

Prevalence, Isolation and Identification of Bacterial Canker Pathogens on Sweet Cherry Trees in Tekirdağ

Merve BÜLBÜL

Mustafa MİRİK

*Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 59030 Tekirdağ, TURKEY
e-mail: mmirik@nku.edu.tr

Accepted for publication October 27, 2014

ABSTRACT

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

Keywords: *Cerasus avium*, LOPAT, GATTa, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*

ÖZET

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

Anahtar kelimeler: *Cerasus avium*, LOPAT, GATTa, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*,

GİRİŞ

Meyveler insan beslenmesinde eskiden beri önemli yer tutmaktadır. Çünkü meyvelerin sağladıkları kalori, içerdikleri tuz, asitler ve vitaminler insan beslenmesinde büyük öneme sahiptirler (Gerçekçioğlu ve ark. 2006).

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

Dünyada kiraz üretimi coğrafik olarak dünyanın farklı bölgelerine yayılmış durumdadır. Dünyada 2012 yılı kiraz üretimi 2.256.519 ton olup bu üretimin yaklaşık %21.30 'unu Türkiye, %17.04'ünü Amerika Birleşik Devletleri (ABD), %8.86 'sını İran üretmektedir. Türkiye' nin 2012 yılı kiraz üretimi 480.748 ton olup birinci sırada yer almaktadır. ABD 2012 yılında 384.646 tonluk üretimi ile ikinci sırada olup bunu sırasıyla İran ve İtalya izlemektedir.

Ülkemizde kiraz üretimi son yıllarda gerek ağaç sayısı gerekse üretim olarak sürekli artış göstermektedir. 2013 yılında meyve veren ağaç sayısı 17.922.000 meyve vermeyen ağaç sayısı ise 7.236.000 adet ağaçtan 494.325 ton kiraz üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK, 2013). İl bazında kiraz üretiminde İzmir, Manisa ve Konya ilk sıralarda yer almaktadır. Tekirdağ ilindeki kiraz üretimi ise yıllık 2.441 ton olarak gerçekleşmektedir (TÜİK 2013).

Ülkemizdeki kiraz üretimini tehdit eden pek çok biyotik ve abiyotik sorunlar vardır. Fitopatolojik problemler arasında yaprak delen hastalığına neden olan *Stigmia carpophila*, monilya (mumya) hastalığına neden olan *Monilinia laxa*, dal yanıklığı hastalığına neden olan *Nectria galligena*, bakteriyel hastalıklardan ise bakteriyel

kansere neden olan *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* gibi önemli hastalık etmenleri hem ürün kayıplarına hem de ağaç ölümlerine neden olmaktadır.

