



## Tokat Yöresinde Kiraz ve Vişne Ağaçlarında Ölümlere Neden Olan Hastalık Etmenlerinin Belirlenmesi

Özer ÇALIŞ<sup>1\*</sup>, Yusuf YANAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 07070 Antalya, Türkiye

<sup>2</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Tokat, Türkiye

\* e-mail: ozercalis@akdeniz.edu.tr

Alındığı tarih (Received): 28.08.2014

Kabul tarihi (Accepted): 11.03.2015

Online Baskı tarihi (Printed Online): 08.04.2015

Yazılı baskı tarihi (Printed): 00.00.2015

**Özet:** Türkiye Dünya kiraz ve vişne üretiminde ilk sıralarda olup bu sert çekirdekli meyvelerin üretiminde son yıllarda ciddi problemler yaşanmaktadır. Özellikle kiraz ve vişne ağaçlarında kısa sürede ölümlere neden olan hastalıklar görülmektedir. Bu çalışma Tokat yöresinde kiraz ve vişne ağaçlarında ölümlere neden olan hastalık etmenlerini ortaya koymak, bu hastalık etmenlerini klasik ve moleküler olarak tanımlamak ve ileride yapılacak çalışmalar için bir temel oluşturmayı amaçlamaktadır. Bu amaçla Tokat Merkez, Pazar, Turhal, Niksar ve Erbaa kiraz ve vişne üretim alanlarında sürveyler gerçekleştirilmiştir. Sürveylerde toplanan bitki örneklerinden laboratuvarında fungal ve bakteriyel etmenler besi ortamında, fitoplazma ve viral etmenleri ise toplam genomik DNA'ları elde edilerek izole edilmişlerdir. Besi ortamlarında gelişen fungal ve bakteriler özel besi yerlerinde saflaştırılarak tanımlanmıştır. Yapılan klasik tanı testleri ve patojenisite testleri kiraz ve vişnelerde kurumlara neden olan hastalık etmelerinin *Leucostoma* spp. ve *Alternaria* spp. olduğunu ortaya koymuştur. Gerçekleştirilen moleküler analizler toplam genomik DNA içerisinde ksilem ve flöeme özelleşmiş olduğu bilinen bakteri ile virus etmenlerinin bulunmadığını ortaya koymuştur. Bu çalışmadan elde edilen veriler, kiraz ve vişnede problem olan hastalık kaynaklı ağaç ölümleri ile mücadele stratejilerinin oluşturulmasında fayda sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Kiraz ve vişne hastalıkları, kiraz ve vişne, *Leucostoma* spp., hastalık tanılama

### Identification of Sudden Death Diseases On Sweet and Sour Cherry Orchards in Tokat Province

**Abstract:** Turkey is in the top of among the most world's sweet and sour cherry producer countries. However, the stone seed fruit trees experience serious disease problems in recent years. Especially, sweet and sour cherry trees are heavily affected with dieback and sudden deaths occurred in short time. This study aims to investigate disease agents on the sweet and sour cherries with applying classical and molecular identification techniques and also to establish a basis for future studies. Tokat's cherry production areas have been searched to determine present infection statu. Hence, surveys were carried out on cherry orchards at Tokat Central, Pazar, Niksar Erbaa provinces. Collected plant samples from the surveys brought to our laboratory; fungi and bacteria were isolated on specific mediums and viruses and phytoplasmas were analysed using total genomic DNAs respectively. The fungal and bacterial pathogens were purified from the culture and they were used in pathogenicity tests. *Leucostoma* spp. and *Alternaria* spp. were identified in conventional diagnostic and pathogenicity tests. Molecular analyses within total genomic DNAs revealed that neither phytoplasmas nor viruses are present our samples. Investigation of the disease agents will let to control the important disease and establish a main step for future studies.

**Key Words:** Sweet and sour cherry diseases, sweet and sour cherries, *Leucostoma* spp., disease identification

#### 1. Giriş

Kiraz ve vişne Türkiye'de çok miktarda üretilen iki önemli taş çekirdekli meyvedir. Kiraz genellikle taze meyve olarak vişne ise reçel, marmelat ve meyve suyu olarak tüketilmektedir.

