

## Ceviz Bakteriyel Yanıklık Etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e Karşı Antagonist Bakteriyel İzolatların *in vitro* Koşullarda Biyokontrol Etkinliklerinin Belirlenmesi

Determination of *in vitro* Biocontrol Potentials of Antagonist Bacterial Isolates against Walnut Blight Disease Agent *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*


Bilgen YÖRÜK<sup>1</sup>, Mustafa MİRİK<sup>2\*</sup>

### Öz

*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in neden olduğu ceviz yanıklık hastalığı, cevizin (*Juglans regia* L.) üretimini etkileyen en önemli ve yaygın bakteriyel hastalıklardan biridir. Hastalık etmeni ülkemiz ceviz üretim alanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Tipik semptomlar sürgün, yaprak, dişi çiçek, tomurcuk ve meyve gibi tüm sulu dokularda görülür. Enfeksiyon başlangıçta su emmiş leke şeklindeyken zamanla bu lekeler kahverengi-siyah nekrotik alanlara dönüşür. Başlangıçta sarı-yeşil bir hale ile çevrelenmiş dairesel lezyonlar genellikle noktasal olarak genişler. Hastalık etmeni ile mücadelede kültürel önlemler ve bakırlı preparatlar önerilmektedir. Son yıllarda, bakteriyel hastalık etmenlerinin kontrolünde çevreye dost biyolojik mücadele üzerine çalışmalar artmıştır. Bu çalışmada; enfekteli bitkilerden *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in izolasyonu ve tanılanması ve potansiyel aday bakteriyel antagonistlerin *in vitro* koşullarda bakteriyel büyümeyi baskılayabilme yetenekleri ve antagonistik potansiyelleri araştırılmıştır. Kütahya ili ceviz üretim alanlarına yapılan surveyler ile hastalıklı yaprak; sağlıklı yaprak ve çiçek örnekleri toplanmıştır. Hastalıklı yapraklardan patojen bakteri izolatu; sağlıklı çiçek ve yapraklarda antagonist bakteri izolatu elde edilmiştir. Bakteriyel hastalık etmeni izole edilmiş ve morfolojik ve biyokimyasal testlerle tanılanmıştır. Sağlıklı ceviz yapraklarından seçici besi ortamları kullanılarak izole edilen 109 adet aday antagonist bakteri izolatları ile *in vitro* koşullarda ikili kültür testi yapılarak *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'i baskılama yetenekleri araştırılmıştır. Bu test sonucunda, 80 adet izolatu farklı boyutlarda (3.44-30.00 mm) engelleme alanı oluşturduğu, 37 adet izolatu ise gelişimini tamamen baskıladığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada antagonist bakterilerin *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* gelişimini önemli oranda engellemiş olması, antagonist izolatların biyolojik mücadelede kullanılabilirliğini göstermiştir. Hastalık etmenine karşı etkili bakteriyel izolatların tanılanması ve *in vivo* çalışmalarla etkinliğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** *Juglans regia*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, Ceviz bakteriyel yanıklık hastalığı, Biyolojik mücadele, Antagonist

<sup>2\*</sup>Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mustafa Mirik, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Tekirdağ, Türkiye. E-mail: [mmirik@nku.edu.tr](mailto:mmirik@nku.edu.tr)  ORCID: 0000-0002-5651-6597

<sup>1</sup> Bilgen Yörük, İzmir Ziraat Karantina Müdürlüğü, İzmir, Türkiye. E-mail: [bilgenyoruk@gmail.com](mailto:bilgenyoruk@gmail.com)  ORCID: 0000-0002-1830-6660

**Atıf/Citation:** Yörük, B., Mirik, M. Ceviz bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' e karşı antagonist bakteriyel izolatların *in vitro* koşullarda biyokontrol etkinliklerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18 (3), 569-577.

\*Bu çalışma Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

©Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi tarafından Creative Commons Lisansı (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) kapsamında yayınlanmıştır. Tekirdağ 2021

## Abstract

Walnut blight disease, caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*), is one of the most important and common bacterial disease which effects production of walnut (*Juglans regia* L.) plants. The bacterial disease is led to economic losses significantly in juglans growth fields of Turkey. Typical symptoms occur on all succulent tissues including shoots, leaves, rachis, petioles, buds, female flowers, catkins and nuts. Infection begin as translucent water-soaked areas which develop into brown to blackish greasy necrotic areas. Lesions, which are often surrounded by a yellow-green halo, are initially circular but often expand into angular spots. Management of the pathogen is suggested the cultural methods and using copper compounds. Recently, controlling bacterial diseases the eco-friendly biological control studies are increased to control bacterial diseases. In this study, isolation and identification of disease agent *Xaj* from infected plants and antagonistic potentials of candidate bacterial antagonist biological control agent were investigated for their ability to suppress bacterial growth *in vitro* conditions. Bacterial disease agents were isolated and identified according to morphological and biochemical methods. Using selective nutrient media, total of 109 candidate antagonist bacterial isolates were isolated from different healthy walnut plant leaves and investigated for their ability to suppress bacterial growth *in vitro* conditions by dual culture test. From this test, eighty-one bacterial isolates were found to produce inhibition zones a varying size (range of 3.44-30.00 mm). Among the 80 isolates, thirty-seven isolates were able to suppress the bacterial growth completely. According to preliminary results of the significant suppression in the bacterial growth caused by antagonist bacteria, bacterial isolates could be used as possible biocontrol agent against walnut bacterial blight disease. Further studies should be conducted on identification and determination of mode of actions and *in vivo* activities of the most efficient bacterial isolates against disease agent.

