

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVELERDE BAKTERİYEL KANSER ETMENİ  
*Pseudomonas syringae* PATOVARLARININ BAKIR TOLERANSININ  
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ahmad HUSSEINI  
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AKKÖPRÜ

Van-2019



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVELERDE BAKTERİYEL KANSER ETMENİ  
*Pseudomonas syringae* PATOVARLARININ BAKIR TOLERANSININ  
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ahmad HUSSEINI

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2018-7036 No'lu proje olarak desteklenmiştir

Van-2019



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üy. Ahmet Akköprü danışmanlığında, Ahmad Husseini tarafından sunulan “Sert Çekirdekli Meyvelerde Bakteriye Kanser Etmeni *Pseudomonas Syringae* Patovarylarının Bakır Toleransının Belirlenmesi” adlı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 21/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. HATİCE ÖZAKTAN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi. Ahmet Akköprü

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Bilgin Taşkın

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05.07.2019 tarih ve 2019/37-I sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

(İmza)

Ahmad Husseini





## ÖZET

### **SERT ÇEKİRDEKLİ MEYVELERDE BAKTERİYEL KANSER ETMENİ *Pseudomonas syringae* PATOVARLARININ BAKIR TOLERANSININ BELİRLENMESİ**

HUSSEINI Ahmad

Yüksek Lisans Tezi, Bitki koruma Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AKKÖPRÜ  
Temmuz 2019, 54 sayfa

Dünyada sert çekirdekli meyvelerdeki önemli bakteriyel hastalıklardan biri olan bakteriyel kanser hastalığının mücadelesinde uzun süreden beri yoğun olarak bakırlı preparatların kullanımı direnç problemini doğurmuştur. Bu çalışmada, sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde pestisit kullanımının düşük düzeyde olduğu Van Gölü Havzası ve yüksek düzeyde olduğu İzmir ili ve civarından elde edilen *Pseudomonas syringae* patovarylarının (*syringae* ve *morsprunorum*) bakır toleransı düzeylerinin *in-vitro* ve moleküler olarak belirlenmesi ve olası direnç mekanizmalarının tespiti amaçlanmıştır. *In-vitro* çalışmalarda, Metanol-glutamin agar ortamında (MGY) bakır sülfat ve 4 farklı bakırlı pestisit izolatların gelişimi üzerine etkileri Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu (MIC) ve % 50 Öldürücü doz (LD<sub>50</sub>) olarak değerlendirilmiştir. Dirençle ilgili genleri *copA* ve *cusA*'nın varlığı PCR ile araştırılmış, dizi analizleri yapılarak izolasyon bölgeleri ve izolatlar arasındaki ilişki filogenetik ağacı oluşturularak incelenmiştir. Direnç seviyelerinin izolatlar ve kullanılan bakır formülasyonuna göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Mancozeb ve Bordo karışımının birlikte olduğu formülasyonu en başarılı pestisit olur iken, yalnızca bakır etkili formülasyonlarda ise bakır oksiklorür en başarılı pestisit olmuştur. Tüm izolatlar içinde maksimum MIC değeri 2 mM olarak belirlenmiştir. İzolatların % 79'unun MIC değeri 1 mM ve altında kalmıştır. İzolatların yalnızca 4'ünde *copA* geni belirlenmiş ve bunların üçü İzmir bölgesinden izole edilmiştir. *copA* geninin dizileri patovarylara göre farklılık göstermemesine rağmen, izolatlar iki grup altında toplanmıştır. Hiçbir izolatın *cusA* genine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Direnç genine sahip olmayan izolatlardaki direnç düzeyi farklılığının Chalkophore üretimi ile ilgili olabileceği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakır direnci, Bakteriyel kanser, Chalkophore, *copA*, *cusA*, MIC, *Pseudomonas syringae*, Siderofor,



## ABSTRACT

### DETERMINATION OF COPPER RESISTANCE OF BACTERIAL CANKER CAUSED BY *Pseudomonas syringae* PATHOVARS ISOLATED FROM STONE FRUIT TREES

HUSSEINI Ahmad

M. Sc. Thesis, Plant Protection Sciences

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ

July 2019, 54 pages

To control Bacterial canker, one of the most important diseases on stone-fruit trees in the world, copper-based pesticides has been used for a long time. However, the pathogens have developed resistance to copper. The aim of this study was to detect the copper tolerance rates and their related tolerance mechanisms in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *morsprunorum* isolated from Lake Van Basin where the usage of copper pesticides is low and Ege region where that usage is high *In-vitro* and molecularly. *In-vitro* works included growing the isolates on Methanol-glutamine agar (MGY) medium with different copper sulfate concentrations along with 4 commercial copper-based pesticide and Minimum inhibition concentrating (MIC) was showed. The existence of the related resistance genes *copA* and *cusA* in the tolerance strains were studied by PCR and after the sequence analysis was created, the relationship between the isolation areas and the isolates was studied by creating a phylogenetic tree. The resistance level was different according to the isolates and the used copper formulation. Between the pesticides Bordeaux mixture with Mancozeb was the best but when looking at only copper effect, copper oxychloride showed the best results between the pesticide. The maximum MIC value in all isolates was 2 mM and 79 % of it was 1 mM and below. The gene *copA* was found in only 4 isolates and 3 of them where isolated from İzmir. Although, there was no differences in the *copA* gene sequences between the pathovars, the isolates were separated into two groups. *cusA* gene was not found in any isolate. It was shown that the different resistant rates in the isolates with no resistance genes could be related to the strains ability to produce Chalkophores.

**Keywords:** Bacterial Canker, Chalkophore, *copA*, Copper resistance, *cusA*, MIC, *Pseudomonas syringae*, Siderophores.



## ÖN SÖZ

Bu çalışmamın her aşamasında yanımda olan hem maddi hem manevi desteğini esirgemeyen, büyük bir sabırla benimle ilgilenen çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Akköprü'ye, plazmit izolasyon çalışmalarında bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Usta'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Her şeyimle beni var eden, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, çalışmamın farklı aşamalarında katkıda bulunan Ceylan Pınar Uçar'a, Ümmügülsüm Olur'a, Yasin Babier. Abidin Günay'a, Araş. Gör. Gökhan Boyno'ya, Hasret Güneş'e ve diğer bölüm arkadaşlarıma, Bashar Debes, Mouhamad Aljafari, Amer Al-Ali, Mohanad Makdam, Mohammed Loay Ali ve Ahmad Nabhan'a teşekkürü borç bilirim. Ayrıca Türkçe konuşmamı iyileştirmek konusunda bana yardımcı olan Leyla Kural ve bütün arkadaşlarıma ve hocalarıma çok teşekkür ederim.

2019

Ahmad Hussein



# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Bakteri İzolatları .....	13
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakırlı Preparatlar ve Formülasyonları.....	14
3.1.3. Besi yerleri ve Çözeltiler .....	15
3.1.4. Moleküler Testler .....	16
3.1.4.1. Moleküler Testte Kullanılan Primerler.....	17
3.1.4.2. Plazmit İzolasyonu .....	17
3.1.4.3. Sekans Çalışmaları .....	17
3.2. Yöntem .....	18
3.2.1. Bakırlı Pestisitlere Karşı Direnç Düzeyinin Belirlenmesi.....	18
3.2.1.1. Bakır Sülfata Karşı Tolerans Düzeyinin Belirlenmesi.....	18
3.2.1.2. Bakırlı Pestisitlere Karşı Toleransın Belirlenmesi.....	19
3.2.2. Bakır Direnç Genlerinin Moleküler Tanımlanması.....	20
3.2.2.1. Total DNA İzolasyonu: .....	20
3.2.2.2. İlgili Genlerin Belirlenmesi (PCR Çalışmaları) .....	21
3.2.2.3. Plazmit İzolasyonu .....	22
3.2.2.4. Sekans Çalışmaları: .....	22
3.2.3. Demirin Bakır Toleransı Üzerindeki Etkisi:.....	22
3.2.4. Bakterilerin Siderofor Üretme Kabiliyeti .....	23
3.2.5. Bakterilerin Chalkophore Üretme Kabiliyeti .....	23
4. BULGULAR .....	24
4.1. İn-Vitro Testler ile Direnç Düzeyinin Belirlenmesi.....	24
4.1.1. Bakır Sülfat ile Yapılan Testler .....	24
4.1.2. Farklı Bakır Formülasyonlarına Direnç Düzeyinin Belirlenmesi.....	26

	<b>Sayfa</b>
4.2. Moleküler Testler .....	30
4.2.1. <i>copA</i> Geni Bulmak İçin PCR Sonuçlar.....	30
4.2.1.1. Dejenere Primer CopA İle PCR Sonuçlar .....	30
4.2.1.2. Spesifik Primer CopA ile PCR Sonuçlar .....	31
4.2.2. <i>CusA</i> Geni Bulmak İçin PCR Sonuçlar .....	32
4.2.3. Seçilen İzolatlardan Plazmit İzolasyonu: .....	32
4.2.4. Sequencing Sonucu: .....	33
4.3. Demirin Bakır Toleransına Etkisi.....	35
4.3.1. Demir Klorür Heksahidrat ile Yapılan Testler: .....	35
4.3.2. İzolatların Siderofor ve Chalkophore Üretme Yeteneği.....	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	38
KAYNAKLAR.....	48
ÖZ GEÇMİŞ.....	54



## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan <i>Pseudomonas syringae</i> pathovarları, kodları, Konukçuları ve izole edildiği yerleri.....	13
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan bakır ve bakırlı pestisitlere ait bilgiler .....	14
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan KB besiyeri ve gerekli kimyasallar ve miktarları .....	15
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan Yeast extract içeren Manitol-Glutamat (MGY) besiyeri ve gerekli kimyasallar ve miktarları .....	16
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan Fe-CAS Agar besiyeri ve gerekli kimyasallar ve miktarları .....	17
Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan spesifik ve dejenere primerlere ait bilgiler .....	17
Çizelge 3.7. 50 mM'lık 30 ml'lik stok hazırlamak için her bakır formülünden ihtiyaç duyulan kütleler .....	20
Çizelge 3.8. 50 mM'lık bakır stokundan alınan ve hedef bakır konsantrasyonunu elde etmek için 100 ml MGY ortamına ilave edilen hacim .....	20
Çizelge 3.9. Spesifik CopA, dejenere CopA ve CusA primerleri için PCR master mix içeriği.....	21
Çizelge 3.10. Dejenere ve spesifik CopA ve CusA primerler için PCR master mix termal cycle koşulları .....	22
Çizelge 4.1. Bakır sülfat ilave edilmiş MGY besi yerinde geliştirilen bütün izolatların ortalama MIC ve LD <sub>50</sub> (mM) değerleri.....	25
Çizelge 4.2. Bakır sülfat ve farklı bakır formları ile formülasyonlar için seçilen izolatların MIC (mM) değerleri.....	27
Çizelge 4.3. Bakır ile MGY ortamında gelişen tüm izolatların MIC değerleri ve bakır ve demir ile MGY'de MIC değerleri ve aralarındaki verim oranları .....	36

Çizelge 4.4. Yedinci günde test edilen tüm izolatlar için  
Cu-Cas agar ve Fe-Cas agar besiyerinde oluşturulan  
sarı bölge çapı (mm) ve önceki *in-vitro* çalışmalar  
ile elde edilen izolatlara ait MIC değerleri (mM)..... 38



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Bakıra tolerans seviyelerinin belirlenmesi amacı ile yürütülen çalışma basamaklarından görüntüler .....	19
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bakır sülfat ve farklı bakırlı formülasyonlar içeren pestisitlerin görünümü .....	20
Şekil 4.1. Farklı bakır sülfat konsantrasyonlarında S45S nolu izolatın 48 saatlik gelişimi.....	26
Şekil 4.2. Bakteri izolatları'nın bakır formlarına göre MIC değerlerinin yüzdesel dağılımı .....	28
Şekil 4.3. Bakır sülfat ile karşılaştırıldığında, bakır hidroksitin izolatlara etkisi (%).....	29
Şekil 4.4. Bakır sülfat ile karşılaştırıldığında, bakır oksiklorür'ün izolatlara etkinlik oranları (%).....	30
Şekil 4.5. Bakır sülfat ile karşılaştırıldığında, bakır oksitin etkinlik oranları (%).....	30
Şekil 4.6. İzolatların dejenere CopA primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüleme sonuçlar.....	31
Şekil 4.7. Dejenere primer ve spesifik primer CopA kullanarak yapılan PCR çalışmasının elektroforez jel görüntüleme sonuçlar .....	32
Şekil 4.8. CusA (486bp) primer kullanılarak yapılan PCR çalışma sonuçları.....	33
Şekil 4.9. Plazmit üzerinde <i>copA</i> geninin tespitine yönelik yapılan PCR çalışmasının jel görüntüleme sonuçları .....	34
Şekil 4.10. <i>copA</i> gen sekanslarından oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç, Neighborjoining yöntemiyle 3000 bootstrap yapılarak elde edilmiştir .....	35
Şekil 4.11. İzolatlardaki <i>copA</i> geninin birbirlerine ve referanslara göre benzerlik yüzdesi ve uzaklık değerleri (CLC Main Workbench 6.7.1).....	35

**Şekil****Sayfa**

Şekil 4.12. MGY ortamı üzerinde 1.7 mM bakır konsantrasyonunda büyüyen S45S ve P40/3 izolatları .....37

Şekil 4.13. Cu-Cas Agar (solda) ve Fe-Cas Agar'da (sağda) bazı izolatlar tarafından 7. Gün sonunda oluşturulan sarı bölge .....38



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklama

<b>bp</b>	Base pair
<b>Cu</b>	Bakır
<b>dk</b>	Dakika
<b>Fe</b>	Demir
<b>g</b>	gram
<b>kb</b>	Kilo base
<b>L</b>	Litre
<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimol
<b>ug</b>	Mikrogram
<b>°C</b>	Santigrat derece

### Kısaltmalar

### Açıklama

<b>CYE</b>	Casitone-yeast extract
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>MGY</b>	Metanol-glutamin agar
<b>MIC</b>	Minimum inhibisyon konsantrasyonunu
<b>NA</b>	Nutrient agar
<b><i>Psa</i></b>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>
<b><i>Psm</i></b>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>

## Kısaltmalar

## Açıklama

*Ps*

*Pseudomonas syringae*

*Pss*

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

*Pst*

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*



## 1. GİRİŞ

Sert-çekirdekli meyve terimi, *Prunus* türlerinden şeftali, nektarin, erik, kiraz, vişne ve kayısı gibi meyveler için kullanılmıştır. Sert çekirdekli meyveler taze, konserve, dondurulmuş, meyve suyu, reçel ve kuru olarak tüketilebilir. İçerisinde bulunan aminoasitler ve vitaminler nedeniyle sağlık açısından büyük bir öneme sahiptirler. Örnek olarak, kayısı meyvesi Demirin (Fe) yanı sıra yüksek miktarda A, C, K ve B kompleks vitaminler içerir. Bu ve benzer yapılar onlara anti-alerjik, anti-tümör ve anti-mikrobiyal birçok fonksiyonel özellik katar (Ali ve ark., 2015). Sert çekirdekli meyveler bu özelliklerine paralel olarak ülkemiz ve dünyada önemli bir ekonomik üründür. Sert çekirdekli meyvelerin yıllık dünya çapında üretimi 38-42 milyon tondur ve bu üretimin 2.4 milyon tonu ile en büyük üreticilerinden birisi ülkemizdir. Örneğin Ülkemizin 2016-2017 arasındaki kayısı üretimi 857.500 ton civarındadır ve bu dünya kayısı üretiminin % 23'ünü oluşturmaktadır (FAO, 2017). Sert-çekirdekli meyve üretimi İzmir ilinin katkısı 2018 yılı verilerine göre 145.849 tona ulaşılmıştır (Anonim, 2019a). Van Gölü Havzası ise her geçen gün sert çekirdekli meyve üretiminin arttırmaktadır (Anonim, 2017a).

Sert çekirdekli meyveler çok sayıda fungus, bakteri ve virüs tarafından saldırıya uğrayabilir. Fungus hastalıkları arasında en önemlileri; şeftali yaprak kıvrıcılığı, kahverengi çürüklük, külleme, pas, yaprak lekesi hastalıkları, şeftali kara leke, geriye doğru ölüm, solgunluk ve kök çürüklüğü hastalıkları sayılabilir (Ram ve Bhardwaj, 2007). Bunun ile birlikte *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Closteroviridae* ve *Potyviriidae* gibi farklı ailelere ait olan birçok virüs sert çekirdekli meyveleri enfekte edebilir (Barba ve ark., 2015). Ayrıca birçok bakteriyel hastalık etmeni önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Fakat *Agrobacterium tumefaciens*'in neden olduğu kök uru ve kanseri, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*'nin neden olduğu bakteriyel leke ve *Pseudomonas syringae* patovaryalarının neden olduğu bakteriyel kanser hastalığı dünyada en yaygın görülen hastalıklardır (Ivanović ve ark., 2017). Aslında, *Pseudomonas syringae*, çok çeşitli konukçularda (dünya çapında yaklaşık olarak 180 bitki türü) hastalık oluşturma yeteneği bakımından benzersizdir (Bultreys ve Kaluzna, 2010). Örneğin, *P. syringae* pv. *syringae* suşlarının neden olduğu mango bakteriyel apikal

nekrozu (BAN), Akdeniz bölgesi ve kuzeybatı Avustralya gibi diğer subtropikal bölgelerde, mango yetiştiriciliğinde en zararlı hastalıklardan biridir (Gutiérrez ve ark., 2013). 1980'lerin sonlarından beri, Amerika Birleşik Devletleri'nde, *Pseudomonas* türlerinden kaynaklı hastalıkların yıllık kayıpları yalnızca süs bitkileri için 8 milyon dolar düzeyinde olduğu tahmin edilmektedir (Scheck ve Pscheidt, 1998). Türkiye'nin İzmir ilinde yetiştirilen şeftali ağaçlarının yaklaşık % 10'unda *P. syringae*'nin neden olduğu hastalıklar ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Özaktan ve ark., 2008).

Ülkemizde sert çekirdekli meyveler üzerinde en yaygın görülen bakteriyel hastalık *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) ve pv. *morsprunorum* (*Psm*)'un neden olduğu bakteriyel kanser hastalığıdır (Akköprü, 2016). Genel olarak *Pss*, sert çekirdekli ve birçok bitkiyi enfekte ederken, *Psm* ise sadece kiraz, erik ve kayısıyı enfekte ettiği bildirilmiştir (Bultreys ve Kaluzna, 2010). *Pseudomonas syringae* gram negatif, çubuk şeklinde ve polar kamçılı bakterilerdir. *Psm* coronatine ve yersinibactin tipte siderforu, *Pss* ise syringomycin ve syringopeptit ve benzeri birçok toksin üreterek hastalık belirtilerini oluştururlar (Bultreys ve Kaluzna, 2010). Sadece Türkiye'de değil, dünya çapında da bakteriyel kanserin kontrolü zordur ve önemli ekonomik kayıplarla neden olur (Donmez ve ark., 2010). Örnek olarak, Almanya'daki erik ağacı ölümlerinin % 30'u bu grup bakteriden kaynaklandığı belirlenmiştir (Kennelly, 2014). Türkiye de ise Malatya bölgesinde kayısı ağaçlarının % 20'sinde *Ps* patovaryalarının neden olduğu hastalık tespit edilmiştir. Benzer olarak sert çekirdekli meyvelerde bu hastalık İzmir (Ertimurtas, 2015), Erzurum, Erzincan, Artvin (Donmez ve ark., 2009), Tekirdağ (Bülbül, 2014) ve Van Gölü Havzasında (Akköprü, 2016) yürütülen çalışmalar ile tespit edilmiştir.

