Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi* 139. 8-10 Eylül 2004, Samsun.

Mirik, M., Aysan, Y., Sahin, F. 2011. Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from several host plants in Turkey and report of fontanesia as a new host. *Journal of Plant Pathology* Vol. 93, No. 2, 263-270.

Mirik, M., Aysan, Y. 2011. Marmara Bölgesinde Zeytin Dal Kanseri Hastalığının Yaygınlığı ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

- izolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. Tarım Bilimleri Dergisi, 17: 279-290.
- Mirik, M., Aysan, Y., Soylu, S. 2019. Zeytin Dal Kanseri, Nar Dal Kanseri, Bacterial Knot Diseases, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Alınmıştır: Bitki Bakteri Hastalıkları, (ed) Saygılı, H., Aysan, Y., Şahin, F., Soylu, S., Mirik, M., 113-115.
- Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A.N., Sing, A., Busch, U., and Huber, I., 2012. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. FEMS Microbiology Letters 328: 46-53.
- Penyalver, R., Garcia, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Lopez, M. M. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Applied and Environmental Microbiology 66:2673-2677.
- Quesada, J.M., García, A., Bertolini, E., López, M.M., and Penyalver, R. 2007. Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. Int Microbiol 10: 77– 84.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Lacy, G. H. 2001. Gram negative bacteria, *Pseudomonas*. p: 84-117. In:Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition). APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Servi, D. 2009. Aydın İlinde Zeytin Dal Kanseri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*)'nin Yaygınlığının Belirlenmesi ve PCR ile Tanısı. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 105 s.
- Sivri, N. 2012. Kahramanmaraş, Gaziantep ve Kilis illerindeki Zeytin Üretim alanlarında Görülen Zeytin Dal Kanseri Hastalığı Etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Tanılanması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 89s.
- Surico, G., Lavermicocca, P, 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*.Phytopathology 79,185–90.
- Tatli, B., Benlioglu, K. 2004. Aydın ve Muğla illeri zeytin alanlarında zeytin ağacı uru hastalığı (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) üzerine çalışmalar. Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi. 147. 8-10 Eylül 2004, Samsun.
- Tegli, S., Cerboneschi, M., Marsili, I., Libelli, I.M., Santilli, E. 2010. Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by End Point and Real-Time PCR. BMC Microbiology 10:156-169.
- TUİK, 2018. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&loca=tr> (Erişim tarihi:12.02.2018).