

**Proje No:**  
**Kiraz Dal Yanıklığı Etmenlerinin Tanisi, Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu**

**Proje Yürütücüsü: Doç.Dr. Mustafa MİRİK**  
**Araştırmacılar: Araş. Gör. Cansu ÖKSEL**  
**Ziraat Yük. Müh. Merve BÜLBÜL**

**2016**

## ÖNSÖZ

Tekirdağ ilinde kiraz üretimi önemli bir yer tutmakta ve her yıl Kiraz Festivali düzenlenmektedir. Tekirdağ ilinde yaygın olarak yetiştirilen kiraz ağaçlarında pekçok hastalık ve zararlı sorun olmaktadır. Tekirdağ ilinde kiraz üretimini sınırlayan en önemli etkenlerden birisi Kiraz Dal Yanıklığı Hastalığına neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* bakteriyel etmenlerdir. Bu hastalık üretim alanlarında hızla yayılmaktadır. Üretici yetiştirme teknikleri ve üretimde sanitasyona dikkat emmelerinden dolayı hastalığın önüne geçememektedirler.

Doç. Dr. Mustafa MİRİK yönetiminde Araş. Gör Cansu ÖKSEL ve Ziraat Yük. Müh. Merve BÜLBÜL tarafından yürütülen bu projede Tekirdağ kiraz üretim alanlarında dal kanseri hastalığının yaygınlık oranı Tekirdağ ilinde bu proje ile ilk defa detaylı olarak çalışılmıştır. Kiraz üretim alanlarında yapılan arazi çalışmaları sonucunda hastalıklı bitki örnekleri toplanmış ve etmenlerin izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanısı yapılmış ve tanı MIS ve PCR ile desteklenmiştir. Elde edilen izolatların fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırmaları yapılmıştır.

Proje kapsamında Namık Kemal ile Mustafa Kemal Üniversitesi arasında işbirliğimiz güçlendirilmiştir. Bizlere bu olanakları sağladığı için Namık Kemal Üniversitesi BAP birimine sonsuz teşekkür ederiz. Arazi çalışmalarımızda bize yardımcı olan Tarım Bakanlığı Personeline, projenin tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen Namık Kemal Üniversitesi Bitki Koruma Bölümüne ve NABİLTEM çalışanlarına, MIS çalışmasındaki yardımlarından dolayı Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim üyelerinden Prof. Dr. Soner SOYLU ve Yrd. Doç. Dr. İmam Adem BOZKURT'a teşekkür ederiz.

Haziran 2016

Doç. Dr. Mustafa MİRİK

Araş. Gör. Cansu ÖKSEL

Yük. Zir. Müh. Merve BÜLBÜL

## ÖZET

Kiraz (*Prunus avium* L.) Tekirdağ' da yetiştirilen önemli bir meyve türüdür. Kirazda verim ve kaliteyi düşüren, ağaçları kurutan kiraz dal kanseri hastalığı etmen(ler)i bu çalışma ile araştırılmıştır. Tekirdağ ili kiraz bahçelerinde 2012-2013 yıllarında gerçekleştirilen sörvey araştırmaları sonucu 135 hasta bitki örneği belirti gösteren ağaçlardan 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 izolasyon çalışmaları sonucu bu örneklerden 60 adet *Pseudomonas syringae* izolatu elde edilmiştir. Yapılan LOPAT testleri sonucunda izolatlar oksidaz, pektolitik aktivite, arginine dehidrolaz negatif, tütünde aşırı duyarlılık ve levan pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca izolatların GATTA özellikleri ise 29 adet izolat (+,+,-,-) özellik gösterirken, 20 adet izolat ise (-,-,+,+) özellik göstermiştir. Tesadüfen seçilen izolat %62-90 oranında benzerlik göstermiştir. Yapılan fenotipik karakterizasyonda izolatlar 2 farklı kümede toplanmaktadır. Moleküler testlerde kullanılan spesifik primerler ile 29 adet izolat 650 bp tekrarlanabilir bant oluşturarak *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ve 20 adet izolat 752 bp tekrarlanabilir bant oluşturması nedeniyle *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanmıştır. Genotipik olarak izolatlar birbirinden farklı iki kümeye ayrılmıştır.

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

## ABSTRACT

Sweet cherry (*Prunus avium* L.) is one of the most important fruit trees grown in Tekirdağ. Causal disease agent(s) of bacterial canker which reduces yield and quality of sweet cherry fruit and cause death of trees were investigated. For this purpose a survey study was conducted in 2012-2013 and 135 infected plant samples were collected from symptomatic trees. As a result of survey studies, bacterial canker was determined in all orchards, while diseases prevalence rate of bacterial canker was determined as 20-57%, severity of disease was measured as 20-85% in surveyed orchards in Tekirdağ Province. As a result of isolation studies, 60 bacterial isolates of *Pseudomonas syringae* were obtained. Results obtained from LOPAT, oxidase, pectolytic activity and arginine dihydrolase revealed that all isolates were recorded as negative for oxidase, pectolytic activity and arginine dihydrolase, but were positive on tobacco and levan production. Further GATTa characters of tested isolates were found as (+,+,-,-) for 29 isolates, while 20 isolates were recorded as (-,-,+,+). Coincidentally 62-90% of selected isolates showed similarity. All isolates were separated into two clusters based on their phenotypic characterization. By using specific primers, 29 isolates formed 650 bp repeatable band so identified as *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, 20 isolates formed 752 bp repeatable band so identified as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. All isolates were separated into two clusters based on their genotypic characterization.

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

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

|   |            |
|---|------------|
| <b>ÖZET</b> .....   | <b>iii</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>4</b>   |
| <b>2. LİTERATÜR ÖZETİ</b> .....   | <b>13</b>  |
| <b>3. MATERYAL ve METOD</b> .....   | <b>22</b>  |
| 3.1. MATERYAL.....  | 22         |
| 3.2. METOD.....   | 22         |
| 3.2.1. Sörvey.....  | 22         |
| 3.2.2. Hasta Bitki Materyalinin Toplanması ve Muhafazası .....                            | 22         |
| 3.2.3. Bakteriyel Kanser Etmeninin İzolasyonu .....                                       | 23         |
| 3.2.4. Patojenite Testinde Kullanılan Bakteri Populasyonunun Hesaplanması .....           | 23         |
| 3.2.5. Patojenite Testi .....   | 23         |
| 3.2.6. Re-İzolasyon.....  | 24         |
| 3.2.8. GATTa Testi.....   | 26         |
| 3.2.9. Bakteri İzolatlarının PCR Testi İle Tanısı .....                                   | 27         |
| 3.2.10. BOX-PCR İle İzolatların Genotipik Karakterizasyonu .....                          | 30         |
| 3.2.11. Bakteri İzolatlarının Yağ Asit Profillerine Göre Fenotipik Karakterizasyonu ..... | 31         |
| 4.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi .....                                    | 32         |
| 4.2. Hastalık etmeninin izolasyonu .....  | 33         |
| 4.3. Patojenite testinde kullanılan bakteri populasyonunun hesaplanması .....             | 34         |
| 4.4. Patojenite testi .....   | 35         |
| 4.5. Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı.....   | 36         |
| 4.6. GATTa Testi .....  | 37         |
| 4.7. Bakteri İzolatlarının PCR Testiyle Tanısı .....                                      | 40         |
| 4.8. BOX-PCR İle İzolatların Genotipik Karakterizasyonu .....                             | 41         |
| 4.9. Bakteri İzolatlarının Yağ Asit Profillerine Göre Fenotipik Karakterizasyonu .....    | 42         |
| <b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b> .....  | <b>45</b>  |

## ÇİZELGE DİZİNİ

## Sayfa

|  |    |
|--|----|
| Çizelge 1.1 : Dünyada kiraz üretimi.....   | 8  |
| Çizelge 1.2 : Türkiye' de 1992-2015 yıllarında kiraz ağaç sayısı ve üretim miktarları.....             | 9  |
| Çizelge 1.3 : Türkiye' de 2015 yılı verilerine göre il bazında kiraz üretimi.....                      | 3  |
| Çizelge 3.1 : PCR işleminde kullanılan reaksiyon karışımının içeriği.....                              | 29 |
| Çizelge 3.2 : B1 ve B2 primerlerinin PCR işlemi için kullanılan program .....                          | 29 |
| Çizelge 3.3 : CFLF ve CFLR primerlerinin PCR işlemi için kullanılan program.....                       | 29 |
| Çizelge 3.4 : Box-PCR işleminde BOXA1R primeri için kullanılan reaksiyon karışım içeriği.....          | 30 |
| Çizelge 3.5 : BOX-PCR işleminde BOXA1R primeri için kullanılan program                                 | 31 |
| Çizelge 4.1 : Tanı çalışmaları için seçilen kiraz izolatları .....                                     | 35 |
| Çizelge 4.2 : Bakteri izolatlarının test sonuçları.....  | 40 |
| Çizelge 4.3: Tekirdağ bölgesi kiraz izolatlarıyla yapılan BOX-PCR sonucu oluşan bant kompozisyonu..... | 43 |
| Çizelge 4.4: Tekirdağ bölgesi kiraz izolatlarından elde edilen yağ asidi kompozisyonu.....             | 45 |

## ŞEKİL DİZİNİ

## Sayfa

|   |    |
|---|----|
| Şekil 3.1 : Sürgün ve çiçek demetlerinde bakteriyel süspansiyonunun uygulanması   | 25 |
| Şekil 4.1 : Kiraz dal kanseri hastalığının neden olduğu zamklanma.....  | 34 |
| Şekil 4.2 : İnokulasyondan sonra çiçeklerde oluşan yanıklık .....   | 36 |
| Şekil 4.3 : Tekirdağ Bölgesi kiraz izolatlarının BOX-PCR'a göre oluşturduğu genotipik farklılık .....                         | 43 |
| Şekil 4.4 : <i>Pseudomonas syringae</i> izolatlarının tüm hücre yağ aside içeriğine göre oluşturduğu fenotipik farklılık..... | 46 |

## 1. GİRİŞ

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).