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

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

Pseudomonas syringae pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* kirazlarda bakteriyel kansere neden olan önemli patojenlerdir. Hastalık etmeni patojenlerin ağacın kök hariç bütün organlarına ve yapılarına saldırması bu etmenlerin önemini daha da arttırmaktadır. Hastalığın tipik belirtisi çeşide, 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 yaralarla (kanser)** birlikte zamklanma ve genel olarak meyve miktarında azalmalar şeklinde ortaya çıkmaktadır (Kennelly ve ark. 2007). Ancak en zararlı hali gövde ve dallarda görülmektedir. Kabuk, dal ve ince sürgünlerde yer alan kanserli dokulardan yaz ve ilkbaharın sonlarında bakteriyel akıntılar görülür. Kanserli dalların terminal yaprakları yaz veya sonbaharın başlarında dalın ucuna doğru yaprakların pörsümesi, sararması şeklinde gözlenir. Sonuçta yapraklar solar ve ölüyor. Yaprak ve meyve enfeksiyonları serin ve yağışlı havalarda önemli ekonomik kayıplara neden olur. Yaprak lekeleri koyu kahverengi, daireselden düzensiz şekillere kadar değişen lekeler şeklinde ve bazı zamanlarda sarı hale ile çevrilidir. Lekeler büyüyerek birleşir ve daha büyük ölü alanlar meydana getirir, lekelerin merkezleri 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 çöktüklerin çukurlar, siyah et benzeri lekeler ve meyvenin yaşına bağlı olarak merkezi sarı-kırmızı renginde lezyonlar meydana gelir. Meyve sapları kahverengi ve su emmiş leke şeklinde görülür. İnfekteli yaprak ve çiçek demetleri baharda açmaz ve ölü tomurcuk olarak adlandırılan belirtiler ortaya çıkar. Bu ölü sürgünlerde küçük kanserler görülür. Diğer infekteli demetler baharda açar fakat yaz başlarında ölür, yapraklar solar ve meyveler kurur (Ogawa ve ark. 1995). Dallarda derin yaralar şeklinde görülen kanser formu genelde ağacın zayıflamasına neden olan don olayları, yaralanma ve stres gibi faktörlerden sonra daha şiddetli gözlenir. Kanser oluşumunu don olayını teşvik eden gövdenin su içeriği, su emmiş lekeler ve büyük gövde çapları gibi faktörler teşvik etmektedir. Kanserli bölgeler konukçu-patojen ilişkisine göre küçük veya büyük olabilmekte ve ağacın ölümlüne neden olabilmektedir. Kanserler, bakterinin kışı dormant olarak geçirdiği yerler olan çiçek demetlerinden ve tomurcuklardan odun dokusuna geçmesiyle başlamaktadır (Kennelly ve ark. 2007). Çiçek demeti enfeksiyonu sonucunda ise 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 de bulunabilir. Bakteriyel etmen yaprakların döküldüğü taze yaralardan gövdeye giriş yapar. Bakteriyel kanserin belirtileri ilkbaharda serin, nemli bir periyot veya yaprak ve çiçeklerden rüzgar nedeniyle oluşan yaraların olması durumunda ortaya çıkmaktadır. Yapraklarda serbest su filminin ve yüksek nemin en az 24 saat devam etmesi sonucunda yaprak enfeksiyonları gerçekleşir (Jones ve Sutton 1996).

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

Pseudomonas syringae pathovaryantlarının tanılama çalışmalarında, LOPAT, GATTA testleri gibi klasik yöntemlerin yanı sıra; patojenisite ve patolojik temelli fitotoksinlerinin dikkate alındığı *in vitro*'da syringomycin üretimi, buz çekirdeği oluşturma aktivitesinin saptanması kullanılmaktadır. Ayrıca, moleküler yöntemlerle de yapılan çalışmalar tanıları desteklemektedir (Ertimurtaş ve ark. 2014).

Pseudomonas syringae pv. *syringae*'nin moleküler tanılanmasında kullanılan *syxB* 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 GGTATTGGCGGGGTGC) kullanılarak moleküler tanılanması yapılabileceği bildirilmiştir. Söz konusu primerlerin PCR ürünleri agaroz jelde 650 bp büyüklüğünde band oluşturmaktadır (Abellera ve ark. 2014). Bu primer setleri izolatların pathovar düzeyinde moleküler tanısında son derece başarılı olarak kullanılmaktadır.

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

MATERYAL ve METOD

MATERYAL

Karakteristik hastalık belirtisi gösteren kiraz bitki örneklerinden izole edilen bakterilerin tanılanması çalışmalarında karşılaştırma kültürleri olarak Çukurova Üniveristesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Yeşim AYSAN'dan temin edilen tanısı yapılmış *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatı, Tekirdağ Merkez ve çevresinden izole edilen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* izolatları, Yalova Bahçe Kültürleri Atatürk Araştırma Enstitüsü'nde çalışan Yük. Zir. Müh. Nesrin TUNALI'dan tanısı yapılmış *Erwinia amylovora* 57 izolatı, besi yerleri, çeşitli kimyasallar, laboratuvar malzemeleri, inkübatör, etüv, otoklav, pH metre, spektrofotometre ve PCR aleti bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