**Keywords:** *Juglans regia*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, Walnut bacterial blight disease, Biological control, Antagonist

## 1. Giriş

Ceviz sağlık ve beslenme bakımından çok önemli bir bitki türüdür. Genel olarak cevizde %3.5 su, %15-30 protein, %55-77 yağ ve %5-15 oranında da karbonhidrat (ağırlık selüloz) bulunmaktadır. Ayrıca cevizin meyvesi, Ca, P, Mg, Fe, Na, K gibi mineral maddeler bakımından zengin olduğu gibi A, B1, B2, B6, C vitaminlerini de içermektedir. Bir kg ceviz yaklaşık 7.000 kalori enerji sağlamaktadır.

Cevizin anavatanı bazılarında göre İran'ın Ghilan Bölgesi, bazılarında göre ise Çin'dir. Daha büyük bir kesim ise cevizin ana vatanının Karpat dağlarından Türkiye, Irak, İran, Afganistan, Güney Rusya, Hindistan, Mançurya ve Kore'ye kadar uzandığını savunulmaktadır (Anonim 2017a).

Ceviz gerek Türkiye'de ve gerekse Dünya'da önemli bir kültür bitkisi olmasından dolayı geniş üretim alanlarına sahiptir. Üretim bakımından değerlendirildiğinde Dünya 2018 yılı ceviz üretimi toplam 3.662.507 ton olup önemli ceviz üretici ülkeler ise Çin, Amerika, İran, Türkiye ve Meksika'dır. Türkiye 2018 verilerine göre 1.117.750 dönümden 215.000 ton ceviz üretimi ile Dünya'da 4. sırada yer almaktadır. Cevizin iklim istekleri uygun olmasından dolayı Türkiye'nin hemen hemen her bölgede yetiştirilmektedir (FAO, 2021).

Ülkemizde üretim, sağlık ve beslenme açısından önemli bir yere sahip olan ceviz bitkisinde fungal, bakteriyel kökenli birçok hastalık görülmektedir. *Armillaria Kök Çürüklüğü (Armillaria mellea)*, Cevizde Memeli Pas (*Gymnosporangium spp.*), Yaprak Sarı Çillenmesi (*Microstroma juglandis*) (Kurt ve ark., 2003) ve Ceviz Antraknozu (*Gnomonia leptostyla*) cevizde görülen önemli fungal hastalıklardır. Ceviz Kök Boğazı Tümörü (*Rhizobium radiobacter*), Cevizde Bakteriyel Kanser ve Zamklanma (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) ve Ceviz Bakteriyel Yanıklığı (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) ise cevizde görülen önemli bakteriyel hastalıklardır. Ceviz yapraklarında karşılaşılması olası bir viral hastalık da mevcuttur. Bu, Kiraz Yaprak Kıvrıcıklığı Virüsü (Cheery Leafroll Nepovirüs, CLRV)'nin bir ırkının cevizin aşı yeri ile anacı arasında siyah bir çizgi şeklinde belirti veren cevizde halkalı leke veya siyah çizgi hastalığıdır (Tezcan, 2005).

Hastalık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*)'ın sebep olduğu ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığı, İran'da bahar aylarında hava koşullarına göre şiddetli epidemilere sebep olarak, ceviz üretim alanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olmuştur (Vauterin, 2000). Ayrıca *Xaj*'ın neden olduğu bakteriyel ceviz yanıklığı hastalığının, Marmara Bölgesi'nde uygun hava koşullarında şiddetli epidemi yaptığı bildirilmiştir (Özaktan ve ark., 2007).

Patojen ceviz yapraklarında kahverengi-siyah lekeler sebep olur. Sayısız lekeler ve çizgi şeklindeki oluşumlar yaprak yüzeyini tamamen kaplayarak yaprak şekil bozukluğuna ve deformasyonlara sebep olurlar. Meyve kabuğu henüz yeşilken dış kabuk üzerinde siyah lekeler sebep olur ve bu lekeler cevizin iç kısmına kadar ilerleyebilir. Etmenin özellikle erken ilkbahar donlarından sonra yeşil sürgün ve tomurcuklarda yanıklık meydana getirmesi oldukça karakteristik bir belirtidir. Patojen yaşlı ağaçların dallarında kurumalara sebep olmaktadır (Anonim, 2017b).