Elma, armut, ayva, erik, üzüm, incir gibi meyvecilik tarımında önem kazanmış olan birçok meyve türü ülkemiz topraklarında yetişmektedir. Anadolu birçok meyve türünde olduğu gibi, kirazında anavatanı sınırları içerisinde. 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. Kiraz ağaçları ılıman iklim meyve türleri içerisinde meyvelerini en erken olgunlaştıran bir türdür. 5-6 yaşında verime geçen kiraz ağaçlarının 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 2016 yılı verilerine göre Türkiye kiraz yetiştiriciliğinde üretim bakımından dünyada birinci sırada yer almaktadır.

**Çizelge 1.1.** Dünya Kiraz Üretimi (Ton) (FAO 2016)

| Sıra* | Ülke         | 2010             | 2011             | 2012             | 2013             |
|-------|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1     | Türkiye      | 417.905          | 438.550          | 480.748          | 494.325          |
| 2     | A.B.D        | 284.148          | 303.376          | 384.646          | 301.205          |
| 3     | İran         | 251.418          | 151.175          | 200.000          | 200.000          |
| 4     | İtalya       | 115.476          | 112.775          | 104.766          | 131.175          |
| 5     | İspanya      | 85.192           | 101945           | 98.400           | 97.200           |
| 6     | Özbekistan   | 75.000           | 82.000           | 84.000           | 100.000          |
| 7     | Suriye       | 58.084           | 62.195           | 82.341           | 62.372           |
| 8     | Ukrayna      | 73.000           | 72.800           | 72.600           | 81.200           |
| 9     | Rusya        | 66.700           | 76.000           | 72.000           | 78.000           |
| 10    | Romanya      | 70.290           | 81.842           | 70.542           | 80.477           |
|       | <b>Dünya</b> | <b>2.072.455</b> | <b>2.158.934</b> | <b>2.256.519</b> | <b>1.079.034</b> |

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



**Çizelge 1.2.** Türkiye’de 1992-2015 yıllarında kiraz ağaç sayısı ve üretim miktarı (TÜİK 2016)

| Yıllar | Meyve Veren Ağaç Sayısı | Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı | Üretim (Ton) |
|--------|-------------------------|----------------------------|--------------|
| 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      |
| 2014   | 19.087.000              | 7.232.000                  | 445.556      |
| 2015   | 20.616.000              | 6.614.000                  | 535.600      |

Ülkemizde kiraz üretimi son yıllarda gerek ağaç sayısı gerekse üretim olarak sürekli artış göstermektedir. Çizelge 1.2’de de görüldüğü gibi 2000 yılında meyve veren 7.450.000 ve meyve vermeyen 2.515.000 adet ağaç sayısına sahipken 2015 yılında meyve veren 20.616.000 ve meyve vermeyen 6.614.000 adet ağaç sayısına sahiptir. 2000 yılında 230.000 ton 2015 yılında 535.600 ton kiraz üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2016).

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 2.308 ton olarak gerçekleşmektedir (TÜİK 2016).

**Çizelge 1.3.** Türkiye’de 2015 yılı verilerine göre il bazında kiraz üretimi

| İller    | Toplam Meyvelik Alanı (Dekar) | Meyve Veren Ağaç Sayısı | Üretim (Ton) |
|----------|-------------------------------|-------------------------|--------------|
| Konya    | 66.672                        | 1.606.455               | 68.376       |
| Isparta  | 53.762                        | 1.085.962               | 53.762       |
| İzmir    | 118.649                       | 2.982.230               | 41.793       |
| Manisa   | 96.482                        | 2.170.802               | 39.713       |
| Amasya   | 23.149                        | 758.030                 | 34.390       |
| Bursa    | 60.115                        | 1.275.819               | 28.470       |
| Tekirdağ | 2.343                         | 94.611                  | 2.308        |

Ülkemizdeki kiraz üretimini tehdit eden pekçok fitopatolojik problemler bulunmaktadır. Bunlar arasında yaprak delen hastalığına *Stigmia carpophila*, monilya (mumya) hastalığına *Monilinia laxa*, dal yanıklığı *Nectria galligena* fungal etmenler olarak ön plana çıkarken 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. Hastalığa neden olan etmenler *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*'dur. Patojen bakteriler, düz ya da eğik çubuk şeklinde, bir veya iki kamçıya sahip gram negatif hücre yapısına sahiptir. Boyutu 0.5-1 µm x 1.5-4.0 µm arasında değişmektedir. DNA'nın G+C oranı %58-71 mol dür (Schaad ve ark. 2001). *Pseudomonas syringae*'nin ilk olarak izolatı 1902 yılında Van Hall tarafından 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 belirlemişlerdir. Bunun yanında Kaluzna ve ark. (2012) ise etmenin yaklaşık 64 pathovarı olduğunu bildirmiştir.

Hastalığa neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* adlı bakteri geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Başta kiraz ve kayısı olmak üzere 80 kadar meyve türünün yanısıra pek çok otsu bitki türünde de hastalık yaparken; *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ise sadece kiraz, erik ve badem türlerinde hastalık oluşturmaktadır (Agrios 2005).

Hastalık etmeni ağacın kök hariç bütün toprak üstü aksamalarında hastalık belirtisi oluşturur. Hastalığın tipik belirtisi çeşide, infektelenmiş ağacın 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). 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 sapsı kahverengi ve su emmiş leke şeklinde görülür (Ogawa ve ark. 1995).

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 infeksiyonları gerçekleşir (Jones ve Sutton 1996).

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).

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ülkemizde; Antalya, Mersin ve Adana'da turuncgillerde (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. (Kennelly ve ark. 2007).

*Pseudomonas syringae* pathovarlarının tanılama çalışmalarında, LOPAT (Levan tipte koloni oluşumu, Oksidaz reaksiyonu, Patatestte 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; Bülbül 2014).

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'nin moleküler tanılanmasında kullanılan *syrB* geninin primerlerinin dizilimi, (B1 5'-CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG-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 GGTATTGGCGGGGGTGC) 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 Barbaros, Çanakçı, Karahisarlı, Kumbağ, Naip, Marmaraeğlisi, Merkez, Yeniçiftlik ilçelerinden 23 adet kiraz üretim alanı ziyaret edilmiş ve 135 adet ağaçtan hastalık şüphesiyle örnek toplanmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen 400 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: Tyrosin kullanma, Ta: Tartarik asidi kullanma) testleri, karbon kaynaklarından asit oluşumu gibi klasik testlerle tanısı yapılarak bakteri izolatlarının *Pseudomonas syringae* olduğu tanılanmıştır. Tanıyı desteklemek amacıyla tesadüfi olarak seçilen izolatlara yağ asit analizi uygulanarak tanı desteklenmiştir. 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. İzolatların genotipik karşılaştırmasında BOX-PCR ile fenotipik karakterizasyonu ise yağ asit analizleri kullanılarak ortaya konmuştur.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

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

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).

Burkowicz ve Rudolph (1994), dünyadan farklı bölgelerinden elde ettikleri 216 izolatın yapılan tanılama çalışmaları sonucunda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* olarak belirlemişlerdir. Kiraz, vişne, erik ve kayısıdan elde edilen izoatların tamamı *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* olarak belirlenmiştir. Elde edilen ülkeler bazında bakıldığında İngiltere ve İtalya'dan kirazdan elde edilen izolatlar *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum*, 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. *morspurunorum*, Polonya izolatları ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak saptanmıştır. Fransa, Güney Afrika, Macaristan, Polonya, Türkiye, Yeni Zellanda 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'inin *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 belirtilerini belirlemişlerdir. 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* ırk 1, 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.