Türkiye kiraz üretiminde 45246 hektar (ha) alanda 438550 ton (t) ile dünya kiraz üretiminde ilk sırada yer almaktadır (FAO, 2014). Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 303376 t ile ülkemizden sonra ikinci sırada bulunmaktadır.

Ancak ABD ürettiği kirazı çok daha etkili bir şekilde pazarlamakta ve ihracat bakımından Türkiye ancak üçüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2012).

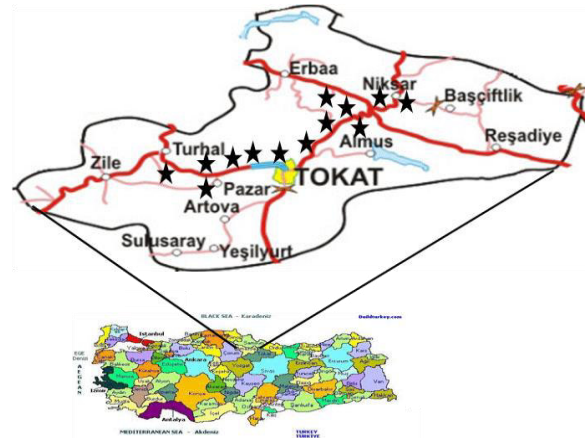
Kiraz üretimi Türkiye’de iklim şartlarına ve yıllara göre değişmektedir. Başlıca kiraz üretimi Kemalpaşa (İzmir), Manisa, Sultandağı (Afyon), Akşehir (Konya), Uluborlu (Isparta), Honaz (Denizli) gibi merkezlerde gerçekleşmektedir. Bu merkezlere ilave olarak Bursa, Amasya ve Tokat’ta da önemli miktarda kiraz ve vişne yetiştiriciliği yapılmaktadır. Son yıllarda Tokat yöresi ve yukarıda belirtilen tüm merkezlerde hızla yayılan bodur ve yarı bodur anaçlar üzerine aşılı kiraz çeşitleri ile üretimde ve kalitede önemli artışlar gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2014). Tokat ili ve ilçelerinde kiraz üretimi son yıllarda 20000 tonun üzerine çıkması, kirazın yurt dışına ihracatı ve üretilen vişnelerin meyve nektarı olarak değerlendirilmesiyle önemli gelir kaynağı olmuştur. (TÜİK, 2014).

Bodur ve yarı bodur anaçlar üzerine aşılana kirazlarda ciddi problemler görülmeye başlanmıştır. Bodur kiraz ve vişnede görülen hastalıktan dolayı ağacın yapraklarında önce kızarma, genel görünümde yapraklarda kloroz ve hafif solgunlukla birlikte dalların uç kısımlarından itibaren geriye ölüm gerçekleşerek (dieback) ağacın tamamı kısa süre içerisinde ölmektedir. Hastalık etmeni tüm kiraz ve vişne üretim alanlarını etkileyerek her yıl artan oranlarda kayıplara neden olmaktadır. Kiraz ve vişne ağaçlarında görülen bu ölümlerin Tokat üretim alanlarındaki durumunu ortaya koymak ve hastalık etmenini tanılamak amacı ile bu çalışma gerçekleştirilmiştir. Böylece ileride hastalığın kontrolü için uygulanacak mücadele çalışmalarına temel oluşturulmuş olacaktır.

## 2. Materyal ve Metot

**2.1. Sürvey çalışmaları:** Hastalığın Tokat kiraz ve vişne üretim alanlarındaki durumunu ve yaygınlığını belirlemek için Tokat Merkezden başlayarak Kemalpaşa, Emirseyit, Güryıldız istikametinde Turhal, Pazar, Niksar ve Erbaa ilçelerinde kiraz yetiştiriciliği yapılan bahçelere Temmuz-Ekim 2013 ayları arasında farklı