Hastalık kontrolü için dayanıklı çeşit kullanma, budama, bitki ekolojik isteklerini karşılama veya hastalığa karşı predispose olmasını engellemek ve koruyucu kimyasallar kullanmak gibi birçok metot uygulanabilir (Agrios, 2005). Fakat dayanıklı çeşitlerin sınırlı olması, patojenlerin konukçu sayısının çokluğu, yüksek adaptasyon özellikleri ve geniş bir ekolojik aralıkta etkin olabilmeleri kimyasal kullanımını zorunlu hale getirmektedir (Kennelly ve ark., 2014). Antibiyotik kullanımının ülkemiz ve birçok ülkede yasak olması, kimyasal mücadelede diğer bir alternatif olan bakırlı preparatları en yaygın kullanılan pestisit haline getirmiştir. Fakat çok yer engelleyici bir



kimyasal olan bakırın yoğun olarak kullanılması sonucu patojenlerin direnç kazandığı belirlenmiştir (Bender ve Cooksey, 1985).

Doğada farklı formlarda bulunan bakır bitkiler ve bakteriler için hayati bir elementtir. Bitkide bazı enzimlerin aktivasyonunda, solunumda, fotosentezde, karbonhidratların ve proteinlerin metabolizmasında görev alır. Bakterilerde ise katekol gibi farklı substratlardan elektron alınması, Sitokrom C oksidaz gibi proteinler için kofaktör ve bazı virülens proteinlerinin aktivasyonunda ihtiyaç duyulur (Uchida, 2000; Argüello ve ark., 2013; Lodomersky ve Petris, 2015). Bu nedenle bakteriler bakır alımını düzenleyen birçok kompleks mekanizmaya sahiptir. Fakat tarımsal sistemlerde bakırın yoğun kullanımı bakterilerin direnç mekanizmaları geliştirilmesine veya dirençli suşların yayılmasına neden olmuştur.

Bakteriler, hücredeki bakır konsantrasyonunu belirli bir düzeyin altında ve dengede tutabilmek için birçok mekanizma kullanmaktadırlar. Bunun ile birlikte akış (Efflux) ve akın (influx) sistemleri ile ilgili temel olarak iki mekanizma ön plana çıkmaktadır; hücre içi ve dışı sekestrasyonu (Zararlı bir maddeyi güvenli tutacak şekilde ayırma ve saklama işlemidir (Anonim, 2019b) ve enzimatik detoksifikasyondur. İnflux mekanizması, *Escherichia coli*'de *pcoABCDE* veya *Pseudomonas syringae* ise *copABCDE* adıyla tanımlanan akın (influx) sistemidir. Akış (efflux) mekanizma ise, *cusABCF* sistemi yoluyla fazla bakırın iyonlarını hücre dışına taşınımını sağlayan sistemdir. Sekestrasyonun örneğinin, sitoplazmada periplazmik oksidaz CueO tarafından desteklenen CopA gibi bazı Cu-şaperonları bakır iyonlarının periplazmik boşluğa veya hücrenin dışına atılmasında rol oynamaktır. Ayrıca, periplazma ve sitoplazma içinde bulunan bakır; CusF, PcoC, SenC, CueP, CopZ ve diğer bakır ile ilgili chaperonlar, hücrede istenmeyen reaksiyonlara girmesini engellemek için bakır iyonlarına bağlanmakta görev alırlar veya dışarı atma sistemlerini (Efflux sistemi ve *cusABCF* sistemi) kullanarak hücrenin dışına aktarırlar. Detoksifikasyonun örneğinin, oksidasyon adlı olan Cu (I)'dan daha az toksik formu olan Cu (II)'e transformasyonunu sağlamaktadır. Bahsedilen mekanizmalardan sorumlu genlerin çalışmasını aktive etmek veya devre dışı bırakmak için dört ana sınıfa ayrılmış olan düzenleyici sistem; Transkripsiyonel baskılayıcı olan CsoR, CopY ve ArsR ve bir transkripsiyonel aktivatör olan MerR ilgili genlerin çalışmasını düzenleyerek bakır dengesinin kontrol altında

tutulmasına sağlarlar (Argüello ve ark., 2013; Bondarczuk ve Seget, 2013; Colombi ve ark., 2016).

Bakırlı preparatların yoğun ve uygunsuz şekilde kullanımına paralel olarak bakteriler yukarıda bahsettiğimiz mekanizmalar ile direnç geliştirebilmektedirler. Bunun sonucu olarak bakırlı pestisitlerin etkinliğinin her geçen gün azaldığı görülmektedir (Marco, 1983; Bender ve Cooksey 1985; Sundin, 1989). Etkin ve başarılı bir mücadele için bu durumun göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Bakıra dayanıklılığın belirlenmesinin yanı sıra düzeyinin ve mekanizmasının belirlenmesi etkin mücadele stratejisinin oluşturulmasına önemli katkı sağlayacaktır. Ülkemizde bakır dayanıklılığının belirlenmesi için bazı çalışmalar yürütülmüştür. Örneğin, Adana, Osmaniye (Mirik ve ark., 2007), Batı Akdeniz Bölgesi (Baştaş, 2013), İzmir, Aydın, Bursa, Bayındır, Yalova, Manisa ve Çanakkale'de (Eğerci, 2015) bakıra direnç gösteren bakteri suşları birçok üründe tespit edilmiştir. Fakat bu çalışmalar *in-vitro* testler düzeyindedir ve dayanıklılık mekanizması üzerinde durulmamıştır.

Bakır dirençli genlere ek olarak, bakır direnç seviyesi birçok faktöre göre değişebilir. Bu faktörlerden biri, demir gibi gelişim ortamındaki diğer eser elementlerin varlığıdır. Bu metal hemen hemen tüm canlı organizmaların büyümesi ve gelişmesi için hayattır. Demir, oksijen metabolizması, elektron transferi ve nükleik asit sentezi ve en temel enzimatik işlemlerin bazılarında katalizör görevi görmektedir. Ortamda zaten çok düşük konsantrasyonlara sahip olan ( $10^{-7}$ - $10^{-24}$  M), serbest demir için mikroorganizmalar arasında yüksek rekabete neden olmaktadır. Bakteriler tarafından demir alımını kolaylaştıran, sideroforlar adında düşük moleküler ağırlığa (200–2000 Da) sahip bir tür şelat üretilmektedir. Bu sideroforlar bakteri için gerekli olan Fe'i organik maddelerden temin etmenin yanı sıra bir virulens faktörü olarak hareket edebilirler (J. Schalk ve ark., 2011). Pyoverdine ve pyochelin, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen iki ana siderofor grubu olarak bilinmektedir ve bakır dahil 16 farklı metali şelatlayabilmektedirler. Aynı zamanda, bu metallerin varlığı, konsantrasyonlarına bağlı olarak, siderofor üretimini aktive etmekte veya önleyebilmektedir (Braud ve ark., 2009). Bakıra karşı yüksek afiniteye sahip olan spesifik sideroforlar Chalkophore olarak adlandırılır ve metanotroflar tarafından yüksek konsantrasyonlarda üretilirler (Yoon., 2010; Yoon ve ark., 2011; Argüello ve ark., 2013; Patel ve ark., 2018). Toksik metaller difüzyon yoluyla Gram negatif bakterilerin periplazmalarına ulaşmaktadırlar.

Sideroforlar hücre dışı ortamda metallerle bağlanır ve bu bağlanma sonucunda serbest metallerin konsantrasyon seviyesini düşürerek difüzyonu etkiler, böylece toksisite azalmasına neden olurlar. (J. Schalk ve ark., 2011).

Yürütülen bu yüksek lisans çalışmasında; ülkemizin sert çekirdekli üretiminin yapıldığı ve yoğun olarak bakırlı preparatların kullanıldığı İzmir ili ve civarı ile, sınırlı düzeyde bakır kullanılan Van Gölü Havzasındaki sert çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas syringae* patovarlarındaki bakıra direnç durumunun tespiti, direnç düzeyinin belirlenmesi ve mekanizmasının biyokimyasal ve moleküler metotlarla ortaya konması amaçlanmıştır.





## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Millardet 1882’de, bağlarında külleme hastalığının kontrolü için hazırladığı bakırlı karışımı kullanmıştır. Bordeaux karışımı olarak adlandırılan bu pestisit keşfedildikten sonra birçok bitki hastalığının kontrolü için kullanılmıştır (Agrios, 2005). Bakır yüz yıldan fazla (Rensing ve Grass, 2003), bitki patojenlerine karşı yüksek etkili, nispeten ucuz maliyetli olması ve memelilere karşı düşük toksisiteye sahip olması nedeni ile halen tercih edilmektedir (Marco, 1983; Cha ve Cooksey, 1991). Ne yazık ki, 1980’lerin ortalarından beri, bakıra karşı birçok bakterinin direnç kazandığı tespit edilmiştir (Marco, 1983; Bender ve Cooksey 1985; Sundin, 1989). Bakır konsantrasyonunu arttırarak bu direnç aşılabılır ancak bu bitki, çevre ve memeliler için toksik düzeye ulaşmasına neden olabilir. Bu probleme uygun çözümler üretmek için bakır direncinin mekanizması ve düzeylerinin belirlenmesi hayati önem taşımaktadır.

Bu kapsamda yapılan bazı *in-vitro* çalışmalarda kullanılan besiyerlerin eser miktarda bakır içerdiği ve çalışma sonucunun etkilediği belirlenmiş, bu nedenle farklı besi yerleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu çerçevede Cooksey ve ark. (1991), domates bitkilerinden *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas putida* ve *P. fluorescens* ve diğer *Pseudomonas spp*’nin bakıra dirençli türlerini izole etmiştir. İzolatların, minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MIC) belirlemek için farklı konsantrasyonda bakır sülfat içeren MGY besiyerinde geliştirerek direnç düzeylerini başarılı bir şekilde tespit etmiştir. Çalışmada bazı suşların, MIC değerlerinin 3.2 mM düzeyine ulaştığını belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada, Mango ağaçları üzerinde bakteriyel uç nekrozuna (BAN) neden olan 71 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* suşu izole edilmiştir. İzolatlar 0.3-2 mM arasında değişen bakır sülfat katkılı MGY ortamına ekilmiştir. Bakıra karşı duyarlı suşlar tespit edilmiş, bunun ile birlikte 44 suş’un (% 62) yüksek direnç (MIC değerleri 2.6-3.2 mM), 16 suş’un (% 22.5) dirençli (MIC 1.8-2.4 mM) ve 11 suşta (% 15.5) bakır sülfata düşük direnç (1.0-1.6 mM) olduğu sonucuna varılmıştır (Aiello ve ark., 2015).

Yumuşak çekirdeklilerden izole edilen *Pseudomonas syringae* türleri, bir ortam olarak “Luria agar” ve minimum bir ortam olarak “Ceria 132” üzerinde geliştirilmiş ve burada dirençli türleri belirlemek için 500 mg/litre bakır sülfat ilave edilmiştir. Ancak,

21 izolatın sekizi, bakır sülfat ile desteklenmiş minimal ortamda gelişebilmiştir (Vanneste ve Voyle, 2003). Florida'da, bakırlı (Bakır sülfat) ve bakırsız glikoz ve CYE (casitone-yeast extract) katkılı Nutrient Agar (NA) besi yerleri *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*)'nın üremesine etkilerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. İzolatlarının % 80'inin bakıra direnç gösterdiği ve iki besin ortamındaki sonuçların benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca CYE agarının *Psp* popülasyonlarındaki bakır direncinin hızlı değerlendirilmesine imkân tanıdığı ortaya konmuştur (Zhang ve ark., 2017).

Japonya'daki kivi meyve bahçelerinden 1984, 1987 ve 1988 yıllarında izole edilen 28 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) izolatlarının bakır sülfata direnç düzeyleri test edilmiştir. 1984 yılında izole edilen tüm suşların, 0.75 mM MIC ile bakıra duyarlı olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık 1987 ve 1988'de bakırlı bakterisitlerin rutin olarak uygulandığı meyve bahçelerinden izole edilen suşların, 1.75-3.0 mM arasında MIC değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir (Nakajima ve ark., 2002).

Teknolojik gelişmeler ile bakır direncinden sorumlu gen ve mekanizmaları belirlemek için moleküler araştırmalar hız kazanmıştır. Bakteriler ana kromozoma ek olarak, sitoplazma içinde plazmit denilen konukçunun ana kromozomal DNA'sından bağımsız olarak kopyalanan küçük dairesel DNA yapılarına sahiptirler (Addgene, 2017). Bakterilerinde bakır direncinden sorumlu genler plazmitler ve/veya kromozom üzerinde bulunabilir (Behlau ve ark., 2016). Yapılan öncü çalışmalar ile bakırla desteklenmiş bir diyetle beslenen domuzlardan elde edilen *Escherichia coli*'deki bakır direncinden sorumlu olan konjüгатif plazmit "pRJ1004" tespit edilmiştir (Tetaz ve Luke, 1983). Bitki bakterilerinde bakır direnç kaynağı olarak tespit edilen ilk plasmidlerden biri *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'dan izole edilen ve diğer bakterilere aktarılabilceği belirlenmiştir(konjüгатif) (Stall ve ark., 1986) . Aynı yıl *P. syringae* pv. *tomato* PT23'ten izole edilen pPT23D plazmiti tanılanmıştır (Cooksey, 1986). Üç yıl sonra pPSII adı verilen ve *Pseudomonas syringae*'den izole edilen plazmitin fiziksel haritası belirlenmiştir (Cooksey, 1989). Son yıllarda, diğer çalışmalar ile birçok bakteri grubunda bakır direncinin plazmit kaynaklı olabileceğini göstermiştir. Yumuşak çekirdeklilerden izole edilen *Pseudomonas syringae* türlerindeki bakır direncin plazmit kaynaklı ve ilgili bölgenin de 1.3 kb büyüklüğünde bir bölge olduğu spesifik primerler kullanılarak tespit edilmiştir. (Vanneste ve Voyle, 2003). Benzer

şekilde İtalya'da mango'dan izole edilen *Pss* izolatlarının direncinin plazmit kaynaklı olduğu belirlenmiştir (Gutiérrez ve ark., 2013). Behlau ve ark. (2016), *Xanthomonas campestris* pv *campestris* BrA1 izolatında konjüгатif olmayan 160- 180 kilo baz (kb) büyüklüğünde plazmite sahip olduğunu belirlenmiştir.

*Xanthomonas campestris* (Cervantes ve Corona, 1993) ve *E.coli*'de (Nies ve Herzberg, 2013) ve olduğu gibi bakteri plasmidinde birçok direnç geni bulunmasına rağmen direnç özelliğinin bakteriyel kromozom üzerinde bulunana genlerden de kaynaklanabileceğini belirlenmiştir. Behlau ve ark. (2016), *Xanthomonas campestris* pv *campestris*'in farklı türlerinde direnç genlerinin kromozom üzerinde olduğunu göstermiştir. Sınırlı sayıdaki *P. syringae* pv. *syringae* türlerinde ise CopJ adlı direnç operonu kromozom üzerinde yer aldığı belirlenmiştir (Cazorla ve ark., 2002).

Bitki bakterilerinde bakır direncinin nasıl oluştuğunu anlamak için, araştırmalar bakır mekanizmalarının aktivasyonundan sorumlu genleri belirlemeye yönelmiştir. Bakterilerde bakır direncinin ilk karakterize edilmiş genetik belirleyicisi *pcoABCDRSE* sistemidir. *E.coli*'de, 7 gen *pcoABCDRSE*'den oluşan *pco* sistemi ilk olarak, bir konjüгатif plazmit olan pRJ1004 üzerinde belirlenmiştir (Brown, 1997). *P.syringae* ise bu sistem *copABCDRS* olarak adlandırılmıştır ve plazmit pPT23D üzerinde tespit edilmiştir. PcoB/CopB ve PcoD/CopD, sırasıyla dış ve iç membranlarında bulunan membran proteinlerinin üretiminden sorumludur ve bu proteinler bakırın taşınmasına katılırlar. PcoA/CopA ve PcoC/CopC periplazmik boşluktaki Cu<sup>+</sup> bağlama görevini üstlenen proteinleridir (Argüello ve ark., 2013). Bazı çalışmalar PcoA ve PcoC'nin *E. coli*'deki *Pco* sistemi için kritik proteinler olduğunu göstermiştir (Bondarczuk ve Seget, 2013). Öte yandan Argüello ve ark. (2013), *copA* ve *copB*'nin kısmi bakır direnci kazandırdığı, buna karşılık *copC* ve *copD* genlerinin *P. syringae* pv. *tomato*'nun tam direnci için gerekli olduğunu belirtmiştir. Örneğin, *copABCDRS* taşıyan plazmit, kivi meyve bahçelerinden ve yağmur sularından izole edilen farklı *Pss* izolatlarında belirlenmiştir (Pettriccione ve ark., 2017). Nakajima ve ark. (2002), *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*)'nın taşıdığı *copABCDRS* bakır direnç genlerini bulmak için *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'dan (*Pst*) tasarlanan spesifik primerler kullanmışlardır. Yirmi sekiz *Psa* izolatından pPaCuC1 adlı plazmit bulunmuş ve bu plazmit homolog bölgeyi içerdiği belirlenmiştir. Bu bölgenin *Pst*'in *copA*, *copB*, *copR* ve *copS* genleri ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Homolog bölgenin DNA dizi analizi,

aynı yönde yönlendirilmiş dört açık okuma çerçevesinin (ORF A, B, R ve S) varlığını ortaya koymaktadır. ORF A, B, R ve S'nin tahmin edilen amino asit dizileri, *Pst*'in *copA*, *B*, *R* ve *S* ile sırasıyla % 80, 70, 97 ve 95 özdeşliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Proteobakterilerde en çok çalışılan diğer bir bakır direnç mekanizması *cusCFBA* çıkış (efflux) sistemidir. Argüello ve ark. (2013)'a göre bu sistem üç temel proteinden oluşmaktadır; CusA adı verilen bir plazma membran enerji verme kanalı (proton-substrat taşıyıcı), dış membran pasaj CusC ve CusB, CusA ve CusC'yi birbirine bağlayan periplazmik bir proteindir. Ayrıca, Franke ve ark. (2003), *E. coli*'deki CusCBA efflux kompleksiyle etkileşime giren başka bir bakır bağlayıcı protein olan CusF'yi saflaştırmış ve karakterize etmiştir. CusCFBA sistemi; regülatör CusSR tarafından kontrol edilmektedir. Genellikle, Cu(I) iyon konsantrasyonu yüksek olduğunda CusCFBA kümesini harekete geçiren düzenleyici CusR'yi aktive ederek periplazmadaki CusS'i faaliyete geçirmekte böylece Cu(I) iyonlarının hücre dışına aktarılması sağlanır. Bu sistemin genleri, farklı çok sayıda araştırma ile incelenmiştir. *E. coli*'de Franke ve ark. (2003), tarafından efflux Cus sistemini spesifik primerleri kullanarak araştırılmış, bakır direnci için CusA ve CusB'nin varlığının önemli olduğunu ve CusC ve CusF'nin tam direnç için gerekli olduğunu kanıtlamışlardır. Ayrıca, Aiello ve ark. (2015), çalışmalarında, Sicilya'daki Mango ağaçlarındaki 28 *Pss* suşunda *cusCBA* genlerinin rep-PCR ile varlığını araştırmışlar ve en yüksek bakır direnç düzeyine sahip olan (2.8-3.2 mM) sadece 3 suşta *cusCBA*'nın varlığını belirlemişlerdir. Gutierrez-Barranquero ve ark., (2013) farklı bitkilerden izole edilen *P. syringae* türlerinde *cusCBA* genleri içeren bakır direnç plasmidi tanımlanmıştır. Çalışma da *cusCBA* genleri, 1.8 mM düzeyinde  $CuSO_4$ 'e direnç ile ilişkilendirilirken, düşük MIC değerlerinde (0.8-1.2 mM) bakır dirençlenden sorumlu bu genlerin bulunmadığını belirlemişlerdir.