Etmenin mücadelesinde; hastalıklı sürgün ve dalların budanarak uzaklaştırılması, dökülen meyvelerin toplanarak uzaklaştırılması, hastalığa karşı dayanıklı çeşit kullanımı, bakırlı fungusitlerin kullanımı önerilmektedir.

Son yıllarda patojen bakterilerin bakıra karşı dayanıklılık kazanması mücadele yönteminde yeni alternatiflerin aranması çalışmalarını hızlandırmıştır. Bu çalışma ile hastalıkla mücadelede kimyasallara alternatif biyolojik mücadele olanakları *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak; *Xaj* CP2 izolatu, Kütahya ili Domaniç ilçesi ceviz üretim alanlarından izole edilen ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bakteriyojoloji Laboratuvarında bulunan Prof. Dr. Mustafa MİRİK'e ait aday antagonist bakteri izolatları ve çeşitli besi yerleri kullanılacaktır.

### 2.1. Hastalık belirtisi gösteren ceviz yapraklarının toplanması ve bakteriyel etmenin izolasyonu

2015-2017 yıllarında Mart-Haziran ayları boyunca düzenli aralıklarla Kütahya'nın Domaniç İlçesi'nde Merkez, Aksu, Böçen, Sarıot ve Yeşilköy mahallelerinde bulunan 21 adet ceviz bahçesine surveyler yapılmıştır. Bu bahçelerden ceviz yapraklarında kahverengi-siyah lekeli ve bu lekelerin kenarları sınırlanmış kloroz olan yaprak örnekleri toplanmıştır. Toplanan örneklerin etiketlemesi yapılarak gazete kağıtlarına sarılıp polietilen torbalara

konulmuştur ve laboratuvara getirilmiştir. Hastalıklı yapraklardan yanıklık belirtisi görülen kısımlarından, hastalıklı ve sağlıklı dokuyu içerecek şekilde yaklaşık olarak 0.5 cm'lik bitki parçaları alınmış ve %70'lik alkol veya %1'lik NaOCl kullanılarak yüzeysel dezenfeksiyonu yapılmıştır. Bitki parçaları havanda steril nutrient broth ile homojenize edilmiş ve 20-30 dakika steril kabinde bekletilmiştir. Daha sonra NA besi yeri içeren petrilere bir öze dolusu bakteri solüsyonundan alınarak çizgi ekimi yapılmıştır. Petriler 25 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Sarı koloni gelişimi gösteren petrilere saflaştırma yapıldıktan sonra eğik agara alınarak inkübe edildikten sonra +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

## 2.2. Elde edilen izolatların tanısı

Lelliott ve Stead (1987)'e göre hastalıklı bitkilerden elde edilen izolatların patojenitesi yapılmıştır. Patojenite çalışmaları için ham ceviz meyveleri kullanılmıştır. Meyveler %3'lük NaOCl içerisinde 3 dakika bekletildikten sonra steril su ile yıkanarak yüzeysel dezenfeksiyonu yapılmıştır. Nemli kurutma kağıtlarının bulunduğu steril kutulara her kutuda 3 adet olacak şekilde ceviz meyveleri yerleştirilmiştir. Daha sonra NA'da 48 saat inkübe edilen *Xaj* izolatları steril bir kürdan ile alınarak ham ceviz meyvesine batırılarak inokule edilmiştir. 25 °C'de 48 saat inkübe edilen kutulardaki cevizler üzerindeki belirtiler değerlendirilmiştir (Van der Zwet, 1986; Klement ve ark., 1990). Ham ceviz meyvesi üzerinde görülen siyah lekelerden re-izolasyonlar yapılmıştır. Elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmalarına geçilmiştir. Ceviz de bakteriye yanıklık etmeni *Xaj*'in KOH ile gram reaksiyonu, sisteminden H<sub>2</sub>S oluşumu ve LOPAT (L: levam oluşumu, O: oksidaz testi, P: patatestte pektolitik aktivite, A: arginin dehidrolaz testi, T: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu), oksidatif-fermantatif, nişasta hidrolizasyonu ile tanı testleri yapılmıştır (Sands, 1990; Lelliott ve Stead, 1987, Klement ve ark., 1990, Schaad, 2001.). Ayrıca Tween B besi yerinde koloni morfolojisine bakılmıştır (McGuire ve ark., 1986).