zamanlarda ziyaret edilerek bahçelerden hastalık örnekleri toplanmıştır (Şekil 1). Örneklemeler bahçelerin büyüklükleri ile doğru orantılı olarak gerçekleştirilmiştir. Örneklemeler gerçekleştirilirken hastalığın belirtilerini gösteren kiraz ve vişne ağaçları seçilerek güdümlü bir örnekleme gerçekleştirilmiştir (Bora ve Karaca, 1970). Tipik hastalık belirtileri gösteren ağaçlardan yaprak, sürgün, dal ve odunsu dokulardan örneklemeler yapılmıştır (Şekil 1). Alınan örnekler plastik poşet içerisine konularak termo kutulara yerleştirilmiş, etiketlemeler yapılmıştır. Laboratuvara getirilen örnekler +4 °C deki buzdolabına yerleştirilerek patojen izolasyonları yapılmaya kadar burada saklanmıştır. Ayrıca örneklemelerin yapıldığı bahçelerin tam bodur, yarı bodur ya da normal bahçe tesisi olup olmadığı, arazinin büyüklüğü, hastalığın en çok görüldüğü çeşitler üreticilere sorularak örneklerin alındığı bahçelerin koordinatları GPS (Global Positioning System) ile belirlenmiştir (Çizelge 1).



**Şekil 1.** Tokat Merkez ve ilçelerinde örnekleme yapılan kiraz ve vişne bahçelerinin harita üzerindeki coğrafik konumları. Örnekleme alanları ‘siyah yıldız’ ile gösterilmiştir.

**Figure 1.** Sweet and sour cherry samples were collected from Tokat province. In sampling, the plant materials were specifically taken from diseased trees considering proportional size of the area. Coordinates of the samples was determined with a GPS. Samples were marked with ‘black star’ on the Tokat map.

**2.2. Patojen izolasyonları:** Toplanan örnekler laboratuara getirildikten sonra iki tür izolasyon gerçekleştirilmiştir. Fungal ve bakteriyel hastalıkların izolasyonu için yüzey sterilizasyonu ve örneklerin besi ortamına yerleştirilmesinden oluşan patojen izolasyonları ilk aşamayı

oluşturmuştur. İkinci aşamada ise iletim demetlerine özelleşmiş bakteri (fitoplazma) ve viruslerin tanılanmasına yönelik yapılan DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizlerini içermektedir.

**Çizelge 1.** Sürvey çalışmalarında örneklerin toplandığı bahçelerin coğrafik konumları.

**Table 1.** Geographical locations of collected samples and their orchards.

Örnek Adı	İli	Yerleşim yeri	Enlem	Boylam
M1	Tokat	Tekbir Evleri	40° 21' 23''K	36° 31' 11''D
M2	Tokat	Tekbir Evleri	40° 21' 40''K	36° 31' 23''D
M3	Tokat	Kemalpaşa	40° 21' 25'' K	36° 30' 28''D
M4	Tokat	Kemalpaşa	40° 21' 27'' K	36° 30' 29''D
M5	Tokat	Emirseyyit	40° 20' 56''K	36° 28' 22''D
M6	Tokat	Emirseyyit	40° 20' 52''K	36° 24' 58''D
M7	Tokat	Kömeç	40° 20' 52''K	36° 24' 56'' D
M8	Tokat	Kömeç	40° 20' 36''K	36° 22' 51''D
M9	Tokat	Güryıldız	40° 20' 36''K	36° 22' 52''D
M10	Tokat	Güryıldız	40° 20' 59''K	36° 22' 20''D
M11	Tokat	Kat	40° 19' 51''K	36° 22' 16''D
M12	Tokat	Vasfi Diren Dimes	40° 20' 46''K	36° 08' 39''D
M13	Tokat	Turhal	40° 20' 48''K	36° 08' 40''D
M14	Tokat	Turhal	40° 20' 48''K	36° 08' 40''D
M5	Tokat	Turhal	40° 20' 49'' K	36° 08' 43''D
M6	Tokat	Niksar	40° 22' 10''K	36° 38' 22''D
M7	Tokat	Akbelen	40° 26' 08''K	36° 42' 45''D
M8	Tokat	Niksar	40° 39' 40''K	36° 47' 60''D
M9	Tokat	Niksar	40° 29' 20''K	36° 45' 58''D
M10	Tokat	Niksar	40° 31' 46''K	36° 54' 42''D
M21	Tokat	Niksar	40° 29' 35'' K	36° 56' 58'' D