Bazı çalışmalarda, sülfat formundaki bakır'ın, hidroksit, oksiklorür veya amonyaklı bakır sülfat formundan daha etkili olduğunu vurgulamıştır (Paulin ve Lachaud, 1984). Öte yandan Bordeaux karışımında kullanılan bakır hidroksit veya klorürün etkisinin birbirinden farklı olmadığı belirlenmiştir (Burr ve Norelli, 1984). Bu da bakırın formu ve ürünün formülasyonunun pestisit bakteriler üzerine etkisini değiştirebileceğini göstermektedir (Burr ve Norelli, 1984). Scheck ve Pscheidt. (1998), araştırmalarında on dört farklı formülasyondaki bakırlı bakterisiti *Pss* üzerinde direnç düzeyini belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, sadece bakır hidroksit ile



mancozeb veya ferrik klorür karışımından oluşan formülasyonlar bakır dirençli türlerin popülasyonunu azaltabilmiştir. Buna karşılık bakıra karşı dirençli olmayan izolatların tüm bakır bazlı bakterisitlerden etkilenmiştir.

Bakıra dirençli bakteriler, toprak ve su kaynakları gibi farklı ortamlarda da bulunabilirler. Ağır metaller tarafından kirlenen, özellikle maden artığı alanlarına yakın yerlerde veya endüstriyel faaliyetlerin yürütüldüğü topraklarda bakır kirliliği gözlenebilir (Badar ve ark., 2014). Ayrıca, Suda, tatlı su veya deniz tortularında da bakır kirliliği mevcut olduğu tespit edilmiştir (Besaury ve ark., 2013). Pakistan'da petrol ve petrolün bulaştığı alanlardan *Enterobacter sp.* türlerinin bakır direnci incelenmiş ve PcoABCDRSE operonunun CMG457 adlı plazmit üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Badar ve ark., 2014). Şili'deki deniz tortularında, bakır direnç genleri *cusA* ve *copA*'nın yaygınlığı ve çeşitliliği bakterilerde incelenmiş ve *copA* ve *cusA* genlerinin sayısının bulaşık alanlarda daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir (Besaury ve ark., 2013).

Bakterilerde bakır direnci, büyüme ortamındaki demirin mevcudiyeti ve bakterilerin siderofor ve chalkophore üretme kabiliyeti gibi başka faktörlerden de etkilenebilir (Yoon ve ark., 2010, 2011; Argüello ve ark., 2013; Patel ve ark., 2018). Çalışmalarında, Teitzel ve ark. (2006), yüksek düzeyde bakır ( $Cu^{+2}$ ) varlığında geliştirilen *P. aeruginosa*'ın demir şelatı siderofor pyochelin'in taşınmasını kodlayan genlerin aşağı yönde regüle edilirken, başka bir siderofor pyoverdinin üretimini kodlayan genlerin yukarı yönde regüle edildiğini belirlemişlerdir. Bakırın ortamdaki varlığı, pyoverdin üretimini indükler iken, pyoverdin-Fe taşıyıcısını indüklemez, böylece metal hücre dışı ortamda bağlansa dahi hücre içine taşınmaz. Ayrıca Braud ve ark. (2010), pyoverdin ve pyochelin üretme kabiliyetine sahip *P. aeruginosa* suşlarının, metal toksisitesine siderofor üretmeyen bir suşa göre daha dirençli olduğunu belirlemiştir. Enterobactin olarak adlandırılan bir başka siderofor, *E. coli*'yi bakır indirgeyici olarak hareket etme kabiliyetinde olduğu ve duyarlılığı arttırdığı belirlenmiştir (Ladomersky ve Petris, 2015). Diğer taraftan *E. coli* ürettiği yersiniabactin'in enfeksiyon sırasında bakırı bağladığı böylece hücreyi bakır iyonlarının toksisitesinden koruyabildiği belirlenmiştir (Chaturvedi ve ark., 2012).

Türkiye'de pek çok çalışma ile pek çok üründe bakır dirençli bakterilerin varlığına işaret etmektedir. Adana ve Osmaniye'de, bitkilerinden izole edilen 67 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın bakır sülfata dirençli olduğu tespit

edilmiştir (Mirik ve ark., 2007). Batı Akdeniz Bölgesi'nde 25 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatının bakır direnci, üç farklı ortamda (CYE, MGY ve NA) bakır sülfat ve bakır oksiklorür dozları kullanılarak test edilmiştir (Bastas, 2013). Ayrıca İzmir, Aydın, Bursa, Bayındır, Yalova, Manisa ve Çanakkale'de bakır sülfatın yanı sıra bakırın farklı formülasyonların farklı genuslara ait bakterilere olan etkileri belirlenmiştir. Bu çalışmada bakır formülasyonuna göre direncin de değiştiği belirlenmiş ve en duyarlı formülasyonun ise sıvı bakır sülfat ve nano-bakıra olduğu sonucuna varılmıştır (Eğerci, 2015). Mineral formdaki Bakır sülfat ise MIC ve LD<sub>50</sub>'ye bağlı olarak en yüksek direnç gösterilen formülasyon olarak belirlenmiştir (Eğerci, 2015).

Ülkemizde farklı bölgelerde birçok grup üzerine bakterilerde bakır direnci ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, bu çalışmaların çoğu *in-vitro* olarak yürütülmüştür. Ayrıca aynı grubun farklı bölgelerdeki direnç durumu karşılaştırılmamıştır. Çalışmamızda yetiştiricilikte düşük miktarda bakır kullanılan Van Gölü Havzası ve yoğun olarak bakır kullanılan İzmir ili ve civarında bulunan sert-çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Ps.* pv. *morsprunorum* izolatların bakır direnç düzeylerinin ve olası mekanizmaların belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bakteri İzolatları

Önceki çalışmalar ile Van Gölü Havzası (Akköprü 2015) ve İzmir ili ve civarındaki sert çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen ve tanımlanan toplam 24 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) ve *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (*Psm*) izolatu çalışmada bakteriyel materyal olarak kullanılmıştır. İzolatların, 10'u kayısıdan (7 *Pss* ve 3 *Psm*), 6'sı şeftaliden (3 *Pss* ve 3 *Psm*), 7'si kirazdan (5 *Pss* ve 2 *Psm*) ve 1'i ise bademden (*Pss*) izole edilmiştir (Çizelge 3.1). İzmir izolatları Ege üniversitesi, Ziraat fakültesi, Bitki koruma bölümü, bakteriyoloji laboratuvarından Prof. Dr. Hatice Özaktan'dan temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan *Pseudomonas syringae* pathovarları, kodları, Konukçuları ve izole edildiği yerleri

İzolat no	İzolatu kodu	<i>P. s</i> pathovar	Konukçu	İzole edildiği bitki kısmı	İzole edildiği yer
1	S16S	<i>syringae</i>	Kayısı	Meyve	Bahçelievler mah. Gevaş/Van
2	S23Y	<i>syringae</i>	Kayısı	Yaprak	Muradiye- Erciş yolu/Van
3	S25M	<i>syringae</i>	Kayısı	Meyve	Çatakdibi Mah., Erciş/Van
4	S25S	<i>syringae</i>	Kayısı	Sürgün	Van
5	S43S	<i>syringae</i>	Şeftali	Sürgün	Adilcevaz- Ahlat, Bitlis
6	S45S	<i>syringae</i>	Şeftali	Sürgün	Ahlat/Bitlis
7	S46S	<i>syringae</i>	Kayısı	Sürgün	Ahlat/Bitlis
8	S49S	<i>morsprunorum</i>	Kayısı	Sürgün	Ahlat/Bitlis
9	S50m2	<i>syringae</i>	Kayısı	Meyve	Uludere köyü, Ahlat, Bitlis
10	S53S	<i>morsprunorum</i>	Kiraz	Sürgün	Göllü köyü/Van
11	S54S1	<i>morsprunorum</i>	Şeftali	Sürgün	Göllü köyü/Van
12	S54S2	<i>morsprunorum</i>	Kayısı	Sürgün	Göllü köyü/Van
13	S59S 1	<i>morsprunorum</i>	Kiraz	Sürgün	Ayanis köyü/Van
14	S59S 2	<i>morsprunorum</i>	Şeftali	Sürgün	Ayanis köyü/Van

Çizelge 3.1. Kullanılan *Pseudomonas syringae* pathovarları, kodları, Konukçuları ve izole edildiği yerleri (devam)

İzolat no	İzolatın kodu	<i>P. s</i> pathovar	Konukçu	İzole edildiği bitki kısmı	İzole edildiği yer
15	S61S	<i>syringae</i>	Kayısı	Sürgün	Ayanıs/Van
16	S62S	<i>morsprunorum</i>	Şeftali	Sürgün	Mollakasım köyü/Van
17	S65S	<i>morsprunorum</i>	Kayısı	Sürgün	İskele Mah/Van
18	SBYS	<i>syringae</i>	Badem	ND	Yalova
19	P40/3	<i>syringae</i>	Şeftali	ND	Çanakkale
20	A2L	<i>syringae</i>	Kiraz	Yaprak	Armutlu, Kemalpaşa/İzmir
21	Ö3L2	<i>syringae</i>	Kiraz	Yaprak	Ören, Kemalpaşa/İzmir
22	Ö3L1	<i>syringae</i>	Kiraz	Yaprak	Ören, Kemalpaşa/İzmir
23	BY5L	<i>syringae</i>	Kiraz	Yaprak	Bağyurdu, Kemalpaşa/İzmir
24	AL1T3	<i>syringae</i>	Kiraz	Sürgün	Allahdiyen, Salihli, Manisa

### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakırlı Preparatlar ve Formülasyonları

*Ps* izolatlarının farklı bakır foramlarına karşı oluşturdukları direnci belirlemek için referans olarak bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ve piyasada yaygın olarak kullanılan farklı formasyonlardaki bakırlı pestisitler kullanılmıştı. Kullanılan bakır preparatlara ait etkili madde içerikleri, bakır formları, ticari isim ve üretici firmalara ait bilgiler (Çizelge 3.2)'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan bakır ve bakırlı pestisitlere ait bilgiler

No	Bakır Formu	Etkili Madde oranı	Preparatın ticari Adı ve firma
1	Cu So <sub>4</sub>	% 99	Merck
2	Bakır oksit	% 75	Nordox 75 WG/ Doğal kimya
3	Bakır oksiklorür	% 50	Cupravit Ob21
4	Bordo Bulamacı ( $\text{CuSO}_4$ ) + Mancozeb	Cu SO <sub>4</sub> % 12 + Mankozeb % 30	WP / Bayer
5	Bakır Hidroksit	% 53.8	Cuprofix 30

### 3.1.3. Besi yerleri ve Çözeltiler

İzolatların geliştirilmesi için King's B (KB) (King ve ark., 1954) besi ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.3). İzolatların bakır direncinin belirlenmesinde Yeast extract içeren Manitol-Glutamat ortamı (MGY) (Cooksey ve ark., 1990) kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Ayrıca demirin direnç üzerine etkisini incelemek için, 100 mM demir (III) klorür ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) içeren MGY ortamı hazırlanmıştır. Louden ve ark. (2011)'e göre izolatların siderofor ve chalkophore üretme kabiliyetlerini incelemek için, sırasıyla Fe-CAS Agar ve Cu-CAS agar ortamı hazırlanmıştır (Çizelge 3.5). Chalkophore üretimini belirlemek amacıyla hazırlanan Cu-CAS agar ortamı, Fe-CAS Agardan farklı olarak Demir yerine 10 ml Cu (II) solusyonu (10mM  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (10mM HCl içinde 0.17g/100ml), kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan KB besiyeri ve gerekli kimyasallar ve miktarları

Besiyeri	Gerekli kimyasallar	Miktar (1000 ml için)
King's B (KB)	Peptone	20.0 g
	Glycerol	10.0 ml
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.5 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 g
	Cycloheximide	16 g
	Cycloxe	0.1 g

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan Yeast extract içeren Manitol-Glutamat (MGY) besiyeri ve gerekli kimyasallar ve miktarları

Besiyeri	Gerekli kimyasallar	Miktar (1000 ml için)
MGY	Mannitol	10 g/L
	L-glutamic asit (Sodium salt)	2 g/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g/L
	NaCl	0.2 g/L
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g/L
	PH'ı 0.7'ye ayarlandıktan sonra:	
	Yeast extract	0.25 g/L
	Agar	15 g/L

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan Fe-CAS Agar besiyeri ve gerekli kimyasallar ve miktarları

Blue-CAS Agar besiyeri (1000 ml için)	
Chrome azürol S solüsyonu	1. 60.5 mg chrome azürol S (CAS) (50ml saf su içinde çözülür)
	2. 10 ml Demir (III) solüsyonu ((1 mM FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O(10 mM HCl içinde 0.027g/100ml), (10 mM HCl; 0036g/100ml su içinde çözülür))
	3. 72.9 mg HDTMA (40 ml su içinde çözülüp, 1 ve 2 basamağa eklenir)
	Oluşan koyu mavi süspansiyon otoklavda sterilize edilir (121°C / 15 dk.)
Free asid solüsyonu (750 ml suda)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30.24 g Pipes (Free asit)</li> <li>• 12 g NaOH (% 50(w/v))</li> </ul>
Tuz solüsyonu (toplam 100mL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.3 g/100ml)</li> <li>• 5g/L NaCl (0.5 g/100ml)</li> <li>• 10 g/L NH<sub>4</sub>Cl (1 g/100ml)</li> <li>• 20 mM MgSO<sub>4</sub> (0.492 g/100ml)</li> <li>• 1 mM CaCl<sub>2</sub> (0.110 g/100ml)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 15 g agar</li> <li>• Free asit ve tuz solüsyonları karıştırılarak 121°C 'de 15 dk. otoklavda sterilize edilir.</li> </ul>
Filtre ile sterilizasyon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 ml (% 20'lik Sukroz veya Gulukoz solüsyonu-</li> <li>• 4 g/20ml su çözülür)</li> <li>• Casamino acid 30ml (% 10 w/v) 4g/40ml su</li> </ul>

### 3.1.4. Moleküler Testler

### 3.1.4.1. Moleküler Testte Kullanılan Primerler

Bakır dirençli genlerin belirlenmesi amacıyla yapılmış olan PCR çalışmalarında kullanılan spesifik ve dejenere primerlere ait dizi bilgileri Çizelge 3.6'da verilmiştir. Çalışmada Master-mix ve termal-cycler koşulları (Aiello ve ark., 2015), (Lejon ve ark., 2007) ve Nakajima ve ark. (2002)'in belirttikleri yöntem doğrultusunda yapılmıştır.

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan spesifik ve dejenere primerlere ait bilgiler

Primer	Dizisi (5'-3')	Amplicon boyutu (bp)	Hedef gen	Kaynak
CusA-F	ATC TGC CAC CAT CGA TAG GGG	486	<i>cusA</i>	Aiello ve ark., (2015)
CusA-R	CCT GAA AAG CTG ATC GAG GC			
Dejenere CopA (F)	GGG ASB TAC TGG TRB CAC	1265	<i>copA</i>	Lejon ve ark., (2007)
Dejenere CopA (R)	TGN GHC ATC ATS GTR TCR TT			
Spesifik CopA (F)	ATG GAA TCA AGA ACT TCT CGA CGT	1878	<i>copA</i>	Nakajima ve ark., (2002)
Spesifik CopA (R)	CTC CTC TAC CCG AAC TTC GCG GAA C			

Dejenere primer ile ilgili olarak, değişken bazlar için aşağıdaki tek harfli kodlar kullanılmıştır: W=A veya T; M= A veya C; R = A veya G; Y = C veya T; K =G veya T; S =G veya C; H = A; T veya C; D=G, A veya T; B = G, T veya C; V =G, A veya C.

### 3.1.4.2. Plazmit İzolasyonu

İzolatlar 24 saat boyunca sıvı NB geliştirildikten sonra plamidi izole etmek için Thermo Scientific kiti (GeneJet Plasmid. Miniprep Kit. #K0503) kullanılmıştır. Çalışmalar üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.4.3. Sekans Çalışmaları

PCR çalışması sonucu elde edilen DNA fragmentleri jel ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit # K0691) kullanılarak jelden izole edilerek saflaştırılmıştır. DNA dizileme çalışmaları Sentebiolab Biyoteknolojik

laboratuvarı (Ankara) tarafından yapılmış ve sonuçları UGENE ve MEGA programları kullanılarak analiz edilmiştir.

### 3.2. Yöntem

Çalışmaların tamamı Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Bakterioloji laboratuvarlarında yürütülmüştür.