## 2.3. Ceviz bakteriye yanıklık hastalığının biyolojik mücadelesine yönelik *in vitro* çalışmalar

### *Ceviz yapraklarından aday antagonist izolasyonu:*

2015-2017 yılları Mart-Haziran aylarında Kütahya ili Domaniç ilçesine bağlı Merkez, Aksu, Böçen, Sarıot ve Yeşilköy mahallesi ceviz bahçelerine yapılan surveylerde, sağlıklı ağaçlardan yaprak örnekleri alınmış ve kağıt torbalara konularak laboratuvara getirilmiştir. Aday antagonist bakteri izolasyonu için PSF besi ortamı kullanılmıştır. İzolasyon için 10 g yaprak örneği tartılarak 90 ml nutrient broth içerisinde 2-3 saat süreyle 150 rpm hızla orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Daha sonra yaprak süspansiyonundan 1'er ml alınarak içerisinde 9 ml nutrient broth bulunan tüplere aktarılmıştır. Her bir örnekten ayrı ayrı seyreltme serisi hazırlanmıştır. Seyreltme serilerinin -4, -5 ve -6.'sından 100 µl alınarak 3 tekerrürlü olacak şekilde PSF içeren petrilere baget ile yayılmıştır. Petriler 48-72 saat 25 °C' de inkübe edilmiştir. Petrilere gelişen farklı renk ve tipteki koloniler saflaştırılmış ve tütünde aşırı duyarlılık testi yapılmıştır. Test için bir öze dolusu bakteri 9 ml nutrient broth ile karıştırılmış ve steril bir şırınga ile tütün yaprağının damar arasına enjekte edilmiştir. 24 saat sonra tütün yapraklarında damar arasında su emmiş leke, nekroz oluşumu gösteren izolatlar elenmiş, herhangi bir belirti göstermeyen izolatlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere YDCA besi yerinde inkübe edilip +4 °C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

### *Aday antagonistlerin *in vitro*'da *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi:*

Aday antagonist bakteri izolatlarının *Xaj*'a karşı etkinliği ikili kültür testleri sonucunda belirlenmiştir (Krishnamurthy ve Gnanamarickam, 1998; Mirik, 2005; Çetinkaya-Yıldız, 2007; Horuz, 2014; Öksel ve Mirik, 2015; Bozkurt ve Soylu, 2019; Umarusman ve ark., 2019). Çalışmada patojen bakteri olarak CP2 Aksu kodlu *Xaj* izolatı kullanılmıştır. Elde edilen aday antagonist izolatlar NA besi yerinde geliştirilmiş ve gelişen kültürlerin her biri petride 120 derecelik açıyla birbirinden uzak çizilmiş üç noktaya nokta ekimi yapılmıştır. Petriler 25 °C' de 24 saat inkübe edilerek aday antagonistlerin gelişimi sağlanmıştır. 24 saat sonra patojenin 1×10<sup>8</sup> hücre/ml konsantrasyondaki süspansiyonu eşit mesafeden petrilere püskürtülerek patojenin eşit olarak yayılması sağlanmıştır. 25 °C'de 2 gün inkübasyondan sonra petrilere oluşan engelleme alanları ölçülerek aday antagonist izolatların etkinliği belirlenmiştir. Petri denemeleri *in vitro* koşullarda üç tekerrürlü olarak kurulmuştur.

### 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

#### 3.1. Ceviz Yapraklarından Bakteriyel Yanıklık Etmeninin İzolasyonu

Kütahya iline bağlı Domaniç ilçesi Merkez, Aksu, Böçen, Sarıot ve Yeşilköy mahallesi ceviz bahçelerinden alınan yaprak örnekleri laboratuvara getirilerek izolasyonu yapılmıştır. İzolatlar NA besi yerinde sarı renkte, mukoid, yuvarlak koloni gelişimi göstermiştir. Toplamda 15 adet izolat elde edilmiştir.

#### 3.2. Elde Edilen İzolatların Tanısı

**Patojenite Testi:** Elde edilen *Xaj* izolatlarının patojenite testi sonucunda ham ceviz meyvelerinde 2-4 gün sonra kahverengi-siyah lekeler gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak steril su ile yapılan meyve inokulasyonlarında ise herhangi bir belirti gözlenmemiştir. İzolatlar ham meyvelerde referans kültür olarak kullanılan Hacıköy izolatı ile aynı belirtileri gösterdiğinden patojenite testi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Patojenite testi sonucu elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmaları yapılmıştır.

**Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyonu:** *Xaj* re-izolatları ile yapılan gram reaksiyonu sonucunda, öze yapışarak viskoz bir yapının oluşmasından dolayı izolatlar Gram (-) olarak değerlendirilmiştir. *Cmm* 1-2 kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatı ise uzama göstermemiştir (Tablo 1).

**Levan Oluşumu:** SNA besi yerine çizimi yapılan *Xaj* re-izolatlarının tamamında levan oluşumu gözlenmemiştir. *E* 4-2 kodlu *Erwinia amylovora* izolatı ise SNA besi yerinde beyaz, kubbemsi, mukoid koloni gelişimini göstermiştir (Tablo 1).

**Oksidaz Testi:** Re-izolatlar oksidaz test solüsyonu emdirilmiş filtre kağıdına çizilen zig zaglar sonucunda hiçbir renk değişimi olmadığından oksidaz testi negatif olarak değerlendirilmiştir. Oksidaz pozitif özellikteki *Pseudomona cichorii* kültürü çalışmada kullanılmıştır ve mavi-mor renkte bir değişime neden olmuştur (Tablo 1).