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 tanımlanmıştır.

Gavriloviç ve ark. (2012) Sırbistan'da kirazlardan karakteristik *Pseudomonas* belirtisi gösteren örneklerden bakteri izolatları elde edilmiştir. Sırbistan'ın farklı bölgelerindeki (Belgrat, Topola, Cocak, Sabac, Novi Sad) kiraz üretim alanlarında iki farklı tip semptom 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, tyrosin ve tartarat ise negatif olarak belirlenmiş ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmıştır. İkinci grup izolatlar ise kiraz tomurcuklarındaki nekrotik alanlardan izole edilen temel patojenite testleri negatif, jelatin ve esculin negatif, tyrosin ve tartarat ise pozitif olarak belirlenmiş *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak saptanmıştır.

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.

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- $\beta$  hydroxybutyrate depolamayan *Pseudomonas*'lar *Pseudomonas syringae*'de içinde bulunduğu; *Pseudomonas aeruginosa* ise günümüzde  $\gamma$ -Proteobacteria içerisine dahil edilmiştir. Çoğu floresan olmayan poly- $\beta$  hydroxybutyrate depolayan *Pseudomonas*'lar ise *Acidovorax*, *Burkholdera* ve *Ralstonia* cinslerinin içine dahil edilmiş ve  $\beta$ -Proteobacteria içerisinde sınıflandırılmıştır.

Hastalık baharda kanser yaraları ve çiçek demetlerindeki popülasyonların gelişmesi ve kolonizasyonu ile başlamaktadır. Çiçek demetlerindeki etmenin popülasyonu  $10^{4-6}$  arasındadır. Yanıklık symptomunun 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).

Kennelly ve ark. (2007) bildirdiğine göre, kirazlarda bakteriyel kanserin epidemiyolojik çalışmaları *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum*'un epifitik ve endofitik fazlarının önemli olduğunu göstermiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum*'un sağlıklı dokularda epifitik yaşamını devam ettirdiği ilk olarak kirazlardaki çalışmalarda 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 oluşturduğu 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*'un 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 da dormant tomurcuklarda hastalık etmenini belirlemişlerdir. Yaprak dūřme yerlerinde çevre koşulları serin sıcak, rüzgar ve yağmur damlasını iğerdiği 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 öldürölmesi nedeniyle ölü tomurcuk simptomu olarak isimlendirir ve kanser başlangıcıdır. Sağlıklı dormant tomurcuklardaki bakteriyel popölasyon ilkbaharda çiçek demetlerinde kolonizasyonları için inokulum kaynağı olarak görev yapar.

Shams-Bakhsh ve Rahimiab (1997) sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki kanserden izole ettikleri *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatlarının tanımlarken oksidaz testi, asit ve levan üretimi ve patatestte pektolitik aktivite testlerini yapmışlardır. Yapılan testlerin sonucunda izolatların oksidaz testine negatif sonuç verdiği, sakkarozda levan ve asit ürettiği ve patatestte pektolitik aktivite negatif sonuç verdiği görölümüştür.

*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 flouresan *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 *Pseudomonas*'lar yer almaktadır (Lelliott ve ark. 1966, Gonzales ve ark 2003).

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 tyrosin ve tartarik asidi kullanmaktadır, ırk 2 ise jelatin ve esculini hidrolize etmiş, tyrosin 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.

*Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum*'un 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 *cfl*<sup>+</sup> formunda olup kirazda patojendir. *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* ırk 2 ise leylak ve vişnede patojendir.

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.

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, tyrosin 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, tyrosin ve tartarat ise pozitif (tipik *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* karakteri) olarak saptanmıştır.

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).

Abu-Ashraf et al. (2000) pathovar seviyesinde *Pseudomonas syringae*' nin fitopajenik sınıflandırılmasında PCR'ı kullanmış ve bu önemli bitki patojenlerinin tanılanmasında faydalı olabileceği düşünülmüştür.

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 tyrosin ve tartarata kullanmamaktadır ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanmıştır. İkinci grup kiraz ve erik izolatlarını içermekte, jelatin ve esculin negatif, tyrosin 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 ayırımında özellikle BOX-PCR kullanılması ile belirlenebileceği bildirilmiştir.

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 kullanılacak 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 kullanımını 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.

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* izolatlarını 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 kesin tanısı yapmışlardır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'nin syringomycin sentezinden sorumlu *sybB* 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 *sybB* genine göre dizayn edilen primerin kullanıldığında 752 bp 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.

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*'un 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.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. MATERYAL

Karakteristik hastalık belirtisi gösteren kiraz bitki örneklerinden izole edilen bakterilerin tanılanması çalışmalarında karşılaştırma kültürleri olarak Çukurova Üniveristesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (Adana) Öğretim Üyesi 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 Kùltürleri 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 caratovororum* 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. Sörvey

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 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatları Tekirdağ'ın Barboros, Çanakçı, Karahisarlı, Kumbağ, Marmaraereğlisi, Merkez, Mermer, Naip Yeniçiftlik 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 yaygınlığı tespit edilmiştir. Ayrıca hasta ağaçlardaki hastalık şiddeti ise hastalıklı alanın uzunluğu bitki boyunun tamamına oranlanarak hesaplanmıştır.

##### 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 Etmeyenin 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 yüzeysel olarak dezenfekte edilmiştir. Parçalar steril havada %0.85 NaCl içeren saline buffer da homojenize edilmiştir. Elde edilen ekstraktan bir öze dolusu alınarak King B (20 g Proteose peptone, 1.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>3H<sub>2</sub>O, 1.5 g MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 10 ml Glyserol, 15 g Agar, 1000 ml Saf su, pH= 7.2) besiyeri içeren petrilere çizgi ekimiyle çizilmiştir. Petriler 25°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Gelişen krem renkli koloniler saflaştırılmış ve gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik olarak hazırlanmış YDC ortamında +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

### 3.2.4. Patogenite Testinde Kullanılan Bakteri Populasyonunun Hesaplanması

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

### 3.2.5. Patogenite Testi

Lelliott ve Stead (1987) bildirdiğine göre hastalıklı kiraz dokularından izole edilen bakteri izolatlarının patojenitesi yapılmıştır. Patogenite testlerinde 10<sup>8</sup> hücre/ml inokulum yoğunluğu kullanılmıştır. Patogenite testlerinde pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* referans kültürü, negatif kontrol olarak ise steril su kullanılmıştır.

**Çiçek demetlerine püskürtme:** Sağlıklı kiraz ağaçlarından 20-25 cm uzunluğundaki henüz açılmamış çiçek demetleri su içeren erlenlere konulmuştur. Hazırlanan bakteri süspansiyonu bir el pülverizatörü yardımıyla çiçek demetlerine 1 ml olacak şekilde püskürtülmüştür. Yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur (Şekil 3.1).

İnokulasyondan bir gün sonra bitkiler nem çemberinden alınmıştır. 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 izolatlardan patojen olup olmadığı belirlemek için çiçekteki tipik leke oluşumuna göre hastalık var/yok olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.1.** Sürgün ve çiçek demetlerine bakteriyel süspansiyonun uygulanması

### 3.2.6. Re-İzolasyon

İnokulasyon yapılan açılmamış çiçek demetleri ile meydana gelen kahverengilikler ve kurumalar incelemeye alınmıştır. Örnekler küçük parçalara ayrılmış ve %70 etil alkol ile yüzeyden dezenfeksiyon edilmiştir. Porselen havan içerisinde konulan örnekler 2 ml steril saline buffer eklenerek süspansiyonlar hazırlanmıştır. bakterinin saline buffer süspansiyonuna geçmesi sağlamak için havanlar 15-20 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonunda içerisinde King B besiyeri bulunan petrilere üç çizgi yöntemine göre çizimler yapılmıştır (Janse 2006). İzolasyon petrilere 25°C'de 48 saat inkübatörde bekletilmiştir. King B agar besiyerinde floresan tipte, küçük yuvarlak ve kabarık tipte olmayan krem renginde gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Simptom veren bitkilerden elde edilen re-izolatlar cam tüplerde eğik olarak hazırlanmış yeast dekstroz



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

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

150 hasta bitkiden izole edilen 400 izolat içinden seçilen 60 adet re-izolat ile tanı çalışmaları yapılmıştır. Lelliott ve Stead (1987) ile Schaad ve ark. (2001)'e göre geleneksel yöntemlerle tanı 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 besi yerinde koloni morfolojilerine, floresanlık ve şekillerine bakılarak not edilmiştir. Dr. Sümer HOROZ 'dan elde edilen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatu pozitif kontrol olarak kullanılır.

**Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon:** Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatılmış ve 25°C' de 24-48 saat inkübe edilen izolatlardan bir öze yardımıyla alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990). Prof. Dr. Yeşim AYSAN'dan alınan gram pozitif özelliğe sahip Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürü kontrol olarak kullanılmıştır.

