

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FINDIK BAKTERİYEL YANIKLIK ETMENİ
Xanthomonas arboricola pv. *corylina*'NİN SAMSUN İLİ'NDE
YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiğdem KARA

Bitki Koruma Anabilim Dalı

**EYLÜL 2012
SAMSUN**

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**FINDIK BAKTERİYEL YANIKLIK ETMENİ
Xanthomonas arboricola pv. *corylina*'NİN SAMSUN İLİ'NDE
YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇİĞDEM KARA
(10210154)**

Tezin Savunma Tarihi : 28 Eylül 2012

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Hasan Murat AKSOY

Bu Yüksek Lisans Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi ZRT.1904.11.024
nolu Proje ile Desteklenmiştir

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalında

Çiğdem KARA Tarafından Hazırlanan

**FINDIK BAKTERİYEL YANIKLIK ETMENİ
Xanthomonas arboricola pv. *corylina*'NİN SAMSUN İLİNDE
YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 28/09/2012 tarihinde yapılan sınav ile
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.**

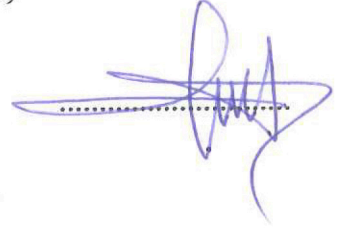
Başkan : Prof. Dr. Neriman BEYHAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. H. Murat AKSOY
Ondokuz Mayıs Üniversitesi (Danışman)



Yrd. Doç. Dr. M. Ali ŞEVİK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



..../..../...2012

Prof. Dr. Recep TAPRAMAZ

Enstitü Müdürü

ÖZ

Bu çalışma 2011 – 2012 yılları arasında fındık bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın Samsun İli'ndeki yaygınlık durumunu tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Bakteriyel izolatlar, biyokimyasal ve moleküler tanı yöntemlerine göre teşhis edilmiştir. Samsun fındık üretim alanlarından Çarşamba, Terme, Salıpazarı, Ondokuzmayıs, Tekkeköy, Atakum ilçelerinden toplam 24 izolat elde edilmiştir.

Hastalık yaygınlık ve şiddeti sırasıyla Çarşamba'da % 21.25, % 8.48; Terme'de % 18.41, % 7.66; Salıpazarı'nda % 5.57, % 1.64; Ondokuzmayıs'ta % 27.37, % 13.71; Tekkeköy'de % 15.08, % 5.26; Atakum'da % 15.41, % 2.75 olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: fındık, bakteriyel yanıklık, tanı testleri

ABSTRACT

This study was performed to determine the status of the prevalence of hazelnut blight *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* in Samsun in 2011 - 2012. Bacterial isolates were identified according to biochemicals and molecular tests. Twenty four bacterial blight agents; Çarşamba, Terme, Salıpazarı, Ondokuzmayıs, Tekkeköy, Atakum were identified in hazelnut growing areas of Samsun Province.

The disease incidence and severity was found to be in Çarşamba 21.25%, 8.48%; Terme 18.41%, 7.66%; Salıpazarı 5.57%, 1.64%; Ondokuzmayıs'ta 27.37%, 13.71%; Tekkeköy 15.08%, 5.26%; Atakum 15.41%, 2.75% respectively.

Keywords: hazelnut, bacteriological blight, identifying tests

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve tezimin tüm aşamalarında bilgi, katkı, yardım ve sabrını esirgemeyen danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. H. Murat AKSOY’a teşekkür ederim.

Değerli katkıları için saygıdeğer hocalarım Sn. Prof. Dr. Neriman BEYHAN ve Yrd. Doç. Dr. M. Ali ŞEVİK’e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin finanse edilmesini sağlayan OMÜ Proje Yönetim Ofisi’ne; Çarşamba, Terme, Tekkeköy, Salıpazarı, Ondokuz Mayıs ve Atakum İlçelerinde bahçelerinden fındık örnekleri aldığım arazi sahiplerine; ilgi ve yardımları için Terme, Tekkeköy, Atakum ve Salıpazarı Tarım İlçe Müdürleri’ne ve değerli personellerine, Çarşamba ve Ondokuzmayıs İlçe Tarım Müdürlükleri’ne; arazi çalışmalarım esnasında bana eşlik eden değerli meslektaşlarım ve bölümümüz lisans öğrencilerine teşekkür ederim.