**Pektolitik Aktivite Testi:** *Xaj* re-izolatları pektolitik enzim üretmediğinden patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük belirtisi oluşturmamıştır. İzolatların patatesteki pektolitik aktivite testi negatif olup, kontrol olarak kullandığımız SRE 31-1 kodlu *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* izolatı çalışmada kullanılmış ve patates dokularında çürümeye neden olmuştur (Tablo 1).

**Arginin Dehidrolaz Testi:** Thornley 2A besi yerine inokule edilen re-izolatlar ve Hacıköy izolatı besi yerinde renk değişimine neden olmamıştır (Tablo 1).

**Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi:** *Xaj* re-izolatları ve Hacıköy izolatı tütün yapraklarının damar aralarında 24 saat sonra su emmiş alanlar ve 48 saat sonra nekroz oluşturduğundan aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1).

**Oksidatif-Fermentatif Test:** Taze geliştirilmiş 48 saatlik *Xaj* izolatları ve orijinal bakteri kültürleri ile nokta aşılama yapılmıştır. Her izolat için 6 tüp kullanılmıştır, bu tüplerden üçüne 1 ml steril ılık vaspar (bir ölçü vazelin üç ölçü parafin karışımı) konarak yüzeyi kapatılmış diğer üçüne hiçbir ekleme yapılmamıştır. 25°C’de 5-6 günlük bir inkübasyondan sonra ortam renginin sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilir. *Xaj* izolatlarıyla yapılan oksidatif-fermantatif test sonuçlarında vasparlı tüplerde sarı renk oluşumu görülmemiştir. Bu nedenle oksidatif-fermantatif test sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir. Bunun sebebi ise *Xaj*’in aerobik bir bakteri olmasıdır. Kısacası vaspar ile hava teması kesilen tüplerde ceviz bakteriyel yanıklık etmeni gelişim yapamadığından karbonhidrat ayrışması gerçekleşmemiştir (Tablo 1).

**Nişasta Hidralizasyon Testi:** Nişasta besi yerine çizilen ceviz bakteriyel yanıklık izolatları ve referans kültürler 7-14 günlük inkübasyon sonunda üzerine lugol eriği döküldüğünde koloni çevresinde referans kültürde belirgin parlak bir alan gözlenirken bölge izolatlarında bu alan zayıf olarak belirlenmiştir. Bölge izolatları nişastayı hidrolize ettiklerinden pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1).

**Tween B ortamında Koloni Gelişimi:** Bölgeden izole edilen *Xaj* izolatları Tween B besi yerinde yuvarlak, sarı tümsek ve çevresinde temiz haleli koloniler geliştirmiştir (Tablo 1).

**Sisteinden H<sub>2</sub>S oluşumu:** Steril tüpler içindeki ortama bakteri aşılandıktan sonra kurşun asetatlı kâğıtlarda renk değişimi olup olmadığı 14 gün boyunca gözlenmiş, tüplerdeki kurşun asetatlı kâğıtları siyahlaştıran referans kültür ve *Xanthomonas arborescens* pv. *junlandis* izolatı pozitif sonuç vermiştir (Tablo 1).

**Tablo 1. Biyokimyasal testler ile *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* re-izolatlarının tanınması**  
Table 1. Identification of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* Strains by biochemical tests

İzolat Adı	Alındığı Yer	Bitki Materyali	NA'daki Koloni Gelişimi	GR	L	O	P	A	HR	N	T	O-F
CP-1	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-2	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-3	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-4	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-5	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-6	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-7	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-8	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-9	Kütahya/Aksu köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-10	Kütahya/Böçen köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-11	Kütahya/Böçen köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-12	Kütahya/Sarıot köyü	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-13	Kütahya/Yeşilköy	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-14	Kütahya/Yeşilköy	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
CP-15	Kütahya/ Merkez	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Hacıköy	Edirne/Hacıköy	Yaprak	Sarı	-	-	-	-	-	+	+	+	-

GR: Gram Reaksiyonu; L: levant tipte koloni gelişimi; O: oksidaz testi; P: patatestte pektolitik aktivite; A: arginin dehidrolaz aktivitesi; HR: tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu; N: nişasta hidrolizasyonu; T: Tween B besi yerinde gelişim; O-F: oksidatif-fermantatif testi

### 3.3. Ceviz bakteriyele yanıklık hastalığının biyolojik mücadelesine yönelik *in vitro* çalışmalar

**Ceviz yapraklarından aday antagonist izolasyonu:** 2015-2016 yılları arası Nisan-Temmuz aylarında Kütahya ilinde bulunan ceviz üretim alanlarına surveyler yapılmıştır. Bu amaçla gezilen 21 ceviz bahçesinden yaprak örnekleri alınmıştır. PSF besi yerine yapılan izolasyonlarda farklı renk ve tipte gelişen koloniler saflaştırılarak tütün bitkisinde HR testine tabi tutulmuştur. HR reaksiyonu sonucunda tütün yaprak aralarında su emmiş leke ve kurumalara sebep olmayan 69 adet izolat aday antagonist olarak seçilmiştir. Ayrıca Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakterioloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, çeşitli kültür bitkilerinin topraklarından alınmış ve NBRIP besi ortamı kullanılarak izole edilen 40 adet aday antagonist bu çalışmada kullanılmıştır.

