



Classical and Molecular Diagnosis of *Pseudomonas syringae* Pathovars Causing Bacterial Canker on Stone Fruits

Damla ERTİMURTAŞ¹ Hatice ÖZAKTAN²

¹Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir
²Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir

ABSTRACT

15 *Pseudomonas syringae* (*Ps*) pathovars isolated from stone fruit trees such as peach, almond and cherry with bacterial cancer symptoms and kept in the Bacteriology laboratory stocks of Ege University Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection were identified based on LOPAT (levan, oxidase, potato rot pectolytic activity, arginin dihydrolase, hypersensitive reaction on tobacco leaves), GATTa (gelatin liquefaction, aesculin hydrolysis, tyrosinase activity, utilization of tartaric acid), utilization of carbon tests classical methods. In addition, pathogenicity, syringomycin production and ice nucleation activity (INA) were used for the identification. *Pseudomonas syringae* pathovars were identified by PCR that cannot be diagnosed with classical tests. Molecular diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) strains were based on syringomycin synthesis (*syfB*) and *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (*Psm*) strains were based on coronatine synthesis (*cfl*) were diagnosed using PCR. Also sequence analysis of 4 housekeeping genes (*cts*, *rpoD*, *gapA*, *gyrB*) were used to distinguish *Pss* and *Psm*. As a result of classical and molecular identification 9 of 15 *Ps* pathovars were identified as *Pss*.

Keywords: Stone fruits, *Pseudomonas syringae*, Bacterial disease, Identification, PCR

ÖZ

Sert Çekirdekli Meyvelerde Bakteriyel Kansere Neden Olan *Pseudomonas syringae* Pathovarlarının Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Tanısı

Bakteriyel kanser belirtisi görülen şeftali, badem ve kiraz gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilmiş ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakterioloji laboratuvar stoklarına alınmış 15 *Pseudomonas syringae* (*Ps*) pathovarlarının LOPAT (levan oluşumu, oksidase, patatestte pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu), GATTa (jelatinin hidrolizi, aesculinin hidrolizi, tirozin aktivitesi, tartaric acid), karbon kaynaklarının kullanımı klasik tanı testleri ile tanısı yapılmıştır. Ayrıca patojenite, *in-vitro*'da syringomycin üretimi ve buz çekirdeği oluşturma aktivitesi (INA) tanı testleri yapılmıştır. Klasik tanı testleri sonucunda kesin tanısı yapılamayan *Pseudomonas syringae* pathovari izolatlarının moleküler tanısı yapılmıştır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*)'nin syringomycin sentezinden sorumlu *syfB* geni ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (*Psm*)'un coronatine sentezinden sorumlu *cfl* geni klasik PCR ile belirlenmiştir. *Pss* ve *Psm*'nin ayırt edilmesinde 4 housekeeping geni (*cts*, *rpoD*, *gapA*, *gyrB*) sekans analizleri yapılmıştır. Klasik ve moleküler tanı sonucunda 15 *Ps* pathovarının 9'u *Pss* olarak kesin tanısı yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sert çekirdekli meyveler, *Pseudomonas syringae*, Bakteriyel hastalık, Tanılama, PCR

GİRİŞ

Ülkemiz sert çekirdekli meyve üretimi açısından büyük önem taşımaktadır. 2018 yılı verilerine göre Türkiye'de sert çekirdekli meyve üretimi toplam 2,575,899 tondur (FAO, 2018). Ancak, sert çekirdekli meyve üretimini tehdit eden sorunların başında bakteriyel hastalıklar gelmektedir. Bakteriyel hastalıklar verimde düşüş, kalitesiz meyve oluşumu hatta ağaçların tamamen kuruması sonucunda önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Sert çekirdekli meyvelerde *Pseudomonas*

syringae'nin (*Ps*) üç pathovari bakteriyel kansere yol açmaktadır. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*), ticari olarak yetiştirilen hemen hemen her meyvede, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (*Psm*) kiraz, vişne ve erikte, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* (*Psp*) ise şeftalide *Pss* ve *Psm* ile benzer belirtileri oluşturmaktadır (Agrios, 2005). Ülkemizde bakteriyel kanser ve zamklanma hastalığını oluşturan *Pss* tüm bölgelerimizde; *Psm* ise Marmara ve Ege bölgesinde görülmektedir (Anonim, 2008). Bu hastalığın konukçularının çok oluşu, belirti oluşturmada sistemik enfeksiyonlara yol açması ve patojenin konukçu ve konukçusu olmayan bitkilerde epifitik olarak gelişmesi hastalıkla ilgili çalışmalarını güçleştirmektedir (Kennelly ve ark., 2007).

Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel kanser hastalık etmeni olan *Pss* ve *Psm*'nin teşhis ve karakterizasyonu

Article Info / Makale Bilgileri

Corresponding author e-mail: ertimurtasdamla@gmail.com

Received: September 25, 2020 Accepted: December 2, 2020

ORCID ID's of Authors in order:

0000-0003-4987-6487, 0000-0001-9971-6508

İlk yazarın Yüksek Lisans tezi ürünüdür. 2019 yılında First International Molecular Plant Protection Congress'te sunulmuş ve özeti basılmıştır.

ile ilgili yapılan çalışmalarda klasik yöntemlerin yetersiz kalması nedeniyle klasik yöntemlerin yanı sıra, moleküler ve patolojik temelli fitotoksinlerinin dikkate alındığı tanılama stratejileri geliştirilmektedir. Son yıllarda, *Psm*'nin 1 ve 2 olarak tanımlanan 2 farklı irkinin bulunması bu etmenlerin sadece fizyolojik, biyokimyasal ve patojenisite testleri temelinde kesin tanısını yapmanın güçlüğünü ortaya koymaktadır (Gasic ve ark., 2012).