Tanı testlerinde kullanılan referans izolat katkısından dolayı Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Fitopatoloji Bölüm Başkanı Sn. Dr. Aynur KARAHAN’a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimime başlamamda yüreklendirici katkısı dolayısıyla, her aşamasında yanımda olan, özellikle arazi çalışmamda yardımları için sevgili arkadaşım Zir. Müh. Melda ŞEN’e, laboratuvar çalışmalarımındaki destekleri için Zir. Müh. arkadaşlarım Elif YILDIRIM ve Armağan ÖZ’e teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim ve tez aşaması boyunca sonsuz anlayış, sabır, yardım, maddi – manevi destekleri için canım annem, canım babam ve sevgili kardeşime sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Çiğdem KARA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	6
3.1. Survey Çalışmaları.....	6
3.2. İzolasyon Çalışmaları.....	11
3.3. Çalışmalar Sırasında Kullanılan Standart Kültürler, Ortamlar ve Teşhis Yöntemleri.....	12
3.3.1. Gram boyama testi.....	13
3.3.2. KOH testi.....	14
3.3.3. Katalaz testi.....	14
3.3.4. Oksidasyon / fermentasyon testi.....	14
3.3.5. Jelatin eritme testi.....	15
3.3.6. Nişastanın hidrolizi testi.....	16
3.3.7. Eskulinin hidrolizi testi.....	16
3.3.8. Karbon kaynaklarının kullanılması testi.....	17
3.3.9. Tütünde aşırı duyarlılık testi.....	17
3.3.10. Patojenite testi.....	18
3.3.11. Moleküler tanılama.....	18
4. BULGULAR.....	20

4.1. Survey Çalışmalarının Sonuçları.....	20
4.1.1. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın ilçelere göre yaygınlık ve şiddeti.....	20
4.1.2. İlçelerde inceleme yapılan köyler ve elde edilen izolat sayıları...	22
4.2. Laboratuvar Sonuçları.....	23
4.2.1. Gram boyama testi.....	24
4.2.2. KOH testi.....	24
4.2.3. Katalaz testi.....	25
4.2.4. Oksidasyon / fermentasyon testi.....	26
4.2.5. Jelatini eritme testi.....	26
4.2.6. Nişastanın hidrolizi testi.....	27
4.2.7. Eskulinin hidrolizi testi.....	28
4.2.8. Karbon kaynaklarının kullanılması testi.....	29
4.2.9. Tütünde aşırı duyarlılık testi.....	30
4.2.10. Patojenite testi.....	31
4.2.11. Moleküler tanılama.....	33
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
7. KAYNAKLAR.....	39
8. ÖZGEÇMİŞ.....	44

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler

%	: yüzde
°C	: santigrat derece
µl	: mikrolitre
da	: dekar
g	: gram
ha	: hektar
kb	: kilobaz
lt	: litre
ml	: mililitre
mM	: milimolar
rpm	: rotation per minute

Kısaltmalar

CaCO ₃	: Kalsiyum Karbonat
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EPPO	: European and Mediterranean Plant Protection Organization
FAO	: Food and Agriculture Organization
Gram (-)	: Gram Negatif
GYCA	: Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Agar
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HCl	: Hidrojen Klorür
KCl	: Potasyum Klorür
KOH	: Potasyum Hidroksit
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum Sülfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit

NaOH	: Sodyum Hidroksit
NGA	: Nutrient Glukoz Agar
NH ₄ H ₂ PO ₄	: Amonyum Fosfat
pv.	: pathovar
PCR	: Polymerase Chain Reaction
REP – PCR	: Repetative - Polymerase Chain Reaction
rRNA	: Ribozomal Ribo Nükleik Asit
TAE	: Tris Asetat EDTA
TBE	: Tris Borik Asit EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Samsun'un coğrafi konumu.....	6
Şekil 3.2. Samsun'un ilçeleri.....	7
Şekil 3.3. Fındık bakteriyel yanıklık hastalığının 0 – 5 skalası.....	10
Şekil 4.1. İlçelere göre hastalık şiddet ve yaygınlık grafiği.....	21
Şekil 4.2. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın NGA besi ortamında gelişimi	23
Şekil 4.3. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın GYCA besi ortamında gelişimi	24
Şekil 4.4. KOH testi: <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın pozitif reaksiyonu	25
Şekil 4.5. Katalaz testi: pozitif reaksiyon; hava kabarcıkları oluşumu.....	25
Şekil 4.6. Oksidatif – fermentatif reaksiyon testi: <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın oksijenli koşulda glukozdan asit üretimi.....	26
Şekil 4.7. Jelatin eritmesi testi: <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın jelatini sıvılaştırması.....	27
Şekil 4.8. Nişastanın hidrolizi testi: <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın pozitif reaksiyonu.....	28
Şekil 4.9. Eskulinin hidrolizi testi: ortam renginin siyahlaşması.....	28
Şekil 4.10. Karbon kaynaklarının kullanılması testi: pozitif reaksiyon sonucu renk değişimi.....	29
Şekil 4.11. Tütünde aşırı duyarlılık testi: <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın tütünde aşırı duyarlılık simptomu.....	31
Şekil 4.12. Patojenite testi: <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın fındık yapraklarında meydana getirdiği nekrotik lekeler.....	32
Şekil 4.13. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	34

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Survey yapılan ilçelere göre ocak sayıları.....	8
Çizelge 4.1. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın ilçelere göre yaygınlık durumu ve hastalık şiddeti.....	20
Çizelge 4.2. Elde edilen izolat sayılarının ilçeler ve köylere göre dağılımı.....	22
Çizelge 4.3. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın karbon kaynaklarını kullanım sonuçları.....	30
Çizelge 4.4. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın biyokimyasal tanı test sonuçları.....	33

1. GİRİŞ

Fındık; Fagales takımı, *Betulaceae* familyası, Coryloidea alt familyası, *Corylus* cinsinde yer almaktadır. Bu cins içerisine giren çok sayıda tür bulunmasına rağmen kültür çeşitlerinin tamamına yakını *Corylus avellana* L. Türü içerisinde yer almaktadır (Mehlenbacher, 1991; Erdoğan ve Mehlenbacher, 2000). Fındığın anavatanı, en değerli yabani türlerinin doğal yayılma alanı ve kültür çeşitlerinin kaynağı Anadolu'dur (Köksal, 2002).