**SNA'da Koloni Morfolojisi:** Nutrient Agar ortamına %5 oranında sakkaroz eklenerek hazırlanan Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine çizilen izolatlar 25°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Kalın, beyaz, konveks, mukoid koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead 1987). Kontrol olarak levan pozitif özellikte Yük. Zir. Müh. Nesrin TUNALI'dan temin edilen *Erwinia amylovora* izolatu kullanılmıştır.

**Oksidaz Testi:** Taze hazırlanan %1'lik N; N; N; N' - Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diclorid eriği steril filtre kağıdına damlatılmış üzerine izolatların 48 saatlik kültürü steril kürdan 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:** Çeşme suyunda patates yumruları fırçalanarak yıkanmış ve yüzey dezenfeksiyonu için %1'lik NaOCI'da 3 dakika bekletilmiştir. NaOCI'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durularak steril bir bisturi ile kabukları soyulmuştur. Steril ıslak filtre kağıdı içeren petriye 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 yapılmış ve inokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* izolatı çalışmada kullanılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

**Arginin Dehidrolaz Testi:** Thorney 2A (1 l distile su, 1 g peptone, 5 g NaCl, 0.3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g Agar, 0.01 g Phenolred, 10 g L-arginine) besi yerinde tüplere 3'er ml konularak otoklavda 121°C'de 15 dakika 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 kiraz izolatları 10<sup>8</sup> 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 savastanoi* pv. *savastanoi* izolatı kullanılmıştır.

### 3.2.8. GATTa Testi

**Jelatin hidrolizi:** Jelatin hidrolizi için gerekli besi yeri (5 g pepton, 3 g beef extract ve 120 g jelatin), pH 7-7,2 ye ayarlanarak tüplere 5 ml konmuş ve otoklavda 121°C'de sterilize edilmiştir. Tüplere bakteri aşılandıktan sonra 20°C'de 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler +4 °C'de yarım saat bekletilmiştir. Daha sonra değerlendirmeler yapılmıştır. *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:** Esculin hidrolizi için besi yerine (10 g pepton, 1 g aesculin, 1 g sodium citrate ve 0.05 g ferric citrate) hazırlanan besi yerinin pH' sı 7'ye ayarlanmış ve tüplere 5'er ml konduktan sonra otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonra tüplere bakteri ekimi yapılmıştır. 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 bazal ortamın kullanımı belirler. Bazal ortam içerisine konulan kimyasallardan (1 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g KCl, 0.2 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.08 g Bromthymolblue, 14 g Agar) agar dışındakiler 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 karbohidratların (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 karbohidratlar otoklavdan çıkarılan ve 4.5 ml besi yeri içeren tüplere 0.5 ml ilave edilmiş ve eğik agar olarak hazırlanmıştır. Sonuç olarak karbohidrat oranı besi yerinde %1'e ayarlanmıştır. Her bir karbohidratın ayrı ayrı bulunduğu tüplere bakteri aşılansmış ve 24–27°C'de tüpler inkübe edilmiştir. Asit oluşturan izolatlar ekimi yapılan tüplerde sarıya dönen renk değişimi olmuş ve değişim pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schaad et al. 2001).

### 3.2.9. Bakteri İzolatlarının PCR Testi İle Tanısı

Tekirdağ ilinden elde edilen izolatlarından tesadüf olarak seçilen 60 adet izolatın PCR ile tanısı yapılmıştır. İzolatlar Nutrient broth 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 ölçüğe yarım ölçük 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 (ddH<sub>2</sub>O) 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 eppendorf 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

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

Kullanılan Primerlerin dizilişleri:

*syfB* gen Primer B1: 5'-CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3'

*syfB* 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

| ProgramAdımları     | Sıcaklık (°C) | Süre (dak) |
|---------------------|---------------|------------|
| 1. İlk denatürasyon | 94            | 4          |
| 2. Denatürasyon     | 94            | 1.5        |
| 3. Bağlanma         | 60            | 1.5        |
| 4. Uzama            | 72            | 3          |
| 5. (2,3,4)x35 Döngü | 94            | 1.5        |
| 6. Son uzama        | 72            | 10         |
| 7. Bekleme          | 4             | Süresiz    |

Kullanılan Primerlerin dizilişleri:

*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

| ProgramAdımları    | Sıcaklık (°C) | Süre (dak) |
|--------------------|---------------|------------|
| 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    |

Sambrook ve ark. (1989)'a göre elde edilen bakteri DNA'sının ve PCR ürünlerinin Agarose jel elektroforezi 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 jel donduktan sonra 1 X TBE buffer tank içerisindeki jeli örtünceye kadar dökülmüştür. 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 5V/cm 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 transliminatörde (302 nm) bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### 3.2.10. BOX-PCR İle İzolatların Genotipik Karakterizasyonu

Tekirdağ bölgesi kiraz bahçelerinden toplanan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* izolatları arasındaki genetik farklılık Louws ve ark. (1994) ile Norman ve ark. (2003)'e göre ortaya konmuştur.

De Boer ve Ward (1995)' e göre izole edilen genomic DNA'larla BOX- (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') çalışması yapılmıştır. Reaksiyon karışımının içeriği ve kullanılan program Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Amplifikasyon sonucu elde edilen PCR ürünleri %1.5'lük agaroz jele verilerek oluşan bantlar fotoğraflanmıştır. Marker olarak 1 kb'lik ve 100 bp'lik DNA ladderlar kullanılmıştır. Her bir izolata oluşturduğu bant durumu not edilmiştir. Veriler istatistik analiz programı olan SPSS (Statistical Package for Social Sciences)' de analiz edilerek oluşturulan dendograma göre genetik akrabalık oranları belirlenmiştir.

**Çizelge 3.4.** Box-PCR işleminde BOXA1R primeri için kullanılan reaksiyon karışım içeriği

| Reaksiyon Karışımın İçeriği            | Miktar (µl) |
|--|-------------|
| PCR Master Mix (Promega, M7502)        | 12.5        |
| 20 pmole BOX 1                         | 1.5         |
| H <sub>2</sub> O (Nuclease free water) | 8.0         |
| g-DNA                                  | 3.0         |
| Toplam                                 | 25          |

**Çizelge 3.5.** BOXA1R primeri ile PCR işlemi için kullanılan program

| Program Adımları         | Sıcaklık (°C) | Süre (dakika) |
|--------------------------|---------------|---------------|
| 1 İlk denatürasyon       | 95            | 7             |
| 2 Denatürasyon           | 94            | 1             |
| 3 Bağlama                | 53            | 1             |
| 4 Uzama (2,3,4)x30 döngü | 65            | 8             |
| 5 Son uzama              | 65            | 15            |

### 3.2.11. Bakteri İzolatlarının Yağ Asit Profillerine Göre Fenotipik Karakterizasyonu

Çalışmanın bu kısmı Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde (Hatay) Prof.Dr. Soner SOYLU tarafından yapılmıştır. Bakteri hücrelerinden yağ asitleri izolasyonu aşağıda belirtildiği üzere De BOER ve SASSER (1986)' in yöntemine göre yapılmıştır. 60 adet Tekirdağ bölgesi izolatının tanısında Mikrobiyal Identifikasyon Sisteminin (MIS) bilgisayar paket programı kullanılıp (Sherlock MIS version 4.5 Microbial ID. Inc. Newark, Delaware) izolatların içerdiği yağ asit türleri ve % oranları karşılaştırılarak tanı yapılmıştır.

Tekirdağ bölgesi kiraz izolatlarının yağ asit türleri ve % oranlarına bakılarak istatistiki analizler yapılmış, aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Statistica istatistik programında küme analizi yapılarak kiraz izolatları arasında farklılık oranları belirlenmiştir.