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakterioloji laboratuvarı stoklarında bulunan, daha önce şeftali ve kiraz gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarından bakteriyel kanser belirtilerinden izole edilmiş *Ps* izolatlarının klasik yöntemler, patojenisite ve moleküler yöntemlerle pathovar düzeyinde kesin tanısının yapılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışma materyalini, şeftali, badem, kiraz gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarında bakteriyel kanser belirtilerinden izole edilmiş ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakterioloji laboratuvarı stoklarına alınan, *Ps* izolatları oluşturmuştur. Onbeş *Ps* izolatı ve 3 referans izolat olmak üzere toplam 18 izolatla çalışılmıştır (Çizelge 1).

Yöntem

Pseudomonas syringae pathovarlarının tanısına dönük testler

Fizyolojik ve biyokimyasal testler

Pss ve *Psm* pathovarlarının birbirinden ayrımında biyokimyasal testler; King B besi yerinde floresan pigment oluşumu, LOPAT (levan oluşumu, oxidase, patatestte pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu testi) (Klement ve ark., 1966) ve GATTa (jelatinin hidrolizi, aesculinin hidrolizi, tyrosin aktivitesi, tartaric acid) testleri kullanılarak yapılmıştır. *Pss* ve *Psm* pathovarlarının birbirinden ayrımında, LOPAT, GATTa testleri, karbon kaynaklarının kullanımı (mannitol, sorbitol, inositol, erythritol, tartaric acid, lactic acid, tyrosin) testleri uygulanmıştır (Ayers ve ark., 1919; Obradovic, 2010; Schaad ve ark., 2001).

Buz çekirdeği oluşturma aktivitesinin saptanması (INA)

Katı King B besi yerinde 24-48 saatte gelişen bakteri kolonileri sıvı King B besi yerine inokule edilmiştir. 24-48 saat sonunda sıvı King B besi yerinde gelişen kültürlerden fosfat tamponu içeren (50 µM, 1 ml, pH = 7.0) tüplere 50 µl sıvı kültürden konulmuştur ve -5 °C'deki buz banyosunda 10 dk bekletilmiştir. 10 dk sonunda INA olan tüplerde donma ve buz oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bu test

sonucunda; *Pss* için buz oluşturma aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

In-vitro'da syringomycin üretiminin saptanması

Ps izolatları, KB besi yerinde geliştikten sonra, syringomycin üretiminin saptanması için Potato Dextrose Agar (PDA) besi yerine nokta ekim yapılmıştır. 25–28 °C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda *Rhodotorula pilimanae* izolat MUCL 30397 (Dr. Monika Kaluzna, Sciernewicze Meyvecilik Araştırma Enstitüsü, Polonya'dan sağlanmıştır) PDA besi yerine ekilmiş ve 3–4 gün 23–24 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. *R. pilimanae*'den bir öze dolusu alınıp 100 ml steril saf suya konularak süspansiyon hazırlanmıştır. 4 günün sonunda PDA besi yerinde gelişen bakterilere, indikatör organizma (*R. pilimanae*) ile hazırlanan süspansiyon (10^8 CFU/ml) püskürtülmüştür. 1–2 günlük inkübasyon sonunda *Pss* kolonilerinin etrafında fungusa karşı engelleme zonu oluşması beklenirken, *Psm* kolonileri için bu engelleme zonu oluşumu beklenilmemiştir (Xu ve Gross, 1988).

Patojenisite testi

Ps izolatlarının patojenisite testi ile ayırt edilmesinde test materyali olarak ham kiraz meyveleri (cv. Salihli) kullanılmıştır. Ham kiraz meyve testinde, kiraz meyveleri üzerindeki inokulasyon noktalarında *Psm* izolatları suda ıslanmış-haşlanmış gibi bir belirti oluştururken, *Pss* izolatları ise kahverengi-siyah çökük lezyonlar oluşturmaktadır (Akköprü, 2016). Ham kiraz meyveleri meyve tutumundan 10–20 gün sonra toplanmıştır. İnokulasyondan önce ham kiraz meyveleri steril sudan geçirilerek kurutulmuştur. Denemelerde 48 saat süreyle 24 °C'de besi yerinde gelişen bakteriyel patojenlerden steril suya süspansiyon hazırlanarak (10^9 CFU/ml), meyveler üzerinde steril iğne ile açılan 2 inokulasyon noktasına patojen bakteri süspansiyonu mikropipet yardımıyla 10 µl/işaretili alan olarak verilmiştir. Kiraz meyve testi, her bir patojen izolatı için her tekerrürde 1 meyve ve her meyvede 2 farklı inokulasyon noktası olmak üzere 8 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Pozitif kontrol olarak, daha önce kesin tanısı yapılmış olan bir *Pss* (RIPF mo *Pss*) ve *Psm* (RIPF 25 *Psm* 1, RIPF 77 *Psm* 2) izolatları kullanılmıştır. Negatif kontrol uygulamasında ise meyvelerde iğne ile açılan inokulasyon noktalarına steril su verilmiştir. Uygulama gören meyveler, sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmiş kapaklı plastik kutular içinde, çift katlı, nemlendirilmiş steril kurutma kağıtları üzerinde, yüksek oransal nem sağlanarak 24 °C'de 5–6 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen belirti tipine bakılarak *Ps* pathovarlarının ayrımı yapılmıştır.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan test patojeni bakterilere ilişkin bilgiler