Dünya fındık üretimi FAO 2010 verilerine göre 857.759 ton olarak gerçekleştirmiş, bunun 600.000 tonu Türkiye'de, 90.270 tonu İtalya'da, 29.454 tonu Azerbaycan'da, 28.800 tonu Gürcistan'da, 25.401 tonu A.B.D.'de, 24.300 tonu İran'da, 19.500 tonu Çin'de, 15.100 tonu İspanya'da üretilmiştir. Türkiye, dünya fındık üretiminin % 70'lik payına sahiptir (Anonymous, 2012a).

Türkiye'de 2011 yılı rakamlarına göre 668 bin ha alanda fındık yetiştiriciliği yapılmaktadır. Fındık alanlarının iller bazında dağılımında ise Ordu 227 bin ha ile toplam fındık alanlarının % 33'üne sahiptir. Ordu'yu sırasıyla Giresun ve Samsun illeri takip etmektedir. Giresun 118 bin ha fındık alanı ile toplam fındık alanlarının % 18'ine sahipken Samsun 88 bin ha ile toplam fındık alanlarının % 13'üne sahiptir. Bu üç ilin fındık alanı toplamı ise yaklaşık olarak 407 bin ha ile toplam fındık alanlarının % 61'ini oluşturmaktadır. Bununla birlikte Sakarya 69 bin ha fındık alanı ile toplam fındık alanlarından % 10, Trabzon ve Düzce ise sahip oldukları 63 bin ha alan ile toplam fındık alanlarından % 9'ar pay alan diğer önemli illerdir (Anonymous, 2012b). TÜİK verilerine göre 2011 yılında Ordu 227.053 ha alanda 99.881 ton, Giresun 117.639 ha alanda 67.603 ton, Samsun fındık üretimi 88.341 ha alanda 52.087 ton, Sakarya 69.084 ha alanda 74.537 ton, Düzce 62.675 ha alanda 45.098 ton, Trabzon 64.283 ha alanda 33.410 ton fındık üretimi gerçekleştirmiştir (Anonymous, 2012b). TÜİK verilerine göre 2010 yılında Türkiye'de 600 bin ton fındık üretimi gerçekleşmiş, üretim alanlarında bir değişim olmamasına rağmen 2011 yılında 430 bin tona gerilemiştir (Anonymous, 2010).

Çalışmanın yürütüldüğü Samsun'da fındık üretiminin ilçelere göre dağılımı ise Çarşamba'da 12.184 ton, Terme'de 10.975 ton, Salıpazarı'nda 8.776 ton, Tekkeköy'de 6.111 ton, Ayvacık'ta 5.567 ton, Ondokuzmayıs'ta 2.700 ton, Atakum'da 1.556 ton şeklindedir (Anonymous, 2010).

Fındık, genel olarak don tehlikesinin nadir görüldüğü, ortalama kış sıcaklığının – 8 °C'nin altına düşmediği, en yüksek sıcaklığın ise 36 - 37 °C ve yıllık ortalama sıcaklığın 13 - 16 °C olduğu, haziran ve temmuz aylarında % 60 orantılı neme ve yıllık 755 mm'den daha fazla yağış alan, yüksekliği 600 m'yi geçmeyen bölgeler fındık tarımı için uygundur (Köksal, 2002). Türkiye'de fındık yetiştirilen alanlar 40 – 41 ° enlem ve 37 – 42 ° boylamları arasında bulunmaktadır. Bu sınırlar içerisinde ekolojik koşullar bakımından en uygun alanlar Karadeniz kıyılarıdır. Fındık yetiştiriciliği Karadeniz kıyılarından 60 km içeriye ve 750 m yüksekliğe kadar çıkmaktadır (Özbek, 1978; Köksal, 2002).

Türkiye'de Tombul, Palaz, Çakıldak, Foşa, Mincane, Uzunmusa, Cavcava, Kargalak, Kan, Kalınkara, İncekara, Sivri, Kuş, Acı, Karafındık, Yassı Badem ve Yuvarlak Badem olmak üzere 17 standart fındık çeşidi tanımlanmıştır (Ayfer ve ark., 1986; Okay ve ark., 1986; Çalışkan, 1995; Köksal 2002; Demir, 2005).

Fındık tarımı genellikle küçük arazilerde ve aile işletmeciliği biçiminde yapılmaktadır. Türkiye'de yaklaşık 400.000 çiftçi ailesinin fındık tarımıyla uğraştığı bilinmektedir. Fındık, yetiştirildiği bölgede doğrudan ya da dolaylı olarak 8 milyon nüfusu ilgilendirmektedir (Karadeniz ve ark., 2008).

