



Araştırma Makalesi

www.ziraat.selcuk.edu.tr/ojs
Selçuk Üniversitesi
Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi
26 (3): (2012) 1-8
ISSN:1309-0550



Aydın İli'nde Zeytin Bakteriyel Dal Kanseri Hastalığı (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*)'nın Tespiti ve Tanılanması¹

Durmuş SERVİ², Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ^{2,3}

²Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Konya/Türkiye

(Geliş Tarihi: 23.12.2011, Kabul Tarihi: 06.06.2012)

Özet

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* 'nin neden olduğu zeytin dal kanseri hastalığı zeytin ağaçlarında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Aydın İlindeki sekiz ilçede (Söke, Koçarlı, Çine, Nazilli, Karacasu, Bozdoğan, Buharkent, Kuyucak) 2006 ve 2007 yıllarında yapılan surveylerde, 189 adet dal ve sürgün örneği toplanılmıştır. Etmenin izolasyonu ve tanılanmasında başlıca PVF1 ve King B besi yerlerinde gelişim, NSA' da levan oluşumu, 37°C' de gelişim, oksidaz testi, esculin hidrolizi, pektolitik aktivite testi, arginine dehidrolaz testi, jelatinin hidrolizi, tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu, nitrat redüksiyonu, üreaz aktivitesi, erythritol, mannitol, sorbitol ve sakkaroz kullanımı, D- arabinoz, nitrat indirgenmesi, IAA üretimi, yumurta sarısı testi testleri kullanılmıştır. Patojenin moleküler tanısında, PCR ile *iaal* ve *hrc* gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Patojenite testleri zeytin ve zakkum fidanlarının sürgünlerinde gerçekleştirilmiş, *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının tümünün zeytinde ur oluşturma kabiliyetinde olduğu gözlenmiştir. Biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik ve PCR testlerinden elde edilen bulgulara göre, 85 örnekte *P. s. pv. savastanoi* tanılanmış ve il genelinden toplanan örneklerde etmenin yaygınlık oranı %44,9 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler; zeytin, dal kanseri, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, PCR

Determination and Identification of Olive Knot Disease (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) in Aydın Province

ABSTRACT

Olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* cause important losses on olive trees. One hundred and eighty nine branch samples were collected from eight districts of Aydın Province (Söke, Koçarlı, Çine, Nazilli, Karacasu, Bozdoğan, Buharkent, Kuyucak) in 2006 and 2007. It was mainly used growth PVF1 and King's B mediums, levan production on NSA, growth at 37 °C, oxidase, aesculin hydrolysis, pectolytic activity, arginine dihydrolase, gelatin hydrolysis, hypersensitive reaction on tobacco, nitrate reduction, urease activity, using of erythritol, mannitol, sorbitol and sucrose, D- arabinose, nitrate reduction, production of IAA, egg yolk test on isolation and determination of the pathogen. In the molecular identification of the pathogen, *iaal* and *hrc* gene regions were amplified by PCR. Pathogenicity tests were performed on shoots of olive and oleander seedlings and all of the *P. s. pv. savastanoi* isolates were able to produce galls on the olive plants. Eighty five isolates were identified as *P. s. pv. savastanoi* by biochemical, physiological and PCR tests and presence rate of pathogen was determined as 44.9% on the collected samples from Aydın province.

Key Words; olive, knot disease, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, PCR

Giriş

Tarihi günümüzden 8000 yıl öncesine dayanan zeytinin anavatanının yukarı Mezopotamya (Güneydoğu Anadolu Bölgesi) olduğu ve çevresine buradan yayıldığı kabul edilmektedir (Denk, 2004). Yaklaşık 500.000 ailenin geçimini zeytincilikten sağladığı 35 ülkede, yaklaşık 10 milyon hektar alanda 900 milyon zeytin ağacı bulunmaktadır (Öztürk, 2006). Ülkemiz, yaklaşık 700 bin hektar alanda 129 milyon ağaç varlığı ile 1.766.749 ton zeytin üretimine sahiptir (Anonim, 2007a).

Ortalama olarak 226.250 ton sofralık zeytin üretimi ile İspanya'nın ardından dünyada 2. sırada olan Türkiye, zeytinyağı üretiminde ise 125.500 ton ile dünya zeytinyağı üretiminin %4,2'sini karşılamakta ve 6. sırada bulunmaktadır (Anonim, 2007b).

Zeytinliklerde maddi olarak önemli kayıplara neden olan hastalıklardan biri, bakteriyel zeytin dal kanseri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Smith 1908) Janse (1982)) hastalığıdır. Hastalık başta zeytin (*Olea europea*) olmak üzere zakkum (*Nerium oleander*), dış-

¹ Bu çalışma Durmuş SERVİ' nin Yüksek Lisans Tezinden özetlenmiştir.

² Sorumlu Yazar: kbastas@selcuk.edu.tr

budak (*Fraxinus excelsior*), ligustrum (*Ligustrum japonicum*), forzitya (*Forstia spp.*) (Iacobellis ve ark., 1998) ve yaseminde (*Jasminum officinalis*) görülmektedir (Wilson, 1965).