Bakteri hücreesindeki yağ asitlerinin izolasyonu: Tryticase soy broth agar (TSBA) (30.0 g Tryticase soy broth (BBL# 11768), 15.0 g Agar, 1000 ml distile su otoklav edilmiş ve petrilere dökülmüştür) besi yerine 4 fazlı şekilde çizilen izolatlar 25 °C' de 24 saat geliştirilmiştir. Geliştirilen bakterinin 3. ve 4. Fazından toplanarak ağızı teflon kapaklı steril cam tüplere konmuştur. Hücreleri parçalamak için her bir test tüpüne 1 ml çözelti 1' den (150 ml metil alkol, 150 ml distile su, 45 g sodium hidroksit) eklenmiştir. Tüpler 10 saniye çalkalandıktan sonar 100 °C' deki su banyosunda 5 dk bekletilmiştir. Çıkartılan tüpler tekrar 10 saniye daha çalkalanmıştır. Daha sonar 100 °C' deki su banyosunda 25 dk bekletilmiştir. Bu işlemle bakteri hücreleri parçalanarak yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır. Test tüplerine 2 ml çözelti 2' den (325 mL 6 N hidrolik asit, 225 ml metil alkol) eklenip 10 saniye çalkalandıktan sonar tüpler 80 °C' deki su banyosunda 10 dk. bekletilmiştir. Bunu takiben tüpler -20 °C' de 10 dk. tutulmuştur. Bu işlem ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenerek yağ asitlerinden yağ asit metil esteri elde edilmiştir. Bu durum yağ asitlerine yüksek sıcaklıkta buharlaşma özelliği kazandırmaktadır. Soğutulmuş tüplere 2.5 ml çözelti 3 ( 200 ml methyl-tert-butly ether, 200 ml hexane) eklenerek 5 dk. boyunca tüpler çalkalanmıştır. Bu aşamada tüplerin alt kısmında asidik, üst kısmında da organic sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluşmuştur. Pastor pipet kullanılarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılmış ve organic faz toplanmıştır. En son aşamada ise her tüpe 3 ml çözelti 4 (10.8 g sodium hidroksit, 900 ml distile su) ilave edilerek 5 dk. çalkalanmıştır. Daha sonra tüpler 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözelti 4 bazik bir solüsyon olup serbest yağ metil esterlerinin daha fazla saf olarak elde edilmesini sağlar. Bu aşamadan sonra tüpler içerisinde yine iki farklı faz oluşmuştur. Üst fazda toplanan yağ asit metil esterlerini içeren faz, pastör pipet ile alınarak 2 ml' lik gaz kromatografisi tüplerine aktarılmış ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Tüpler MIS cihazı (HP6890, Hewlettpackard, Palo Alto, CA) üzerindeki örnek depolama birimine yerleştirilmiş ve daha sonra Mikrobiyal Identification Sistemin (MIS)

bilgisayar paket programı kullanılarak (Sherlock MIS version 4.5 Microbial ID. Inc. Newark, Delaware) her izolat tanılanmıştır.

## **4. BULGULAR VE TARTIŞMA**

### **4.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi**

Tekirdağ ilinde 9 farklı yörede Barboros, Çanakçı, Karahisarlı, Kumbağ, Marmaraereğlisi, Merkez, Mermer, Naip, Yeniçiftlik kiraz üretim alanlarına 2014 ve 2015 yılının Mart-Haziran aylarında arazi çıkışları 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 gözlenmiştir. Hastalık etmeni yapraklarda koyu kahverengi, daireselden düzensiz şekillere kadar ve bazı zamanlarda sarı hale ile çevrili lekelerle neden olur. Lekeler büyüyerek birleşmekte ve daha büyük ölü alanlar meydana getirmekte, lekelerin merkezleri dökülerek saçma ile delinmiş bir görüntü almaktadır. İnfekteli ağaçlarda yaprak ve çiçek demetleri baharda açılmamakta ve ölmektedir. Üretim sezonunda meydana gelen enfeksiyonlarda çiçek demetleri baharda açmakta fakat yaz başlarında ölmekte, yapraklar solmakta ve meyveler kurumaktadır. Hastalığın en belirgin belirtisi ise ağaçlarda parlak görünümlü zank salgılanması ve sağlam dokulardan daha



koyu kahverengi ve hafif çökük kanser yapılarıdır (Şekil 4.1). Kanserli bölgedeki kabuk dokusunun rengi parlak portakal renginden kahverengiye kadar değişir. 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. Kiraz meyvelerinde ise lekeler başlangıçta su emmiş şeklinde olduğu belirlenmiştir. Hastalıktan etkilenmiş olan meyvelerin yüzeylerinde çukurlar meydana getirmiştir. Meyve sapları ise kahverengi ve su emmiş leke şeklinde görülmüştür.



**Şekil 4.1.** Kiraz dal kanseri hastalığının neden olduğu zamklanma

#### **4.2. Hastalık etmeninin izolasyonu**

Tekirdağ çevresinde bakteriyel kanser belirtisi gösteren 150 adet bitki örneğinin hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içeren parçalardan King B besi yerine yapılan izolasyonlarda 2-3 gün içinde krem-beyaz renkte ve floresan tipte kolonilerden 400 adet bakteri izolatu elde edilmiş ve tanı testleri yapılmak için tesadüfi olarak Çizelge 4.1’de de listelenen 60 adet izolat kullanılmıştır. Bu izolatlar YDCA besi yerine çizimleri yapılarak tanı çalışmaları yapılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

**Çizelge 4. 1.** Tanı çalışmaları için seçilen kiraz izolatları

| İzolatlar  | İzole edildiği yer | İzolatlar         | İzole edildiği yer   |
|------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Naip 1/1   | Naip-Tekirdağ      | Kumbağ 1/2        | Kumbağ-Tekirdağ      |
| Naip 1/2   | Naip-Tekirdağ      | Kumbağ 3/1        | Kumbağ-Tekirdağ      |
| Naip 1/3   | Naip-Tekirdağ      | Kumbağ 3/2        | Kumbağ-Tekirdağ      |
| Naip 1/4   | Naip-Tekirdağ      | Karahisarlı 1/1   | Karahisarlı-Tekirdağ |
| Naip 2/1   | Naip-Tekirdağ      | Karahisarlı 1/2   | Karahisarlı-Tekirdağ |
| Naip 2/2   | Naip-Tekirdağ      | Karahisarlı 1/3   | Karahisarlı-Tekirdağ |
| Naip 2/3   | Naip-Tekirdağ      | Çanakçı 1/1       | Çanakçı-Tekirdağ     |
| Naip 2/4   | Naip-Tekirdağ      | Çanakçı 1/2       | Çanakçı-Tekirdağ     |
| Naip 2/5   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 1/1      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 3/1   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 1/2      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 3/2   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 1/3      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 3/3   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 1/4      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 4/1   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 1/5      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 4/2   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 2/1      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 5/1   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 2/2      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 5/2   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 2/3      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 6/1   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 3/1      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 6/2   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 3/2      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Naip 6/3   | Naip-Tekirdağ      | Barbaros 3/3      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Mermer 1/1 | Mermer-Tekirdağ    | Barbaros 3/4      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Mermer 1/2 | Mermer-Tekirdağ    | Barbaros 3/5      | Barbaros-Tekirdağ    |
| Mermer 1/3 | Mermer-Tekirdağ    | Kumbağ 2/1        | Kumbağ-Tekirdağ      |
| Mermer 1/4 | Mermer-Tekirdağ    | Kumbağ 2/2        | Kumbağ-Tekirdağ      |
| Mermer 1/5 | Mermer-Tekirdağ    | Kumbağ 2/3        | Kumbağ-Tekirdağ      |
| Merkez 1/1 | Merkez-Tekirdağ    | Kumbağ 2/4        | Kumbağ-Tekirdağ      |
| Merkez 1/2 | Merkez-Tekirdağ    | Marmaraeğlisi 1/1 | M.ereğlisi-Tekirdağ  |
| Merkez 2/1 | Merkez-Tekirdağ    | Marmaraeğlisi 1/2 | M.ereğlisi-Tekirdağ  |
| Merkez 2/2 | Merkez-Tekirdağ    | Yeniçiftlik 1/1   | Yeniçiftlik-Tekirdağ |
| Merkez 2/3 | Merkez-Tekirdağ    | Yeniçiftlik 1/2   | Yeniçiftlik-Tekirdağ |
| Kumbağ 1/1 | Kumbağ-Tekirdağ    | Yeniçiftlik 2/1   | Yeniçiftlik-Tekirdağ |

#### 4.3. Patojenite testinde kullanılan bakteri popülasyonunun hesaplanması

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

#### 4.4. Patojenite testi

Hastalıklı kiraz dokularından izole edilen ve tanı çalışmasında kullanılan 52 bakteri izolatu ve referans kültür King B besi yerinde geliştirilen 24 saatlik bakteri izolatlarının  $7 \times 10^8$  hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonları hazırlanmıştır. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe bitkileri Demonstrasyon Kiraz bahçesinde toplanan çiçek, sürgün ve meyvelere inokulasyon yapılmış ve 25°C ve %70 nem içeren sera bölümünde 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 60 adet bölge izolatu ve referans kültür ile yapılan patojenite testlerinde tüm izolatlar inokulasyondan sonra 8-10 gün içerisinde kiraz çiçek (Şekil 4. 2) yanıklığa neden olmuştur. Sürgün demetlerinde yapılan inokulasyonlar sonucunda 10-15 gün içerisinde sürgün yapraklarında kahverengileşme, içe doğru kıvrılma ve yanıklık belirtileri ortaya çıkmıştır. Negatif kontrol olarak steril su ile çiçek, sürgün ve meyve inokulasyonlarında ise herhangi bir belirti gözlenmemiştir.