Fındıklarda görülen hastalıklar arasında; fındık bakteriyel yanıklık etmeni (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* Miller et all.), fındık külleme hastalık etmeni *Phyllactinia guttata* (Wallr.: Fr.) Lev. (Hartney et all., 2005), fındık dal kanseri *Nectria galligena* Bres. (Farr and Rossman, 2011), Armillaria kök çürüklüğü *Armillaria mellea* (Vall.) Quel., (Janick and Paull 2008; Keča et all. 2009; Lushaj et all. 2010), Rosellinia kök çürüklüğü *Rosellinia necatrix* Prill (Minter and Peredo Lopez 2006) ve fındık mozaik virüs hastalığı *Apple mosaic ilarvirus*, (ApMV) (Snare, 2006) yer alır. Bunlardan *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* en önemlisidir (Viggiani, 1994).

Fındık üretiminin yaygın olarak yapıldığı Samsun İli'nde fındık bakteriyel yanıklık etmeni (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* Miller et all.)'nin yaygınlık seviyesiyle ilgili olarak son yıllarda yeterli seviyede çalışma yürütülmemiştir. Bu nedenle, bu araştırmada hastalığın yaygınlık durumu saptanmak istenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Xanthomonas corylina (Miller et all.) ilk olarak 1913 yılında A.B.D. - Oregon'da tanılanmıştır (Barss, 1913). Bu ilk tanıdan sonra 1956 yılında eski adıyla Yugoslavya'da Sutic, 1969 yılında İtalya'da Noviello, 1973 yılında Türkiye'de Alay ve ark., 1976 yılında Fransa'da aynı yıl hem Luisetti ve ark. hem Prunier ve ark., 1978 yılında Rusya'da Koval, 1979 yılında İngiltere'de Locke ve Barnes, 1980 yılında Avustralya'da Wimalajeewa ve Washington, 1982 yılında Cezayir'de Gardan, 1987 yılında Şili'de Guerrero ve Lobos tarafından varlığı tespit edilmiştir (EPPO, 1990).

X. arboricola pv. *corylina* EPPO A2 karantina listesinde yer almaktadır. Ancak karantina başka herhangi bir bölgesel bitki koruma örgütü tarafından onaylanmamıştır. *X. arboricola* pv. *corylina* dünya fındık üretim alanlarının sınırlı bir kısmına yayılmıştır. Diğer ülkeler ana fındık üreticisi olmamalarına rağmen halen risk altında bulunmaktadır (Smith ve ark., 1997).

X. arboricola pv. *corylina*'nın ana konukçusu fındıktır. Bakteri bitkiye tomurcuk, yaralar ve yapraklar üzerindeki açık stomalar yoluyla girer. Kanserli dokularda ve hastalıklı tomurcuklarda canlılığını sürdürür. Bitkiden bitkiye ise yağmur, rüzgâr ve budama aletleri ile yayılır (EPPO, 2004).

Yapraklar üzerindeki lekeler, yuvarlak veya düzensiz bir şekilde görünür ve lekelerin çapları genellikle 1 – 2 mm'dir. Yeni oluşan lekeler donuk, sarımsı yeşil renkte olup, zamanla kırmızı – kahverengi bir görünüm alabilmektedir. Lekelerin etrafı sarımsı yeşil bir hale ile çevrilidir. Dallar ise dışarıdan kurumuş gibi görünmekte, yapraklar bu dallar üzerinde kıvrılarak kurur ve asılı kalmaktadır. Dallardaki lezyonları tespit etmek güç olabilir, fakat yakından kontrol edildiğinde, kabuğun hafifçe çökük ve kırmızımsı mor bir renk aldığı görülmektedir. Kabuk kaldırıldığında iç kısımlardaki dokuların küçük lekeler şeklinde kırmızımsı kahverengine dönüştüğü görülür. Gövdede belirtiler uzunlamasına 10 - 25 cm uzunluğunda kanser oluşumu şeklindedir ve hastalığın en önemli devresidir. Yaralar genellikle 4 yaşına kadar olan ağaç gövdelerini kuşatır ve genç fidanların ölümüne neden olur (Anonymous, 2011a).

Meyve ve zuruflardaki lekeler şekil ve büyüklük bakımından yapraklardakine benzeyen koyu kahverenkli lekeler şeklindedir. Başlangıçta yüzeysel olan bu lekeler zamanla çukurlaşır ve sertleşir.

Ağaçlarda genellikle 8 - 10 yaşına kadar olan dönem en hassas dönemdir. 1 - 2 yaşındaki genç sürgünler kurumaya karşı özellikle hassastır. Tomurcuklar, genç sürgün

ve dallar en hassas organlardır. Daha sonra yapraklarda gelişme görülür. Nemli hava hastalığın daha kolay gelişimine yardımcı olur. Donlu havalardan sonra bitkiler hastalığa karşı daha hassas hale gelir. Sağlıklı ağaçlar hastalığa karşı daha dirençlidir (Karadeniz ve ark., 2008).