P. s. pv. savastanoi endemik bir hastalıktır ve zeytin ağaçlarında ölüme veya şiddetli yaprak dökümlerine neden olabilmektedir. Bununla beraber, ağaçta ürün kaybı ve alınan üründe kalite düşüklüğüne sebep olmaktadır (Varvaro ve Surico, 1984).

Patojen, bitki dokularına soğuk ve dolu yaraları, sırkla yapılan hasat sırasındaki açılan yaralar başta olmak üzere doğal açıklıklar yoluyla girerek bitkilerin dal ve gövde kısımlarında hatta yapraklarında da görülebilen ırlar oluşturmaktadır (Wilson, 1965). Bu yapılar bitkinin besin maddesi ve su alımını engellemekte ve dolayısıyla bitki giderek canlılığını kaybetmekte ve en sonunda da tamamen kurumaktadır. Bu kurumalar, oluşan ırlar nedeniyle yaprağın ucuna öz su akışını engelleyerek solma kuruma ve erken yaprak dökümüne neden olmaktadır (Gardan ve ark., 1992). Ayrıca hiçbir zeytin çeşidinin bu hastalığa dayanıklı olmadığı belirlenmiştir (Penyalver ve ark., 2006).

Ülkemizde zeytin, Ege ve Marmara Bölgeleri başta olmak üzere Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz Bölgelerimizde toplam 35 ilde yetiştiriciliği yapılan bir üründür (Anonim, 1997). Hastalığa sebep olan etmen *P. s. pv. savastanoi* ülkemiz zeytin yetiştirilen hemen hemen tüm bölgelerde görülmektedir (Tunalıoğlu, 2003).

Bu çalışma Aydın ilinde, zeytin ağaçlarının bakteriyel dal kanseri hastalığıyla bulaşıklılığının belirlenmesi ve etmenin biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler yöntemlerle tanısının yapılması amacıyla yürütülmüş, elde edilen bulguların ise etmenin sağlıklı bahçelere yayılmasını önleme açısından önemli olabileceği düşünülmüştür.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmamızın ana materyalini Aydın ilinde zeytin dikiliş alanlarındaki ilçelerden (Söke, Koçarlı, Çine, Nazilli, Karacasu, Bozdoğan, Buharkent, Kuyucak) toplanan ırlu ve sağlıklı görünüme sahip zeytin dalları oluşturmuştur.

Patojenisite testlerinde 2 yaşlı *Olea europea* cv. Yamalak Sarısı fidanları, 3 yaşlı zakkum (*Nerium oleander*) fidanları ve aşırı duyarlılık testlerinde yaklaşık 5 haftalık tütün (*Nicotiana tobaccum* cv. White Burley) bitkileri kullanılmıştır.

Referans kültürler

Tüm testlerde, PSS112 ve PSS116 nolu referans *P. s. pv. savastanoi* kültürleri (Prof. Dr. Kemal Benlioğlu,

Adnan Menderes Üniversitesi) ve negatif kültür olarak da *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü) kullanılmıştır.

Metot

Aydın ilinde yoğun olarak zeytin yetiştiriciliği yapılan ilçeler (Söke, Koçarlı, Çine, Nazilli, Karacasu, Bozdoğan, Buharkent, Kuyucak) ve bunlara bağlı köylerden, 2006–2007 tarihlerinde örnekler toplanarak Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma laboratuvarına getirilmiştir. Zeytin bahçelerine ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında gidilerek taze ırl oluşturmuş ve semptomsuz bitkilerden dal örnekleri alınmış ve polietilen torbalarda ve buzluk içersinde laboratuara getirilmiştir. Örnekleme Bora ve Karaca (1970)' e göre yapılmış, 8 ilçe ve mevkilerinden toplam 11.851.000 zeytin ağacını temsilen 189 adet örnek toplanmıştır. Tüm ildeki gezilen toplam bahçe sayısına, hastalıklı bahçe sayısı oranlanarak, hastalığın ildeki yaygınlığı hesaplanmıştır. Ayrıca her zeytinlik, hastalıklı ve sağlıklı ağaçların sayıları belirlenerek basit ortalama metoduna göre zeytinliklerdeki hastalık %'si hesaplanarak, hastalığın bir bahçe içerisindeki yaygınlığı tespit edilmiştir. Özellikle Karacasu, Buharkent ve Nazilli ilçelerinden hastalıkla ilgili yoğun şikayetler gelmesi sebebiyle planlanandan daha fazla örnek toplanılmıştır. İl genelinde toplanan örnek sayıları Çizelge 1'de verilmiştir.

Etmenin izolasyonu

Toplanan bitki materyallerinden etmenin izolasyonu Lelliott ve Stead (1987)' e göre yapılmıştır.

Patojenin Tanısı

Biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testler

P. s. pv. savastanoi' nin tanısında, levan oluşumu, oksidaz reaksiyonu, patatestte pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz, tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu (LOPAT) testlerinin yanı sıra gram reaksiyon, 37 °C' de gelişim, PVF1 yarı seçici besi yerinde gelişim, King B besi yerinde gelişim, jelatin hidrolizi, üreaz aktivitesi, trehaloz, erythritol, sellibioz, raffinoz, malik asit, sorbitol, sakkaroz, glycerol ve L-tartarik asitten asit oluşumu (Lelliott ve Stead, 1987; Mohan ve ark., 1987; Surico ve Lavermicocca, 1989; Klement ve ark., 1990; Schaad, 2001) testleri esas alınmış her test her bir izolat için aynı şartlarda 3 tekrarlı yapılmıştır.