**Aday antagonistlerinin *in vitro*'da *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'e karşı etkinliğinin belirlenmesi:** Aday antagonist bakterilerin patojene karşı etkinliğinin belirlenmesi için ikili kültür testleri yapılmıştır.  $1 \times 10^8$  yoğunluğundaki *Xaj*'e etkisinin *in vitro* petri denemeleriyle araştırıldığı çalışmada 109 adet aday antagonistin engelleme alanları ölçülmüştür. Aday antagonist izolatların 37 adeti ikili kültür testi sonucunda *Xaj*'in gelişimini tamamen engellediği (30.00 mm), 43 adedi ise 3.44-27.00 mm aralığında değişen engelleme alanı oluşturduğu ve 29 adet aday antagonist izolatın ise patojene karşı hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Tablo 2).

**Tablo 2. *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' e karşı antagonist bakteri izolatlarının etkinliğinin belirlenmesi**Table 2. Effect of antagonist bacterial isolates obtained against *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

No	İzolat Adı	Eng. Al. (mm)	No	İzolat Adı	Eng. Al. (mm)	No	İzolat Adı	Eng. Al. (mm)	No	İzolat Adı	Eng. Al. (mm)
1	CA-1	5.22	29	CA-29	0.00	56	CA-56	0.00	83	MMA-14	0.00
2	CA-2	30.00	30	CA-30	12.00	57	CA-57	0.00	84	MMA-15	0.00
3	CA-3	30.00	31	CA-31	0.00	58	CA-58	0.00	85	MMA-16	3.44
4	CA-4	10.22	32	CA-32	5.44	59	CA-59	0.00	86	MMA-17	7.56
5	CA-5	9.78	33	CA-33	30.00	60	CA-60	30.00	87	MMA-18	0.00
6	CA-6	14.67	34	CA-34	30.00	61	CA-61	7.56	88	MMA-19	12.78
7	CA-7	30.00	35	CA-35	11.56	62	CA-62	30.00	89	MMA-20	30.00
8	CA-8	8.11	36	CA-36	14.00	63	CA-63	30.00	90	MMA-21	0.00
9	CA-9	10.44	37	CA-37	30.00	64	CA-64	30.00	91	MMA-22	30.00
10	CA-10	9.67	38	CA-38	9.00	65	CA-65	6.22	92	MMA-23	30.00
11	CA-11	0.00	39	CA-39	6.56	66	CA-66	9.56	93	MMA-24	0.00
12	CA-12	0.00	40	CA-40	30.00	67	CA-67	30.00	94	MMA-25	0.00
13	CA-13	5.67	41	CA-41	11.78	68	CA-68	30.00	95	MMA-26	0.00
14	CA-14	8.22	42	CA-42	30.00	69	CA-69	13.33	96	MMA-27	30.00
15	CA-15	30.00	43	CA-43	30.00	70	MMA-1	0.00	97	MMA-28	0.00
16	CA-16	9.89	44	CA-44	0.00	71	MMA-2	30.00	98	MMA-29	30.00
17	CA-17	12.78	45	CA-45	30.00	72	MMA-3	7.00	99	MMA-30	15.11
18	CA-18	11.33	46	CA-46	7.67	73	MMA-4	30.00	100	MMA-31	6.11
19	CA-19	0.00	47	CA-47	30.00	74	MMA-5	0.00	101	MMA-32	30.00
20	CA-20	0.00	48	CA-48	30.00	75	MMA-6	9.11	102	MMA-33	9.22
21	CA-21	30.00	49	CA-49	8.11	76	MMA-7	30.00	103	MMA-34	27.00
22	CA-22	10.67	50	CA-50	30.00	77	MMA-8	0.00	104	MMA-35	0.00
23	CA-23	30.00	51	CA-51	11.00	78	MMA-9	0.00	105	MMA-36	3.89
24	CA-24	0.00	52	CA-52	30.00	79	MMA-10	0.00	106	MMA-37	3.78
25	CA-25	0.00	53	CA-53	5.44	80	MMA-11	30.00	107	MMA-38	30.00
26	CA-26	0.00	54	CA-54	9.56	81	MMA-12	30.00	108	MMA-39	30.00
27	CA-27	8.33	55	CA-55	5.11	82	MMA-13	30.00	109	MMA-40	5.78
28	CA-28	0.00									