İzolat No	İzolatın Adı	İzole Edildiği Yıl	İzole Edildiği Konukçu	İzole Edildiği Yer
1	P99	2009	Şeftali	Buruncuk, İzmir
2	P11/2	2009	Şeftali	Davutlar, Aydın
3	P29/2	2009	Şeftali	Avşar, Manisa
4	P32/2-b	2009	Şeftali	Dombaylı, Manisa
5	P39/3	2009	Şeftali	Kemalpaşa, İzmir
6	P95/2	2009	Şeftali	Ayrancılar, İzmir
7	P40/3	2009	Şeftali	Bigadiç, Çanakkale
8	P39/2 şeftali çiçek	2009	Şeftali	Kemalpaşa, İzmir
9	Badem	2010	Badem	Yalova
10	Da1	2010	Kiraz	Kemalpaşa, İzmir
11	Da2	2010	Kiraz	Kemalpaşa, İzmir
12	Da3(1)	2010	Kiraz	Kemalpaşa, İzmir
13	Da3(2)	2010	Kiraz	Kemalpaşa, İzmir
14	Da4	2010	Kiraz	Kemalpaşa, İzmir
15	Badem Yalova	2011	Badem	Yalova
16	RIPF mo <i>Pss</i>	2010	Referans kültür	Polonya
17	RIPF 25 <i>Psm 1</i>	2010	Referans kültür	Polonya
18	RIPF 77 <i>Psm 2</i>	2010	Referans kültür	Polonya

Moleküler tanılama

Sert çekirdekli meyve ağaçlarından elde edilen bakteri izolatlarının moleküler tanısı, biyokimyasal ve patojenisite testlerinden sonra, *Ps* pathovarlarının birbirinden ayırt edilmesinde önem taşıyan *syrB* (*syringomycin* sentezi), *cfl* (*coronatine* sentezi), *cts*, *rpoD*, *gyrB* ve *gapA* (*housekeeping* genler) genleri için spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2).

Pss'nin (*syrB* geni) ve *Psm*'nin (*cfl*) geninin moleküler tanısı Obradovic (2010)'a göre yapılmıştır.

PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde 100 Voltta 40 dk yürütülmüştür. *Psm* ırk1 tanısında *cfl* geni için 650 bç bant oluşumu beklenirken *Psm* ırk 2 için bant oluşumu beklenmemiştir. *Pss* tanısında *syrB* geni için 752 bç bant oluşumu beklenilmiştir (Janse, 2010; Obradovic, 2010).

PCR ürünlerinin sekans analizi ile belirlenmesi

Moleküler çalışmalarda kullanılan *cts*, *rpoD*, *gapA* ve *gyrB* genlerinin primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi sonucunda transilluminatörde gözlenen spesifik DNA bantları jelden ekstrakte edilip saflaştırılarak (DNeasy jel ekstraksiyon kiti, QIAGEN) sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizi ABD Oregon State Üniversitesi Biyolojik Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları

Kiraz, şeftali ve badem ağaçlarının farklı organlarından bakteriyel kanser şüphesi ile izole edilmiş 15 *Ps* pathovarı ve referans *Pss*, *Psm* ırk 1 ve ırk 2 izolatları ile yapılan LOPAT (+---+) testlerinde referanslara dayanılarak elde edilen sonuçlara göre P11/2, P29/2,

Çizelge 2. *syrB*, *cfl*, *cts*, *gapA*, *gyrB* ve *rpoD* genlerinin oligonükleotit dizilimi

Primer	Oligonükleotit Dizilimi	Baz Uzunluk (bç)	Literatür
<i>syr</i> B1 (F)	CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG	752	Sorensen ve ark., 1998
<i>syr</i> B2 (R)	TCGATTTTGCCGTGATGAGTC		
<i>cfl</i> Primer1 (F)	GGC GCT CCC TCG CAC TT	652	Obradovic, 2010;
<i>cfl</i> Primer 2 (R)	GGT ATT GGC GGG GG TGC		Schaad ve ark., 2001
<i>cts</i> (F)	AGTTGATCATCGAGGGCGCWGCC	542	
<i>cts</i> (R)	TGATCGGTTTTGATCTCGCACGG		
<i>gapA</i> (F)	CGCCATYCGCAACCCG	476	Sarkar ve Guttman, 2004
<i>gapA</i> (R)	CCCAYTCGTTGTCTGACCA		
<i>gyrB</i> (F)	MGGCGGYAAGTTTCGATGACAAYTC	507	
<i>gyrB</i> (R)	TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC		
<i>rpoD</i> (F)	AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG	575	
<i>rpoD</i> (R)	GGAACWKGCAGGAAGTCGGCACG		