Patojenisite testleri

Denemede elde edilen *P. s. pv. savastanoi* izolatları, King B besiyerinde 24–48 saat 27 °C' de geliştirilerek, 10⁸ cfu ml⁻¹ yoğunlukta bakteriyel süspanسیونlar hazırlanmıştır. Yamalak Sarısı çeşidi zeytin

fidanlarının ve zakkum fidanlarının taze sürgünlerinde, steril bir bistrü yardımıyla açılan yaralara, steril bir pamukla sürülerek bakteriler inokule edilmiş, yaraların üzerleri kapatılmıştır. Enfekte edilmiş bitkiler sera koşullarında ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de sıcaklık, %70-80 nispi nem ve 16 saat ışıklı, 8 saat karanlık) bekletilmiş, 2 ay sonunda inokule edilen izolatların ur oluşturup oluşmamasına göre değerlendirme yapılmıştır (Surico ve ark., 1984).

Moleküler tanı

DNA izolasyonu

Elde edilen *P. s. savastanoi* izolatlarının total DNA'sı, DNA izolasyon kit'i (Genomic DNA Purification Kit, Cat No: AI 125, Promega) kullanılarak izole edilmiştir.

PCR reaksiyonları

P. s. pv. savastanoi'nin *iaal* geninin amplifikasyonu için;

IAALF (5'GGCACCAGCGGCAACATCAA3') ve IAALR (5'CGCCCTCGGAACTGCCATAC3') (Penyalver ve ark., 2000), *hrc* geninin amplifikasyonu için; *hrcC-2F* (5'-GACCGGCTTGGTCAGGAAT-3') ve *hrcC-2R* (5'-CGGCTTTCCCGGATTCT-3') (Sisto ve ark., 2004) spesifik primer setleri kullanılmıştır.

Toplam 25 µl hacimde hazırlanan PCR solusyonunun içeriği; bakteri DNA' sı 2 µl, PCR Master Mix (0.05 ünite/ µl *Taq* DNA, 4 mM MgCl_2 , 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP) 12.5 µl, forward primer 2 µl, revers primer 2 µl, di distile saf su 6.5 µl şeklinde hazırlanmıştır.

P. s. pv. savastanoi'nin tanısında kullanılan *iaal* geninin amplifikasyonu için PCR protokolü termalcykler'da (eppendorph mastercykler personal); 95°C ' de 5 dk inkübasyon (1 döngü) adımıyla başlatılmış 95°C ' de 30 sn denaturasyon, 62°C ' de 30 sn primer bağlama ve 72°C ' de 45 sn amplikon sentezi olacak şekilde (toplam 35 döngü) tamamlanmış ve 72°C ' de 5 dk inkübasyon (1 döngü) şeklinde programlanmıştır (Penyalver ve ark., 2000). *hrc* geninin amplifikasyonu için ise; 94°C ' de 5 dk inkübasyon (1 döngü), 94°C ' de 1 dk denaturasyon, 58°C ' de 1 dk primer bağlama ve 72°C ' de 2 dk amplikon sentezi (toplam 30 döngü) ve 72°C ' de 10 dk inkübasyon şeklinde tamamlanmıştır (Sisto ve ark., 2004).

Elde edilen PCR ürünleri, 1000 bp'lik moleküler işaretleyici (marker, Fermentas 100 bp Plus DNA Ladder SM 1153) ile birlikte %1' lik agaroz jelde elektroporasyona tabi tutulmuştur (Sambrook ve ark., 1989). Ethidium bromide ile boyanan DNA bantları jel dokümantasyon sisteminde (Biolab, Quantity One Imaging and Analysis PDQest 2-D Gel Analysis Software, User Guide for Version 4.1 Windows) analiz edilmiştir.

Araştırma Bulguları

Örnekleme Sonuçları

2006 ve 2007 yıllarında, Aydın İlindeki sekiz ilçeden (Söke, Koçarlı, Çine, Nazilli, Karacasu, Bozdoğan, Buharkent, Kuyucak) 189 adet dal örneği toplanılmış, izole edilen toplam 125 izolatın 85'i biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik ve moleküler yöntemlerle *P. s. pv. savastanoi* olarak tanımlanmıştır.

Elde edilen bulgulara göre, hastalığın ilçeler düzeyindeki yaygınlık oranları en yüksek Bozdoğan ilçesinde (%100) iken, Söke'de %10 olarak belirlenmiştir. Zeytin dal kanseri hastalığının il genelindeki yaygınlık oranı ise %44,9 olmuştur (Çizelge 1).

Patojenin tanısı

Koloni morfolojisi

P. s. pv. savastanoi, PVF-1 besiyerinde, 27°C ' de 6 gün inkübasyondan sonra yüzeyleri pürüzsüz, 2-3 mm çapında, grimsi beyaz, kubbemsi, kenarları düzgün koloniler oluşmuştur. 85 adet *P. s. pv. savastanoi* izolatından 41 tanesi King B besiyerinde 27°C de 3-5 günlük inkübasyonun sonunda UV ışık altında yeşilimsi sarı renkte fluoresan pigment oluşturan koloniler meydana getirmişlerdir.