METOD

Hastalığın Yaygınlığının Tespiti

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

Bakteriyel Kanser Etmelinin İzolasyonu

Bakteriyel kanser belirtisi gösteren örneklerin hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içeren 0.5 cm'lik bitki parçaları % 70'lik alkol veya % 1'lik NaOCl ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Parçalar steril havanda %0.85 NaCl içeren saline buffer da homojenize edilmiştir. Elde edilen ekstraktan bir öze dolusu süspansiyon alınarak King B besi yeri içeren petrilere çizgi ekimiyle çizilmiştir. 25°C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra gelişen krem renkli koloniler saflaştırılmış ve gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik olarak hazırlanmış YDC ortamında +4°C'de buzdolabında saklanmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

Patojenite Testi

Hastalıklı kiraz dokularından izole edilen bakteri izolatlarının patojenitesi Lelliott ve Stead (1987)'nin bildirdiğine göre 3 farklı yöntem kullanılarak yapılmıştır. Patojenite testi çalışmalarında 10⁸ hücre/ml inokulum yoğunluğu kullanılmıştır. Patojenite testlerinde pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* referans kültürü, negatif kontrol olarak ise steril su kullanılmıştır. Çalışmada çiçek demetlerine püskürtme, sürgünlerin uç kısımlarına injeksiyon ve meyve inokulasyonu olmak üzere üç farklı inokulasyon yöntemi kullanılmıştır.

Re-izolasyon

Inokulasyon yapılan kiraz sürgün, açılmamış çiçek demetleri ve meyvelerinde meydana gelen kahverengilikler ve kurumalar incelemeye alınmıştır. Örnekler küçük parçalara ayrılmış ve %70 etil alkol ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Örnekler porselen havan içerisine konulmuş ve 2 ml steril saline buffer eklenerek süspansiyonlar hazırlanmıştır. Havanlar 15-20 dakika bekletilerek bakterinin saline buffer süspansiyonuna geçmesi

sağlanmıştır. Bekleme sonunda içerisinde King B besiyeri bulunan petrilere üç çizgi yöntemine göre çizimler yapılmıştır (Janse 2006). İzolasyon petrilere 25°C'de 48 saat inkübatörde bekletilmiştir. King B besi yerinde floresan tipte, küçük, yuvarlak ve kabarık olmayan tipte krem renginde gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Simptom veren bitkilerden re-izolasyonlar yapılarak elde edilen re-izolatlar cam tüplerde eğik olarak hazırlanmış yeast dekstroz kalsiyum karbonat agar (YDCA) besi yerine çizimleri yapılarak tanı çalışmaları yapılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı

129 hasta bitkiden izole edilen 387 izolat içinden seçilen 41 adet re-izolat ile tanı çalışmaları yapılmıştır. Geleneksel yöntemlerle tanı Lelliott ve Stead (1987) ile Schaad ve ark. (2001)'e göre yapılmıştır. KOH ile gram reaksiyonu ve LOPAT (L: levan oluşumu, O: oksidaz testi, P: patatestte pektolitik aktivite, A: arginin dehidrolaz aktivitesi, T: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu), GATTA (G: Jelatin hidrolizi, A: Esculin hidrolizi, T: Tyrosine kullanma, Ta: Tartarik asidi kullanma) 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.

Bakteri İzolatlarının PCR Testi İle Tanısı

Tekirdağ ilinden elde edilen 41 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.