X. arboricola pv. *corylina* bir yıldan diğer yıla canlılığını koruyabildiği için epidemiyolojik önem taşımaktadır. Tomurcukların enfeksiyonu vejetatif gelişim esnasında ortaya çıkar ve bu da ilkbahar ayında inokulumun asıl kaynağını oluşturur. Etmen dökülen yapraklarda 4 aydan fazla canlılığını korur fakat toprakta kışlayamaz (Gardan, 1982; 1983).

Hastalık; bulaşık materyallerin yok edilmesi ve ortadan kaldırılması, budama ekipmanlarının temizliğine dikkat edilmesi, bakırlı preparatların kullanılması ve yeni dikilen fidanların dayanıklı çeşitler olmasına dikkat edilmesiyle kontrol altına alınabilir. Sağlıklı bitki materyali kullanmak en önemli önleyici yöntemdir (EPPO, 2004).

Bacteria alemi, Proteobacteria şubesi, Gammaproteobacteria sınıfı, Xanthomonadales takımı, Xanthomonadaceae familyası, *Xanthomonas* cinsine dahil olan *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller et al.) Vauterin et al. fındık bakteriyel yanıklık etmeni olarak bilinmektedir. Sinonimleri *Xanthomonas campestris* pv. *corylina* (Miller et al.) Dye ve *Xanthomonas corylina* (Miller et al.) Starr & Burkholder' dır.

Hastalık etmeni *X. arboricola* pv. *corylina* Gram - negatif, kutuptan tek kamçılı ve aerobiktir. Diğer *Xanthomonas*'lar gibi kültür ortamında sarı renkli, akışkan formda ve parlak görümlü koloni oluşturur. Besi ortamında optimum gelişme sıcaklığı 28 °C'dir (Bradbury, 1987).

Miller ve ark. (1949), gerçekleştirdikleri çalışmalarda hastalıklı bitkilerin mikroskopik deneyleri ve tekrarlanan izolasyonlar sonucunda spesifik bakteri türünü elde etmişlerdir. Elde ettikleri bakteriyi tekrar fındık bitkisine inokule ederek hastalık simptomlarını gözlemlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada *X. arboricola* pv. *corylina*'nın 1 - 4 yaş arası genç ağaçlarda zarar meydana getirdiği, bu ağaçlarda % 10 oranında ölüme neden olduğu ve meyvede meydana getirdiği zararlanmalar nedeniyle % 25 verim düşüklüğüne yol açtığı belirlenmiştir (Miller ve ark., 1949).

Alay ve ark. (1973) tarafından Karadeniz Bölgesi'nde *X. arboricola* pv. *corylina*'nın yayılış ve bulaşıklılık durumunu tesbit için yürütülen çalışmada hastalığın

Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin İllerindeki fındık bahçelerine yayıldığı ve kontrol edilen fındık ocaklarının tamamen bulaşık olduğu bildirilmiştir.

Scortichini ve ark., (2002), *X. arboricola* pv. *corylina*'nın farklı coğrafik orijinlerden elde edilmiş izolatlarının çeşitliliğini değerlendirmek amacıyla; REP – PCR (Repetitive – Polymerase Chain Reaction), protein analizi, patojenite ve biyokimyasal testlerini gerçekleştirmişlerdir. *X. arboricola* pv. *corylina* izolatlarının yanı sıra, karşılaştırmalı analiz için referans izolat olarak *X. arboricola* pv. *juglandis* NCPPB 411, *X. arboricola* pv. *pruni* NCPPB 416, ve *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB 528 ırklarını kullanmışlar, izolatları GYCA ortamında 25 – 27 °C'de geliştirmişlerdir. Biyokimyasal olarak ise Lelliot ve Stead (1987)'ye göre nişasta ve eskulinin hidrolizi, jelatinin eritilmesi testlerini uygulamışlardır. Çalışmalar sonucunda tüm izolatların nişasta ve eskulini hidroliz ettiği, jelatini erittiği sonucunu elde etmişlerdir. PCR işlemi sonucunda ise referans izolatlarla *X. arboricola* pv. *corylina* izolatları arasında gözle görülür bir farka rastlanmadığına kanaat getirmişlerdir.

Pulawska ve ark., (2010), Polonya'da 2007 ve 2009 yıllarında yaprak lekelenmeleri görülen farklı çeşitlerde fındık ağaçlarından elde ettikleri örnekleri izole etmiş ve sarı renkli koloni şeklinde gelişen bakterileri *Xanthomonas* cinsine ait, spesifik X1 ve X2 primerleri ile PCR analizi uygulayarak sonucu pozitif olarak değerlendirmişlerdir. PCR uygulaması için *X. arboricola* pv. *corylina*'nın LMG 688 referans ırkını kullanmışlardır. 15 izolatla referans ırk testlendiğinde, izolat desenlerinin referans ırkın desenine büyük benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca izolatların sera koşullarında patojenite testini gerçekleştirmiş, bakterinin sağlıklı bitkilerde hastalık meydana getirdiğini, simptom gösteren kısımlardan örnek alınıp izole edildiğinde ise yeniden izolat elde edildiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmanın ana materyalini survey sırasında toplanan hastalık belirtisi gösteren fındık çotanak ve yaprakları oluşturmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmanın ana materyalini survey sırasında toplanan hastalık belirtisi gösteren fındık çotanak ve yaprakları oluşturmuştur.