Biyokimyasal ve fizyolojik testler

Elde edilen *P. s. pv. savastanoi* izolatları, yapılan biyokimyasal testlere Çizelge 2' de verilen reaksiyonları göstermişlerdir.

Patojenisite testi

P. s. pv. savastanoi izolatlarının Yamalak Sarısı çeşidi zeytin fidanlarına ve zakkum fidanlarına inokulasyondan yaklaşık 60 gün sonra, *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının tamamı zeytinde ur oluşumuna sebep olurken, 6 adet izolat zakkumda ur oluşturmamıştır (Şekil 1).

Patojenin moleküler tanısı

Çalışmamızda biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testlerle *P. s. pv. savastanoi* olarak tanımlanan 85 adet izolatın, *iaal* geni IAALF ve IAALR ve *hrc* geni *hrcC-2F* ve *hrcC-2R* spesifik primerleri kullanılarak PCR ile amplifiye edilmiş, tüm izolatların sırasıyla 454 bp ve 593 bp' lik spesifik bantlar oluşturduğu belirlenmiştir. İzolatlarımızdan bazılarının *iaal* geninin amplifikasyonu ile oluşturdukları 454 bp' lik spesifik bantlar Şekil 1' de gösterilmiştir.

Tartışma

Karaca (1977) hastalığın en çok zarar verdiği bölgenin Ege olduğunu belirtmiştir. Araştırmamızdan elde edilen bulgulara göre ise Aydın ili genelinde, zeytin dal kanseri hastalığının 2006 ve 2007 yıllarında incelenen zeytinliklerdeki bulunma oranı % 44,9 olarak belirlenmiştir. Bu oran yüksek olarak görülmekle birlikte, uygun koşullar altında ve hastalığı baskı altında tutabilecek tedbirler alınmadığında hastalığın tahripkar seviyelere ulaşabileceği görülmektedir.

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*'nin İspanya (Alonso ve ark., 1988), Fas (Benjama ve ark.,1993), Ürdün (Tehabsim ve ark., 1991), Tunus (Boulila, 1994), Portekiz (Fernandes, 1994; Marcelo ve ark., 1999), ABD (Teviotdale, 1994, Azad ve Cooksey, 1995), Avustralya'da (Hall, 2004) önemli verim kayıplarına neden olduğu belirtilmektedir. Yunanistan da yapılan çalışmalarda *P. s. pv. savastanoi*'nin zakkum ve yaseminde doğal enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmiştir (Panagopoulos,1993). Türkiye'de 1939 yılında meydana gelen dolu yağışı sonucunda zeytin dal kanser hastalığının şiddetli bir şekilde görüldüğü İyriboz'ca (1941) rapor edilmiştir. Karaca (1997)'de hastalığın Karadeniz, Marmara, Ege, Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu'da görüldüğü ancak Ege ve Akdeniz bölgelerinde daha şiddetli olduğunu bildirmiştir. Son yıllarda batı Akdeniz'in Antalya, Aksu, Döşemealtı, Serik, Manavgat, Kaş ve Kale ilçe ve köylerinde *P. s. pv. savastanoi*'nin yaygınlığı belirlenmiştir (Basım ve ark., 2000; Ersoy, 2002).

Günümüzde mikroorganizmaların tanısında her ne kadar moleküler tekniklerin kullanılması hızla yaygınlaşsa da klasik tanı teknikleri birçok araştırmacı için hala güncelliğini korumaktadır. Bunun en önemli nedeni ise tanılamak istenen mikroorganizma gruplarının belirlenmesi ve takip eden moleküler çalışmalara hız kazandırmasıdır. Bu nedenle bizim çalışmamızda da izole edilen bakteriyel izolatların moleküler tanıların yanı sıra morfolojik ve biyokimyasal karakterleri de belirlenmiştir.

Surico ve Lavermicocca (1989) tarafından, *P. s. pv. savastanoi*'nin izolasyonu ve tanısı için yarı seçici besi yeri PVF-1 kullanılmıştır. Tatlı ve Benlioğlu (2004) yaptıkları izolasyon çalışmalarında ırlu bölge ile sağlıklı ve hastalıklı bölgeden yaklaşık olarak 0.5–1 cm büyüklüğünde parçalar keserek %70'lik etil alkol ile 1–2 dakika yüzeysel sterilizasyon yapmışlardır. Daha sonra steril damıtık su ile durulanmış ve steril kurutma kağıtları ile kurulanmıştır. Bu parçalar 1-2 ml steril damıtık su içinde havanda ezilmiş ve elde edilen süspansiyonlardan bir öze dolusu alınarak çizgi ekim yöntemi ile SNA ve PVF-1 besi yerlerine ekim yapılmışlardır. Çalışmamızda SNA ve PVF-1 besi yerine izolasyonlar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Araştırmamızdan elde edilen *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının hepsi SNA'da levan koloni oluşturmamıştır. Ayrıca 85 tane *P. s. pv. savastanoi* izolatımızdan, 44 tanesinin King B besiyerinde fluoresans pigment üretmediği saptanmıştır. Sonuçlarımıza benzerlik gösteren diğer çalışmalarda ise Iacobellis ve ark., (1993) İtalya'da elde edilen *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının SNA'da levan negatif ve KB'de fluoresans üretmeyen izolatlar olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca zeytinden izole edilen izolatlar içinde *P. s. pv. savastanoi* için tipik olmayan KB' de fluoresans pigment üreten ve levan negatif izolatlar elde edildiğini belirtmişlerdir.