Şekil 4.2.

İnokulasyondan sonra çiçeklerde oluşan yanıklık

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 simptonu gösteren bitkilerden yapılan re-izolasyonlar sonucu seçilen 60 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 60 adet bölge izolatu ve bir referans izolat olmak üzere 61 adet re-izolatla yapılan tanı çalışmaları sonucunda tüm izolatların koloni morfolojilerinin benzer olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

**King B Besi Yerlerinde Koloni Gelişimi:** Elde edilen re-izolatlar King B besisi yerinde krem renkli floresan koloni gelişimi göstermiştir.

**Potasyum Hidroksit Testi (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi:** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* re-izolatları ve referans izolatla yapılan KOH testi sonucunda özeye yapışarak mukoid bir yapı oluşturmamasından dolayı gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). Karşılaştırma kültürü olarak kullanılan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'de ise sümüksü bir yapı gözlenmemiş olmasından dolayı gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.

**Levan Oluşumu:** SNA besisi yerine çizimi yapılan kiraz re-izolatları ve referans kültürde levan tipi beyaz, mukoid, tümsek şeklinde koloni oluşmuştur (Çizelge 4.2). Pozitif kontrol olarak *Erwinia amylovora* 57 izolatu'nun kolonileri bu besisi yerinde inci gibi beyaz ve tümsek şeklinde gelişmiştir.

**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 4.2). Oksidaz pozitif özellikteki *Pseudomonas cichorii* kültürü çalışmada kullanılmıştır ve mor renkte bir değişime neden olmuştur.

**Pektolitik Aktivite Testi:** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* re-izolatları ve referans izolatu'nun hiçbir pektolitik enzim üretmediğinden patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük belirtisi oluşturmamıştır (Çizelge 4.2). İzolatların patatesteki pektolitik aktivite negatif olup, kontrol olarak kullandığımız referans izolat *Pectobacterium carotovorum* çalışmada kullanılmış ve patates dokularında çürümeye neden olmuştur.

**Arginin Dehidrolaz Testi:** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* re-izolatları ve referans izolatu'nun 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 4.2).

**Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi:** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* re-izolatları ve referans izolatu'nun 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* izolatu kullanılmıştır (Çizelge 4.2).

#### 4.6. GATTa Testi

**Jelatin hidrolizi:** *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv.*morsprunorum* 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 4.2).

**Esculin hidrolizi:** *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv.*morsprunorum* re- 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 4.2).

**Karbon kaynaklarının 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 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g KCl, 0.2 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 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 7 pH 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 aşılanmış ve 24–27°C’de tüpler inkübe edilmiştir. Asit oluşan tüplerde renk değişimi olmuş (sarıya dön) ve değişim pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schaad et al., 2001).

**Karbon kaynaklarının kullanımı:** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* re- izolatları ve referans izolat tartaric acid ve tyrosin içeren besi yerlerine çizilmiş ve 24–27°C’de tüpler inkübe edilmiştir. Asit oluşan tüplerde renk değişimi olmamış ve sonuç negatif olarak değerlendirilirken *Pseudomonas syringae* pv. *morspurunorum* izolatlarında ise renk değişimi olmasından dolayı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2’de de görüldüğü üzere izolatların tanılama çalışmalarında kullanılan klasik yöntemlerden LOPAT karakterizasyonuna göre izolatların tamamı +,-,-,-,+ özellikler göstererek *Pseudomonas syringae* olduğu ortaya konulmuştur.

Re-izolatlar GATTa testi sonucunda iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup içerisinde yer alan 28 izolatın (Naip 3/1, Naip 3/2, Naip 3/3, Naip 4/1, Naip 4/2, Naip 5/1, Naip 5/2, Naip 6/1, Naip 6/2, Merkez 1/1, Merkez 1/2, Merkez 2/1, Merkez 2/2, Merkez 2/3, Kumbağ 1/1, Kumbağ 1/2, Kumbağ 2/1, Kumbağ 3/1, Kumbağ 3/2, Karahisarlı 1/1, Kirahisarlı ½, Karahisarlı 1/3, Çanakçı 1/1, Çanakçı ½, Barbaros 1/1, Kumbağ 2/2, Kumbağ 2/3, Kumbağ 2/4) GATTa sonuçları -, -, +, + olarak belirlenmiş ve bunların *Pseudomonas syringae* pv.*morsprunorum* olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 32 izolatın (Naip 1/1, Naip 1/2, Naip 1/3, Naip 1/4, Naip 2/1, Naip 2/2, Naip 2/3, Naip 2/4, Naip 2/5, Naip 6/3, Mermer 1/1, Mermer 1/2, Mermer 1/3, Mermer 1/4, Mermer 1/5, Barbaros 1/2, Barbaros 1/3, Barbaros 1/4, Barbaros 1/5, Barbaros 2/1, Barbaros 2/2, Barbaros 2/3, Barbaros 3/1, Barbaros 3/2, Barbaros 3/3, Barbaros 3/4, Barbaros 3/5, Marmaraereğlisi 1/1, Marmaraereğlisi 1/2, Yeniçiftlik 1/1, Yeniçiftlik 1/2, Yeniçiftlik 2/1) ise GATTa sonuçları +, +, -, - olarak saptanmış izolatların *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* olarak tanıları yapılmıştır. Benzer olarak Ivanovic ve ark. (2009), Kaluzna ve ark. (2010), Gavriloviç ve ark. (2012), Ertimurtaş ve ark. (2014) ve Bülbül (2014) gibi bir çok araştırmacıda izolatlarının tanısında GATTa testinin kullanılmasının uygun olacağını belirtmişler ve elde ettiğimiz sonuçlar bu araştırmacılar çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

**Çizelge 4.2.** Bakteri izolatlarının test sonuçları

| İzolat Adı      | Gram Reaksiyon | Flouresan Pigmentasyon | L | O | P | A | T | G | A | T | Ta | PCR        |             | Tanı Sonucu |
|-----------------|----------------|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|------------|-------------|-------------|
|                 |                |                        |   |   |   |   |   |   |   |   |    | <i>cfl</i> | <i>syrB</i> |             |
| Naip 1/1        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 1/2        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 1/3        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 1/4        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 2/1        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 2/2        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 2/3        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 2/4        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 2/5        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Naip 3/1        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 3/2        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 3/3        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 4/1        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 4/2        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 5/1        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 5/2        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 6/1        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 6/2        | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Naip 6/3        | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Mermer 1/1      | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Mermer 1/2      | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Mermer 1/3      | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Mermer 1/4      | -              | +                      | - | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Mermer 1/5      | -              | +                      | - | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Merkez 1/1      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Merkez 1/2      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Merkez 2/1      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Merkez 2/2      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Merkez 2/3      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Kumbağ 1/1      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Kumbağ 1/2      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Kumbağ 2/1      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Kumbağ 3/1      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Kumbağ 3/2      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Karahisarlı 1/1 | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Karahisarlı 1/2 | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Karahisarlı 1/3 | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Çanakçı 1/1     | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Çanakçı 1/2     | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Barbaros 1/1    | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Barbaros 1/2    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 1/3    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 1/4    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 1/5    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 2/1    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 2/2    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 2/3    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 3/1    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 3/2    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 3/3    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 3/4    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Barbaros 3/5    | -              | +                      | + | - | - | - | + | + | + | - | -  | -          | +           | Pss         |
| Kumbağ 2/2      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Kumbağ 2/3      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |
| Kumbağ 2/4      | -              | +                      | + | - | - | - | + | - | - | + | +  | +          | -           | Psm         |

|                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| M.ereğlisi 1/1  | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| M.ereğlisi 1/2  | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Yeniçiftlik 1/1 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |
| Yeniçiftlik 1/2 | - | + | + | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + | Pss |

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*

#### 4. 7. Bakteri İzolatlarının PCR Testiyle Tanısı

DNA izolasyonu işleminden sonra elde edilen genomik DNA'lar %1'lik agaroz jele verildiğinde oluşan bantlar oluşmasına göre değerlendirilmiştir.