3.1. Survey Çalışmaları

Çalışma; Türkiye fındık üretiminde 3. sırada bulunan Samsun İli'nde fındık üretim alanlarını oluşturan Çarşamba, Terme, Salıpazarı, Tekkeköy, Ondokuzmayıs ve Atakum İlçelerindeki fındık bahçelerinde yürütülmüştür.

Karadeniz sahil şeridinin orta bölümünde Yeşilırmak ve Kızılırmak Nehirlerinin Karadeniz’e döküldükleri deltalar arasında yer alan Samsun; 9.083 km²’lik bir yüz ölçüme sahiptir. Coğrafi konum olarak 40° 50’ - 41° 51’ kuzey enlemleri, 37° 08’ ve 34° 25’ doğu boylamları arasındadır. Kuzeyinde Karadeniz’in yer aldığı İlin komşuları; doğusunda Ordu, batısında Sinop, güneyinde Tokat ve Amasya, Güney batısında ise Çorum illeridir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Samsun'un coğrafi konumu

Samsun, yeryüzü şekilleri bakımından üç ayrı özellik gösterir. Birincisi güneyindeki dağlık kesim, ikincisi; dağlık kesimle kıyı şeridi arasında kalan yaylalar, üçüncüsü; yaylalarla Karadeniz arasındaki kıyı ovalarıdır. Kızılırmak ve Yeşilirmak akarsularının delta alanlarında oluşmuş kıyılarında, yurdumuzun tarımsal potansiyeli en yüksek ovalarından Bafra ve Çarşamba ovaları yer almaktadır (Anonymous, 2012). Atakum, Alaçam, Asarcık, Ayvacık, Bafra, Canik, Çarşamba, Havza, İlkadım, Kavak, Ladik, Ondokuzmayıs, Salıpazarı, Tekkeköy, Terme, Vezirköprü, Yakakent olmak üzere 18 ilçeye ayrılmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Samsun'un ilçeleri

Karadeniz iklim özelliklerini taşıyan Samsun'un sahil kesimlerinde yazlar ve kışlar ılıman, iç ve dağlık kesimler ise yazlar serin, kışlar daha sert geçmektedir. Yağış miktarı, Karadeniz sahil şeridindeki diğer illere oranla daha azdır. Samsun'da yıllık yağış ortalaması 735 mm'dir. Yağış miktarı, mevsimlere göre çok büyük farklılıklar göstermemekle beraber kışın ve ilkbaharda daha fazla düşmektedir (Anonymous, 2012 c).

TÜİK 2011 verilerine göre Samsun İli'nde 883.410 dekar alan, toplam 47.012.665 ağaçta 52.087 ton fındık üretimi yapılmıştır. Verim ağaç başına ortalama 1 kg'dır.

İlçeler TÜİK tarımsal üretim verilerine göre, en çok fındık ocağı bulunan ilçeler sıralaması ve 2010 üretim miktarları göz önünde bulundurularak seçilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Survey yapılan ilçelere göre ocak sayıları

İlçe	Meyve Veren Ağaç Sayısı	Üretim Miktarı (ton)	Gezilen Bahçe Sayısı
Atakum	1.225.000	1.556	9
Çarşamba	12.897.500	12.184	20
Ondokuzmayıs	1.125.000	2.700	8
Salıpazarı	6.908.000	8.776	12
Tekkeköy	2.777.500	6.111	9
Terme	11.750.000	10.975	20
Toplam	36.683.000	42.302	78

Fındık üretim alanlarında *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın yaygınlık ve şiddetini tesbit etmek üzere 2011 ve 2012 yıllarında Haziran – Ağustos ayları arasında aynı ilçe, köy ve bahçelerde ayrı ayrı survey yapılmıştır. Örnek toplanacak köyler seçilirken köylerin bulundukları ilçeyi temsil etmesi açısından sahil – orta – yüksek kuşaklarda bulunan köyler olmasına dikkat edilmiştir. Sahil 0 – 250 m., orta kuşak 250 – 500 m., yüksek kuşak ise rakımı 500 m.'den fazla olan kesimler olarak değerlendirilmiştir.

Hastalığın yaygınlık tespitini gerçekleştirmek amacıyla toplanan örnekler tesadüfî örnekleme yöntemine göre toplanmıştır. Fındık bahçelerinden köşegenler doğrultusunda yürünerek, bahçe büyüklüğüne göre 25 - 100 yaprak örneği alınmıştır. Her yaprak bir ocağı temsil etmektedir. Yaprak örnekleri kese kağıdına konulup etiketlendikten sonra laboratuvara getirilerek *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın

tipik semptomlarını değerlendirilmiş ve hastalığın yüzde yaygınlık oranları bahçe, köy, ilçe ve il bazında hesaplanmıştır.