Tüm *P. s. pv. savastanoi* izolatlarımız, jelatin ve eskulin hidrolizi testlerinde değişimsiz negatif sonuç vererek diğer çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Aynı şekilde eritritol, xylose, rafinoz ve gliserol karbon kaynaklarını kullanım test sonuçlarımız diğer araştırmacıların bulunduğu sonuçlar ile paralellik göstermiştir. Schaad ve ark. (2001)'e göre, *P. s. pv. savastanoi*'nin 37°C'de geliştiği belirtilmiştir ancak bizim çalışmamızda *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının bazıları bu sıcaklıkta gelişme göstermemiştir. Ayrıca sellobioz kullanımı testinde, değişimsiz negatif sonuç tarafımızca bulunurken, aynı araştırmacılar tarafından bu test sonucu pozitif olarak verilmiştir. Trehaloz, sorbitol ve sakkaroz kullanımı bakımından *P. s. pv. savastanoi* izolatlarımızdan elde ettiğimiz sonuçlar Alvarez ve ark. (1988)'nin elde ettiği sonuçlar ile benzer bulunmuştur. Lacaobellis ve ark., (1993)'de malonik asit ve L-tartarik asit kullanımı açısından izolatlar arasında değişken olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının, organik asit kullanımları açısından benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Patojenisite testlerinde, 85 *P. s. pv. savastanoi* izolatının ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan Yamalak Sarısı zeytin çeşidinde ur oluşturduğu gözlenmiştir. Denemelerimizde zeytin izolatlarının zeytinde ur oluşturduğu fakat zakkum da yapılan patojenisite testlerinde bazı izolatların ur oluşturmadığı belirlenmiştir. Surico ve ark. (1984), zeytin, zakkum ve kurtbağrı izolatları ile yürüttüğü çapraz inokulasyon denemelerinde zeytin izolatlarının zeytinde ur oluşturduğunu, ancak bir zeytin izolatının zakkumda da ur oluşturabildiğini, tüm zakkum izolatlarının ise hem zeytinde hem de zakkumda urlara neden olabildiğini, kurtbağrı izolatlarını ise sadece zeytinde ur oluşturduğunu belirtmişlerdir. Aynı şekilde Panagopoulos (1993), zeytin izolatlarının sadece zeytinde ur oluşturduğunu, zakkum izolatlarının ise kendi konukçusu olan zakkum dışında, zeytinde de ur oluşturduğu ve yasemin izolatlarının da sadece zeytinde ur oluşturduğunu bildirmiştir. Caponero ve ark. (1995), 11 zeytin izolatının sadece zeytinde patojen olduğunu, zakkum izolatlarının hem zakkum hem de zeytinde ur oluşturduğunu gözlediklerini bildirmişlerdir. İspanya'da

ise zeytin izolatlarının sadece zeytinde ur oluşturduğu, zakkum izolatlarının hem zeytinde hem de zakkumda ur oluşturduğunu, kurtbağrı izolatlarının ise sadece kurtbağrı bitkisinde ur oluşturduğu ve *Rethama sphaerocarpha* izolatının ise sadece konukçusunda virulent olduğu belirtilmiştir (Alvarez ve ark., 1998).

Pseudomonas s. pv. savastanoi izolatları ile ilgili bulgular değerlendirildiğinde izolatlar arasında gerek biyokimyasal testler, gerekse farklı konukçulardaki patojeniste sonuçları bakımından farklılıklar göstermiştir. Bu bulgular, Surico ve ark. (1984), Surico ve

Lavermicocca (1989), Iacobellis ve Surico (1993), Panagopoulos (1993), Mugnai ve ark. (1993 ve 1994), Iacobellis ve ark. (1995), Caponero ve ark. (1995) tarafından da desteklenmektedir. Alvarez ve ark. (1998), farklı konukçulardan 160 *P. s. pv. savastanoi* izolatının fenotipik çeşitliliğini araştırdığı çalışmasında sonuç olarak *P. s. pv. savastanoi* izolatlarının fenotipik olarak heterojen bir yapıda olduğunu, biyokimyasal Penyalver ve ark. (2000), özelliklerdeki bu heterojenliğin çevresel faktörlerden, konukçu bitkiden kaynaklanabileceğini ya da farklı patovaryları olabileceğini belirtmiştir.