Çizelge 3. *Pseudomonas syringae* izolatlarının LOPAT ve GATTa testlerine karşı reaksiyonları

İzolat adı	LOPAT sonuçları					GATTa sonuçları			
	L	O	P	A	T	Jelatin sivilaşması	Aesculin hidrolizi	Tyrosinase aktivitesi	Tartarate kullanımı
P99	+	+	-	-	-	+	-	-	-
P11/2	+	-	-	-	+	+	+	-	-
P29/2	+	-	-	-	+	+	+	-	-
P32/2-b	+	-	-	-	+	+	+	+/-	-
P39/3	-	-	-	-	+	-	+	-	-
P40/3	+	-	-	-	+	+	+	+	-
P95/2	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P39/2 şeftali çiçek	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Da1	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Da2	+	+	-	-	+	+	-	+	-
Da3(1)	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Da3(2)	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Da4	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Badem	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Badem Yalova	+	-	-	-	+	+	+	-	-
RIPF mo <i>Pss</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-
RIPF 25 <i>Psm1</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+
RIPF77 <i>Psm2</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>Pss</i> *	+	-	-	-	+	+	+/-	-	+/-
<i>Psm</i> *	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Psm</i> ırk 1*	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Psm</i> ırk 2*	-	-	-	-	-	-	+	-	+

*Referanslara dayanılarak elde edilen test sonuçlarıdır (Schaad ve ark., 2001).

P32/2-b, P40/3, Da3(1), Da3(2), P39/2 şeftali çiçek, Badem ve Badem Yalova izolatlarının *Ps* pathovarı olduklarına karar verilmiştir (Çizelge 3). P99, P39/3 (---+), P95/2 (----), Da1 (+----), Da2 (++---) ve Da4 (---) izolatlarının LOPAT testi sonuçlarındaki bazı farklılıklar nedeni ile *Ps* pathovarı olup olmadıkları konusunda kesin bir sonuca varılamamıştır.

LOPAT testi (Lelliot ve ark., 1987) bitki patojeni floresan *Ps*'nin diğer *Pseudomonas* türlerinden ayırt edilmesinde kullanılan önemli testlerdendir (Bultreys ve Kaluzna, 2010) ve sert çekirdekli meyve ağaçlarında bakteriyel kansere neden olan *Pss*, *Psm* ırk 1 ve *Psm* ırk 2'nin kesin tanısında uygulanan klasik tanı yöntemlerindedir (Kaluzna ve Sobiczewski, 2009). Çalışmamızda 9 *Ps* izolatı LOPAT testinde referans kültürler ile aynı sonuçları vermiş ve daha önce saptanan bulguları destekler bulunmuştur (Bultreys ve Kaluzna, 2010). LOPAT testi sonuçlarına göre 9 izolatın *Ps* olduğu belirlenirken *Pss* ve *Psm* olarak ayırt edilebilmeleri diğer biyokimyasal, patojenisite testleri ve moleküler tanılama yöntemleri ile yapılabilmektedir.

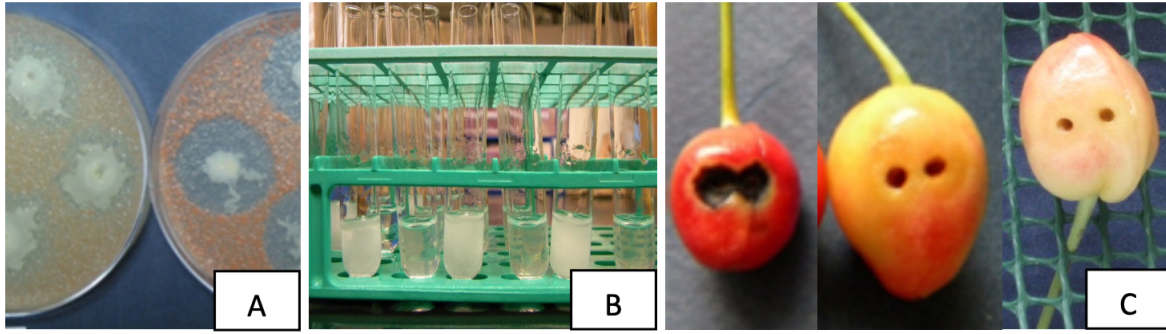
Psm ırk 1 ve ırk 2 ayırımında kullanılan GATTa [*Psm* ırk 1: GATTa (--++), *Psm* ırk 2: GATTa (-+-)] testlerinde referanslara dayanılarak elde edilen sonuçlara göre, bazı biyokimyasal testlerde sapmalar olmakla birlikte, Çizelge 3'de görüldüğü gibi P11/2, P29/2, P32/2-b, P40/3, Da3(1), Da3(2), Badem, Badem Yalova ve P39/2 şeftali çiçek izolatlarının *Pss* olduklarına karar verilmiştir. Diğer izolatların ise

LOPAT ve GATTa testleri sonuçlarındaki farklılıklarından dolayı *Psm* olup olmadıkları konusunda kesin karar verilememiştir.