Her bahçede hastalık belirtisi gösteren bitkiler, incelenen toplam bitki sayısına oranlanarak hastalıklı bitki yüzdeleri tespit edilmiştir. İncelenen alanlarda hastalık oranı ve hastalık şiddeti belirlendikten sonra, tartılı ortalama ile ilçelere ve ilde ait hastalık değerleri belirlenmiştir (Bora ve Karaca, 1970).

Hesaplama formülleri řu şekildedir:

$$\text{Bir Bahçede Hastalık Yaygınlık Yüzdesi} = \frac{\text{Hastalıklı Bitki Sayısı}}{\text{Toplam Bitki Sayısı}} \times 100$$

$$\text{Bir Köyde Hastalık Yaygınlık Yüzdesi} = \frac{\text{Toplam Hastalıklı Bitki Sayısı}}{\text{Toplam Bitki Sayısı}} \times 100$$

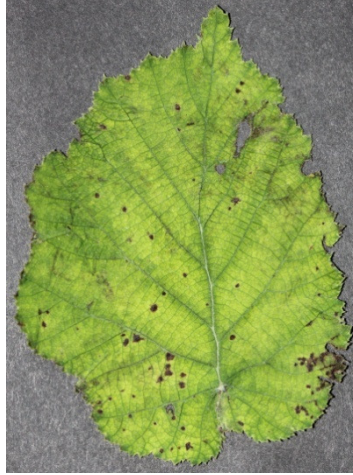
$$\text{Bir İlçede Hastalık Yaygınlık Yüzdesi} = \frac{\text{Köylerdeki Toplam Hastalıklı Bitki Sayısı}}{\text{Köylerdeki Toplam Bitki Sayısı}} \times 100$$

$$\text{Bir İlde Hastalık Yaygınlık Yüzdesi} = \frac{\text{İlçelerdeki Toplam Hastalıklı Bitki Sayısı}}{\text{İlçelerdeki Toplam Bitki Sayısı}} \times 100$$

Hastalık şiddetini hesaplamak amacıyla 0 – 5 skolasından faydalanılmıştır. Buna göre; 0: Sağlıklı yaprak, 1: Yaprak alanının 1/5'i lekeli, 2: yaprak alanının 2/5'i lekeli, 3: Yaprak alanının 3/5'i lekeli, 4: Yaprak alanının 4/5'i lekeli, 5: Yaprak alanının 4/5'den fazlası lekeli olarak değerlendirilmiştir (şekil 3.3).



0: Sağlıklı yaprak



1: Yaprak alanının 1/5'i lekeli



2: yaprak alanının 2/5'i lekeli



3: Yaprak alanının 3/5'i lekeli



4: Yaprak alanının 4/5'i lekeli



5: Yaprak alanının 4/5'den fazlası lekeli

Şekil 3.3. Fındık bakteriyel yanıklık hastalığının 0 – 5 skalası.

Hastalık şiddetinin hesaplanmasında kullanılan formül:

$$\text{Bahçede Hastalık Ş.} = \frac{\text{Sıfır Skalasındaki Bitki Sayısı} \times 0 + \dots + \text{Beş Skalasındaki Bitki Sayısı} \times 5}{\text{Toplam Bitki Sayısı} \times \text{Maksimum Skala Değeri}} \times 100$$

$$\text{İlçede Hastalık Şiddeti} = \frac{(\% \text{Hastalık Şiddeti} \times \text{Arazi Büyüklüğü}) + \dots}{\text{Toplam Arazi Büyüklüğü}} \times 100$$

$$\text{İlde Hastalık Şiddeti} = \frac{(\% \text{Hastalık Şiddeti} \times \text{Arazi Büyüklüğü}) + \dots}{\text{Toplam Arazi Büyüklüğü}} \times 100$$

3.2. İzolasyon Çalışmaları

X. arboricola pv. *corylina*'nın izolatlarını elde etmek amacıyla simptom gösteren ocaklardan yaprak ve çotanaklar örnek olarak toplanmıştır. Toplanan hastalıklı bitki örnekleri etiketli kese kağıdına konularak içerisinde buz kalıpları bulunan kapta laboratuara getirilmiş ve örnekler izolasyon işlemine kadar + 4 °C'de buzdolabında bekletilmiştir.

Hastalık belirtisi taşıyan fındık yaprak ve çotanaklarındaki zuruflar üzerinde simptom görünen bölgeyi kapsayacak şekilde bistüri yardımıyla 2 - 4 mm büyüklüğünde doku parçaları kesilerek bu parçalar % 1'lik NaOCl çözeltisinde 2 dakika süreyle bekletilmiş, böylelikle yüzeysel dezenfeksiyon sağlanmıştır. Yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulan doku parçaları steril saf sudan geçirildikten sonra steril kurutma kağıdıyla kurulanmıştır. Steril doku parçaları, 2 ml'lik steril ependorf tüpler içerisine konulduktan sonra üzerine 300 µl saf su ilave edilmiştir. Steril homojenizatör yardımıyla bitki parçaları steril ependorf tüp içerisinde iyice ezilmiş ve örnekler oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkube edilmiştir. İnkubasyondan sonra her örnekten 50 ve 100 µl'lik miktarlarda sıvı alınarak GYCA ve NGA besi ortamlarına ayrı ayrı drigalski baget yardımıyla aşılama yapılmıştır.