PCR çalışmasında *syrB* gen Primer B1 (5'-CTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3') ve *syrB* gen Primer B2 (5'-TCGATTTGCCGTGATGAGTC-3') (Bereswill 1992) ile *cfl* gen Primer CFLF (5'-GGCGCTCCCTCGCACTT-3') ve *cfl* gen Primer CFLR (5'-GGTATTGGCGGGGGTGC-3') Abbasi 2013) primer setleri kullanılmıştır. Çalışma, reaksiyon tüpü adı verilen 0.5 ml'lik ince duvarlı eppendorf tüplerde toplam hacmi 25 µl olan reaksiyon karışımının (12.5 µl PCR Master Mix (Promega, M7502), 2.0 µl 20 pmole primer1 ve primer2, 6.5 µl H₂O, 2.0 µl g-DNA) kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. B1 ve B2 primerlerinin PCR işlemi için kullanılan program; İlk denatürasyon 94°C'de 4 dak., 35 döngü 94°C'de 1 dak., 60°C'de 1.5 dak., 72°C'de 1.5 dak., Final extention 72°C'de 10 dak. olarak PCR cihazına programlanmıştır. CFLF ve CFLR primerlerinin PCR işlemi için kullanılan program ise İlk denatürasyon 93°C'de 4 dak., 37 döngü 93°C'de 1 dak., 52°C'de 2 dak., 72°C'de 1.5 dak., Final extention 72°C'de 10 dak. olarak PCR cihazına programlanmıştır. Elde edilen bakteri DNA'sının ve PCR ürünlerinin Agarose jel elektroforezine yönelik çalışmalar Sambrook ve ark. (1989)'a göre yapılmıştır. Bunun için 0.9 g agarose 90 ml 1 X TAE tamponuna konularak mikrodalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulan solüsyon, taraklar yerleştirilen jel tepsisine dökülmüştür. Agaroz jelin donmasından sonra jel tankı içerisine jeli örtünceye kadar 1XTBEbuffer konmuştur. Daha sonra örnek koymak için kullanılan tarak dikkatlice çekilerek çıkarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan agaroz jel çukurlarına 3 µl loading buffer ve 12 µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımı ile dikkatlice verilmiştir. Moleküler ağırlık işaretleyici (Marker) olarak 100 bp DNA işaretleyici (Marker, Fermentas SM 0623) kullanılmıştır. Elektroforez tankında agaroz jeldeki örnek hücrelerin bulunduğu yer güç kaynağının negatif (-) kutbuna denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve PCR ürünleri 100 V elektrik akımında yaklaşık 1 saat süre ile yürütülmüştür. Bantların görülmesi için ethidium bromür ile (10 mg/ml) 10 dak. boyama yapılmış ve bunu takiben 15 dak. saf su ile jel yıkanarak transliminatörde (302 nm) bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi: Tekirdağ ilinde 7 farklı yörede Merkez, Naip, Mermer, Kumbağ, Karahisarlı, Çanakçı, Barboros kiraz üretim alanlarına 2012 ve 2013 yılının Mart-Haziran aylarında periyodik olarak ziyaretler yapılmış ve ziyaret edilen kiraz bahçelerinde bakteriyel kanserin neden olduğu karakteristik hastalık belirtileri olan çiçek demeti yanıklığı, sürgünlerde geriye doğru ölüm, yaprak ve meyve lekeleri ile odun dokularında kanserle birlikte zamklanma belirtileri gözlenmiştir. Arazi çalışmalarında ziyaret edilen bahçelerde hastalığın bulunma oranı %100 olarak belirlenmiştir. Tekirdağ ili mevkilerine göre ziyaret edilen bahçelerde hastalığın bulunma oranları ise Naip'te %35.6, Mermer'de %33.3, Merkez'de %17.4, Kumbağ'da %38.5, Karahisarlı'da %25.0, Çanakçı'da %20.0, Barboros'ta %57.1 olarak belirlenirken, hastalık şiddetinin ise %28.5-50.7 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir.

Hastalık etmeninin izolasyonu: Tekirdağ çevresinde bakteriyel kanser belirtisi gösteren 129 adet bitki örneğinin hastalıklı ve sağlıklı doku kısımlarını içeren parçalardan King B besi yerine yapılan izolasyonlarda 2-3 gün içinde krem-beyaz renkte ve floresan tipte kolonilerden 387 adet bakteri izolatu elde edilmiş ve tanı testleri yapılmıştır.