Saflaştırılan genomik DNA'lar ile yapılan B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR testlerinde 32 re-izolatın (Naip 1/1, Naip 1/2, Naip 1/3, Naip 1/4, Naip 2/1, Naip 2/2, Naip 2/3, Naip 2/4, Naip 2/5, Naip 6/3, Mermer 1/1, Mermer 1/2, Mermer 1/3, Mermer 1/4, Mermer 1/5, Barbaros 1/2, Barbaros 1/3, Barbaros 1/4, Barbaros 1/5, Barbaros 2/1, Barbaros 2/2, Barbaros 2/3, Barbaros 3/1, Barbaros 3/2, Barbaros 3/3, Barbaros 3/4, Barbaros 3/5, Marmaraereğlisi 1/1, Marmaraereğlisi 1/2, Yeniçiftlik 1/1, Yeniçiftlik 1/2, Yeniçiftlik 2/1) %1.5 agaroz jel üzerinde oluşturdukları 752 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur. Moleküler ağırlık işaretleyicisi olarak kullanılan 100 bp'lik marker PCR ürününün 752 bp büyüklüğünde olduğu görülmüştür. B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 28 adet izolatın *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* olduğu belirlenmiştir. CFLF-CFLR primerleri ile yapılan PCR çalışmasında ise re-izolatların 28 adedi (Naip 3/1, Naip 3/2, Naip 3/3, Naip 4/1, Naip 4/2, Naip 5/1, Naip 5/2, Naip 6/1, Naip 6/2, Merkez 1/1, Merkez 1/2, Merkez 2/1, Merkez 2/2, Merkez 2/3, Kumbağ 1/1, Kumbağ 1/2, Kumbağ 2/1, Kumbağ 3/1, Kumbağ 3/2, Karahisarlı 1/1, Karahisarlı 1/2, Karahisarlı 1/3, Çanakçı 1/1, Çanakçı 1/2, Barbaros 1/1, Kumbağ 2/2, Kumbağ 2/3, Kumbağ 2/4) %1.5 agaroz jel üzerinde 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 650 bp baz uzunluğunda bant oluşturarak *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen re-izolatların tanısında moleküler yöntemlerle desteklenmesinin gerektiği birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir. İki farklı primer dizilimi olan *syr* ve *cfl* kullanılarak yapılan PCR çalışmaları sonucunda elde edilen re-izolatların iki farklı tür olduğu saptanmıştır. İzolatların 28 tanesi *cfl* genine göre dizayn edilen primerlere reaksiyon verirken 32 adet izola ise *syrB* genine göre dizayn edilen primerlerle reaksiyon vermiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda elde edilen veriler GATTA testinden elde edilen sonuçlar benzerlik göstermiştir. *cfl* genine göre reaksiyon veren ve 650 bp baz uzunluğunda ürün



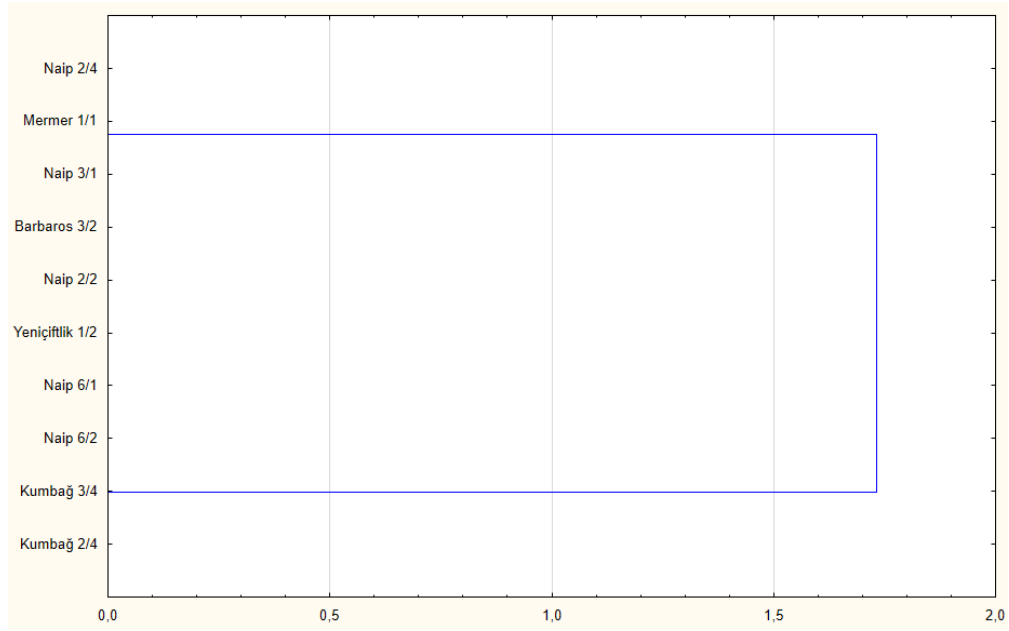
veren izolatların *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanılanırken, *syrB* genine reaksiyon veren ve 752 bp baz uzunluğunda tekrarlanabilen bantlar oluşturan izolatlar ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar ile Abbasi ve ark. (2012), Albelleria ve ark. (2014) ve Bülbül (2014) çalışmalarına benzerlik göstermektedir.

#### 4.8. BOX-PCR İle İzolatların Genotipik Karakterizasyonu

İzolatlar arası genetic benzerlik çalışmasında BOX-PCR' dan faydalanılmıştır. Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, Tekirdağ Bölgesi kiraz izolatları ile yapılan BOX-PCR çalışmalarında, izolatların tümünde 450, 1050 ve 1075 bp'lik bantlar elde edilmiştir. 1150, 1250 ve 1300 bp'lik bantlar 3 farklı izolatta tespit edilmiştir. Yapılan istatistiki analizler sonucunda iolatları arasında bant farklılıklarının az olmasından dolayı Şekil 4.1'de de görüldüğü üzere aralarındaki farklar belirlenememiştir.

**Çizelge 4.3.** Tekirdağ Bölgesi kiraz izolatlarıyal yapılan BOX-PCR sonucu oluşan bant kompozisyonu

| İzolatlar | Oluşan Bantlar (bp) |         |         |         |         |         |
|-----------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|           | 450 bp              | 1050 bp | 1075 bp | 1150 bp | 1250 bp | 1300 bp |
| 21/2      | +                   | +       | +       | +       | +       | +       |
| 16/1      | +                   | +       | +       | +       | +       | +       |
| 11/1      | +                   | +       | +       | -       | -       | -       |
| 19/1      | +                   | +       | +       | -       | -       | -       |
| 25/5-3    | +                   | +       | +       | -       | -       | -       |
| 15/1      | +                   | +       | +       | +       | +       | +       |
| 20/2      | +                   | +       | +       | -       | -       | -       |
| 20/1      | +                   | +       | +       | -       | -       | -       |
| 14/1      | +                   | +       | +       | -       | -       | -       |
| 14/2      | +                   | +       | +       | -       | -       | -       |



**Şekil 4.3.** Tekirdağ Bölgesi kiraz izolatlarının BOX-PCR'a göre oluşturduğu genotipik farklılık

#### 4.9. Bakteri İzolatlarının Yağ Asit Profillerine Göre Fenotipik Karakterizasyonu

Sekiz adet bölge izolatu ile yapılan tümhücre yağ asit analizlerine göre izolatlar %61-90 arasında değişen oranlarda *Pseudomonas syringae* pv *syringae* oldukları belirlenmiştir. Yapılan tüm yağ asit analizleri sonucunda *Pseudomonas syringae* pv *syringae* oldukları saptanarak izolatların tanıları desteklenmiştir.