Bultreys ve Kaluzna (2010) *Pss* ve *Psm* ırk 1'in ayırımında GATTa testlerinin spesifik testlerden biri olduğunu vurgulamıştır. Lattore ve Jones, (1979) yaptıkları çalışmada *Pss* ve *Psm*'nin tanısında, tyrosinase aktivitesinin belirlenmesi dışında, GATTa testlerinin çabuk tanılama güvenilir olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda 15 bakteri izolatının GATTa testi sonuçlarına bakıldığı zaman 9 izolatın *Pss* oldukları ve bu test sonuçlarının LOPAT testi sonuçları ile de tutarlı olduğu görülmüştür. LOPAT ve GATTa [*Pss* için GATTa (+--), *Psm* ırk 1 için GATTa (--++), *Psm* ırk 2 için GATTa (-+-)] (Schaad ve ark., 2001; Obradovic, 2010; Janse, 2010) testlerinden elde ettiğimiz sonuçlar yukarıdaki diğer bulguları da doğrulamaktadır.

Karbon kaynaklarının kullanımı

Karbonhidrat kaynakları kullanımı testi sonuçlarına göre P11/2, P29/2, P32/2-b, P40/3, Da3(1), Da3(2), Badem, Badem Yalova ve P39/2 şeftali çiçek izolatları sorbitol, mannitol, erythritol ve inositol testi sonuçları referans *Pss* izolatı ile aynı olup bu izolatların *Pss* olduklarına karar verilmiştir. P99, P39/3, Da3(1), Da3(2) izolatlarının sorbitol, mannitol, erythritol, inositol ve lactic acid test sonuçları referans *Psm* ırk 1 ile aynıdır, ancak LOPAT ve GATTa test sonuçlarındaki



Şekil 1. A: *in-vitro* da syringomycin üretimi *Pss* (zon oluşan) ve *Psm* (zon oluşmayan), B: buz çekirdeği oluşturma aktivitesi beyaz renkli olanlar (+), şeffaf görünümlü olanlar (-), C: Patojenisite testi sonuçları (soldan sağa) kahverengi-siyah çökük lezyonlar, suda haşlanmış ve negatif kontrol.

tutarsızlıklar nedeniyle bu izolatların *Psm* oldukları konusunda kesin bir sonuca varılamamıştır. P95/2 ve Da 4 izolatlarının ise inositol test sonuçlarının negatif olması nedeni ile *Psm* ırk 1 ya da ırk 2 olduklarına bu test ile karar verilememiştir.

Buz çekirdeği oluşturma aktivitesi ve *In-vitro*'da syringomycin üretiminin saptanması

Buz çekirdeği oluşturma aktivitesinin (INA) saptanması *Pss* ve *Psm* izolatlarının ayırımında anahtar rol oynamaktadır (Bultreys ve Kaluzna, 2010). *Pss* izolatları INA⁺ bulunurken, *Psm* izolatları INA⁻ dir (Süle ve Seemüller, 1986). Bu test sonucunda P11/2, P29/2, P32/2-b, P40/3, Badem, Da3(1), Da3(2), P39/2 şeftali çiçek, Badem Yalova izolatları olmak üzere toplam 9 *Ps* pathovarı INA⁺ sonuç vermiş ve *Pss* olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1). Özellikle de bu test GATTA⁺ izolatları için oldukça spesifik ve GATTA⁻ izolatları için ise nadir olarak pozitif sonuç vermektedir (Lattore ve Jones, 1979). 15 *Ps* izolatı ile yapılan LOPAT, GATTA test sonuçları da birbirini desteklemektedir.

In-vitro'da syringomycin üretiminin saptanması

Syringomycin aktivitesi biyolojik ve moleküler yöntemlerle saptanabilmektedir. Biyolojik test yöntemi olan *in-vitro* syringomycin aktivitesinin belirlenmesi test sonuçlarına göre 15 *Ps* izolatından 9'u engelleme zonu oluşturmuş olup pozitif olarak değerlendirilmiştir, diğer 6 izolat ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1). Ancak; *Ps* pathovalarının ayırt edilmesinde kullanılan syringomycin aktivitesi sonuçları *Pss* ve *Psm*'nin ayırımında belirleyici olsa da klasik tanılama yöntemlerinden sadece bu testin kullanılmasının her zaman güvenilir sonuç vermeyebileceği belirtilmektedir (Kaluzna ve Sobiczewski, 2009).