Son yıllarda bakırlı preparatlar bakteriyel hastalık etmenlerine üzerinde beklenen sonucu vermemektedir (Shen ve ark., 2013). Bakırlı preparatlar gibi kontak etkili pestisitler, kanserle ve dormant sürgünlerdeki bakteri popülasyonuna etki etmemektedirler (Kennelly ve ark., 2007). Bu gibi sebeplerden dolayı bakırlı preparatlara karşı alternatifler aranmaktadır. Bu alternatifler içerisinde; sistemik kazanılmış dayanıklılığı (SAR) tetikleyen acibenzolar-S-methyl ve bakteriyel hastalıkların kontrolü için bitki düzenleyici olarak kullanılan prohexadione kalsiyum yer almaktadır. Bunun yanı sıra bazı antimikrobiyal peptidler, terpenler ve kitinaz gibi ürünlerin *Xaj* üzerine etkilerinin belirlenmesi için yapılan arazi denemeleri devam etmektedir (Cameron ve Sarojini, 2014).

Hastalık etmeninin biyolojik mücadelesine yönelik yapılan bir çalışmada, 35 adet antagonist bakteri izolatının patojen üzerine olan etkisi *in vitro* koşullarda değerlendirilmiş ve 18 adet izolatın 3 mm ve 13 mm arasında değişen değerlerde engelleme zonu oluşturarak patojenin gelişimini baskıladığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada da 43 adet antagonist bakteri izolatının *in vitro* koşullarda 3.44-27.00 mm arasında engelleme alanı oluşturarak *Xaj*'in gelişimini baskıladığı belirlenmiştir. Çalışmada antagonist bakteri izolatlarının yaklaşık %60'ının hastalık etmeninin gelişimini %41 ile %77 oranında azalttığı belirlenmiştir (Özaktan ve ark., 2012).

Kimyasal mücadelenin bakırlı ve bazı fungusitlerle sınırlı olduğu bakteriyel hastalıklara karşı mücadelede antagonistlerin kullanımı alternatif yöntemleri oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışmada önceki çalışmalarla paralellik göstererek ceviz bakteriyel yanıklık hastalık etmenine karşı biyolojik mücadelede yararlı bakterilerin kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

#### 4. Sonuç

Dünya da olduğu gibi ülkemizde de ekonomik öneme sahip olan ceviz de bakteriyel yanıklığa sebep olan *Xaj* önemli kalite ve kantite kayıplarına sebep olmaktadır. Hastalık etmeni ile mücadele de kültürel önlemler dışında önerilen bakırlı preparat kullanımının istenilen etkinin altında kalması biyolojik mücadele gibi alternatif yöntemlerin araştırılmasını teşvik etmiştir. Son yıllarda birçok patojen bakteriyel hastalık etmeni ile mücadelede antagonist bakteri kullanımı yaygın hale gelmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmamızda elde edilen sonuçlar, hastalık etmeni ile mücadelede antagonist bakteri kullanımının ümit vaat ettiğini göstermiştir.

Çalışma kapsamında Kütahya iline bağlı Domaniç ilçesinde ceviz bahçelerine surveyler yapılmış olup hastalıklı ve sağlıklı ceviz yapraklarından izolasyonlar yapılmıştır. Hastalıklı yapraklardan izole edilen izolatların patojenitesi yapılarak re-izolatlar elde edilmiştir. Re-izolatlara KOH ve LOPAT, oksidatif-fermantatif, nişasta hidrolizasyonu ile tanı testleri yapılarak ayrıca Tween B ortamında koloni gelişimine bakılarak izolatlar *Xaj* olarak tanılanmıştır.

Sağlıklı örneklerden elde edilen izolatlar tütün bitkisinde HR testine tabi tutulmuş ve test sonucunda 69 adet izolatın patojen olmadığına karar verilmiştir. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarında daha önce yapılan ve çeşitli patojenlere karşı etkili sonuçlar veren 40 adet aday antagonist bakteri izolatı da ceviz bakteriyel yanıklık etmeni *Xaj*' e karşı denenmek üzere geliştirilmiştir.

Toplamda 109 adet aday antagonist izolatın *in vitro*da *Xaj*' e karşı etkinliğinin belirlenmesi için ikili kültür denemesi kurulmuştur. Petri kabında aday antagonistlerin patojen gelişimini baskılaması sonucunda oluşan engelleme alanları ölçülmüştür. 37 adet antagonistin patojen *Xaj*' in gelişimini tamamen baskıladığı, 43 adet antagonist izolatın ise 3.44-27.00 mm çapında engelleme alanı oluşturduğu ve geriye kalan 29 adet aday antagonistin patojen üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Bakteriyel hastalıklarla mücadelede kimyasal kullanımının olmaması ve antibiyotik kullanımının ülkemizde yasak olmasından dolayı, bakteriyel hastalıklarla mücadelede alternatif yöntemlerin araştırılmasını gerekli kılmıştır. Bu amaçla yapılan tez çalışmasında bakteriyel yanıklığa karşı mücadelede aday antagonistlerin *in vitro* ' da patojenin gelişimini tamamen engelleyecek kadar etkili sonuçlar verdiğini ve antagonistlerin ümit vaat eden mücadele yöntemi olabileceğini göstermiştir. Etkili bulunan bu antagonistlerin *in vivo* da etkileri araştırılarak antagonist izolatların türleri belirlenmelidir.