**2.2.1. Fungal ve bakteriyel etmenlerin izolasyonu:** Steril kabin içerisinde hastalıklı ve sağlıklı dokuları içeren bitki örnekleri, içerisine %5'lik çamaşır suyu, %96'lık etil alkol ve steril distile su konulmuş 250 ml'lik beherlerde ardışık olarak 1 dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Dezenfekte edilen örnekler steril kurutma kağıtları arasına alınarak kurutulmuştur. Yüzeyleri dezenfekte edilen örnekler içerisinde su agarı veya nutrient agar bulunan 90 mm çaplı Petri kapları üzerine yerleştirilmiştir. Petrilerin kapak kenarları parafilm ile kapatılarak 28°C inkübatörde 3-4 gün bekletilmiştir. İnkübatörden çıkartılan örnekler incelenerek gelişen fungal koloniler besin yönünden daha zengin olan patates dekstrose agar (PDA) ortamına, bakteriler ise spesifik King's B agara transfer edilerek saf kültürler elde edilmeye çalışılmıştır.

**2.2.2. Fitoplazma ve viral etmenlerin DNA izolasyonu:** Bitki dokuları içerisinde bulunan fitoplazma ve hücre içerisindeki viruslerin bulunması için toplam genomik DNA izolasyonu Doyle and Doyle (1987)'e göre yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinde fitoplazmaların ve DNA

içeren viruslerin varlığını ortaya çıkarmak için PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda Pierce's hastalığı etmeni *Xylella fastidiosa* ve bağ sarılık fitoplazmaları ile Cherry Leaf Roll Virus hastalık etmenlerinin genetik yapılarına özelleşmiş primer setleri kullanılmıştır.

### 2.3. Moleküler Tanı

**2.3.1. Primerler:** Kültüre alınamayan fitoplazma ve viruslerin Tokat yöresinde kirazlarda ve vişnelerde görülen ölümlerden sorumlu olup olmadığını anlamak amacıyla bu organizmalara spesifik olarak dizayn edilmiş primerler, bu organizmalara özgü genetik materyalin izole edilen toplam DNA materyalinden çoğaltılmasını sağlamak amacıyla çalışmada kullanılmışlardır (Çizelge 2). Çalışmada kullanılan spesifik primerler seçilirken kirazlarda ani ölümlere neden olabilecek, aynı habitatta bulunan bağlarda hastalık yapan iletim demetlerine özgü olan fitoplazma ve kirazlarda enfeksiyona neden olduğu bilinen virus hastalıklarının primerleri seçilmiştir. Çalışmada bu obligat hastalık etmenlerinin tanınması için kullanılan spesifik primer çiftleri ve annealing sıcaklıkları Çizelge 2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.** Kiraz ve vişnelerde ani ölümlere neden olabilecek fitoplazma ve viruslere spesifik genetik yapıların PCR ile çoğaltılmasında kullanılan moleküler primerler.

**Table 2.** Specific molecular primers used for PCR amplifications to detect phytoplasmas and viruses cause sudden death disease on sweet and sour cherries.

Hedef organizma	Oligo adı	Oligo sekansı	Annealing sıcaklığı	Beklenen fragment
<i>Xylella fastidiosa</i>	XyfasRST31	GCGTTAATTTTCGAAGTGATTTCGATTGC	62°C	733 Bp
	XyfasRST33	CACCATTCGTATCCCGGTG	58°C	
<i>Xylella fastidiosa</i>	Xyfas2721int	CTGCACTTACCCAATGCATCG	59°C	700 Bp
	Xyfas2722int	GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT	63°C	
Fitoplazma	FitR16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	57°C	1248 Bp
	FitR16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	69°C	
Bağ sarılık fitoplazma hastalığı	BagsarYV2	CGCTACACCTGGAATTCTAC	57°C	643 Bp
	BagsarYV1	GGGAGCTTGCTCCCCGG	62°C	
Cherry Leaf Roll Virus	CLRV1	TTGGCGACCGTGTAACGGCA	61°C	431 Bp
	CLRV2	GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	56°C	
Cherry Leaf Roll Virus	RW1	GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	56°C	375 Bp
	RW2	TGGCGACCGTGTAACGGCA	61°C	