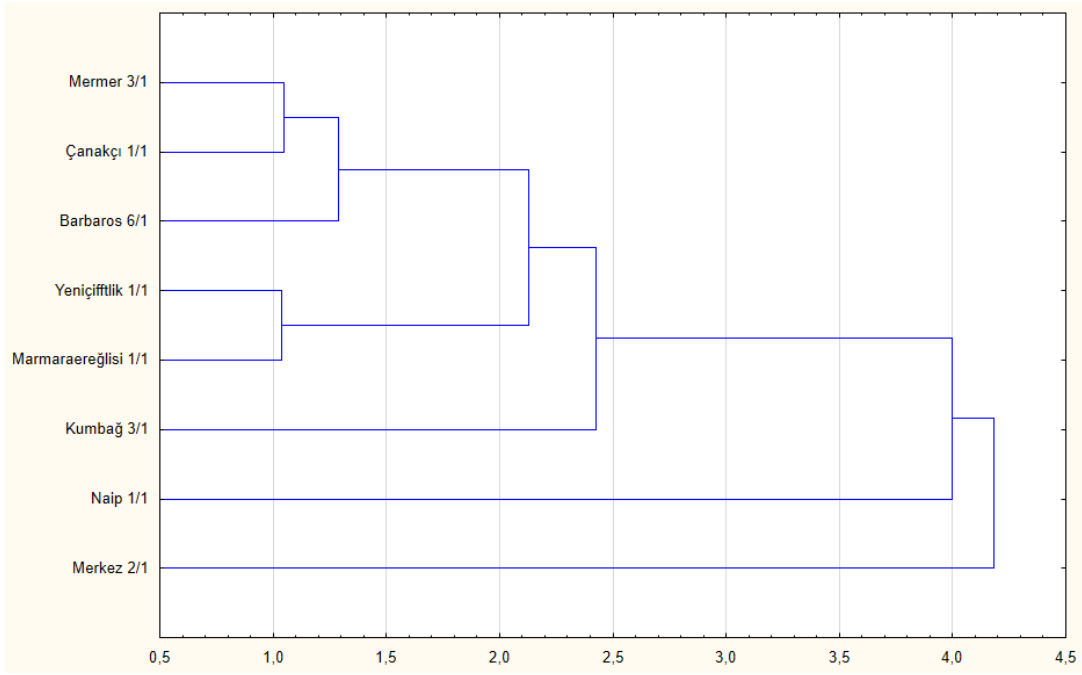
Çizelge 4.4'de de görüldüğü üzere Marmara bölgesinden elde edilen izolatlar arasından tesadüfi olarak her bölgeyi temsil edecek şekilde seçilen izolatların yağ aside kompozisyonu görülmektedir. Kirazlarda dal kanserine neden olan *Pseudomonas syringae* pv *syringae* izolatlarından 36 adet farklı yağ aside elde edilmiştir. İzole edilen yağ asitleri doymuş (10:0, 11:0, 12:0, 13:0, 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, ve 19:0), doymamış (16:1 w5c, 17:0 w8c, 18:1 w5c, 18:1 w7c 11-methyl20:1 w7c ve 20:4 w6, 9, 12, 15c), hidroxy asit (10: 2OH, 10:0 3OH, 11:0 2OH, 11:0 3OH, 12:0 2OH, 12:0 3OH ve 15:0 2OH) methyl branched (11:0 ISO 3OH, 13:0 ISO, 16:0 ISO, 17:0 ISO, 17:0 ANTEISO ve 18:0 ISO), cyclopropane (17:0 CYCLO ve 19:0 CYCLO w8c) 6 tane Sum in features (2, 3, 5, 6, 7, 8) olmak üzere 6 grup olduğu belirlenmiştir. Genelde izolatların yağ aside çeşidi ve miktarı açısından büyük benzerlik olduğu görülmektedir. 10:012:0, 12:0 2OH, 12:0 3OH, 14:0, 16:0, 16:0 ISO, 16:1 w5c, 17:0, 17:0 ISO, 17:0 CYCLO, 17:0 w8c, 18:1 w5c Sum in Feature 3 (16:1 w7c/16:1 w6c) yağ asitlerinin tüm izolatlarda bulunduğu belirlenmiştir. Diğer yağ asit açısından değişen oranlarda farklılıklar elde edilmiştir.

Yağ asitlerinin bulunuşları ve miktarları göz önüne alınarak yapılan küme analizlerinde kirazlarda dal kanserine neden olan Tekirdağ kiraz izolatları 2 ana küme oluşturmuşlardır (Şekil 4.4) birinci grup içerisinde (Mermer 1/3, Çanakçı 1/1, Barbaros 2/1, Yeniçiftlik 1/1,

Marmaraereğlisi 1/1, Kumbağ 3/1 ve Naip 1/1) 7 izolat yer alırken ikinci grup içerisinde (Merkez 2/1) bir adet izolat yer almıştır. Tekirdağ ili kiraz üretim alanlarından ele edilen izolatların yağ asitlerine dayanana küme analizlerine göre birbirinden en uzak türü %96 oranında fenotipik olarak benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** Tekirdağ Bölgesi kiraz izolatlarından elde edilen yağ asidi kompozisyonu

| Yağ Asidi           | İzolat Sayısı                | Dağılım Aralığı | Ortalama | Standart Sapma |
|---------------------|------------------------------|-----------------|----------|----------------|
| 10:0                | 8                            | 0.13-0.17       | 0.15     | 0,01           |
| 10:0 2OH            | 7                            | 0.06-2.72       | 0.45     | 1.00           |
| 10:0 3OH            | 7                            | 2.62-3.21       | 2.80     | 0.19           |
| 11:0                | 5                            | 0.05-0.06       | 0.06     | 0.01           |
| 11:0 2OH            | 6                            | 0.06-0.09       | 0.08     | 0.01           |
| 11:0 ISO 3OH        | 6                            | 0.06-0.19       | 0.10     | 0.05           |
| 11:0 3OH            | 6                            | 0,11-0,19       | 0,16     | 0,03           |
| 12:0                | 8                            | 4,91-6,09       | 5,27     | 0,35           |
| 12:0 2OH            | 8                            | 2,93-3,46       | 3,10     | 0,17           |
| 12:0 3OH            | 8                            | 4,61-5,62       | 4,90     | 0,32           |
| 13:0                | 7                            | 0,09-0,13       | 0,11     | 0,01           |
| 13:0 ISO            | 5                            | 0,04-0,12       | 0,07     | 0,03           |
| 14:0                | 8                            | 0,23-0,30       | 0,27     | 0,02           |
| 15:0 2OH            | 1                            | 0,07            | -        | -              |
| 16:0                | 8                            | 21,90-25,42     | 23,33    | 1,12           |
| 16:0 ISO            | 8                            | 0,10-0,21       | 0,16     | 0,04           |
| 16:1 w5c            | 8                            | 0,09-0,10       | 0,09     | 0,00           |
| 17:0                | 8                            | 0,36-0,50       | 0,43     | 0,05           |
| 17:0 ISO            | 8                            | 0,16-0,82       | 0,45     | 0,29           |
| 17:0 ANTEISO        | 5                            | 0,16-0,23       | 0,17     | 0,06           |
| 17:0 CYCLO          | 8                            | 2,08-3,14       | 2,56     | 0,38           |
| 17:0 w8c            | 8                            | 0,19-0,24       | 0,22     | 0,02           |
| 18:0                | 7                            | 0,61-1,23       | 0,97     | 0,20           |
| 18:0 ISO            | 4                            | 0,06-0,10       | 0,08     | 0,02           |
| 18:1 w5c            | 8                            | 0,08-0,10       | 0,09     | 0,01           |
| 18:1 w7c 11-Methyl  | 7                            | 0,18-0,59       | 0,32     | 0,14           |
| 19:0                | 6                            | 0,05-0,07       | 0,06     | 0,01           |
| 19:0 CYCLO w8c      | 7                            | 0,11-0,16       | 0,13     | 0,02           |
| 20:1 w7c            | 5                            | 0,06-0,10       | 0,08     | 0,02           |
| 20:4 w6, 9, 12, 15c | 7                            | 0,06-0,09       | 0,07     | 0,01           |
| Sum In Feature 2    | 1                            | 0,05            | -        | -              |
| Sum In Feature 3    | 8                            | 32,81-36,75     | 34,49    | 1,19           |
| Sum In Feature 5    | 6                            | 0,04-0,07       | 0,06     | 0,01           |
| Sum In Feature 6    | 2                            | 0,04-0,04       | 0,04     | 0,00           |
| Sum In Feature 7    | 7                            | 1,02-1,53       | 1,23     | 0,16           |
| Sum In Feature 8    | 8                            | 15,34-19,85     | 18,22    | 1,46           |
| Summed Feature 2    | 12:0 ALDEHYDE/unknwn 10.9525 |                 |          |                |
| Summed Feature 3    | 16:1 w7c/16:1 w6c            |                 |          |                |
| Summed Feature 5    | 18:0 ANTE/18:2 w6,9c         |                 |          |                |
| Summed Feature 6    | 19:1 w11c/19:1 w9c           |                 |          |                |
| Summed Feature 7    | 19:1 w7c/19:1 w6c/19:1 19cy  |                 |          |                |
| Summed Feature 8    | 18:1 w7c                     |                 |          |                |



**Şekil 4.4.** *Pseudomonas syringae* izolatlarının tüm hücre yağ asidi içeriğine göre oluşturduğu fenotipik farklılık

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında Tekirdağ ilinde kiraz üretimin yapıldığı Naip, Merkez, Mermer, Marmaraeğlisi, Yeniçiftlik Kumbağ, Karahisarlı, Çanakçı, Barbaros yörelerinde 23 adet kiraz alanı ziyaret edilmiş ve 135 adet ağaçtan hastalık şüphesiyle örnek toplanmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen 400 adet bakteri izolatının elde edilmiştir.

Elde edilen izolatların izolatların *Pseudomonas syringae* olduğu LOPAT, patojenite, GATTA testleri gibi klasik tanı testleri yapılarak belirlenmiştir.

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

İzolatların genotipik karakterizasyonunda BOX-PCR'da oluşan polimorfizmden faydalanılmıştır.

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

Kiraz bahçerine yapılan surveylerde, budanan hastalıklı dalların bahçe içerisinde bırakıldığı görülmüştür. Bahçedeki bu hastalıklı dalların etmenin bir sonraki döneme taşınmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan survey sonucu elde edilen izolatların çeşitli testlerle tanısı yapılmış ve bölgede hastalığa neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* pathovarlarının varlığı tespit edilmiştir.

Hastalıkla mücadele için 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](http://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 rekisyonları. 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, Baló 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.
- Lelliot 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*. 2<sup>nd</sup> 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](http://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.