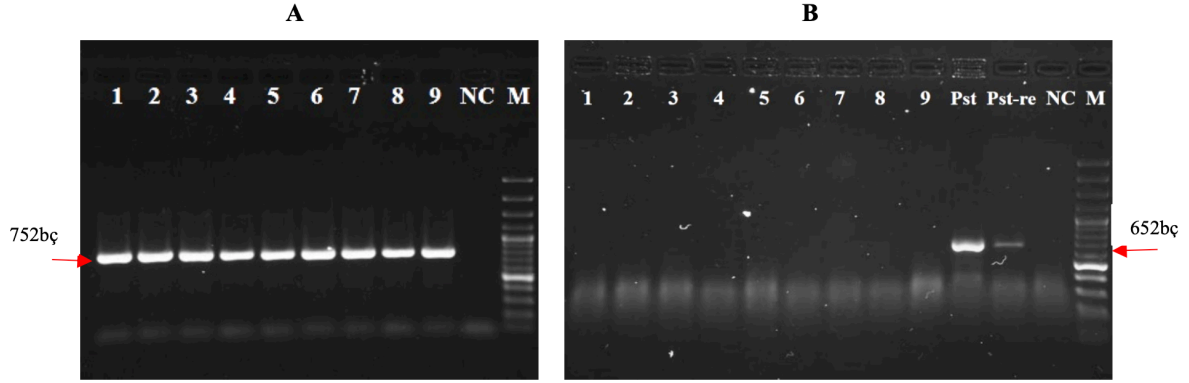
Patogenesis testi sonuçları

Sert çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen *Ps* pathovalarını *Pss* ve *Psm* düzeyinde ayırt etmek için ham kiraz meyvelerine patojenisite testi uygulanmıştır.

Inokule edilen kiraz meyveleri yüksek oransal nem altında inkübasyona bırakıldığında 4-5 gün içinde belirtiler oluşmuştur. İnkubasyon sonunda meyveler üzerindeki inokulasyon noktalarında oluşan siyah çökük belirti *Pss*, suda ıslanmış-haşlanmış belirti ise *Psm* olarak değerlendirilmiştir. Biyokimyasal testler sonucunda, ayırt edici bir tanı sonucuna ulaşılamamakla birlikte, ham kiraz meyvelerinde gerçekleştirilen patojenisite testi sonuçlarına göre P99, P39/3, P 95/2, Da1, Da2, Da4 izolatlarının inokulasyon noktası çevresinde suda haşlanmış lezyonlar oluşturması nedeniyle *Psm*'ye daha yakın olduğunu; P11/2, P29/2, P32/2-b, P40/3, P39/2 şeftali çiçek, Da3(1), Da3(2), Badem, Badem Yalova izolatlarının ise içe çökük siyah lezyonlar oluşturması nedeniyle, *Pss*'ye yakın olduklarına karar verilmiştir (Şekil 1). Ham kiraz meyvelerinde yapılan patojenisite testi sonuçlarının literatür bulgularını destekleyici nitelikte olduğu saptanmıştır (Kaluzna ve Sobiczewski, 2009; Kaluzna ve ark., 2010). *Ps* pathovalarının birbirinden ayırt edilmesinde, patojenisitesinin belirlenmesinde ve tanılmasında ham kiraz meyve testinin önemli ve pratik bir yöntem olduğu görülmektedir (Bultreys ve Kaluzna, 2010). Ayrıca, çalışmada testlenen 15 *Ps* pathovasının 9'unun belirgin bir *in-vitro* syringomycin aktivitesi bulunduğu ve bu 9 izolatın ham kiraz meyvelerinde gerçekleştirilen patojenisite testinde pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, *in-vitro* syringomycin aktivitesi ile virulenslik arasında korrelatif bir ilişki bulunduğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Moleküler tanı sonuçları

LOPAT, GATTA, INA ve patojenisite testi sonuçlarına göre *Ps* pathovarı olduğu kesinleşen P11/2, P29/2, P32/2-b, P40/3, Da3(1), Da3(2), Badem, Badem Yalova ve P39/2 şeftali çiçek izolatlarının moleküler tanısı *syfB* ve *cfl* genleri dikkate alınarak yapılmıştır. Dokuz *P. syringae* pathovarı yapılan PCR sonucunda *syfB* geni için 752 bç'de bant oluştururken *cfl* geni için 652 bç'de bant oluşturmamışlardır (Şekil 2). Her iki gen için de yapılan PCR sonuçlarına göre bu izolatların *Pss* olduklarına karar verilmiştir. Moleküler tanılama



Şekil 2. Fitotoksin üreten *syrB* ve *cfl* genlerinin moleküler tanısı: *syrB* (A) ve *cfl* (B). 1: P11/2, 2: P29/2, 3: P32/2-b, 4: P40/3, 5: Badem, 6: Da3(1), 7: Da3(2), 8: Badem Yalova, 9: P39/2 şeftali çiçek, Pst: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Pst-re: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* rekolonyasyonu, NC: Negatif Kontrol, M: marker (GeneRuler 100 bp DNA ladder).

yöntemleri ile *Ps*'nin farklı üyeleri tarafından üretilen farklı fitotoksinler, toksin üretiminden sorumlu genlerin teşhisi temeline dayanan moleküler tanılamada yol göstermektedir (Bultreys ve Gheysen, 1999). *syrB* geninin (*Syringomycin* sentezi) moleküler tanısı da oldukça önemlidir. Çalışmamızda *syrB1* ve *syrB2* spesifik primerleri kullanılarak fitopatogenik streynleri tanılamak için *in-vitro* *syringomycin* aktivitesi testinde pozitif sonuç veren 9 *Ps* izolatının fitotoksin temelli moleküler tanısı yapılmıştır. Moleküler tanılama sonucunda lipodepsipeptit üreten *Pss* izolatlarının *syrB* geni spesifik primerlerin de *Pss* ve *Psm* izolatlarının ayırt edilmesinde güvenilir olduğu görülmüştür (Bultreys ve Gheysen, 1999). *syrB* temelli PCR testinde sadece *Pss* 752 bç'de bant (Obradovic, 2010) oluşturduğu için *Pss*'yi *Psm*'den ayırt etmede moleküler tanılama yöntemlerinin yardımcı olduğu bu çalışmada bir kez daha doğrulanmıştır.