**2.3.2. PCR analizleri:** Klasik PCR analizleri toplam 20 µl'lik reaksiyon karışımları içerisinde gerçekleştirilmiş olup her bir tüp içerisinde primer konsantrasyonuna göre değişen miktarda ultra dsH<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10X PCR buffer, 2 µl deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 2 µl karışımın pH sını ayarlayan MgCl<sub>2</sub> buffer, 2 µl primer forward, 2 µl primer reverse, 0.3 µl Taq polimeraz enzimi (Promega, USA) ve 1 µl template DNA içermektedir. Bu karışımı içeren PCR strip tüpleri termal cycler'da 94 °C'de 4 dakika (d) başlangıç denatürasyonunda (denaturation) bekletildikten sonra 40 döngü ile 94 °C'de 1 d denatürasyon, 45-60 °C değişken sıcaklıklarda 1 d primer yapışma (annealing) ve 72 °C'de 2 d uzama (extension) sıcaklıklarında amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu döngülerden sonra PCR karışımı 72 °C'de 10 d son uzama sıcaklığında kalmış, sonra +8 °C'de bekletilerek amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunda çoğaltılan ürünleri görüntüleyebilmek için %2'lik agaroz (Sigma Aldrich, Almanya) jel hazırlanmıştır. Hazırlanan agaroz jeldeki her bir kuyucuğa toplam 15 µl'lik örnek yüklenerek doğru akım verilerek örnekler önce 110 Volt (V) da 15 d koşturulmuş daha sonra 90 V'da 45 d koşturulmuştur. Koşturulan örnekler Vilber Lourmat Jel görüntüleme sisteminde fotoğraflanarak termal yazıcıdan fotoğrafların çıktıları alınmıştır.

**2.4. Patojenisite testleri:** Nutrient ve patates dekstroz agar üzerinde izole edilen fungusların tanımlamaları Prof. Dr. Yusuf YANAR tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu fungal türler alt kültürlerle alınarak saf olarak besi ortamlarında üretilmiştir. Besi ortamlarında yetiştirilen fungusların virulentliklerini belirlemek, en virulent fungus izolatları ile çalışmaları gerçekleştirmek için patojenisite testleri gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen fungusların virulentliklerini belirlemek için Gaziosmanpaşa Üniversitesi Uygulama arazisinde bulunan 0900 ziraat kiraz çeşidinden taze ve hastaliksız 20-30 cm uzunluğunda dallar kesilmiştir. Kesilen dalların uçları laboratuvar ortamında su kaybetmesini

önlemek için mum ile kaplanmıştır. Her iki ucundan 3 cm içeride cork borer (5 mm) ile kabuk üzerinde yaralar açılarak PDA ortamında 7 gün süreyle geliştirilen fungusun aktif olarak gelişen uç kısımlarından yine mantar delici ile alınan 5 mm'lik fungus diskleri bu yaralar üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 2). Daha sonra steril pamuk ile üzerleri kapatılmış ve saf distile su ile nemlendirildikten sonra üzerleri streç film ile kaplanarak nemli perlit ortamına yerleştirilmiştir (Şekil 2). Kasa içerisinde bulunan enfekteli çubukların üzeri siyah bir naylon örtü ile kaplandıktan sonra kasa karanlık nemli bir odaya yerleştirilmiştir. Deneme tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekerrürlü kurulmuş ve iki kez tekrarlanmıştır. Çubuklar üzerindeki hastalık gelişimleri inokulasyondan 15 gün sonra kumpasla ölçülerek lezyon uzunlukları belirlenmiştir.

### 3. Bulgular ve Tartışma

#### 3.1. Sürvey Bulguları

Tokat İli ve ilçelerinde gerçekleştirilen sürveylerde, hastalığın kiraz üretiminin yapıldığı tüm alanlarda yaygın olduğu belirlenmiştir. Yüksek verim veren kirazların özellikle tam bodur ve yarı bodur anaçlar üzerine aşılansak bahçe tesisi yapılan yerlerde bu ağaçların hastalıklardan daha yoğun etkilendikleri ortaya konmuştur. Hastalık etmeni ağaçların yapraklarında önce hafif kızarmaya neden olmaktadır (Şekil 3). Yapraklar üzerinde kloroz, bükülmeler ve halkalı lekeler görülmektedir (Şekil 3). Uç dallardan başlayarak geriye ölüm (Şekil 3) ağacın ana gövdesine kadar inmektedir. Hastalıklı dallarda kahverengileşme, gövde üzerinde zamklanma ve akıntılarla birlikte kabuk altında kahverengileşmeler bulunmaktadır (Şekil 3). Hastalıktan etkilenen odunsu iletim dokularında renk değişimleri tipik olup ağaçlar bir ay gibi kısa sürede ölmektedir (Şekil 3). Kuşkirazı ve siyah mahlep gibi anaçlar üzerine aşılansak kirazlarda hastalığın sarı mahlebin anaç olarak kullanıldığı bitkilere göre daha az görüldüğü saptanmıştır.