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 7×10^8 hücre/ml yoğunluğunda olduğu hesaplanmıştır (Klement ve ark. 1990).

Patojenite testi:Hastalıklı kiraz dokularından izole edilen ve tanı çalışmasında kullanılan 41 bakteri izolatu ve referans kültür King B besi yerinde geliştirilen 24 saatlik bakteri izolatlarının 7×10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonları hazırlanmıştır. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe bitkileri Demonstrasyon Kiraz bahçesinden 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). Tipik hastalık belirtisi gösteren bitkilerden yapılan re-izolasyonlar sonucu seçilen 41 re-izolat tekrar izole edilmiş ve tanı testlerinde kullanılmıştır.

Bakteri İzolatlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Testlerle Tanısı:Hastalık belirtisi gösteren kiraz bahçelerinden izole edilen 41 adet bölge izolatu ve bir referans izolat olmak üzere 42 adet re-izolatla yapılan tanı çalışmaları sonucunda; izolatlar King B besi yerinde krem renkli flouresan koloni, gram negatif, levan tipte koloni oluşumu ve tütünde aşırı duyarlılık pozitif olarak belirlenmiştir. Oksidaz, pektolitik aktivite ve arginin dehidrolaz ise negatif olarak belirlenmiştir. İzolatların tür ayırımında kullanılan GATTa testi sonucunda iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup içerisinde yer alan 23 izolatın GATTa sonuçları -, -, +, + olarak belirlenmiş ve bunların *Pseudomonas syringae* pv.*morsprunorum* olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 23 izolatın ise GATTa sonuçları +, +, -, - olarak saptanmış, izolatların *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* olarak tanıları yapılmıştır. İzolatlarla yapılan tanı testlerinin sonuçları Çizelge 1’de özetlenmiştir.

Çizelge 1. Bakteri izolatlarının test sonuçları

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

Barbaros 3/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 4/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 5/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 6/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 7/1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	Pss
Barbaros 8/1	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	Psm

F: King B'de floresan tip koloni gelişimi, L: Levan oluşumu, O: Oksidaz reaksiyonu, P: Pektolitik aktivite, A: Arginin dehidrolaz, T: Tüttünde 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*

Elde edilen re-izolatların tanımlarının yapılmasında mutlaka GATTA testinin kullanılması gerektiği bu çalışma ile de ortaya konmuştur. Re-izolatlarla yapılan GATTA testi sonucunda iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup içerisinde yer alan 23 izolatın GATTA sonuçları -, -, +, + olarak belirlenmiş ve bunların *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 23 izolatın ise GATTA sonuçları +, +, -, - olarak saptanmış izolatların *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımları yapılmıştır.