Çizelge1. Aydın İlinde Zeytin Dal Kanseri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*)' ni Belirlemek Amacıyla Örnek Alınan İlçeler, Dikim Alanları, Alınan Örnek ve Elde Edilen İzolat Sayıları, İlçeler ve İl Genelinde Yaygınlık Oranları (%)

İlçe	Örnek Alınan Bahçe Sayısı	<i>P. s. pv. savastanoi</i> İle Bulaşık Örnek Sayısı	Hastalığın Yaygınlık Oranı (%)
Bozdoğan	9	9	100.0
Çine	35	14	40.0
Buharkent	15	5	33.3
Karacasu	35	24	68.5
Koçarlı	15	7	46.6
Kuyucak	15	12	80.0
Nazilli	30	6	20.0
Söke	35	8	22.8
TOPLAM	189	85	44.9

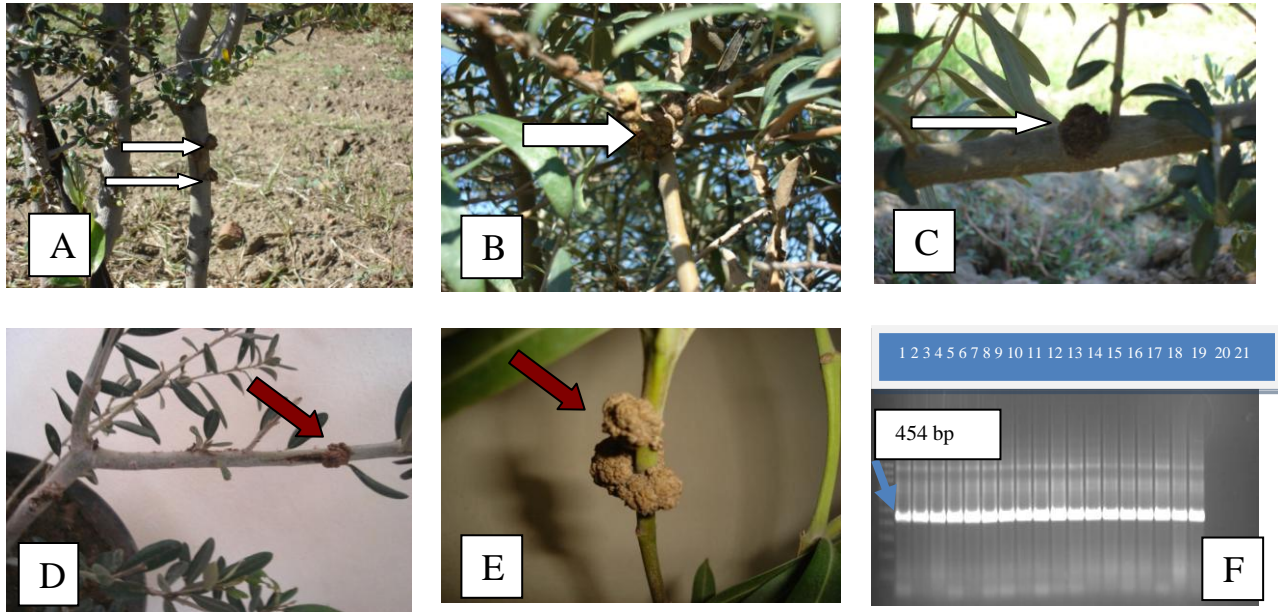
Çizelge 2. Aydın İli Zeytin Ağaçlarından Elde Edilen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının tanısında kullanılan biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testler ve referans izolatlar ile karşılaştırmalı bulgular

TESTLER	REFERANS İZOLATLAR			ELDE EDİLEN <i>P. s. pv. savastanoi</i> İZOLATLARI
	<i>P. s. pv. savastanoi</i> (PSS112)	<i>P. s. pv. savastanoi</i> (PSS116)	<i>P. s. pv. phaseolicola</i> (negatif izolat)	
Gram reaksiyon	-	-	-	-
Levan oluşumu	-	-	-	-
Oksidaz testi	-	-	-	-
Pataeste pektolitik aktivite	-	-	-	-
Arginin dehidrolaz testi	-	-	-	-
Tütünde aşırı duyarlılık	+	+	+	+
Jelatinin hidrolizi testi	-	-	-	-
King B besiyerinde floresans pigment oluşumu	+	+	+	D
PVF-1 besiyerinde gelişim	+	+	-	+
Üreaz aktivitesi	-	-	-	-
Esculin hidrolizi	-	-	-	-
37 °C' de gelişim testi	+	+	+	+
Karbohidratlardan asit oluşumu;				
Trehaloz	-	-	-	-
Erytritrol	-	-	-	-
Sellibioz	-	-	-	-
Raffinoz	-	-	-	-
Malik asit	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Sakkaroz	+	+	+	+
Glyserol	+	+	+	+
L-Tartarik asit	+	+	+	+

Sisto ve ark. (2004), Penyalver ve ark. (2000)' nın *hrc* geninin saptanması metodunu değiştirerek uygulamışlar, buna göre; 0,5 ml. hücre süspansiyonu 15 dakika kaynatılmış, 10 dakika 15000 g'de mikro santrifüjle ayrıştırılmış, çökelti ayrılmış ve süpernatant 2µL'lik kısım çoğaltım için kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda da bu modifiye yöntem kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Penyalver (2000), *iaal* geninin amplifikasyonunu gerçekleştirerek 454 bp bant oluşumunu ve Sisto ve ark. (2004), *hrcC* geninin amplifikasyonunda 593 bp bant oluşumunu belirlemişlerdir. Çalışmalarımızda da her iki gen için araştırıcıların önerdikleri spesifik primerler kullanılarak aynı bulgular elde edilerek *P. s. pv. savastanoi* nin moleküler tanısı yapılmıştır.