#### 3.2.1. Bakırlı Pestisitlere Karşı Direnç Düzeyinin Belirlenmesi

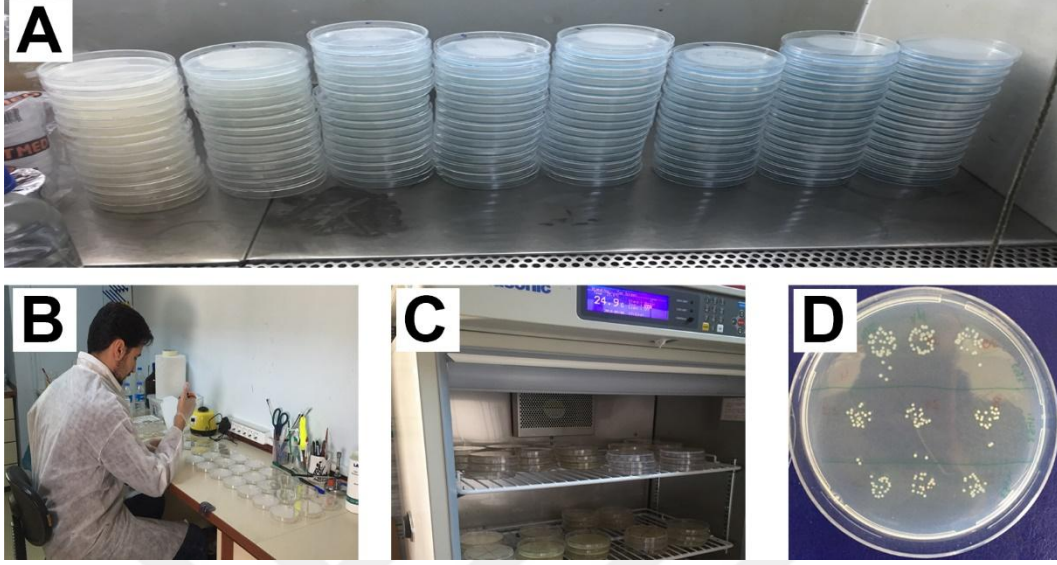
Bu tez çalışmasında *in-vitro* testlerde önce bakteriyel izolatların bakır sülfat'ın farklı doz serilerinde gelişme durumuna bakılmıştır. Bakırın farklı dozlarına tolerans gösteren bakteriyel izolatlar daha sonra farklı bakır formlarını ve formülasyonlarını içeren ticari bakırlı preparatların farklı doz serileriyle *in-vitro* koşullarda test edilmiştir.

##### 3.2.1.1. Bakır Sülfata Karşı Tolerans Düzeyinin Belirlenmesi

KB besi yerinde geliştirilen 48 saatlik bakteri kültürleri final konsantrasyonu 0.1-2.1 mM (Çizelge 3.7; 3.8) arasında hazırlanan Bakır Sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) ilave edilmiş MGY besi yerine ekilmiştir. Bu amaçla ortamlar otoklavda sterilize edilmiş ve  $50^\circ\text{C}$ 'ye soğutulmuş, 100ml MGY besi yerlerine bakırlı preparatlardan oluşan stok çözeltilerden her bir doz serisi için uygun miktarlarda ilave edilerek hazırlanmıştır. İzolatların  $10^7\text{cfu/ml}$  ( $\text{OD}_{600} = 0.047-0.050$ ) yoğunluğunda süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan oluşturulan seyreltme serilerinden  $10^3$ ,  $10^4$  ve  $10^5$  basamaklarından 20  $\mu\text{l}$  alınarak hazırlanan MYG besi ortamına birbirinden eşit uzaklıkta 3 noktaya damlatılarak veya yayılarak ekimler yapılmıştır. Petriler 48-72 saat süreyle  $25^\circ\text{C}$ 'de inkubasyona bırakılmış, inokulasyon noktalarında gelişen bakteriyel koloniler sayılarak bakır sülfatın farklı doz serilerindeki MIC ve bakteriyelerin gelişimini % 50 düzeyinde engelleyen doz ( $\text{LD}_{50}$ ) değerleri saptanmıştır. Her bakır konsantrasyonu ve her bir izolat için koloniler sayıldıktan sonra ortalamalar hesaplanmıştır. Bakteri gelişiminin olmadığı en düşük bakır konsantrasyonunu ise o izolatın MIC değeri olarak kabul edilmiştir. Aynı zamanda, uygulamalardaki gelişen koloniler negatif kontrol grubu ile karşılaştırılacak ve popülasyonu yarıya indiren doz  $\text{LD}_{50}$  değeri olarak belirlenecektir. Yürütülen *in-vitro* çalışmalarda her izolat ve her bir doz serisi için 3 tekerrürlü olarak



gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bakıra tolerans seviyelerinin belirlenmesi amacı ile yürütülen çalışma basamaklarından görüntüler. A: Farklı oranlarda bakır sülfatlı eklenmiş MGY besiyeri, B: Bakterilerin ekim. C: Bakterilerin inkübasyonu. D: 48 saat sonra gelişen koloniler.

### 3.2.1.2. Bakırlı Pestisitlere Karşı Toleransın Belirlenmesi

Bakır sülfata ortamında MIC değeri 0.5 mM ve üzeri olan izolatlar ticari pestisitlerle yürütülen çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 3.2.). Ortam hazırlığı ve bakteri ekimi bölüm 1.3'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Bu test için kullanılan bakır konsantrasyonu değerleri (Çizelge 3.7) ve (Çizelge 3.8) 'de gösterilmiştir. MIC değerleri, bölüm 3.2.1.1.'de belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

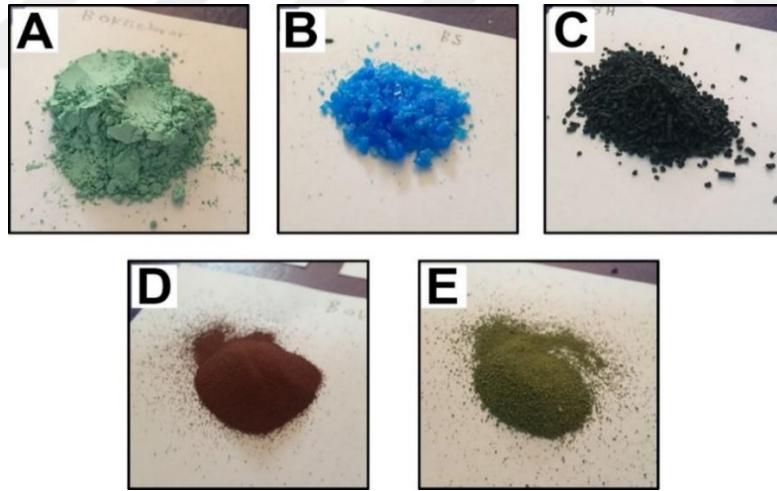
Çizelge 3.7. 50 mM'lık 30 ml'lik stok hazırlamak için her bakır formülünden ihtiyaç duyulan miktar

Bakır türü	Formül	Molar kütlesi (gram/mol)	Bakır konsantrasyonu	Üründen ihtiyaç duyulan miktar (g)
Bakır sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.68	% 100	0.375

(referans bakır)				
Bakır (I) oksit	$\text{Cu}_2\text{O}$	143.09	% 75	0.286
Bakır hidroksit	$\text{Cu}(\text{OH})_2$	97.561	% 53.8	0.272
Bakır oksiklorür	$\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$	213.57	% 50	0.641
Bordo karışımı + Mancozeb	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.68	% 12	3.125

Çizelge 3.8. 50 mM'lık bakır stokundan alınan ve hedef bakır konsantrasyonunu elde etmek için 100 ml MGY ortamına ilave edilen hacmi

İstenen bakır konsantrasyonu (mM)	0	0.1	0.3	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	1.5	2
Bakır stokundan alındığı hacmi (ml)	0	0.2	0.6	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2	3	4



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bakır sülfat ve farklı bakırlı formülasyonlar içeren pestisitlerin görünümü. A: Bakır Oksiklorür. B: Bakır Sülfat. C: Bakır Hidroksit. D: Bakır Oksit. E: Mancozeb ile Bordeaux karışımı

### 3.2.2. Bakır Direnç Genlerinin Moleküler Tanımlanması

#### 3.2.2.1. Total DNA İzolasyonu:

İzolatların bakır toleransının mekanizmasını belirlemek için *copABCDRS* ve *cusABC* sistemlerinin varlığını (Çizelge 3.6)'daki bahsedilen primerler kullanılarak

tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda DNA ekstraksiyonu;  $10^7$  cfu/ml yoğunluğunda ( $OD_{600nm}:0.1$ ) hazırlanan bakteri süspansiyonu 1.5'lik santrifüj tüplerine konularak kuru blok ısıtıcıda 10 dakika süreyle kaynatılmış ve daha sonra kullanılmak üzere  $-20$  °C'de saklanmıştır.

### 3.2.2.2. İlgili Genlerin Belirlenmesi (PCR Çalışmaları)

Çalışmada kullanılan master-mix ve termal cycle koşulları Aiello ve ark. (2015), Lejon ve ark. (2007) ve Nakajima ve ark., (2002)'e belirttiği yöntemlere göre hazırlanmıştır (Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10). PCR ürünlerinin değerlendirilmesi % 1.5'lik agaroz jelde 100 V'ta dejenere CopA ve spesifik CopA için 80 dk, CusA için 45-60 dk koşularak gerçekleştirilmiştir. İlgili genlerin varlığı (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3) belirtilen amplifikasyon boyutlarının jel üzerinde gözlenmesine göre değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.9. Spesifik CopA, dejenere CopA ve CusA primerleri için PCR master mix içeriği

Gerekli Kimyasallar	Başlangıç Stok	Final Konsantrasyon	1 örnek için gerekli miktar
Taq Buffer	10 X	1 X	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.2 µl
dNTP	2.5 mM	0.1 mM	1 µl
Primer	10 mM	0.4 mM	1 µl
Primer	10 mM	0.4 mM	1 µl
Taq Polimeraz	5 U	1 U	0.2 µl
Steril Distile Su (H <sub>2</sub> O)	-	-	13.1 µl
Örnek Nükleik Asit		$10^7$ cfu/ml	5 µl
Toplam Hacim	-	-	25 µl

Çizelge 3.10. Dejenere ve spesifik CopA ve CusA primerler için PCR master mix termal cycle koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95 <sup>0</sup> C	3 dk	1
94 <sup>0</sup> C	30 sn	CopA primerler için 35

CopA primerler için 57 <sup>0</sup> C		CusA primer için 40
CusA primer için 60 <sup>0</sup> C	30 sn	
72 <sup>0</sup> C	1 dk	
72 <sup>0</sup> C	5 dk	1
15 <sup>0</sup> C	∞	-

### 3.2.2.3. Plazmit İzolasyonu

Hedeflenen genlere sahip izolatlar, 100 ml sıvı Nutrient Broth (NB) besi yerinde 24 saat boyunca 120 rpm'de çalkalanarak geliştirilmiştir. Daha sonra, Thermo Scientific (GeneJet Plasmid. Miniprep Kit. # K0503) kiti kullanılarak plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon ürünleri sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 1.5'lik santrifüj tüplerinde, -20° C'de saklanmıştır. PCR ve görüntülenme çalışması, (bölüm 3.2.2.2)'de tarif edildiği gibi gerçekleştirildi.

### 3.2.2.4. Sekans Çalışmaları:

PCR çalışmasında ürünler Agaroz Jelde koşulmuş ve beklenen boyutlardaki bantlar jel ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden elde edilmiştir. Ürünler yeni nesil dizileme tekniği kullanılarak dizileme işleminin yapılması için Sentebiolab Biyoteknolojik (Ankara) firmasına gönderilmiştir.

Yeni Nesil dizileme (New Generation Sequencing) metodu, firma, Miseq (Illumina Co.) cihazı ve Nextera XT kiti kullanarak gerçekleştirmiştir. Sıralama sonuçları Kit v2 300cy kullanılarak düzenlenmiştir. Sonuçlar, Clustal Alignment'ın UGENE ve MEGA programları kullanılarak analiz edilmiş Muscle metodu kullanılarak hizalanmış ve Maximum likelihood yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

### 3.2.3. Demirin Bakır Toleransı Üzerindeki Etkisi:

Demirin bakterilerin tolerans düzeylerine etkisini incelemek için, iki MGY ortamı hazırlanmış; birincisi, (Bölüm 3.2.1.1)'de açıklandığı gibi farklı bakır konsantrasyonları içermiştir. Diğerine ise FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ilave edilmiş, Bölüm 3.2.1.1'de

tarif edildiği gibi hazırlanmıştır. Otoklavlanan besi yeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra bakıra ek olarak ortama 100 mM demir klorür heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ilave edilmiştir. Bakteriler Bölüm 3.2.1.1'de tarif edildiği gibi, bakır ve demir katkılı MGY ortamı üzerinde ve paralelini ise yalnızca bakır katkılı MGY ortamına ekilmiştir. Sonuçlar MIC değerleri hesaplanıp her ortam için karşılaştırarak elde edilmiştir.

### **3.2.4. Bakterilerin Siderofor Üretme Kabiliyeti**

Blue-Cas Agar (Fe-Cas Agar) ortamı, Louden ve ark. (2011), tarafından tarif edildiği gibi hazırlanıp 9 cm'lik bir petri kabına dökülmüştür. İzolatlar KB'de 24-48h geliştirildikten sonra, ine uçlu öze yardımıyla nokta ekim yapılmıştır. Her bir petri kabının 4 ekim ve her izolat için 3 tekrar yapılmıştır. İzolatlar 7 gün boyunca 25°C'de inkübe edilmiş ve sonuçlar cetvel kullanılarak her bir izolat için oluşan sarı renkteki zon bölgesinin çapı ölçülerek alınmıştır.

### **3.2.5. Bakterilerin Chalkophore Üretme Kabiliyeti**

Cu-Cas agar ortamı, Yoon ve ark. (2011), tarafından tarif edildiği gibi hazırlanmış (Çizelge 3.5) ve yukarda (bölüm 3.2.4) belirtilmiş olan yol takip edilmiştir. Bu çalışmadaki tek fark  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'nun yerine, 10 mM'lik bakır klorür dihidrid ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) kullanılmış olmasıdır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İn-Vitro Testler ile Direnç Düzeyinin Belirlenmesi

#### 4.1.1. Bakır Sülfat ile Yapılan Testler

Yirmi dört *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve pv. *morsprunorum* izolat, Türkiye'nin farklı bölgelerinden (Van'dan 17 ve İzmir'den 7) sert çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilmiştir. Tüm isolatlar, referans bakır formu olarak kullanılan Bakır sülfat'ın farklı konsantrasyonlarını (0.1-2.1 mM) içeren MGY ortamlarında MIC (mM) ve LD<sub>50</sub> (mM) değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Bakır sülfatın LD<sub>50</sub> değerleri yönüyle incelendiğinde isolatların % 37'si 0.1-0.6 mM arasında, % 46'sı 0.7-0.9 mM arasında ve % 17'si ise 1.3-1.5 mM arasında olduğu belirlenmiştir. Aynı bakır formunun MIC değerleri yönünden ise isolatların % 42'si 0.5-0.9mM, % 42'si 1-1.1mM ve % 16'si ise 1.7-2 mM arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1; Şekil 4.1).

İzole edilen bölgeye göre, MIC değerlerine bakılacak olursa; Van Gölü Havzasından toplanan isolatlarının % 41'i (7/17 adet) 1 mM, % 47'si (8/17 adet) 1 mM'dan düşük ve % 12'si (2/17 adet) 1 mM'dan yüksek olduğu gözlenmiştir, İzmir isolatlarının ise % 29'u (2/7 adet) 1 mM, % 29'u (2/7 adet) 1 mM'dan düşük ve % 42'si (3/7 adet) 1 mM'dan yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.1).

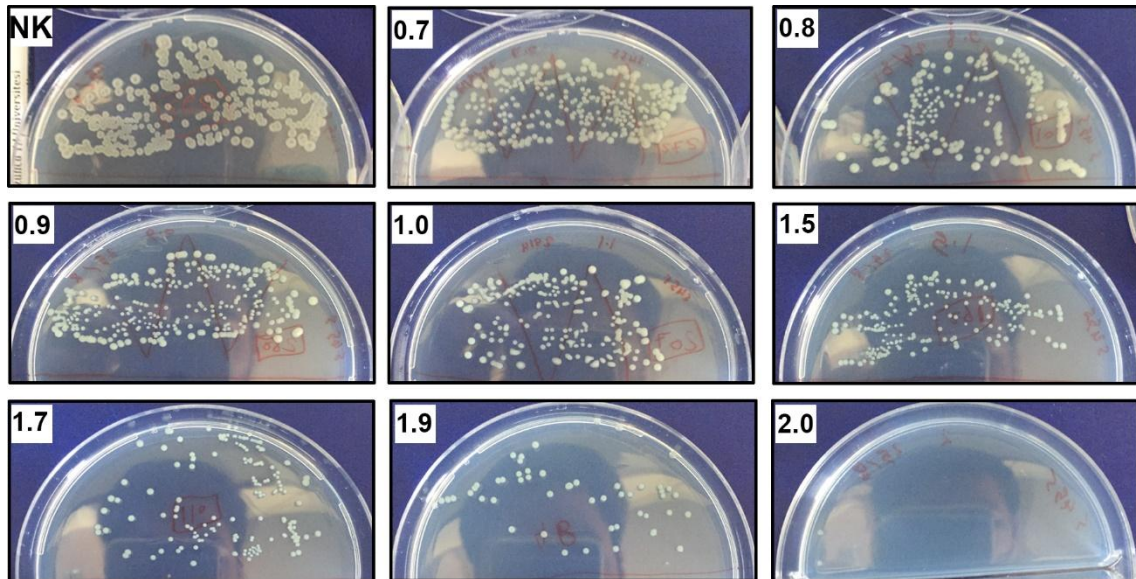
Bakır sülfat çalışmasında MIC değeri 0.5 mM ve daha yüksek olan 21 izolat diğer bakır formları ile de test edilmiştir.

Çizelge 4.1. Bakır sülfat ilave edilmiş MGY besi yerinde geliştirilen bütün isolatların ortalama MIC ve LD<sub>50</sub> (mM) değerleri

İzolat No	izolat adı	MIC ve LD <sub>50</sub> değerleri. (mM)	
		LD <sub>50</sub>	MIC
1	S62S	0.1	0.5
2	S59S1	0.1	0.5
3	S54S2	0.1	0.5
4	S53S	0.1	0.5
5	S59S2	0.6	0.7
6	AL1T3	0.6	0.77

Çizelge 4.1. Bakır sülfat ilave edilmiş MGY besi yerinde geliştirilen bütün izolatların ortalama MIC ve LD<sub>50</sub> (mM) değerleri (Devam)

İzolat No	izolat adı	MIC ve LD <sub>50</sub> değerleri. (mM)	
		LD <sub>50</sub>	MIC
7	S16S	0.6	0.87
8	S65S	0.6	0.9
9	S25M	0.6	0.9
10	Ö3L1	0.7	0.9
11	S61S	0.7	1
12	S50M2	0.7	1
13	S49S	0.7	1
14	S46S	0.7	1
15	S43S	0.8	1
16	S25S	0.8	1
17	S23Y	0.8	1
18	A2L	0.85	1
19	Ö3L2	0.9	1
20	S54S1	0.9	1.1
21	BY5L	1.3	1.7
22	SBYS	1.4	1.7
23	P40/3	1.5	1.9
24	S45S	1.5	2



Şekil 4.1. Farklı bakır sülfat konsantrasyonlarında S45S nolu izolatın 48 saatlik gelişimi. Rakamlar bakır konsantrasyonunu (mM) göstermektedir. NK: Negatif Kontrol.