Pss, *Psm* ırk 1 ve ırk 2'nin ayırt edilmesinde kullanılan diğer bir moleküler yöntem de bitkilerde klorozise neden olan *cfl* geni (*coronatine* sentezi) moleküler tanısıdır (Mitchell, 1982). Çalışmamızda 9 *Ps* izolatının *cfl* gen temelli yapılan PCR sonucunda 652 bç'de bant oluşturamamışlardır. Kiraz ağaçlarından izole edilen *Psm* streynlerinin %98'inin *coronatine* ürettikleri (Liang ve ark., 1994) fakat buna rağmen *coronatine* üretmeyen pv. *morsprunorum* streynlerinin de tanıldığı belirtilmiştir (Mitchell ve ark., 1983; Ullrich ve ark., 1993). *syrB* ve *cfl* geninin PCR testleri sonuçları birbirini desteklemektedir ve 9 bakteri izolatının *Pss* olarak kesin tanısı yapılmıştır.

Moleküler karakterizasyon

cts, *rpoD*, *gapA* ve *gyrB* genlerine spesifik primerler (Çizelge 2) ile yapılan PCR sonucunda *Pss* izolatları *cts* geni için 542 bç, *rpoD* geni için 575 bç, *gyrB* geni için 507 bç, *gapA* geni için de 476 bç'de bant oluşturmuşlardır. Bu bantlardan ekstrakte edilen DNA'lar sekans analizine gönderildiğinde saptanan baz dizinleri NCBI

gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-nucleotide Blast (blastn) ve alignment programları ile eşleştirildiğinde *cts*, *rpoD*, *gapA* ve *gyrB* genleriyle %99 benzerlik endeksi ile *Pss* olarak tanımlanmıştır.

Yamamoto ve ark. (2000), filogenetik analizi, *gyrB* ve *rpoD* genlerinin nükleotid sekanslarını kombine ederek yapmışlar ve sonuç olarak *Pseudomonas* için teşhis, tanılama ve sınıflandırmada *gyrB* ve *rpoD* temelli sekansların çok kullanışlı olabileceğini savunmuşlardır. Filogenetik çalışmalarda 16S rRNA'nın yeterli olmadığı ve 4 lokusun (*gapI*, *gltA*, *gyrB* ve *rpoD*) gen fragmentlerinin sekansının yapıldığı çalışma sonucunda DNA sekans analizinin, *Ps* (*sensu lato*) içinde bilinmeyen patojenlerin, tür ve genomspecies düzeyinde tanısında kullanılabilir olduğu görülmüştür (Bull ve ark., 2011). Çalışmamızda 9'u *Pss* olarak belirlenen 15 izolatın moleküler karakterizasyonunda kullanılan *cts*, *rpoD*, *gapA* ve *gyrB* genlerine ait elde edilen sekans analizi sonuçlarının da önceki çalışmalardan elde edilen sonuçları desteklediği görülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada şeftali ve kiraz gibi sert çekirdekli meyve ağaçlarından bakteriyel kanser belirtilerinden izole edilmiş *Ps* izolatlarının klasik yöntemler, patojenisite ve moleküler yöntemlerle pathovar düzeyinde kesin tanısı yapılmıştır. E. Ü. Z. F. Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan, sert çekirdekli meyve ağaçlarında bakteriyel kanser belirtilerinden elde edilen sınırlı sayıda *Ps* izolatlarının patojen olanlarının tümünün *Pss* olması, *Pss* ve *Psm* arasında patojenisite açısından ekolojinin de belirleyici olabileceğini düşündürmüştür. *Psm* daha çok yüksek kesimlerde ve serin iklimde saptanırken (Akköprü, 2016; Donmez ve ark., 2010; Kotan ve Şahin, 2002), *Pss* ise kışı ılık geçen kesimlerde sorun olmaktadır (Akbaba ve Özaktan, 2019; Özaktan ve ark., 2008).