Bakteri İzolatlarının PCR Testiyle Tanısı: B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR testlerinde 18 re-izolatın (Naip1/1, Naip 2/1, Naip3/1, Naip 4/1, Naip5/1, Naip 6/1, Naip7/1, Mermer 1/1, Mermer 2/1, Mermer 3/1, Mermer 4/1, Barbaros 1/1, Barbaros 2/1, Barbaros 3/1, Barbaros 4/1, Barbaros 5/1, Barbaros 6/1, Barbaros 7/1) %1.5 agaroz jelde 752 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur. Moleküler ağırlık işaretleyicisi olarak kullanılan 100 bp'lik marker PCR ürününün 752 bp büyüklüğünde olduğu Şekil 4. 18'de görülmektedir. B1-B2 primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 18 adet izolatın *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olduğu belirlenmiştir. CFLF-CFLR primerleri ile yapılan PCR çalışmasında ise re-izolatların 23 adedi (Naip 8/1, Naip 9/1, Naip 10/1, Naip 11/1, Naip 12/1, Naip 13/1, Naip 14/1, Naip 15/1, Naip 16/1, Merkez 1/1, Merkez 2/1, Merkez 3/1, Merkez 4/1, Kumbağ 1/1, Kumbağ 2/1, Kumbağ 3/1, Kumbağ 4/1, Kumbağ 5/1, Karahisarli 1/1, Karahisarli 2/1, Karahisarli 3/1, Çanakçı 1/1, Barbaros 8/1) %1.5 agaroz jelde Şekil 4.19'da görüldüğü gibi 650 bp baz uzunluğu oluşturarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 1'de görüldüğü üzere izolatların tanımlama çalışmalarında kullanılan klasik yöntemlerden LOPAT karakterizasyonuna göre izolatların tamamı +,-,-,+ özellikler göstererek *Pseudomonas syringae* olduğu ortaya konulmuştur. Elde edilen re-izolatların tanımlarının yapılmasında mutlaka GATTA testinin kullanılması gerektiği bu çalışma ile de ortaya konmuştur. Re-izolatların yapılan GATTA testi sonucunda iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup içerisinde yer alan 23 izolatın GATTA sonuçları -, -, +, + olarak belirlenmiş ve bunların *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 18 izolatın ise GATTA sonuçları +, +, -, - olarak saptanmış izolatların *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımları yapılmıştır.

Ivanovic ve ark (2009) izolatların GATTA testine göre iki farklı gruba ayrıldığını belirlemiştir. GATTA birinci grupta yer alan izolatlar jelatin ve esculini hidrolize ederken thyrosinaz ve tartarata kullanılmamalarından dolayı *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmışlardır. İkinci grup içinde bulunan izolatlar jelatin ve esculin hidrolize etmezken, thyrosinaz ve tartarattan kullanılmalarından dolayı *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanımlanmıştır. Kaluzna ve ark. (2010) farklı sert çekirdekli meyvelerden izole ettikleri 30 adet *Pseudomonas* 'ın 23 adedi LOPAT testlerine göre *Pseudomonas syringae* olarak tanımlanmıştır. Tam olarak tür ayırımını yapmak için GATTA kullanmaları sonucunda 10 tanesi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1, 6 tanesi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 ve 6 tanesi de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmışlardır. Gavriloviç ve ark. (2012) ise kiraz üretim alanlarından elde ettiği *Pseudomonas* izolatlarının tanısını patojenite testi ve GATTA testine jelatin ve esculin pozitif, tyrosinaz ve tartarat ise negatif olarak *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak, jelatin ve esculin negatif, tyrosine ve tartarat ise pozitif olan izolatları ise *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* olarak tanımlanmıştır. Gasic ve ark. (2012) gram reaksiyonu, KB'de floresan ve LOPAT testleri *Pseudomonas* türlerini birbirinden ve bazı diğer cinslerden ayırmada kullanılan testler olarak kullanılabilirliğini belirtmiştir. GATTA testi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ayırmada kullanılırken (Latorre ve Jones 1979) *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2'de ise uygun olmamıştır (Gilbert ve ark. 2009). *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 jelatin ve esculini hidrolize etmiş, tyrosine üretmiş ama tartarik asidi kullanmamıştır. GATTA testi *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 için uygun olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 jelatin ve esculini hidrolize etmezken tyrosine ve tartarik asidi kullanmaktadır (Bultreys ve Kaluzna 2010). Bu yüzden GATTA testinde *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 1 ve ırk 2'yi ayırmada sadece jelatin hidrolizi kullanılabilir. Vicente ve Roberts (2007) bazı *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 izolatlarının GATTA test sonucu (+++-) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'ye benzer olduğunu bildirmiştir. Bunun yanında GATTA test *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ayırmada kullanılacak bir yöntem olduğu ama *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ırk 2 için buz çekirdeği aktivitesi, sukroz nutrient broth besiyerinde