**Şekil 2.** Patojenisite testleri: 0900 Ziraat kiraz çeşidinden alınan sağlıklı sürgünler (A), sürgün uçlarının mum ile kaplanması (B), çubuğun her iki ucundan 5 mm çaplı mantar delici ile yara açılması (C), yara yerlerine fungal miselleri yerleştirilmesi. Misel bırakılan yerlerin üzerinin nemli pamuk ve streç film ile kaplanması (D).

**Figure 2.** Healthy rod sticks (A) were obtained from 0900 ziraat sweet cherry trees. Both ends of sticks were coated with wax (B) and 5 mm diameter wounds (C) were opened by cork borer, the wounds were placed with fungal mycelia. The mycelium discs were covered with moist cotton and stretch films (D).

### 3.2. İzolasyon Bulguları ve Patojenisite

#### 3.2.1. Fungus ve Bakteri İzolasyonları

Hastalıklı kirazlardan alınan yaprak, dal, sürgün ve diğer odunsu dokulardan yapılan fungal ve bakteriyel izolasyonlar sonucunda elde edilen funguslar yeni ortamlara aktararak saf olarak geliştirilmiştir. Bakteri izolatları ise fitopatojen bakteriler için hazırlanmış seçici ortamlara aktarıldığında herhangi bir gelişme olmamıştır ve

bu izolatların fitopatojenik bakteriler olmadığı sonucuna varılmıştır.

Saf olarak geliştirilen funguslar *Alternaria* spp. ve *Leucostoma* spp. olarak Prof. Dr. Yusuf YANAR tarafından tanılanmıştır. Saf olarak geliştirilen *Leucostoma* fungusları besi ortamında üstten bakıldığında beyaz misellerden oluşan kolonilere sahip iken alttan bakıldığında merkezde açık kahverengi-krem, uçlara doğru ise beyaz misel kolonileri oluşturduğu bulunmuştur.



**Şekil 3.** Hastalıktan etkilenen kiraz bahçesindeki ağaçta görülen renk değişimi (sağ üst) ve renk değişimi ile başlayan belirtilerin yaprak, dal, gövde ve odunsu dokudaki görünüşleri (sol taraf). Hastalıktan etkilenerek ölmüş kiraz ağacı (sağ alt).

**Figure 3.** Disease symptom on affected sweet cherry canopy (upper right). The pathogen causes discoloration on leaf, branch, bark and woody tissues of the tree (left side). Death cherry tree is due to the fungal infection (bottom right).

### 3.2.2. Patojenisite Testleri

Hastalık etmeni *Leucostoma* spp. izolatlarının patojenisitesini ve virulenslik düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan sürgün testi sonuçları Çizelge 3'de verilmiştir. İzolatlar arasında virulenslik düzeyleri açısından önemli düzeyde farklılıklar gözlenmiştir. En virulent izolat M-18 olup, oluşturduğu lezyon uzunluğu istatistik olarak diğer bütün izolatlardan ve kontrolden önemli düzeyde farklı bulunmuştur. Bunu M-16, M-7, M-1 ve M-11 izolatları izlemiştir. Diğer taraftan M-6, M-9, M-10, M-13, M-20 ve M-21 izolatları kontrolden oluşturdukları nekrotik alanın uzunluğu açısından farksız bulunmuştur (Çizelge 3). Bunların oluşturduğu nekrotik alan kontrolde mantar delici ile açılan mekanik

yaralanmanın oluşturduğu nekrozla aynı düzeyde kalmıştır. Bu nekrotik uzunluklar kontrolden farksız bulunan izolatların patojen olmadıklarını veya virulenslik düzeylerinin çok düşük olduğunu göstermektedir. Bunların dışında kalan beş fungal izolat ise (M-3, M-4, M-5, M-12 ve M-17) oluşturdukları lezyon açısından kontrolden istatistik olarak önemli düzeyde farklı olduğu ve 11.7 ile 9.43 cm arasında değişen uzunluklarda lezyonlar meydana getirmişlerdir (Çizelge 3). Virulent ırklar sürgünlerde istatistik olarak büyük lezyonlar oluştururken, avirulent ırklar kontrolle aynı miktarda lezyon uzunlukları oluşturmaktadır. Bu sonuçlar izole edilen *Leucostoma* spp. izolatlarının virulensliklerinin farklı olduğunu göstermektedir. Nitekim daha önce yapılan