#### 4.1.2. Farklı Bakır Formülasyonlarına Direnç Düzeyinin Belirlenmesi

MIC değeri 0.5 mM'den yüksek olan 20 izolat bakır hidroksit, bakır oksiklorür, bakır oksit ve bakır sülfat + mancozeb formülasyonlarındaki pestisitlere olan direnç düzeyleri belirlenmiştir. İlgili sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de belirtilmiştir.

Bakır hidroksitin MIC değerlerine bakıldığında; izolatların % 35 (7 adet) 0.3-0.6 mM arasında, % 40'ı (8 adet) 0.7-0.8 mM arasında, % 15'i (3 adet) 0.9-1 mM arasında ve sadece % 10'u (2 adet) 1.1-1.5 mM arasında olduğu gözlenmiştir. Bakır Oksiklorür için MIC değerleri incelendiğinde, izolatların % 80'ı (16 adet) 0.3-0.6 mM arasında ve % 20'si (4 adet) 0.8 mM olduğu belirlenmiştir. Bakır oksit için MIC değerleri; izolatların % 35'i (7 adet) 0.5-0.6 mM arasında, % 45'ü (9 adet) 0.7-0.8 mM arasında ve % 20'si (4 adet) 0.9-1.5 mM arasındadır. Bakır sülfat + Mancozeb ise izolatların en duyarlı olduğu formülasyon olmuş ve seçilen izolatların MIC değerlerinin 0.001-0.003 mM gibi çok düşük düzey aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Bununla birlikte Bakır formları arasında karşılaştırılma yapılacak olursa, Mancozeb karışımından sonra bakır oksiklorür uygulaması olduğu belirlenmiştir. Bu formda izolatların % 80'ninde MIC değerinin 0.3-0.6 mM arasında olduğu ve bu yönüyle en iyi etkiye sahip bakır formülasyonu olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Bakır sülfat ve farklı bakır formları ile formülasyonlar için seçilen izolatların MIC (mM) değerleri

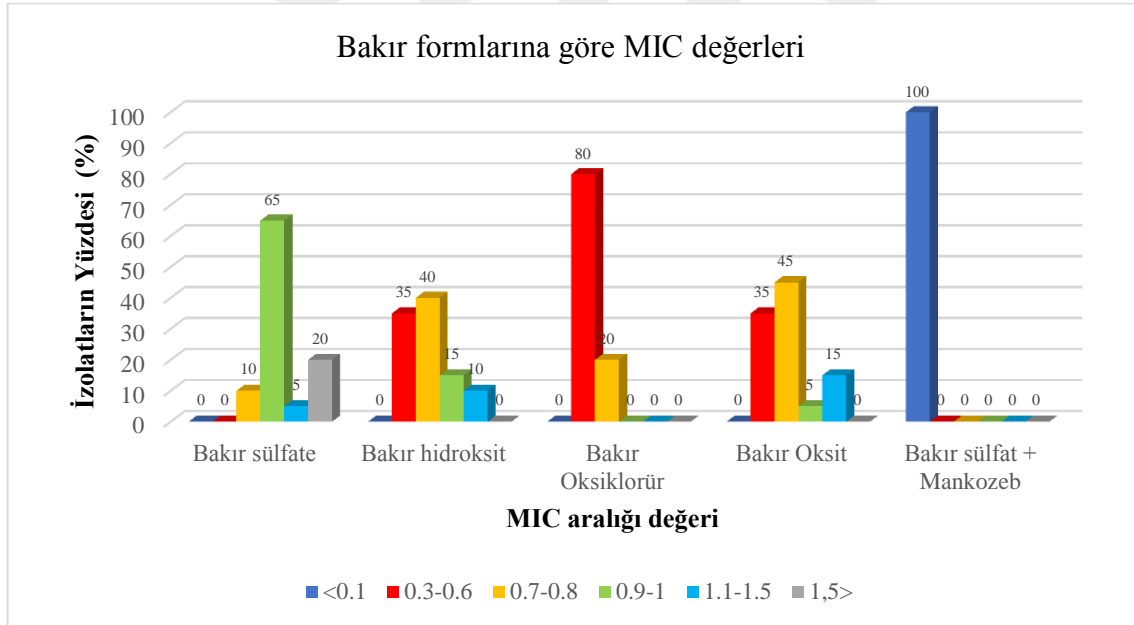
İzolat No	izolat adı	Her bakır formül için MIC değeri (mM)					Bakır sülfat + Mancozeb
		Bakır sülfat	Bakır hidroksit	Bakır Oksiklorür	Bakır Oksit		
5	S59S2	0.7	0.3	0.3	0.5	ND*	
6	AL1T3	0.77	0.3	0.3	0.5	ND	
7	S16S	0.87	0.7	0.5	0.6	ND	
8	S65S	0.9	1	0.6	0.9	ND	
9	S25M	0.9	0.7	0.5	0.6	ND	
10	Ö3L1	0.9	0.3	0.3	0.7	ND	
11	S61S	1	0.6	0.5	0.7	ND	
12	S50M2	1	0.6	0.5	0.5	ND	
13	S49S	1	0.7	0.6	0.8	ND	
14	S46S	1	0.7	0.5	0.7	ND	
15	S43S	1	0.7	0.5	0.7	ND	



Çizelge 4.2. Bakır sülfat ve farklı bakır formları ile formülasyonlar için seçilen izolatların MIC (mM) değerleri (Devam)

İzolat No	izolat adı	Her bakır formül için MIC değeri (mM)					Bakır sülfat + Mancozeb
		Bakır sülfat	Bakır hidroksit	Bakır Oksiklorür	Bakır Oksit		
16	S25S	1	0.7	0.5	0.7	ND	
17	S23Y	1	0.7	0.5	0.6	ND	
18	A2L	1	0.3	0.3	0.5	ND	
19	Ö3L2	1	0.3	0.5	0.7	ND	
20	S54S1	1.1	1.5	0.5	0.8	0.003 - < 0.005	
21	BY5L	1.7	0.9	0.8	1.5	0.003 - < 0.005	
22	SBYS	1.7	1.1	0.8	1.5	0.003 - < 0.005	
23	P40/3	1.9	0.9	0.8	0.8	0.003 - < 0.005	
24	S45S	2	0.8	0.8	1.5	0.003 - < 0.005	

\*ND=Değerlenmemiş



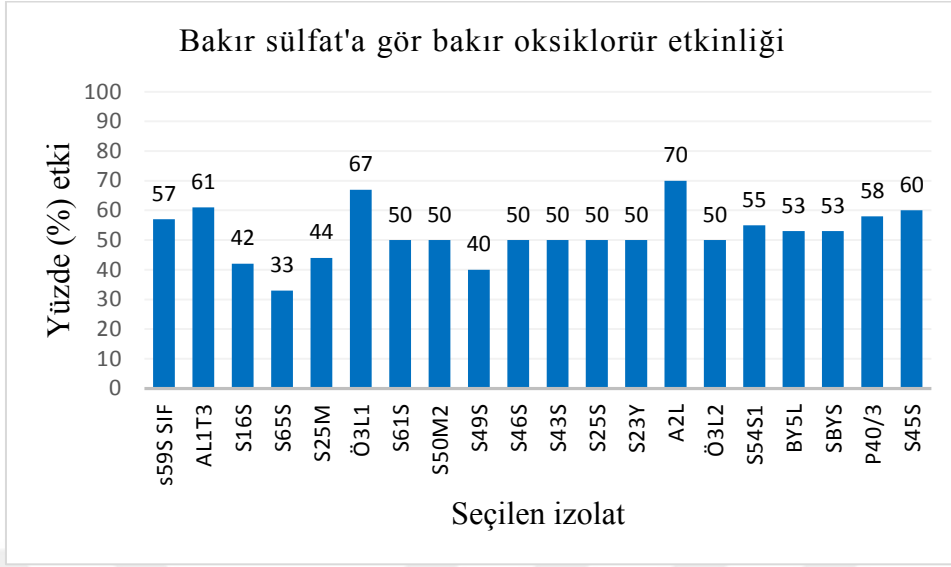
Şekil 4.2. Bakteri izolatları'nın bakır formlarına göre MIC değerlerinin yüzdesel dağılımı.

İzolatların MIC değerlerinin referans bakır formu olan Bakır sülfata göre değerlendirilmiş ve sonuçlar şekil 4.4'te verilmiştir. Buna göre Bakır hidroksit ile bakır sülfatın etkinlikleri karşılaştırıldığında, bakır sülfata karşı bakır hidroksitin etkisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. İzolatların neredeyse yarısına (10 adet) ait MIC değerleri % 19-40 oranında azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte bazı izolatlar, % 47-70 (8 adet) oranında azalma ile bakır hidroksit'e gelişme gösteremediği belirlenmiştir. Ancak, S65S ve S54S1 izolatlarının MIC değerlerinin sırasıyla % 11 ve % 36 düzeyinde arttığı görülmüştür. (Şekil 4.3).



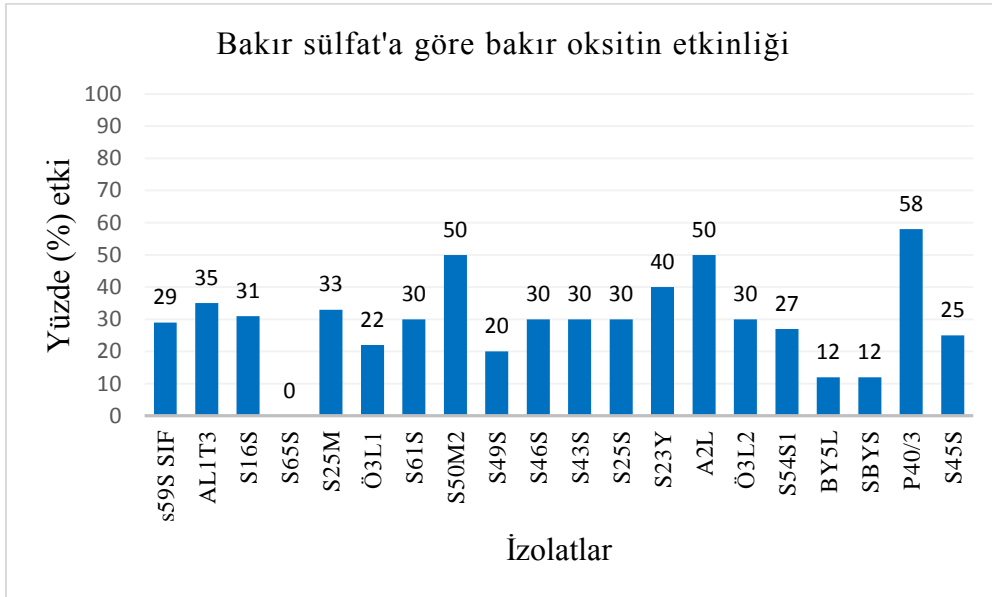
Şekil 4.3. Bakır sülfat ile karşılaştırıldığında, bakır hidroksitin izolatlara etkisi (%).

Bakır sülfat ile bakır oksiklorür karşılaştırıldığında, bakır oksiklorürün etkisi 6 izolatta % 57-70 oranında bir azalma ile bakır sülfata göre etkin olduğu görülmüş ve A2L izolatının en yüksek etkinlik oranına (% 70) sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda 10 izolatta % 50-55 oranında bir azalma olmuştur. Sadece 4 izolatta % 33-44 azalma oranı ile düşük bir etki elde edilmiştir. (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Bakır sülfat ile karşılaştırıldığında, bakır oksiklorür'ün izolatlara etkinlik oranları (%).

Bakır Oksit ile bakır sülfat karşılaştırıldığında, verimlilik oranı 5 izolat için çok düşük (% 0-22) iken, 11 izolat için orta (% 25-35) ve 4 izolat için biraz yüksek (% 40-58) tespit edilmiştir. P40/3 izolatının en yüksek etkinlik oranı (% 58) sahip olduğu gösterilmiştir. (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. Bakır sülfat ile karşılaştırıldığında, bakır oksitin etkinlik oranları (%).

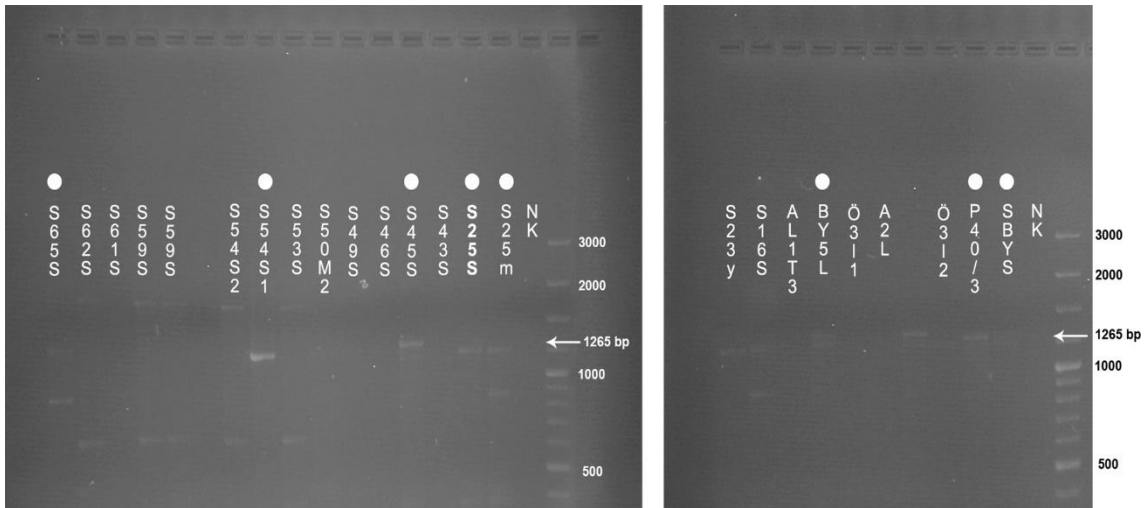
## 4.2. Moleküler Testler

Tüm izolatların için bakırlı ortamlardaki MIC değerleri belirlendikten sonra olası direnç genlerinin belirlenmesi için DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *copA* genini belirlemek için dejenere CopA (F)/CopA (R) primerleri ve spesifik CopA (F)/CopA (R) primerler kullanılmıştır. Ayrıca *cusA* genini bulmak için CusA(F) ve CusA(R) primerleri kullanılarak Bio-PCR çalışması yürütülmüştür.

### 4.2.1. *copA* Geni Bulmak İçin PCR Sonuçlar

#### 4.2.1.1. Dejenere Primer CopA İle PCR Sonuçlar

Tüm izolatlar dejenere primerler kullanılarak *copA* geni tespiti için test edilmiştir. Pozitif sonuçlara sahip izolatlar, spesifik primer ile tekrar test edilmiştir. Fakat, önerilen annealing sıcaklığında (55<sup>0</sup>C) bazı izolatlar için farklı uzunluklarda çoklu veya çift bantlar meydana gelmiştir. Bu nedenle dejenere primer için en uygun annealing sıcaklığını bulmak için farklı sıcaklıklar (55, 56, 57 ve 58 <sup>0</sup>C) ile testler yapılmıştır. Çalışma sonucunda, 57 <sup>0</sup>C ve 5  $\mu$ l DNA konsantrasyonunun en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir. Belirlenen şartlarda dejenere primerler ile yürütülen çalışmalarda S65S, S54S1- S45S, S25S, S25M, P40/3 ve SBYS hedef bölgeye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).

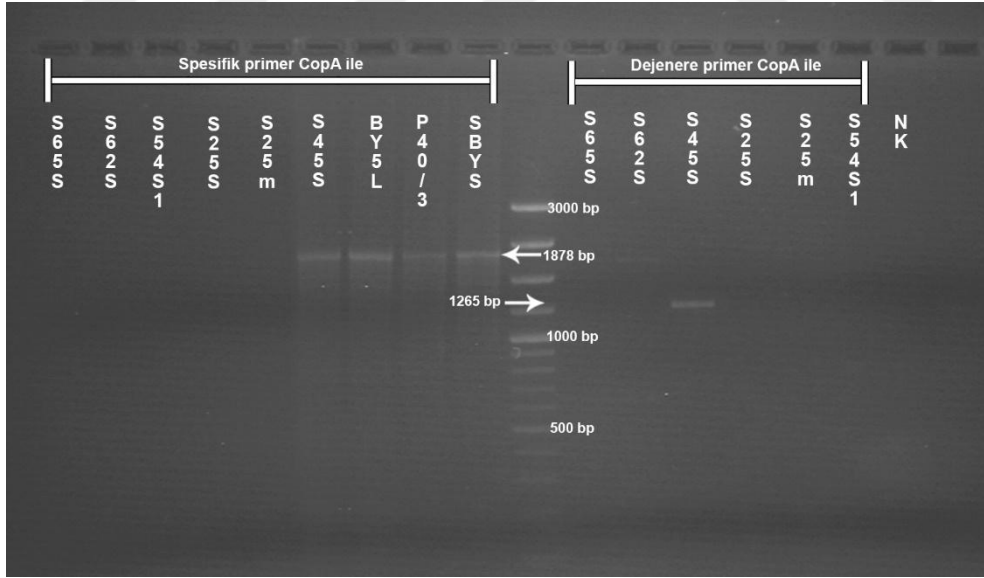


Şekil 4.6. İzolatların dejenere CopA primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüleme sonuçları (Beyaz çemberlerin altındaki izolatlar copA genine sahip izolatlardır.).