LİTERATÜR LİSTESİ

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press. United States of America, 948 pp.
- Akbaba, M. ve Özaktan, H. 2019. Kirazda Bakteriyele Kansere Neden Olan Etmenlerin Moleküler Tanısı ve Mücadelesine Yönelik Biyolojik Yaklaşımlar. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, 154s.
- Akköprü, A. 2016. Determination of Bacterial Disease on Stone Fruits grown in Lake Van Basin, East Anatolia of Turkey Acta Horticulture ISHS II. Int. Workshop on Bacterial Disease of Stone Fruits and Nuts Acta.Hortic.1149.
- Anonim, 2008. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları. 4. Ankara, 388s.
- Ayers, S.H. and Johnson, W.T. 1919. A Study of the Alkali-forming Bacteria in Milk. U.S.Department of Agriculture Bull. 782:1-39.
- Bull, C.T., Clarke, C.R., Cai, R., Vinatzer, B.A., Jardini, T.M. and Koike, S.T. 2011. Multilocus Sequence Typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato Confirms Previously Described Genomespecies and Permits Rapid Identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* Causing Bacterial Leaf Spot on Parsley. The American Phytopathological Society 11-10-0318.
- Bultreys, A. and Gheysen, I. 1999. Biological and Molecular Detection of Toxic-Lipodepsipeptide-Producing *Pseudomonas syringae* Strains and PCR Identification In Plants. Applied and Environmental Microbiology Vol:65 (5) 1904-1909.
- Bultreys, A. and Kaluzna, M. 2010. Bacterial Canker 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 92:21-33.
- Donmez, M.F., Karlıdag, H. and Eşitken, A. 2010. Identification of Resistance to Bacterial Canker *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Disease on Apricot Genotypes Grown in Turkey European Journal of Plant Pathology 126 (2) 241-247.
- FAO 2018. Agriculture and Consumer Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (<http://www.fao.org/faostat/>). (Date accessed: June 2020).
- Gasic, K., Prokic, A., Ivanovic, M., Kuzmanovic, N. and Obradovic, A. 2012. Differentiation of *Pseudomonas syringae* originating from Stone Fruits. Pesticides Phytomedicine (Belgrade) 27(3) 219-229.
- Janse, J.D. 2010. Diagnostic Methods for Phytopathogenic Bacteria of Stone Fruit and Nuts in COST 873, Bulletin OEPP/EPPO, 40:68-85.
- Kaluzna, M. and Sobiczewski, P. 2009. Virulence of *Pseudomonas syringae* Pathovars and Races Originating from Stone Fruit Trees. The Polish Phytopathological Society 54:71-79.
- Kaluzna, M. Pulawska, J. and Sobiczewski, P. 2010. The Use of PCR Melting Profile for Typing of *Pseudomonas syringae* Isolates from Stone Fruit Trees. European Journal of Plant Pathology. 126:437-443.
- Kennelly, M.M., Cazorla, F.M., Vicente, A., Ramos, C. ve Sundin, G.W. 2007. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees progress toward understanding and control. *Plant Disease*, 91,1.
- Klement, Z., Farkas, G.L. and Lourekovich, L. 1966. Hypersensitive Reaction Induced by Phytopathogenic Bacteria in Tobacco Leaf. *Phytopathology* 54:474-477.
- Kotan, R., and Şahin, F. 2002. First Record of Bacterial Canker Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, on Apricot Trees in Turkey. *Plant Pathology*, 51:798.
- Lattore, B.A. and Jones, A.L. 1979. *Pseudomonas morsprunorum*, The Cause of Bacterial Canker of Sour Cherry in Michigan and Its Epiphytic Association with *P. syringae*. *Phytopathology* 69:335-339.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods in Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications for British Society for Plant Pathology, 2, Oxford, UK, 216p.
- Liang, L.Z., Sobiczewski, P., Patterson, J.M. and Jones, A.L. 1994. Variation in Virulence, Plasmid Content and Genes for Coronatine Synthesis Between *P. syringae* pv. *morsprunorum* and *P. s. syringae* from *Prunus*. *Plant Disease* 78:389-392.
- Mitchell, R.E. 1982. Coronatine Producing by Some Phytopathogenic *Pseudomonads*. *Physiological Plant Pathology* 20:83-89.
- Mitchell, R.E., Hale, C.N. and Shanks, J.C. 1983. Production of Different Pathogenic Symptoms and Different Toxins by Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Not Distinguishable by Gel-Immuno-diffusion Assay. *Physiologica Plant Pathology* 23:315-322.
- Obradovic, A. 2010. *Pseudomonas* Pathogens of Stone Fruits and Nuts: Classical and Molecular Phytobacteriology, COST873 Stone Fruit Nut Health Training Course Handbook. Belgrade, 69pp.
- Ozaktan, H., Akköprü, A., Bozkurt, A. and Erdal, M. 2008. Information of Peach Bacterial Canker in Aegean Region in Turkey, "Determination of the Incidence of the Different Pathovars of *Pseudomonas syringae* in Stone Fruits" COST Action 873 Bacterial Disease of Stone Fruits and Nuts.
- Sarkar, S.F. and Guttman, D.S. 2004. Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1999-2012.
- Schaad, N.W. Jones, B.J. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification Plant Pathogenic Bacteria, APS Press, USA, 543pp.
- Sorensen, K.N., Kim, H.K. and Takemoto, J.Y. 1998. PCR Detection of Cyclic Lipodepsinoapeptide-Producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of Strains. *Applied and Environmental Microbiology* P:226-230.
- Süle, S. and Seemüller, E. 1986. The Role of Ice Formation in the Infection of Sour Cherry Leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *The American Phytopathological Society* Vol.77 (2).
- Ullrich, M., Bereswill, S., Völksch, B., Fritsche, W. and Geider, K. 1993. Molecular Characterization of Field Isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* Differing in Coronatine Production. *J. Gen. Microbiology* 139: 1927-1937.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S. 2000. Phylogeny of the Genus *Pseudomonas*: Intragenic Structure Reconstructed from the Nucleotide Sequences of the *gyrB* and *rpoD* Genes. *Microbiology* 146:2385-2394.
- Xu, G.W. and Gross, D.C. 1988. Physical and Functional Analyses of the *syrA* and *syrB* Genes Involved in Syringomycin Production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Bacteriology* 170:5680-5688.