çalışmalarda *Leucostoma* türlerinin hücrelerinde dsRNA virus içerebildiği, ve bu viruslerin fungusun genetik yapısında değişikliklere neden olarak virulentliğini artırıp ya da azalttığı bildirilmiştir (Hammar et al., 1989; Adam et al., 1990).

**Çizelge 3.** *Leucostoma* spp. izolatlarının virulentlik düzeyleri.

**Table 3.** *Isolates of Leucostoma spp. have different virulence levels.*

No	İzolat	Ortalama Lezyon uzunluğu (cm)
M-18		24.85 a*
M-16		15.56 b
M-7		14.00 b
M-1		13.97 b
M-11		12.94 bc
M-5		11.17 cd
M-12		10.94 cde
M-3		10.64 cdef
M-17		9.49 defg
M-4		9.43 defg
M-9		9.32 defgh
M-13		8.27 efghi
M-21		8.00 fghi
M-10		7.52 ghij
M-6		6.78 ghij
M-20		5.82 ij
KONT		
ROL		6.70 hij

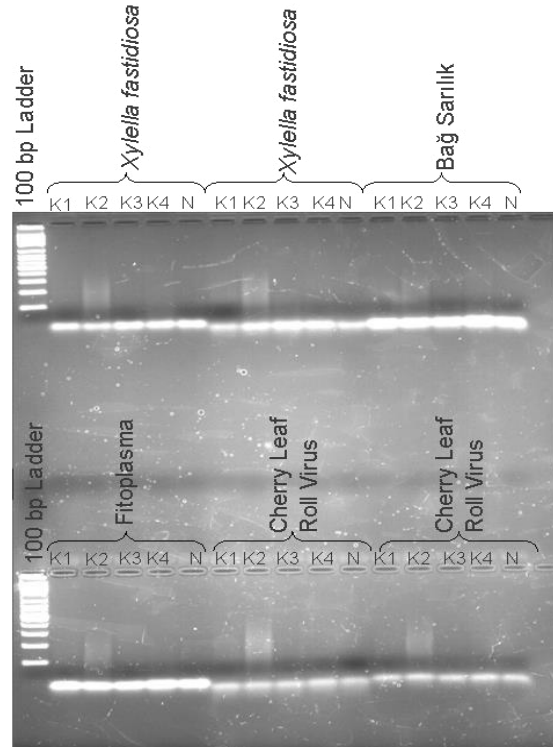
LSD (Least Significant Difference): 2.71

\* Aynı sütün içerisinde benzer harf ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.3. Fitoplazma ve viral etmenler

Kiraz ve vişnelerde ani kurumalara neden olan fitoplazma ve virus hastalıklarını ortaya koyabilmek için 2 tane ksilem ile 2 flöem fitoplazmalarına ve 2 viruse özelleşmiş primer çiftleri ile yapılan PCR analizlerinde bu organizmaların hedeflenen genetik materyalleri PCR ile çoğaltılamamıştır (Şekil 4). Moleküler çalışmalarda kirazlarda ani ölümlere neden olan bu obligat patojenlerin *Xylella fastidiosa* ve bağ sarılık fitoplazmaları olmadığı anlaşılmıştır. Ancak Cherry Leaf Roll Virus (CLR)nin ssRNA genetik materyalini içeren virus olması

nedeniyle toplam genomik DNA'da amplifikasyonlarının yapılamadığı anlaşılmıştır (Şekil 4).