#### Teşekkür

Yüksek Lisans çalışmasında ve yazımında yardımlarından dolayı Araş.Gör. Dr. Cansu ÖKSEL'e teşekkürlerimizi sunarız.



## Kaynakça

- Anonim (2017 a). Ceviz Hakkında. <http://ceviz.ksu.edu.tr> (erişim tarihi, 10.03.2017)
- Anonim (2017 b). Ceviz Bakteriyel Yanıklığı. <https://bku.tarim.gov.tr/Zararli/KayakDetay/808> (erişim tarihi, 16.03.2017)
- Bozkurt, A., Soylu, S. (2019). Elma kök uru hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter* ' e karşı epifit ve endofit bakteri izolatlarının antagonistik potansiyellerinin belirlenmesi. Journal of Tekirdağ Agricultural Faculty. 16(3):348-361.
- Cameron, A., and Sarojini, V. (2014). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. Plant Pathol. 63:1-11.
- Çetinkaya-Yıldız, R. (2007). *Domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis)' nin tanınması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakterler ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması*. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı
- FAO (2021). [www.fao.org](http://www.fao.org). Dünyada 2019 Yılındaki Ceviz Üretimi. (erişim tarihi, 01.02.2021)
- Horuz, S. (2014). *Karpuzda bakteriyel meyve lekesi hastalığı etmeni Acidovorax citrulli'nin tanısı, moleküler karakterizasyonu ve bakteriyel antagonistlerle biyolojik mücadele*. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, sayfa 117.
- Kennelly, M. M., Cazorla, F. M., De Vicente, A., Ramos, C., and Sundin, G. W. 2007. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: Progress toward understanding and control. Plant Dis. 91:4-17.
- Klement, Z., Mavridis, A., Rudolph, K., Vidaver, A. (1990). Inoculation of plant tissue. In: Methods in Phytobacteriology. Edts: Klement, Z., Rudolph, K., and Sands, D. C., 99
- Krishnamurthy, K., Gnanamanickam, S. S. (1998). Biological control of rice blast by *Pseudomonas flourescens* strain Pf-14: evaluation of a marker gene and formulations. Biological Control. 13:158-165.
- Kurt S, Soylu E M, Soylu S (2003). First report of downy leaf spot of walnuts caused by *Microstroma juglandis* in Turkey. Plant Pathology, 52:409.
- Lelliot, R.A., Sted, D.E. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. 216 pp.
- McGuire, R. G., Jones, J. B., Sasser, M. (1986). Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. Plant Disease 70:887-891.
- Mirik, M. (2005). *Biberde bakteriyel leke etmeni Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanınması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanakları. (Doktora Tezi) Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Öksel C, Mirik M (2015). Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı *in vitro* koşullarda farklı bitkilerin uçucu yağlarının etkisi. Bitki Koruma Bülteni 55: 265-275
- Özaktan H, Uslu A, Erdal M, Akköprü A (2007). Determination of bacterial diseases on peach in Aegean and on walnut Western Anatolian Regions of Turkey. Diagnostic and Monitoring of Bacterial Disease of Stone Fruits and Nuts. Joined meeting of WG 1 and 2 of COAST Action 873, Angers, France:23.
- Özaktan H, Erdal M, Akkopru, A, Aslan E. (2012). Biological control of bacterial blight of walnut by antagonistic bacteria. Journal of Plant Pathology, 94: 54-56.
- Sands D. C. (1990). Physiological criteria-determinative tests. Methods in phytobacteriology, 133-143.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 350 pp
- Shen, Y. M., Huang, T. C., Chao, C. H., Liu, H. L. (2013). First report of bacterial spot caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on Japanese plum in Taiwan. Plant Dis. 97:835.
- Tezcan H (2005). Bazı önemli ceviz hastalıkları ve bunlara karşı bir entegre mücadele (IPM) Yaklaşımı. Bahçe Dergisi, 34:187-192.
- Umarusman, M. A, Aysan, Y., Özgüven, M. (2019). Farklı bitki ekstraktlarının bezelye bakteriyel yaprak yanıklığına (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) antibakteriyel etkilerinin araştırılması. Journal of Tekirdağ Agricultural Faculty. 16(3): 297-314.
- Van Der Zwet, T. (1986). Identification, symptomatology, and epidemiology of fire blight on Le Conte pear in the Nile Delta of Egypt. Plant Dis., 72:230-234.
- Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology 90:677-682.