LOPAT testleri, *P. s. pv. savastanoi*' nin teşhisinde kullanılabilecek testlerin başında sayılmaktadır. Yarı seçici besi ortamı ve biyokimyasal testlerle yapılan tanılama, izole edilen etmenin *P. s. pv. savastanoi* olabileceğini göstermiş olsa da, kesin tanı için günümüzde DNA bazında elde edilen bulgularla da desteklenmesi oldukça faydalı olmuştur. Bu çalışma, bu konuda Aydın yöresinde yapılan detaylı bir çalışmayı temsil etmektedir.

Zeytinin oldukça önemli bir tarım ürünü olduğu ülkemizde, tüm Türkiye' den elde edilecek izolatlarla, *P. s. pv. savastanoi* genotipleri belirlenerek, hastalıkla mücadelede etkili olabilecek detaylı bilgiler sağlanabilecektir.



Şekil 1. Aydın İlindeki farklı ilçelerde, zeytin dal kanseri görülen bahçelerdeki urlu ağaçlar, **A**: Nazilli, **B**: Kuyucak, **C**: Söke, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları için patojenisite testleri **D**; Pss25 nolu izolatin Yamalak Sarısı zeytin fidanında oluşturduğu ur, **E**; Pss32 nolu izolatin zakkum fidanında oluşturduğu ur, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının PCR bulguları; **F**; *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının, *iaal* geninin amplifikasyonu sonucu oluşan 454 bp'lik spesifik bantlar 1: Marker, 2: pozitif referans kültür Pss116, 3: kapss2, 4: kapss5, 5: kapps6, 6: kapss7, 7: kapss9, 8: kapss10, 9:kapss11, 10: kapss12, 11: kapss16, 12: kopss1, 13: kopss2, 14: kopss6, 15: kopss3, 16: kopss4, 17: kopss5, 18: kopss6, 19: kapss13, 20: *X. c. pv. phaseoli*, 21: *P. s. pv. phaselicola*

Kaynaklar

Anonim, 1997. www.tuik.gov.tr. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü-Tarımsal Yapı.

Anonim, 2007a. www.tuik.gov.tr. Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK) Türkiyede Zeytin Üretimi

Anonim, 2007b. www.tuik.gov.tr. Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK) Türkiyede ve Dünyada Zeytin Üretimi

- Alonso E., Jj. Anchez Errano, Anehes Quintana R. Beltra And Lg Llobet 1988, Relation between the presence of plasmids and indoleacetic acid synthesis in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. omunicaciones del III ongre o acional de Fitopatologia. *Puerto de la ruz (Terierife- i las anarias)*, 281-288p.
- Alvarez F. J.E. Garcia De Los Rios, P. Jimenez . Rojas P. Reche And M.T. Troya 1998. Phenotypic variability in different of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* isolated from different hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 603- 609p.
- Azad, H.R. and A. Cooksey, 1995. A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic populations of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. *Phytopathology*, 85:7 740 -745.
- Basım, H., 2002. Characterization by Pulsed-field Gel Electrophoresis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains in Western Mediterranean Region of Turkey. *APS. SO. MSA Joint Meeting, August 25-29 Salt Lake, USA*. 6.
- Benjama, A. M. Atbi H. Tahiri, And A. Aznad, 1993. The present situation with olive knot disease in the Zerhoun region of Morocco. *Al Awamia*, No: 8, 153-160p.
- Basım, H.O. Yeğen, Ersoy, Ülger., 2000. Batı Akdeniz Bölgesinde Zeytin Ağaçlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Tarafından Oluşturulan Bakteriyel Dal Kanseri Hastalığının Yayılışı ve Hastalık Etmeninin Tanısı. Türkiye 1. Zeytincilik sempozyumu 6-9 Haziran 2000 Uludağ üniversitesi Ziraat Fak. Bahçe Bit. ve Gıda Mühendisliği Bölümleri, Bursa, 310-315s.
- Bej, A. K., Dicesare, J. L., Half, L. And Atlas R. M., 1991. Detection Of *Escherichia Coli* And *Shigella* Spp. In Water Using The Polymerase Chain Reaction And Gene Probes For Uid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1013-1017
- Boulila M., 1994. Olive diseases in Tunisia: Current situation and prospects in controlling them. 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union Kuşadası, Aydın. Türkiye, 421-42 s.
- Caponero, A., Am. Contensini, And Iacobellis, 1995. Population diversity of *Pseudomonas Syringae* subsp. *savastanoi* on olive and oleander. *Plant Pathology*, 44: 5, 848-855.
- Denk, G., 2004.
- http://www.tgdf.org/turkce/tr/rapor/ITO/2004/zeytinyagi_2004.pdf. Zeytinyağı Sektör Profili Araştırması.
- Erlich, HA., Gelfand, D., Sninsky, JJ., 1991 Recent Advances In The Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252: 1643-1651.
- Ersoy, A. 2002. Batı Akdeniz Bölgesinde Zeytin Ağaçlarında Görülen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* nin eden Olduğu Bakteriyel Dal Kanseri Hastalığının Yayılışı, Etmenin Moleküler Tanısı, İzolatlarının Elde Edilmesi ve Moleküler Karakterizasyonu. *T.C. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı*, 72 s.
- Fernandes, A.M.M. ,1994. Studies on olive knot disease in Portugal. 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union Kuşadası, Aydın, Türkiye, 517.
- Garden, L., C. David M., Morel, E. Glickmann, M., Abu-Ghorrah, And Y. Dessaux, 1992. Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Applied and Environmental Microbiology* 58(5): 1780-1783.
- Hall, B., 2004. First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on olives (*Olea europaea*) in Australia *Australasian Plant Pathology*, 2004, 33, 433-436
- İyriboz, N. 1941. Zeytin Hastalıkları. 2. Basım. T.C. Ziraat Vekaleti Neşriyatı Umumi Sayı:322. *Zirai Hastalıkları Sayı*: 1. Manfet Matbaası-İzmir. 94s.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J.J. And White, T. J. 1990. Pcr Protocols. *Academic Press*, New York.
- Karaca, İ. 1977. Fitobakteriyoloji ve Bakteriyel Hastalıklar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları* o: 294.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C., 1990. Methods In Phytobacteriology, *Akademia Kiado*, Budapest, XIV+568s.
- Iacobellis ve ark., 1993. Occurrence of unusual of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive in central Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 23,429-435p.
- Iacobellis N.S., A. Caponero and A. Evidente, 1998. Characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* isolated from ash. *Plant Pathology*, 47, 73-83.
- Leite, R. P., Jones J. B., Somodi, G. C., Minsavage G. V. And Stall R. E., 1995. Detection Of *Xanthomonas campestris* Pv. *vesicatoria* Associated With Pepper And Tomato Seed By DNA Amplification. *Plant Disease*, 79 (9), 917-922.