#### 4.2.1.2. Spesifik Primer CopA ile PCR Sonuçları

Dejenere primer CopA ile test edilen ve hedeflenen gene (*copA*) sahip olan izolatlar, TS 58 °C olan ve gen hedef uzunluğunun 1878 bp olduğu spesifik primer CopA ile test edilmek için kullanılmıştır. Bir önceki çalışmadan seçilen izolatların hedeflenen gene sahip olduğu görülmüştür. Fakat, bazı izolatların (S65S, S62S, S54S1, S25S ve S25m) çift bantlara sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden daha güvenilir bir sonuç elde etmek için dejenere primer CopA ve spesifik primer CopA ile PCR çalışmaları yenilenmiştir (Şekil 4.7)

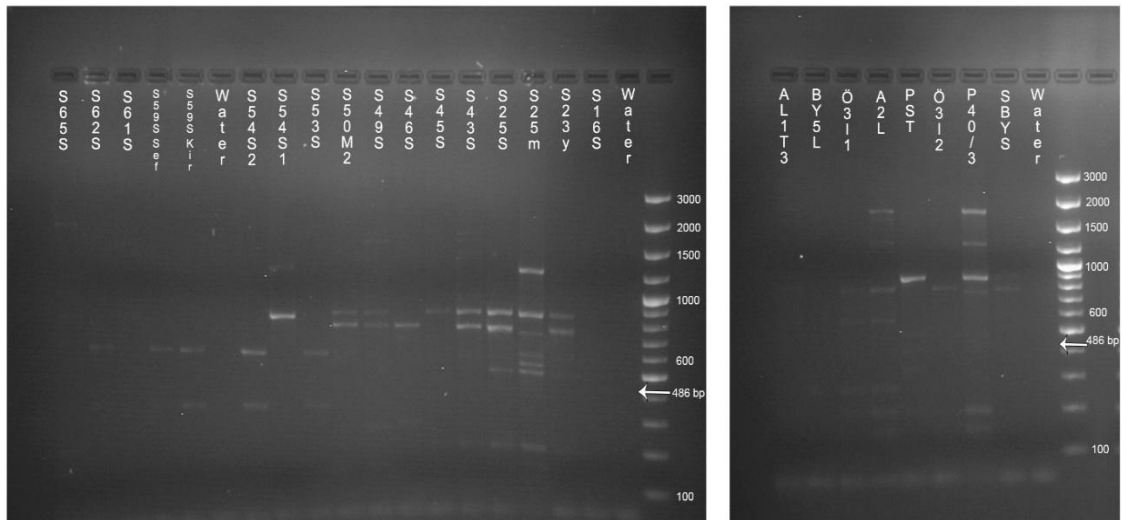
Alıma sonunda dejenere primer çalışmalarından sağlıklı sonuçlar alınmadığı *in-vitro* sonuçlarla karşılaştırılarak karar verilmiştir. Spesifik CopA primerleri ile yapılan sonuçlar *in-vitro* çalışmalar ile de tutarlı bulunmuş ve S45S, BY5L, P40/3 ve SBYS izolatlarının *copA* genine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Dejenere primer ve spesifik primer CopA kullanarak yapılan PCR çalışmasının elektroforez jel görüntüleme sonuçları.

#### 4.2.2. *CusA* Geni Bulmak İçin PCR Sonuçlar

*cusA* geni, hücre dışına ekstra  $Cu^{+2}$  ihraç eden diğer *Cus* genlerinden sorumlu olan genidir. Deneyimizde, *cusA* geninin varlığını incelemek için tüm izolatlarda *CusA* (486 bp) primer kullanılarak PCR çalışması yapılmıştır. Test iki kez tekrarlanmış, fakat hiçbir izolatin *cusA* genine sahip olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *CusA* (486bp) primer kullanılarak yapılan PCR çalışma sonuçları.

#### 4.2.3. Seçilen İzolatlardan Plazmit İzolasyonu:

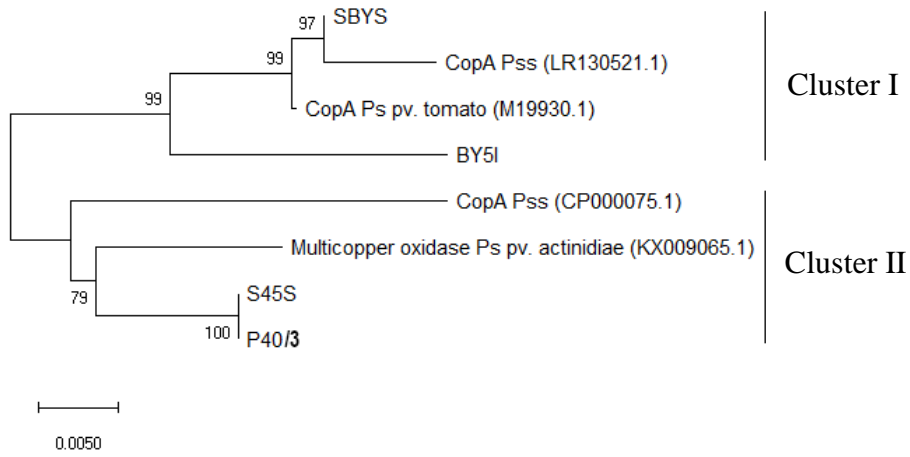
Seçilen S45S, BY5L, P40/3 ve SBYS izolatların plazmitleri izole edildikten sonra, spesifik *copA* genini kullanan tekrar PCR çalışması yapılarak elektroforez jel görüntülemesi yapılmıştır. Test edilen bütün izolatlar da hedeflenen genenin plazmit üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Plazmit üzerinde *copA* geninin tespitine yönelik yapılan PCR çalışmasının jel görüntüleme sonuçları.

#### 4.2.4. Sequencing Sonucu:

Yeni nesil dizi analizi (NGS) yöntemi ile elde edilen diziler MEGA programı kullanılarak filogenetik bir ağaç oluşturulmuş ve Test edilen izolatlar arasındaki benzerlik yüzdesi ve uzaklık değerleri CLC Main Workbench 6.7.1 programı yardımıyla belirlenmiştir. Filogenetik ağaç oluşturma çalışmasında kullanılan aynı türün farklı patovarlara ait DNA dizileri NCBI'dan elde edilmiştir. Filogenetik ağaçta, iki cluster olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6). Cluster I'de İzmir izolatları SBYS ve BY5L'yi içerdiği ve bu iki izolatın benzerlik oranının % 96.17 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). Cluster II' de ise Van izolatı ile S45S ve İzmir izolatı P40/3'ü kapsadığı gözlenmiş ve % 99.78 oranında benzedikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Referan izolatlarara göre değerlendirildiğinde ise patovarlara göre gruplanmanın oluşmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.10. *copA* gen sekanslarından oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç, Neighborjoining yöntemiyle 3000 bootstrap yapılarak elde edilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>P40/3</b>	1	0,00	0,03	0,04	0,05	0,05	0,10	0,06
<b>S45S</b>	2	99,78	0,03	0,04	0,05	0,05	0,09	0,06
KX009065.1	3	96,89	96,83	0,04	0,05	0,05	0,10	0,07
CP000075.1	4	96,38	96,27	95,83	0,07	0,06	0,11	0,07
M199000.1	5	95,22	95,33	95,00	93,59	0,01	0,07	0,04
<b>SBYS</b>	6	95,47	95,58	95,26	93,84	99,40	0,06	0,04
LR130521.1	7	90,93	91,15	90,72	89,52	93,62	94,19	0,08
<b>BY5L</b>	8	94,26	94,37	93,61	93,01	96,02	96,17	92,40

Şekil 4.11. İzolatlardaki *copA* geninin birbirlerine ve referanslara göre benzerlik yüzdesi ve uzaklık değerleri (CLC Main Workbench 6.7.1). Kalın yazılmış izolatlar, bu çalışmada kullanılan izolatları göstermektedir.



### 4.3. Demirin Bakır Toleransına Etkisi

#### 4.3.1. Demir Klorür Heksahidrat ile Yapılan Testler:

Çalışmanın bu bölümünde  $Fe^{+2}$ 'nin bakırsız-MGY'ye ve bakırlı-MGY ortamına eklenmesinin etkisi incelenmiştir. İki MGY ortamı üzerinde geliştirilen bütün izolatların MIC değerlerini Çizelge 4.2 'te gösterildiği gibidir.

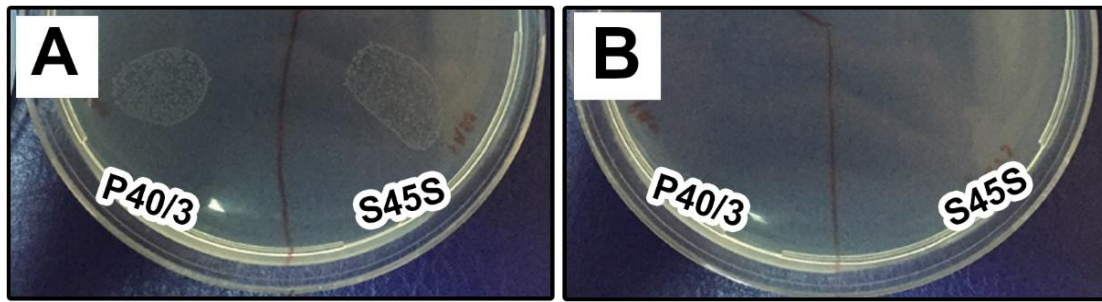
$Fe^{+2}+CuSo_4$  ilave edilmiş ortamda yetişen izolatların bakıra toleransı, sadece  $Cu^{+2}$  ilave edilmiş ortamda geliştirilen izolatlardan daha düşük MIC değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Demir ilavesinin bakır toleransı üzerine etki oranı Çizelge 4.7'de verilmiştir ve sonuçların direnç veya tolerans seviyesine göre değiştiği gözlenmiştir. Toleransın yüksek olduğu izolatlarda etkinin düşük olduğu, örneğin 1.7mM MIC değerine sahip olan izolatlarda (SBYS izolatu hariç) etkinin % 12-15 arasında değiştiği gözlenmiştir. Diğer taraftan MIC değeri 0.5 mM olan izolatların direnci ortadan kalkmış ve % 100 etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.12).

Çizelge 4.3. Bakır ile MGY ortamında gelişen tüm izolatların MIC değerleri ve bakır ve demir ile MGY'de MIC değerleri ve aralarındaki verim oranları

İzolat no	izolat adı	MIC değeri (mM)		% Etki
		Sadece bakır	Bakır + demir	
1	S62S	0.5	0	100
2	S59S KIR	0.5	0	100
3	S54S2	0.5	0	100
4	S53S	0.5	0	100
5	S59S SIF	0.7	0	100
6	AL1T3	0.77	0.5	35
7	S16S	0.87	0.6	31
8	S65S	0.9	0.7	22
9	S25M	0.9	0.7	22
10	Ö3L1	0.9	0.7	22
11	S61S	1	0.7	30
12	S50M2	1	0.7	30
13	S49S	1	0.8	20
14	S46S	1	0.8	20
15	S43S	1	0.7	30
16	S25S	1	0.7	30
17	S23Y	1	0.7	30

Çizelge 4.3. Bakır ile MGY ortamında gelişen tüm izolatların MIC değerleri ve bakır ve demir ile MGY'de MIC değerleri ve aralarındaki verim oranları (devam)

İzolat no	izolat adı	MIC değeri (mM)		% Etki
		Sadece bakır	Bakır + demir	
18	A2L	1	0.8	20
19	Ö3L2	1	0.8	20
20	S54S1	1.1	0.8	27
21	BY5L	1.7	1.5	12
22	SBYS	1.7	1.3	23
23	P40/3	1.9	1.7	11
24	S45S	2	1.7	15



Şekil 4.12. MGY ortamı üzerinde 1.7 mM bakır konsantrasyonunda büyüyen S45S ve P40/3 izolatları; A: Demir ilavesiz. B: Demir ilaveli.

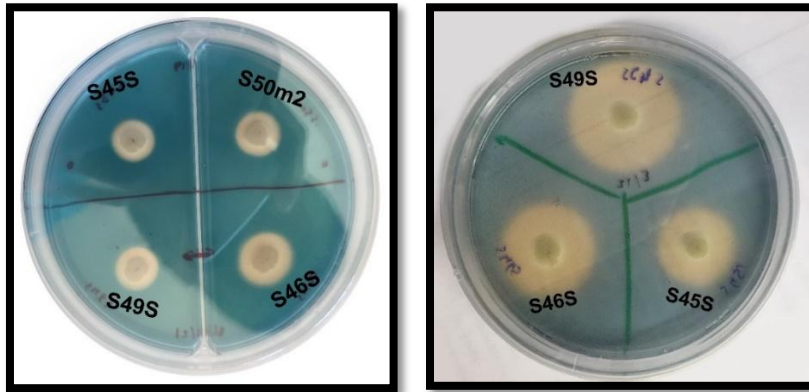
#### 4.3.2. İzolatların Siderofor ve Chalkophore Üretme Yeteneği

İzolatların siderofor veya çalkofor üretme kabiliyeti ile bakır direnci arasında bir ilişki olup olmadığını bulmak için, izolatlar Cu CAS-Agar ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve Fe CAS-Agar üzerinde gelişimleri izlenmiştir (Çizelge 4.4) (Şekil 4.13). MIC değeri 0.5-1mM, 1-1.1mM ve 1.7-2 mM aralığında olan izolatlar gruplandırıldığında sırasıyla siderofor üretim zonu: 3, 2.4 ve 2.2 mm, chalkophore üretimi için ise 7.7, 9.5 ve 8.3 mM olduğu belirlenmiştir. Tespit ettiğimiz üzere 1.7mM ve üzerindeki MIC değerlerine sahip izolatların konjugatif plazmit üzerinde bulunan direnç genlerine sahip olduğu tarafımızdan belirlenmiştir. Bu nedenle bu grup göz ardı edildiğinde chalkophore üretimi attıkça direnç düzeyinin arttığı görülmektedir. Belirtilen guruplar arasında yapılan t testi ile MIC değeri ile chalkophore üretimi arasında istatistiki olarak önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Yedinci günde test edilen tüm izolatlar için Cu-Cas agar ve Fe-Cas agar besiyerinde oluşturulan sarı bölge çapı (mm) ve önceki *in-vitro* çalışmalar ile elde edilen izolatlara ait MIC değerleri (mM)

İzolot adı	Oluşturulan sarı bölge uzunluğu (mm)		MIC değeri (mM)	Sarı bölge uzunluğunun ortalaması	
	Cu-Cas Agar	Fe-Cas Agar		Cu-Cas Agar	Fe-Cas Agar
S62S	9.5	3.4	0.5		
S59S KIR	6.2	3.7	0.5		
S54S2	7.5	3.75	0.5		
S53S	7.5	2.6	0.5		
S59S SIF	5.5	2.8	0.7	7.7 ± 0.6 (p:0,047)	3.0 ± 0.1 (p:0,046)
AL1T3	7.8	1.7	0.77		
S16S	10.7	4	0.87		
S65S	5	3.4	0.9		
S25M	9.2	2.3	0.9		
Ö3L1	8	2.2	0.9		
S61S	11.7	2.9	1		
S50M2	10.2	2.3	1		
S49S	11.5	2.7	1		
S46S	9.7	3	1	9.5 ± 0.6 (p:0,047)	2.4 ± 0.2 (p:0,046)
S43S	10.3	2.2	1		
S25S	9.5	2.4	1		
S23Y	9.7	2.3	1		
A2L	9.2	2.3	1		
Ö3L2	7.8	2.1	1		
S54S1	5	1.9	1.1		
BY5L	7.8	2.1	1.7		
SBYS	10	2.6	1.7	8.3	2.2
P40/3	7.2	2	1.9		
S45S	8	2	2		

\* Ortalamalar arasındaki fark  $p < 0.05$ 'e göre önemsizdir.



Şekil 4.13. Cu-Cas Agar (solda) ve Fe-Cas Agar'da (sağda) bazı izolatlar tarafından 7. Gün sonunda oluşturulan sarı bölge.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*P. syringae* pv. *syringae* ve *P.s.* pv. *morsprunorum*'un neden olduğu bakteriyel kanser hastalığı, yalnızca Türkiye'de değil, tüm dünyada sert çekirdekli bitkileri etkileyen önemli bakteriyel hastalıklardan biridir (Bultreys ve Kaluzna., 2010). Bu hastalığı kontrol etmek için 100 yıldan daha uzun süredir bakır ve bakırlı preparatlar kullanılmaktadır ve buda patojenin direnç gelişimine veya dirençli popülasyonların yaygınlaşmasına neden olmuştur (Marco, 1983; Bender ve Cooksey 1985; Sundin, 1989). Birçok araştırmacı bakırın uzun süre sıkça kullanıldığı alanlarda direncin varlığını tespit etmiştir (Cooksey ve ark., 1989; Aiello et al., 2015) Bu tezde; Türkiye'de iki farklı bölge, Van Gölü Havzası ve İzmir ili ve civarından sert çekirdekli meyvelerden izole edilen *Pss* ve *Psm* strainlerinin bakır direncinin varlığı ve düzeylerinin belirlenmesi ile mekanizmasının ortaya konması amaçlanmıştır.

*In-vitro* testlerin ilk aşamasında, bakteriler farklı konsantrasyonlarda (0.1-2 mM) bakır sülfat içeren MGY besi ortamında geliştirilerek direnç düzeyleri belirlenmiştir. Bakır sülfatın referans bakır olarak seçilmesinin ana nedenleri; 1882'de Millardet tarafından üretilen Bordo bulamacı karışımının keşfetmesinden buyan bakteriyel hastalıkların çoğunu kontrol eden ilk ve en çok kullanılan bakterisit olmasınınadır. Bunun ile birlikte bakır sülfatın bakır hidroksit, bakır oksiklorür veya amonyaklı bakır sülfattan daha etkili olduğu gösterilmiştir (Burr ve Norelli, 1984; Paulin ve Lachaud, 1984).

Araştırmamızdaki Bakır direnç seviyesini belirten MIC değerinin izolatlar arasında farklılık gösterdiği ve en yüksek MIC değeri grubunun 1.7 ile 2 mM arasında değiştigi gözlenmiştir. Fakat Malik ve Jaiswal (2000), metallere dirençli veya metale duyarlı bakterilerini ayırt etmek için kullanılabilecek hali hazırda kabul edilebilir metal iyon konsantrasyonlarının olmadığı belirtmiş. Benzer yönde yapılan çalışmalarda da MIC değerlerinin farklılık gösterdiği ve elde ettiğimiz değerlerin üstünde veya altında olduğu tespit edilmiştir. Aiello ve ark. (2015), test edilen *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarının en yüksek MIC değeri grubu 2.6-3.2 mM arasında olduğunu belirtmiştir. Başka bir çalışmada *P. syringae* pv. *syringae* MIC değerinin 1.8 mM olduğu en yüksek direnç seviyesi olarak belirlenmiştir (Gutiérrez ve ark., 2013).