gelişim ve insitoldan asit üretimi gibi ekstra testlerin eklenmesi gerekmektedir. *Pseudomonas syringae* pathovarlarının simptomolojik ve genel karakteristik özellikleri nedeniyle sert çekirdekli meyvelerde ayırımı kolaylıkla karıştırılabilmektedir. Sadece LOPAT testi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* ayırmada yeterli olmadığı gerek yaptığımız çalışmada gerekse diğer yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi uygun olmamaktadır. Bu nedenle yapılan bütün çalışmalar GATTa gibi ayırıcı testlerin yapılması daha doğru sonuçların alınmasında faydalı olacaktır. Ayrıca elde edilen re-izolatların tanısında moleküler yöntemlerle desteklenmesinin gerektiği birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir. İki farklı primer dizimleri kullanılarak yapılan PCR çalışmaları sonucunda elde edilen re-izolatların iki farklı tür olduğu saptanmıştır. İzolatların 23 tanesi *cfl* genine göre elde edilen primerlere reaksiyon verirken 18 adet izolat ise *syrB* genine göre dizayn edilen primerlerle reaksiyon vermiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda elde edilen verilerle 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 752bp baz uzunluğunda tekrarlanabilen bantlar oluşturan izolatlar ise *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* olarak tanılanmıştır. Gasic ve ark. (2012) PCR metotlarında toksin üretimlerinin belirlenmesinde, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* için *syrB* ve *syrD*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* için *cfl* genlere dayalı PCR testlerinin izolaların ayırımında yeterli olacağını bildirmiştir. Ertimurtaş ve ark. (2014) *Pseudomonas syringae* pathovarlarının moleküler yöntemlerle yapılan tanısında *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 'nin syringomycin sentezinden sorumlu *syrB* geni ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 'nin coronatine sentezinden sorumlu *cfl* genlerine göre belirlemiştir. Benzer olarak Abbasi ve ark. (2012) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 'nin moleküler tanılanmasında *syrB* genine göre dizayn edilen primer kullanıldığında 752bp baz uzunluğunda PCR ürünleri elde edilirken, Albelleria ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* 'un moleküler tanılanmasında kullanılan *cfl* geninin kullanıldığı PCR çalışmalarında ise 650 bp baz uzunluğunda PCR ürünlerinin elde edildiğini belirlemiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar ile araştırmacıların sonuçları paralellik göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje ofisi tarafından NKUBAP.00.24.YL.14.06 nolu proje olarak desteklenmiştir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- 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.
- Anonim 2008. Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel yanıklık hastalığı. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Ankara, Cilt 4, 66-68.
- Burak, M. 2003. Meyvecilik-1, 147-151.
- De Boer, S. H., Ward, L. J. 1995. PCR detection of *Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. Phytopathology, 85:854-858.
- Ertimurtaş, D., Özaktan, H. 2014. Sert çekirdekli meyvelerde bakteriyel kansere neden olan *Pseudomonas syringae* pathovarlarının tanısı. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, Antalya.
- 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).
- Görmez, A. 2011. Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit reaksiyonları. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- 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.
- 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., 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.
- Kennely, M. M., Cazorla, F. M., Vicente, A., Ramos, C., Sundin, G. W. 2007. *Pseudomonas syringae* disease on fruit trees. *Plant Disease*, 91(1).
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. 1990. *Methods in Phytopathology*, Akademia Kiado, Budapest, XIV+568p.
- Lelliot, R. A., Stead, D. E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- 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. M., Zehr, E. L., Bird, G. W., Ritchie, D. F., Uriu, K. and Uyemoto, J. K. 1995. *Compendium of stone fruit diseases*, 78-87.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p.
- 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.
- TÜİK, 2013. www.tuik.gov.tr. Türkiye’de kiraz ağaç sayısı ve üretim miktarı. 23\07\2014.