- Lelliott, R. A. And D. E. Stead 1987. A Manual for the Diagnosis of Plant Pathogenic Bacteria. *Blackwell scientific Publication Ltd. OsneyM ad Oxford.* 224s.
- Marcelo A., M. Fernandes, Mf. Potes, Jf. Errano It. Metzidakis (Ed.), D.G. Voyiatzis 1999. Proceedings of the Third International Symposium on Olive Growing Chania, Crete Oreece, 22-26 September 1997: volume 2. *Acta Horticulturae*, 1999, 0:474 581-584p.
- Mohan ve ark., 1987 An Improved Agar Plating Assay For Detection *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* And *Peudomonas syringae* Pv. *phaseolicola* In Contaminated Bean Seed. *Phytopathology*, 77: 1390-1395.
- Mugnai L. O. Surico And Iacobellis, 1993. Response of explants and cultured cells of oleanderto inoculation with strains of *Pseudomonas syringae subsp. savastanoi*. *Petria*, 3: 1,27-39 20 ref
- Mugnai, L. L. Gio Anetti, Ventura, And G. Surico 1994. The grouping of strains of *Pseudomonas syringae subsp. savastanoi* by D A restriction fingerprinting. *Journal of Phytopathology*, 142:3-4 209-218p.
- Öztürk, 2006 <http://www.egeekonomisi.com/yazar>
- Panagopoulos C. G., 1993. Olive Knots in Greeee. *Bulletin OEPP/ EPPO Bulletin*, 23,417- 422p.
- Penyalver, R., Garcia, A., Ferrer, A, Bertolini, E. and Lopez, M. M. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and -PÇR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6): 2673-2677.
- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Quesada, J. M., Salcedo, C. I., Piquer, J., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E. A., Del Río, C., Caballero, J. M., And López, M. M. 2006. Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology*, 96:313-319.
- Sambrook ve ark., 1989 Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
- Schaad . W. J. B. Jones And W . Chun 2001. Laboratory Guide for Identificatorı of Plant Pathogenic Bacteria. Third edition. APS PRESS. St. Paul, Minnesota.
- Sisto, A., Cipriani, M. G., And Morea, M. 2004. Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is *hrp*-dependent. *Phytopathology*, 94:484-489.
- Surico G., Comai, L. and Kosuge T. 1984. Pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* and their indoleacetic aciddeficient mutants on olive and oleander. *Phytopathology*, 74: 490-493.
- Surico G., And P. Lavermicocca 1989. A serniselective mediwn for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytopathology*, 78: 185-190.
- Tatlı B. ve Benlioğlu K., 2004 Aydın ve Muğla İllerinde Zeytin Ağacı Uru *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Hastalığı Üzerine Çalışmalar. *T.C. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı*, 62 s.
- Tehabsim, A., Khadair And Jd. Janse 1991. Oeeurenee and distribution of *Pseudomonas syringae subsp. savastanoi* in Jordan. *Phytopatologia Mediterranea*, 30: 1,64-66p.
- Teviotdale, Beth L. 1994. Olive Production Manua (L8. Part. Pest Management Diseases Of Olive). 107p.
- Tunalıoğlu, R., Karahocagil, P., Tan, M. 2003 tarımsal ekonomi araştırma enstitüsü zeytin yağı ve sofralık zeytin durum ve tahmini : 2002/2003
- Varvaro, L. And Surico, G. 1984. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* and its multiplication in host tissues. u. S. Workshop/Seminar "Plant Pathology and Quarantine" Roma (Italy) , 17- 21 September.
- Wilson E. E. 1965. Pathological histogenesis in oleander tumors induced by *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopalhology*, 55: 1244-1249.