Ülkemizde farklı bölgelerde yapılan çalışmalar ile bakteriyel bitki patojenlerinin direnç düzeyleri belirlenmiştir. Eğerci (2015), tarafından yapılan çalışma, test edilen farklı bakteri türleri arasındaki en yüksek MIC değerinin 2 mM olduğunu ve test edilen bakteri türleri arasında *Pss* suşlarının en yüksek MIC değerlerine sahip olduğunu belirlemiştir. Ayrıca, Benlioğlu. (1998), çalışmalarında, test edilen *Pst*'in bakır sülfata karşı en yüksek MIC değeri, çalışmalarında yüksek direnç oranı olarak kabul edilen 2.8mM' olduğu ortaya konmuş ve bu sonuç, Cooksey. (1990), tarafından elde edilen sonuçlara benzer olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada; ayrıca farklı form ve formülasyonlardaki bakırlı preparatlar *Ps* patovarlarına karşı denenmiş ve her bakır formu için izolatlar arasında farklı düzeylerde direnç olduğu gözlenmiştir. Benzer yönde yapılan bir çalışmada bakır sülfatın, bakır hidroksit, bakır oksiklorür ve amonyaklı bakır sülfattan daha etkili olduğu belirlenmiştir (Burr ve Norelli; 1984; Paulin ve Lachaud,1984), Fakat çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu çalışmalar ile uyuşmamakta ve kullandığımız tüm bakır formlarının bakır sülfattan daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Bu durum çalışmamızda referans olarak mineral haldeki  $CuSO_4$  kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Çalışmalardaki diğer formdaki bakırların pestisit formülasyonlarının kullanması etkinlikleri daha yüksek olmasına neden olmuş olabilir. Ayrıca, Özaktan ve ark. (1991), test edilen ürünler arasındaki çözünürlük farkıyla da ilgili olabileceğini belirtilmiştir. Eğerci. (2015), farklı form ve formülasyonlarda yaptığı çalışmada mineral haldeki  $CuSO_4$ 'ın etkisinin sıvı formdaki pestisit formülasyonundaki  $CuSO_4$ 'tan daha düşük olduğunu belirlemiştir. Bu bulguda çalışmamızda  $CuSO_4$ 'ın etkinliğinin neden düşük olduğunu açıklamaktadır.

Ayrıca, Mancozeb ile kullanılan Bordeaux karışımı (bakır sülfat bileşenlerinden biri) çalışmamızda en iyi sonucu veren uygulama olduğu belirlenmişti. Benzer bulgular Conlin ve Mc Carter, (1983) *P. syringae* pv. *tomato* ile yürüttükleri çalışmada da elde edilmiştir. Ayrıca, Scheck ve Pscheidt. (1998), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'e karşı, mancozeb'li bakırlı ürünleri kullandıklarında, sonuçların tek başına bakır uygulamalarından daha başarılı olduğunu göstermiştir. Her iki çalışmada da yüksek etkinin Mancozeb'ten kaynaklandığı vurgulanmıştır. Benlioğlu ve ark. (1998), etilen bisdithiocarbamate (maneb veya mancozeb) grubu fungusitlerinin *Pst*'yi kontrol etmede daha başarılı olduğunu belirlemişlerdir. Bakırlı pestisitler ile birlikte mancozeb karışımlarının artan toksisitesinin, dithiocarbamate anyonunun bakır şelatı olarak

hareket ettiği ve  $\text{Cu}^{2+}$ 'in bakteri hücresi içindeki bakıra duyarlı bölgelere taşıma kabiliyeti ile ilişkili olduğu açıklanmıştır (Medhekar, ve Boparai, 1981). Diğer taraftan, Etilen-bisdithiokarbamat içeren fungusitlerin bakır ile birlikte kullanıldığında, bakırın organik bitki materyalleri ile kompleks yapılar oluşturmasını engelleyen şelat formu oluşturabileceğini belirtilmiştir (Cooksey, 1990; Benlioğlu ve ark. 1998). Bu da bakırın bakterilere daha kolay ulaşmasını sağlamanın yanı sıra daha uzun süre etkili olmasına da neden olabileceğini belirtilmiştir. Fakat, carbamat-bakır kompleksinden bakteriler tarafından toksik bakır iyonlarının nasıl alındığı açık değildir (Cooksey, 1990).

Çalışmamızda *Pss* ve *Psm*'e karşı en başarılı formülasyonun Bordeaux karışım ile mancozeb kombinasyonunun olduğu gözlenmiştir. Fakat en etkili bakır formun ise sırasıyla bakır oksiklorür, bakır hidroksit ve bakır oksit'in olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra bakır hidroksit uygulaması iki *Pss* izolat üzerine  $\text{CuSO}_4$  uygulamasından daha az etkili olduğu belirlenmiştir. Bu sıralama çalışmalarda kullanılan formülasyonlara göre farklılık gösterebilir. Örneğin, Eğerci. (2015), çalışmasında bu sıralamayı MIC değerine göre; bakır sülfat, bakır oksit, bakır oksiklorür ve bakır hidroksit'in olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak Benlioğlu, (1998) çalışmalarında, inhibisyon bölgesine göre *Pst* suşlarında sıralamanın; Bakır oksiklorür, bakır hidroksit ve bakır oksit'in olduğu belirlemiştir.

Çalışmamızda, bakır direnc seviyesi test edilen izolatlar arasında farklılık göstermiştir. Ayrıca direncin görülme sıklığının izolatların izole edildiği bölgelere göre değişimi belirlenmiştir. Öyleki İzmir bölgesinde elde edilen izolatların en düşük MIC değerleri 0.77mM ve 0.9 mM (yanlızca iki izolat) iken diğer izolatların 1mM ve daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık Van Gölü Havzasından elde edilen izolatların yalnızca bir tanesi (S45S) 1 mM değerinin üzerinde bulunmuştur. Bu durum yüksek oranda ve düzenli olarak bakır uygulamaları ve bakırın birikmesi sonucu seçim basıncının artmasına neden olabilir, buda dirençli izolatların popülasyondaki oranının artmasını sağlayabilir (Burr ve Norelli., 1984, Paulin ve Lachaud 1984). Güncel veriler ışığında iki bölge arasında pestisit kullanımı önemli düzeyde farklılık göstermektedir. Öyleki Kaymak ve ark. (2015) Ege bölgesindeki pestisit kullanım oranının % 17 düzeyinde iken, Van Gölü Havzasında bu oranın %1'e kadar düştüğünü bildirmiştir. (Kaymak ve ark. 2015). Ayrıca Çevre ve Şehircilik Bakanlığı verilerine göre Van ili ve civarı pestisit kullanımı bakımından en alt seviye olan 5. Grupta yer alırken, İzmir 2.

grupta yer almaktadır (Anonim 2017). Bu da İzmir bölgesinden elde edilen izolatlarda genel olarak Van Gölü Havzasından direnç bakımından daha yüksek bir profil çizmesini açıklayabilir.

Benzer yönde yapılan araştırmalarda, Japonya'daki kivi meyve bahçelerinden 1984 yılında izole edilen *Ps pv actinidiae* (*Psa*) izolatlarının bakır sülfata direncinin 0.75 mM düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Bunu takiben 1987 ve 1988 yıllarında aynı bölgeden fakat bakırın rutin olarak uygulandığı meyve bahçelerinden elde edilen bazı izolatların, 2.25-3.0 mM arasında MIC değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir (Nakajima et al., 2002). Ayrıca, Cazorla ve ark. (2002)'nin çalışmalarında (MIC: 0.8-2.0 mM) *Pss*'in bakır direnç suşlarının varlığının, Mango bahçelerinde Bordeaux karışımının sürekli olarak uygulanmasından kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Petriccione ve ark. (2017), çalışmasında, kivi bahçelerinde *Psa*'nın bakır direnç 1.8-3.8 Mm düzeyine ulaştığını ve bunun bakır bileşiklerinin yoğun şekilde uygulandığı bölgelerde meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Fakat yüksek ve sürekli pestisit uygulanmasına rağmen duyarlı suşlar popülasyonda görülebilmektedir. İzmir bölgesinde yüksek oranda pestisit kullanılmasına rağmen direncin yaygınlığı % 43 oranında (7/3) olduğu görülmüştür. Cazorla ve ark. (2002), bu durumu, duyarlı suşların bakterisitler uygulamalarının erişmediği bölgelerde bulunmaları hayatta kalma şanslarını arttırabileceğini belirtmiş ve popülasyonlardaki duyarlı suşların varlığının açıklanması olarak öne sürülmüştür (Cazorla ve ark., 2002). Çalışmamızda Van Gölü Havzasından izole edilen patojenler arasında yalnızca S45S izolatı 2 mM düzeltinde bakır direncine sahip olduğunu görülmüştür. Düşük düzeyde pestisit girdisine sahip olan Van Gölü Havzasında dirençli suşların varlığı ve yaygınlığı çok düşük düzeyde kalmıştır. Bu durum Burr ve Norelli, (1984), Paulin ve Lachaud. (1984),'nin belirttiği gibi yüksek pestisit direnci olmamasından dolayı duyarlı suşların popülasyonda ağırlıklarının devam etmesi olarak açıklanabilir.

Bakterilerde bakır direnci mekanizmalarını anlamak amacıyla bu mekanizmalardan sorumlu genler ve faaliyetleri araştırılmıştır. *E.coli*'de *PcoABCDRSE* sistemi ilk defa keşfedildikten sonra (Tetaz ve luke, 1983), bu sisteme *P.syringae* de bulunan homologu *copABCDRS* olarak adlandırılmıştır (Cha ve Cooksey, 1991). Tezimiz çerçevesinde öncelikli olarak izolatlardaki *copA* genine odaklanılmıştır. Çünkü

PcoA ve PcoC, *E. coli*'deki bakır direnci *pco* sistemi için kritik bir protein üretmektedirler (Bondarczuk ve Piotrowska-Seget, 2013). Argüello ve ark. (2013), ise kısmi Cu<sup>+</sup> direnci sağlamak için *copA* ve *copB* genlerinin gerekli olduğunu, tam direnç için ise *copC* ve *copD* genlerinin varlığına ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir.

Çalışmamızda *copA* genini yalnızca MIC değeri 1.7 mM ve üzeri olan izolatlarda tespit edilmiştir. Nakajima ve ark. (2002), *copA* geninin varlığını MIC değeri 1.5 mM ve daha yüksek olan izolatlarda tespit ettikleri fakat düşük MIC değeri (0.75 mM) olan izolatlarda tespit etmedikleri çalışmalar ile de uyumludur. Başka bir çalışmada, *copA* geni, bakırla kirlenmiş tarımsal topraklardan izole edilen suşlarda tespit edilirken, bakır içeriği düşük olan topraklarda bulunmamıştır (Altimira ve ark., 2012).

Bakteriyel hücreler, copRS düzeyici tarafından kodlanan iki bileşenli sinyal iletim sistemleri aracılığıyla yüksek Cu<sup>+</sup> konsantrasyonlarına tepki vermektedir. Ortamdaki bakır seviyeleri arttıkça, copS'in ürettiği kinazlar ve bunların benzer gruplarının düzenleyicileri olan copR'yi aktive etmektedir. Böylece copR dönüşümü ile Cop grubunun aktivasyonu sağlanmış olmaktadır (Mills ve ark., 1994; Argüello ve ark., 2013; Bondarczuk ve Piotrowska-Seget., 2013). copRS hem duyarlı hem de dirençli izolatlarda bulunabilir ve hücre bakır alım ve dengelenmesinde rol oynamaktadır (Mills ve ark., 1994). Fakat ek olarak, bazı çalışmalar, bakır dirençli suşların *copA* genine sahip olmasına rağmen, hassas olmayanlar ise bu genden yoksun oluşlarına bağlamıştır (Cazorla ve ark., 2002; Lejon ve ark., 2007; Petriccione ve ark., 2017).

Farklı çalışmalar *copA* geninin; 35kb büyüklüğündeki pPT23D, 70.5 kb büyüklüğündeki pPaCu1, 62 kb büyüklüğündeki pPT23A-like ve 62 kb büyüklüğündeki pPs0081 plazmitler üzerinde bulunduğu belirlenmiştir (Cooksey, 1988; Nakajima ve ark., 2002; Cazorla et al., 2002; Gutiérrez et al., 2013). Bahsi geçen plazmitlerin konjugatif oldukları ve diğer bakterilere aktarılabilirliği tespit edilmiştir (Cooksey, 1988; Nakajima ve ark., 2002; Cazorla et al., 2002; Gutiérrez et al., 2013). Çalışmamızda, 4 izolatın hepsin de belirlenen *copA* genlerinin plazmit üzerinde olduğu tespit edilmiştir. İlginçtir ki, Nakajima ve ark., (2002), plazmit üzerinde *copA* genini olmasına karşın, *copRS* geninin bulunmadığı fakat direncin gözlemlendiği izolatların varlığını tespit etmiştir. Bu durumu ise ilgili düzenleyici genlerin (*copRS*) kromozomlar üzerinde olabileceğini belirlemiştir. Böylece direnç oluşumundan sorumlu genler konjugatif plazmitler üzerinde olduğu, fakat bazı düzenleyici genlerin ana kromozom üzerinde de



bulunabileceğini görülmektedir. Ayrıca, aynı çalışmada, Pa429 suşunun bakır direncinden sorumlu *copA* geni, Tn5 aktarılarak etkisizleştirilmiş ve bakır sülfata karşı MIC değerinin 2.75'den 0.75 mM'ye düştüğü gözlenmiştir.

Bakır toleransında büyük rol oynayan diğer bir önemli sistem, CusSR regülatörleri tarafından düzenlenen CusC(F)BA efflux (dışa akış) sistemidir (Argüello ve ark., (2013). Franke ve ark. (2003), tüm *Cus* yapısal genleri tam bakır direnci için gerekli olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte, CusC(F)BA bakır efflux kompleksinin merkezi pompası olan *cusA* proteini, *cus* aracılı bakır direnci için en önemli birimlerden biri olduğunu belirtilmiştir. Ayrıca,  $\gamma$ -protobacteria sınıfı (*Pss* ve *Psm* içeren sınıf) arasında, *CusA/CusC* çifti, efflux sisteminin birleştirmek için gerekli olduğu görünmektedir, çünkü *CusB* bu sınıfın çoğu üyesinde bulunmadığı görülmüştür. *CusB*, *CusA-CusC* kanalının oluşumu için yardımcı protein olabilir veya diğer RND komplekslerinden gelen homolog proteinler bu işlevi yerine getirebilir (Hernández-Montes ve ark., 2012). Çalışmamızda *cusA* geninin varlığı, test edilen hiçbir izolatta tespit edilmemiştir. Aiello ve ark. (2015), bu geni çalışmalarında yalnızca 2.8 ve 3.2mM arasında dirence sahip olan suşlarda belirlemiştir. Birden fazla çalışmada *CusCBA*'nın yalnızca bakır uygulamalarının çok yüksek olduğu veya bakır kirliliği yüksek olan bölgelerde bulunduğu tespit edilmiştir (Besaur ve ark., 2013; Gutiérrez-Barranquero ve ark., 2013; Aiello ve ark., 2015). Bu araştırmaların bulguları çalışmamızda kullandığımız izolatların hiçbirinin 2mM'ün üzerinde direnç göstermemiş olmasını ve bu genin tespit edilemeyişi açıklamaktadır.

*copA* geninin bakteri türleri veya tür içinde çok korunaklı (stabil) olduğu birçok araştırma ile ortaya konmuştur (Altimira ve ark., 2012; Besaur ve ark., 2013). Çalışmamızda dizi analizleri sonuçlarına göre yapılan dendogramda bu durum gözlenmektedir. *Ps* patovarları arasında bir fark olmadığı ve izolatların farklı gruplar içinde yer aldığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan *copA* geninin evrildiği veya bulunduğu ortam koşullarından etkilendiği görülmektedir. Kullandığımız izolatların ikisi farklı clusterlarda yer aldığı görülmektedir. Lejon ve ark. (2007); Altimira ve ark. (2012) ve Besaur ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *copA* genleri bulunduğu ortamdan etkilendiği ve evrildiğini belirtmiştir. Çalışmamızda Van Gölü Havzasından izole edilen S45S izolatının *copA* geni bakımından çok yüksek düzeyde (% 99.7) İzmir izolatı P40/3 ile benzer ve aynı grupta yer aldığı belirlenmiştir. Bu da her iki izolattaki bu genin

benzer veya aynı bölgede evrilmiş olduğu kanısını oluşturmuştur. Bu durum fide veya üretim materyali taşınım sırasında izolatin dışarıdan Van Gölü Havzaya gelebileceği fikrini doğurmuştur. Bölgeye sert çekirdekli fidan girişinin bir kısmının ege bölgesinden olduğu düşünüldüğünde bu ihtimal daha güçlü bir hal almaktadır.

Bakterilerde bakır direnci, büyüme ortamındaki demirin mevcudiyeti ve bakterilerin siderofor ve/veya chalkophore üretme kabiliyeti gibi başka faktörlerden de etkilenebilir (Yoon., 2010; Yoon et al., 2011; Argüello et al., 2013; Patel et al., 2018). Teitzel ve ark. (2006), yüksek düzeyde bakır ( $Cu^{+2}$ ) varlığında geliştirilen *P. aeruginosa*'ın metal iyon şelatı siderofor pyochelin'in taşınmasını kodlayan genlerin aşağı yönde regüle edilerken, başka bir siderofor olan pyoverdin'in üretimini kodlayan genlerin yukarı yönde regüle edildiğini belirlemiştirlerdir. Aynı zamanda, bakırın ortamdaki varlığı, pyoverdin üretimini indüklerken, pyoverdin-Fe taşıyıcısını (fpvA) indüklemeyi, böylece metal hücre dışı ortamda bağlansa dahi hücre içine taşınmaz. Ayrıca Braud ve ark. (2009), pyoverdin ve pyochelin'in üretme kabiliyetine sahip *P. aeruginosa* suşlarının, metal toksisitesine siderofor üretmeyen bir suştan göre daha dirençli olduğunu belirlemiştir. Enterobactin olarak adlandırılan bir başka siderofor, *E. coli*'yi bakır indirgeyici olarak hareket etme kabiliyetinde olduğu ve duyarlılığı arttırdığı belirlenmiştir (Ladomersky ve Petris, 2015). Diğer taraftan *E. coli* ürettiği yersiniabactinin ile enfeksiyon sırasında bakırı bağlamakta böylece hücreyi bakır iyonlarının toksisitesinden koruyabildiği belirlenmiştir (Chaturvedi ve ark., 2012). Yukarıda belirtilen bulgular ışığında, çalışmamızda bakırlı ortamlara  $Fe^{+3}$  eklendiğinde MIC değerlerinin düşürdüğünü görülmüştür. Bu, demir iyonlarının varlığının, hücreye daha fazla bakır iyonunun girmesine izin veren siderofor üretimini azaltacağı ve dolayısıyla direncinin azalmasına neden olabileceği yönünde yorumlanabilir.

Sideroforun bakır gibi diğer mineraller üzerindeki etkisini inceleyen araştırmacılar, sideroforun bakteriyel hücrelere toksik olan yüksek bakır konsantrasyonundan hayatta kalmalarında rol oynayabileceği belirlenmiştir (Schalk ve ark., 2011). Sideroforlar demir iyonlarını konsantrasyonunun düşük olduğu çevre koşullarında bakteri hücreleri tarafından üretilmektedir (Schalk ve ark., 2011). Ayrıca, diğer minerallerin siderofor üretmesine neden olan genleri aktive edebileceği belirlenmiştir (Brandel ve ark., 2012; Chaturvedi ve ark., 2012). Çalışmamızda, yetiştirme ortamında farklı bakır konsantrasyonlarıyla demir ilave edildiğinde, tüm

izolatların MIC değerlerinin azaldığını tespit edilmiştir. Özellikle duyarlı izolatlarda bu etki % 100' oranında olduğu görülmüştür. Bu, bakır içeren bir ortamda gelişen izolatların transkripsiyonel profili ile açıklanabilir. Teitzel ve ark. (2006) *P. aeruginosa*'nın Pyoverdinin sentezinde yer alan genleri yukarı regüle ederek pyoverdinin-Fe alımına dahil olan *fpvA*, aşağı regüle ettiğini belirtmiştir. Böylece bakır, pyoverdinin-Fe taşıyıcısının değil, pyoverdinin üretimini indüklemiştir, böylece metal, hücre dışı ortamda tecrit edilip taşınmamaktadır.