**Şekil 4.** PCR analizlerinde kullanılan fitoplazma ve virüslere spesifik primerlerin oluşturduğu jel görüntüsü.

**Figure 4.** Gel picture of PCR analysis with specific primers to detect phytoplasma and viruses.

Moleküler çalışmalarda özellikle fitoplazmalar üzerinde durulmasının 3 temel nedeni bulunmaktadır. Bunlar ı) fitoplazmaların ani ölümlere neden olabilecek kapasitede olmaları, ii) ağaçlar üzerindeki görülen belirtilerin fitoplazmaların oluşturduğu belirtiler ile örtüşmesi, ve iii) bağlar ile kiraz-vişne bahçelerinin aynı ekolojik isteklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

### 4. Sonuç

Bu çalışmada Tokat kiraz ve vişne bahçelerinde hastalık sürveyleri gerçekleştirilmiştir. Sürveylerin gerçekleştirildiği tüm kiraz ve vişne bahçelerinde önce ağaç yapraklarının kızardığı, yapraklarda çeşitli derecelerde klorotik ve nekrotik lekeler, dallarda ve gövdelerde akıntılar ve geriye ölüm, odunsu



dokularda renk değişimleri bulunmuştur. Hastalığın Tokat Merkez ve ilçelerinde tüm kiraz ve vişne üretim alanlarında bulunduğu ve hastalıktan etkilenen ağaç sayısının her geçen yıl arttığı tespit edilmiştir. Hastalığın özellikle tam ve bodur anaçlar üzerine aşılı kirazlarda daha yoğun olduğu ortaya konmuştur. Alınan odun dokusu örneklerinden kiraz ve vişnelerde kısa sürede ölümlere neden olan faktörlerden birinin *Leucostoma* spp. nin yol açtığı *Leucostoma* kanseri olabileceği ortaya konmuştur. *Leucostoma* spp. izolatları ile gerçekleştirilen patojenite testleri *Leucostoma* izolatlarının farklı seviyelerde virulentliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Farklı seviyelerde virulentlik gösteren bu hastalık etmenlerinin avirulent ırkları kullanılarak çapraz korunma ile virulent ırkların kontrol edilebileceği anlaşılmaktadır. Bu nedenle hypovirulent ırkların araştırılması gerekmektedir.

Yapılan moleküler analizler kiraz ve vişnelerin ölümüne sebep olan hastalığın test edilen fitoplazma ve/veya virusler olmadığını göstermiştir. Hastalık etmeninin anlaşılmasıyla gelecekte bu patojenlerin kontrol altına alınması kolaylaşacaktır. Bu amaçla daha detaylı çalışmalara, özellikle bahçe bitkileri ile bitki koruma konularında uzmanların bir araya gelerek multi disiplinler olarak bu problemi tüm yönleriyle çözüme kavuşturması gerekmektedir.

### Teşekkür

Bu projeye destek olan Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederiz. Bu projede çalışan ve çeşitli düzeylerde katkı sağlayan Dr. Sabriye BELGÜZAR, yüksek lisans öğrencileri Serhat KARA, Merve KARA, Deniz KARABULUT ve Ziraat Mühendisi Hande Nur ARSLAN'a ayrıca teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

- Adams, G., Hammar, S. and Proffer, T. (1990). Vegetative compatibility in *Leucostoma persoonii*. *Phytopathology* 80:287-291.
- Anonim (2012). Uludağ İhracatçı Birlikleri <http://www.uib.org.tr/tr/uib-gundem-kiraz-uretiminde-dunya-birincisi-turkiye-ihracatta-da->

liderligi-hedefliyor.html (Access to web: 04.08.2014).

Anonim (2014). <http://www.bayindirtarim.gov.tr/index.php/bitkisel-ueretim/9-kiraz-ve-visne-yetistirciligi.html> (Accessed to web: 23.07.2014).

Bora T. ve Karaca G. (1970). Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniv. Ziraat Fak., Yardımcı Ders Kitabı, No: 167, 43 p.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15

FAO (2012). FAO. <http://faostat.fao.org>; Statistic Database, (Access to web: 05.08.2014).

Hammar, S., Fulbright, D.W., and Adams, G.C. (1989). Association of double-stranded RNA with low virulence in an isolate of *Leucostoma persoonii*. *Phytopathology* 79:568-572.

TÜİK (2014). Türkiye İstatistik Kurumu Konularına göre İstatistikler veri tabanı <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=kategorit>