Çalışmamızda ayrıca izolatların siderofor veya chalkophore üretme kabiliyeti ile bakır dayanıklılık seviyesi arasında bir bağlantının varlığı araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, chalkophore üretim düzeyleri arttıkça direncin arttığı görülmektedir. İzolatların Cu ortamlarda chalkophore üretme kabiliyeti,  $Fe^{+3}$  ortamında siderofor üretme kabiliyetinden daha yüksek olduğunu gözlenmiştir. Johnstone ve Nolan (2015) ve Patel ve ark., (2018), sideroforun farklı çeşit ve rollere sahip olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca işlevlerinin bakteri cinsleri arasında farklılık gösterebileceğini bildirmişlerdir. Örneğin, siderofor schizokinen'in üretimi, hücre içi Cu birikimini artırarak *Bacillus megaterium*'in bakıra karşı duyarlılığını arttırmış, fakat *Anabaena*'da ters etki oluşturarak tolerans kazanmasına neden olmuştur (Johnstone ve Nolan, 2015). Çalkafor üretiminin etkinliğinin ortaya konması *copA* genine sahip olmayan izolatlar arasındaki direnç düzeyi farklılığını açıklayabilir.

Bakterilerde belirtilen bu mekanizmalar dışında bakıra karşı kendini koruyabilir. Örneğin Sülfatı indirgeyen bakteriler (SRB) salgılarıyla bakır, demir ve çinko gibi metalleri bağlayarak kullanılmaz forma dönüştürebilir (Martins ve ark., 2009). Ya da, Biyosorpsiyon prosesleri yoluyla da metal iyonlarının hücre duvarında bulunan metal bağlayıcı proteinlerle bağlanması ile bakırın etkinliğini azaltabilirler (Shamim, 2018). Ayrıca, ökaryot ve prokaryot organizmalarda görülebilen metallothionein adı verilen küçük, cysteine-rich metal binding proteinleri yoluyla bakıra karşı direnç sergileyebilir (Hamer, 1986; Blindauer ve ark., 2002).

Sonuç olarak;

- Van Gölü Havzasından izole edilen izolatların, İzmir ili ve civarından izole edilen izolatlardan daha düşük direnç seviyelerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

- Bir pestisit olarak, mancozeb'li Bordeaux karışımı en yüksek etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan etkili maddesi yalnızca bakır olan dört formülasyon arasında, bakır oksiklorür en başarılı pestisit olduğu gözlenmiştir.
- İzole edilen izolatlar arasında, 4 izolat (3'ü İzmir'dan, 1'i Van'dan) plazmit kaynaklı bakır direnç geni *copA*'ya sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar 1.7-2 Mm aralığında MIC değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.
- Hiçbir izolatta *cusA* geni belirlenmemiştir.
- *copA* geninin DNA dizisinde oluşan değişikliklerin patovarlara göre değişmediği tespit edilmiştir.
- Chalkophore üretme kabiliyeti bakır direncinin oluşmasına katkı sağladığı belirlenmiştir

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar ışığında direnç oluşumunun sınırlandırılması için alternatif yaklaşımların geliştirilmesinin önemli olduğunu görülmektedir. Ayrıca; oluşan direnç düzeyinin kırılması için farklı etkili madde, form ve formülasyonlarının yanı sıra Fe veya Mancozeb gibi pestisit veya gübreler ile birlikte kullanılmasının daha etkin sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.



## KAYNAKLAR

- Agrios, G., 2005. *Plant Pathology*. Fifty Ed. Ed.sl.: Elsvier Academic Pres, 922p.
- Aiello, D., Ferrante, P., Vitale, A., Polizzi, G., Scortichini, M., Cirvilleri, G., 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in sicily and occurrence of copper-resistant strains. *Plant Pathology*, **97** (2): 273-282.
- Akköprü, A. 2016. Determination of bacterial disease on stone fruits grown in Lake Van Basin, East Anatolia of Turkey. *ActaHortic*, **1149**: 15-20.
- Altimira, F., Yáñez, C., Bravo, G., González, M., Rojas, L. A., Seeger, M., 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology*, **12**: 193-205.
- Ali, S., Masud, T., Abbasi, K. S., Mahmood, T., Hussain, A., 2015. Apricot: Nutritional Potentials and Health Benefits-A Review. Annals. *Food Science and Technology*. Valahia University Press.
- Anonim, 2017. Toplam tarım ilacı kullanımını <https://cevresehgostergeler.csb.gov.tr/tarim-ilaci-pestisit-kullanimi-i-85834>. Çevre ve şehircilik bakanlığı, Türkiye. Erişim tarihi: 12.11.2018.
- Anonim, 2019. Cambridge dictionary. <https://dictionary.cambridge.veyag/dictionary/english/sequestration>. Cambridge University, England. Erişim tarihi: 01.02.2019.
- Argüello, J. M., Raimunda, D, Padilla-Benavides, T., 2013. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **3**: 1-14
- Badar, U., Ahmed, N., Shoeb, E, M Gadd, G., 2014. Identification of the pco operon in *Enterobacter* species isolated from contaminated soil. *International Journal of Advanced Research*, **2** (3): 227-233.
- Barba, M., Ilardi, V., Pasquini, G., 2015. Control of pome and stone fruit virus diseases, chapter three. *Advances in Virus Research*, **91**: 48-72.
- Bastas, K. K., 2013. Vegetable bacterial diseases in turkey. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, **1**: 14-24.
- Behlau, F., M.Gochez, A., Lugo, A. J., Elibox, W., V.Minsavage, G., F. White, F., Ebrahim., 2017. Characterization of a unique copper resistance gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Trinidad, West Indies. *European Journal of Plant Pathology*, **147** (3): 671–681.
- Bender, C. L., Cooksey D. A., 1985. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *Journal of Bacteriology*, **165** (2): 534-541.
- Benlioğlu, K., Benlioğlu, S., 1998, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı bakır dayanıklılığı üzerinde çalışmalar, 8. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 21-25 Eylül 1998, Ankara. 52 - 56.
- Besaury, L., Bodilis, J., Delgas, F., Andrade, S., De la Iglesia, R., Ouddane, B., Quillet, L., 2013. Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in

- microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, **67** (1–2): 16–25.
- Blindauer, C. A., 2011. Bacterial metallothioneins: past, present, and questions for the future. *J Biol Inorg Chem*, **16**:1011–1024.
- Bondarczuk, Piotrowska-Seget, Z., 2013. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biology and Toxicology*, **29** (6) : 397–405.
- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I. J., Mislin, G. L. A., Albrecht-Gary, A. M., 2012. Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron(iii), copper(ii) and zinc(ii) complexes. *Dalton Transactions*, **41** (9): 2820–2834.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., Schalk, I. J., 2009. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine–iron uptake pathway. *Environmental Microbiology*, **11** (5), 1079–1091.
- Brown, N. L., Barrett, S. R., Camakaris, J., Lee, B. T., Rouch, D. A., 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol*, **17** (6):1153-66.
- Bultreys, A, Kaluzna, M., 2010. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and morsprunorum race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, **92** (1): 21-33.
- Burr, T. J., Norelli, J. L., 1984, Recent progress in chemical control fire blight, *Acta Horticulture*, **151**: 155-164.
- Bülbül, M., 2014. *Tekirdağ'da Kiraz Dal Kanseri Hastalığına Neden Olanbakteriyel Etmenlerin İzolasyonu, Tanisi ve Yaygınlığı* (Yüksek lisans tezi, basılmamış). Namik Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Turkey.
- Cazorla, F. M., Arrebola, E., Sesma, A., Pérez-García, A., Codina, J. C., Murillo, J., de Vicente, A. 2002. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. *Phytopatholog*, **92**: 909-916.
- Cervantes, C, Guitierrez-Corona, F., 1993. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. (review) *FEMS Microbiology*, **14**: 121-138.
- Cha, J-S., Cooksey, D. A., 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88** (20): 8915–8919.
- Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E., Henderson, J. P., 2012. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nature Chemical Biology*, **8** (8): 731–736.
- Colombi, E., Straub, C., Künzel, S., Templeton, M. D., McCann, H. C., Rainey, P. B., 2017. Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids. *Environmental Microbiology*, **19** (2): 819–832.
- Conlin, K. C., McCarter, S. M., 2008. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *in-vitro* and in controlling bacterial speck. *Plant Disease*, **67** (6): 639-644.
- Cooksey, D. A., 1987. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl Environ Microbiol*. **53** (2): 454–456.
- Cooksey, D. A. 1990. Plasmid-determined copper resistance in *Pseudomonas syringae* from impatiens. *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (1): 13-16

- Cooksey, D. A., AZAF, H. R., Cha, J-S, Lim, C-K., 1990. Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato. *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (2): 431-435.
- Cooksey, D. A., Azad, H. R., 1992. Accumulation of copper and other metals by copper-resistant plant-pathogenic and saprophytic *Pseudomonads*. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (1): 274-278.
- Donmez, M. F., Karlidag, H., Esitken, A., 2010. Identification of resistance to bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) disease on apricot genotypes grown in Turkey. *Eur J Plant Pathol*. **126**: 241–247.
- Eğerci, K., 2015. *Bazı Bitki Patojeni ve Saprofitbakterilerin Bakirli Bileşiklere Karşı Duyarlılık Düzeylerinin Araştırılması* (Yüksek lisans tezi). EGE Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Turkey.
- FAO, 2015. Food and agriculture organization of the united nation <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Erişim tarihi: 12.11.2018.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C, Nies, D. H. 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **185** (13): 3804–3812.
- Gutiérrez-Barranquero, J., de Vicente, A., J. Carrión, V., W. Sundin, G, M. Cazorla., 2013. Recruitment and rearrangement of three different genetic determinants into a conjugative plasmid increase copper resistance in *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **79** (3): 1028-1033.
- Gutiérrez-Barranquero, J. A., Carrión, V. J., Murillo, J., Arrebola, E., Arnold, D. L., Cazorla, F. M., de Vicente, A., 2013. A *Pseudomonas syringae* diversity survey reveals a differentiated phylotype of the pathovar *syringae* associated with the mango host and mangotoxin production. *Phytopathology*, **103** (11): 1115- 1129.
- Hamer, D. H., 1986. Metallothionein. *Biochem*, **55**: 913-945
- Hernández-Montes, G., Argüello, J. M., Valderrama, B., 2012. Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria. *BMC Microbiology*, **12**: 249-263
- Ivanović, Ž., Perović, T., Popović, T., Blagojević, J., Trkulja, N., Hrnčić, S., 2017. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, causal agent of citrus blast of mandarin in montenegro. *Plant Pathol. J.* **33** (1): 21-33.
- Johnstone, T. C., Nolan, E. M., 2015. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans*, **44** (14): 6320–6339.
- Kaymak, S., Özdem, A., Karahan, A., Özercan, B., Aksu, P., Aydar, A., Kodan, M., Yılmaz, A., Başaran, S., Asvan, Ü., Erdoğan, P., Güler, Y., 2015. *Ülkemizde Zirai Mücadele Girdilerinin Değerlendirilmesi*. Ankara, Türkiye. 83.
- Kennelly, M. M., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Ramos, C., Sundin, G. W., 2014. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant Disease*, **91** (1): 4-17.
- King, E. O., Ward, M. K., Raney, D., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med*, **44** (2): 301-307.
- Ladomersky, E, Petris, M. J., 2015. Copper tolerance and virulence in bacteria. *HHS Public Access*, **7** (6): 957–964.
- Lejon, D. P. H., Nowak, V., Bouko, S., Pascual, N., Mougel, C., Martins, J. M. F., Ranjard, L., 2007. Fingerprinting and diversity of bacterial *copA* genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination. *FEMS Microbiology Ecology*, **61** (3), 424–437.



- Louden, B. C., Haarmann, D., M.Lynne, A., 2011. Use of blue agar cas assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, **12** (1): 51-53.
- Malik, A., Jaiswal, R., 2000. Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **16**: 177-182.
- Marco, G. M., Stall, R. E., 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, **67** (7): 779-781.
- Martins, M., Faleiro, M. L., Barros, R. J., Veríssimo, A. R., Barreiros, M. A., Costa, M. C. (2009). Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *Journal of Hazardous Materials*, **166** (2–3): 706–713.
- Medhekar, S., Boparai, K. S., 1981. Fungicidal bis (1-amidino-O-ethylisourea) copper (II) carbamates. *J. Agric. Food Chem.* **29**: 421- 422.
- Mills, S. D., Lim, C-K., Cooksey, D. A., 1994. Purification and characterization of CopR, a transcriptional activator protein that binds to a conserved domain (cop box) in copper-inducible promoters of *Pseudomonas syringae*. *Mol Gen Genet*, **244**: 341-351.
- Mirik, M., Aysan, Y., Cinar, O., 2007. Copper-resistant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria* (doidge) dye in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Journal of plant pathology*, **89** (1): 153-154
- Morgan, K., Juchheimm, M. A., Patrick, M., 2014. Plasmids 101: *The Promotor Region*, **3**: 18–24.
- Nakajima, M., Goto, M., Hibi, T., 2002. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. *Journal of General Plant Pathology*, **68**(1): 68–74.
- Nies., D. H., Herzberg, M., 2013. A fresh view of the cell biology of copper in *Enterobacteria*. *Molecular Microbiology*, **87** (3): 447–454.
- Özaktan, H., Öden, S., Delen, N., 1991, Domates bakteriyel benek hastalığı etmeni (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)’ne bazı bakırlı preparatların etkililikleri üzerinde araştırmalar, *VI.Türkiye Firopatoloji Kongresi*. 7-11 Ekim 1991, İzmir. 291-294.
- Özaktan H., Akkopru A., Bozkurt A., Erdal M., 2008. Information on peach bacterial canker in Aegean Region of Turkey. Proceedings of STF meeting on “Determination of the incidence of the different pathovars of *Pseudomonas syringae* in stone fruits”. *COST Action 873 “Bacterial Diseases of Stone Fruits and Nuts”*. 27th-28th March 2008, Skierniewice, Polant.
- Patel, P. R., Shaikh, S. S., Sayyed, R. Z., 2018. Modified chrome azurol S method for detection and estimation of siderophores having affinity for metal ions other than iron. *Environmental Sustainability*, **1** (1): 81-87.
- Paulin, J. P., Lachaud, G., 1984. Comparison of the efficiency of some chemicals in preventing fire blight blossom infections, *Acta Horticulturae*, **151**: 209-214.
- Petriccione, M., Zampella, L., Mastrobuoni, F., Scortichini, M., 2017. Occurrence of copper-resistant *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from rain and kiwifruit orchards also Resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *European Journal of Plant Pathology*, **149** (4): 953–968.

- Ram, V, Bhardwaj, L.N., 2004. Stone Fruit Diseases and their Management. *Diseases of Fruits and Vegetables*, **2**: 485-510.
- Rensing, C., Grass, G., 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**: 197-213
- Reznikoff, W. S., 2008. Transposon Tn 5. *Annual Review of Genetics*, **42** (1): 269–286.
- Scheck, H. J, Pscheidt, J. W., 1998. Effect of copper bactericides on copper-resistant and -sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Disease*, **82** (4): 397- 406.
- Schalk, I. J., Hannauer, M., Braud, A., 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental microbiology*, **13** (11): 2844-2854.
- Shamim, S., 2018. Biosorption of heavy metals, **2**. *Biosorption (Derco, E., Vrana, B.)*. 147.
- Sipahioğlu, H. M., Demir, S., Polat, B., Akköprü, A., Usta, M., 2003. Van ve civarında yetiştiriciliği yapılan sert çekirdekli meyve ağaçlarında tespit edilen viral ve fungal hastalık etmenleri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, **14** (2): 133-139.
- Stall, R. E., Loschke, D. C., Jones., 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, **76**: 240-243.
- Sundin, G. W., Jones, A. L., Fulbright, D. W., 1989. Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer *in-vitro* and in planta with a plasmid. *Phytopathology*, **79** (8): 861-865.
- Teitzel, G. M., Geddie, A., De Long, S. K., Kirisits, M. J., Whiteley, M., Parsek, M. R., 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: Transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **188** (20): 7242–7256.
- Tetaz T. J, Luke, K. J., 1983. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *Bacteriology*, **154** (3): 1263-1268.
- Uchida, R., 2000. Essential nutrients for plant growth: nutrient functions and deficiency symptoms, Chap. 3. *Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture* (J. A. Silva and R. Uchida). College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa. 151.
- Vanneste, J.L., Voyle, M.D., 2003. Genetic basis of copper resistance in new zealand strains of *Pseudomonas syringae*. *New Zealand Plant Protection*, **56**: 109-112.
- Yoon, S., 2010. *Towards Practical Application of Methanotrophic Metabolism in Chlorinated Hydrocarbon Degradation, Greenhouse Gas Removal, and Immobilization of Heavy Metals* (Doctora). The University of Michigan, USA
- Yoon, S., Dispirito, A. A., Kraemer, S. M., Semrau, J. D., 2011. A simple assay for screening microorganisms for chalkophore production, Chap. 16. *Methods in Enzymology*, USA. 495.
- Zhang, S., Fu, Y., Mersha, Z., Pernezny, K., 2017. Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean. *Crop Protection*, **98**: 8-15



## ÖZ GEÇMİŞ

Ahmad Hussein, 1992 yılında Şam'da dünyaya geldi. İlk ve orta öğrenimini Şam'daki Al-Bawader İlkokul'unda, liseyi Al-Saade Lisesi'nde okudu. 2010 yılında Damascus Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümüne yerleşti ve 2015 yılında aynı fakülteden mezun oldu. 2016 yılında T.C Türkiye Burslar bursu kazanarak, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisansına başladı.



T.C  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 02/07/2019

Tez Başlığı / Konusu:

Sert Çekirdekli Meyvelerde Bakteriyel Kanser Etmeni *Pseudomonas syringae* Patovarylarının Bakır Toleransının Belirlenmesi

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin, 02/07/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından benzerlik indeksi intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 (bir)dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

02/07/2019

Adı Soyadı: AHMAD HUSSEINI

Öğrenci No: 169101122

Anabilim Dalı: Bitki koruma

Program: Fitopatoloji, Bakteriyoloji

Statüsü: Y. Lisans Doktora DANIŞMAN ONAYI  
UYGUNDUR

Dr. Öğr. Üy. Ahmet AKKOPELİ

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ENSTİTÜ ONAYI  
UYGUNDUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)