Ekim yapılan petriler 24 – 26 °C sıcaklıkta 48 saat süreyle inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresince petrilerde bakteriyel gelişim olup olmadığı periyodik olarak kontrol edilmiştir. Yeterli sayı ve büyüklükte gelişen koloniler yeni besi ortamına alınarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminde parlak görünümlü, mukoid, düzgün kenarlı olan koloniler seçilmiş, saflaştırılan izolatlar mikrobanka alınarak etiketlenmiş ve – 20 °C'de tanı çalışmaları için muhafaza edilmiştir.

Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Agar (GYCA):

Yeast extract	5.0 g
Glucose	5.0 g
CaCO ₃ (ince öğütölmüş toz)	40 g
Agar	15g
Saf su	1 lt

Yukarıdaki ortam içeriğı tartılarak üzerine 1 l'lik su ilave edilmiştir. Ortam otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edildikten sonra manyetik karıştırıcıda petrilere dökölene kadar 150 rpm'de karıştırılarak homojenizasyonu sağlanmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

Nutrient Glucose Agar (NGA)

Beef extract	3.0 g
Pepton	5.0 g
Glukoz	2.5 g
Agar	15 g
Saf su	1 lt

3.3. Çalışmalar Sırasında Kullanılan Standart Költürler, Ortamlar ve**Teşhis Yöntemleri**

Elde edilen izolatların teşhis edilmesinde biyokimyasal ve moleköler tanı testlerinden yararlanılmıştır. Biyokimyasal testler, moleköler tanı testini destekleyici amaçla yapılmıştır. Uygulanan biyokimyasal testler *Xanthomonas* cinsi için tanılayıcı olan testlerdir. Bunlar; Gram Boyama, KOH'de Çözünme, Katalaz, Oksidasyon – Fermantasyon, Jelatini eritme, Nişastanın Hidrolizi, Eskulinin Hidrolizi, Karbon kaynaklarını kullanılması testleridir. Moleküler karakterizasyonda ise Touchdown Koloni PCR yöntemi kullanılmıştır.

3.3.1. Gram boyama testi

Elde edilen bakteri izolatlarının gram pozitif veya gram negatif olduğunu ayırt etmek amacıyla Gram boyama testi kullanılmıştır.

I. Çözelti İçeriği:

A çözeltisi:	Crystal violet	2 g
	Etil alkol (%95)	20 ml
B çözeltisi:	Amonyum oksalat	0,8 g
	Saf su	80 ml

A ve B çözeltileri ayrı ayrı hazırlandıktan sonra karıştırılarak filtre kağıdından geçirilmiştir.

II. Lugol Çözeltisinin İçeriği:

İyodin	1 g
Potasyum İyodid	2 g
Saf su	300 ml

III. Safranin Çözeltisinin İçeriği:

Stok çözeltisi:	Safranin 0	2,5 g
	Etil alkol (% 95)	100 ml
Kullanma çözeltisi	Stok çözeltisi	10 ml
	Saf su	90 ml

Lamın ortasına bir damla steril su damlatıldıktan sonra, besi yerinde 24 saat gelişmiş fındık bakteriyel yanıklık etmeni kolonilerinden öze yardımı ile alınmış, su damlası içerisine dairesel hareketlerle karıştırılmış, lam üzerine yayılmış ve bakterilerin lama fikse olmaları için lam hafifçe alevden geçirildikten sonra oda sıcaklığında bekletilerek kuruması sağlanmıştır.

I. solüsyondan lam üzerine dökülüp, 1 dakika beklendikten sonra musluk suyu ile indirekt olarak yıkanıp kurutma kağıdıyla hafifçe kurulanmıştır. Daha sonra lam

üzerine Lugol solüsyonu konulup 1 dakika bekletildikten sonra yine indirekt olarak musluk suyuyla yıkanarak kurutma kağıdıyla hafifçe kurulanmıştır.

% 95'lik etil alkol bulunan bir kaba lam batırılarak 25 saniye kadar beklenip ve birkaç saniye suda yıkandıktan sonra tekrar hafifçe kurulanmıştır. Son aşama olarak ise Safranin solüsyonunda 10 saniye süreyle zıt boyama yapılmış, suda indirekt olarak yıkanmış, kurutma kağıdında kurutulmuştur (Gram, 1884). Lam üzerine sedir yağı damlatılıp 100X objektifle incelenmiştir.

3.3.2. KOH testi

Taze hazırlanan % 3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra NGA'da 24 – 26 °C'de 48 saat süreyle geliştirilen izolatlar bir öze dolusu alınarak çözeltiye batırılmış ve dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. Öze 15 - 20 saniye sonra yukarı kaldırıldığında ipliğimsi bir sünmenin oluşması durumunda izolatın Gram negatif bakteri, sünmenin oluşmaması durumunda ise Gram pozitif bakteri olduğuna karar verilmiştir (Sands, 1990).

3.3.3. Katalaz testi

Lam üzerine % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂)'ten 1 ml damlatılıp, daha sonra NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen izolatlardan bir öze dolusu alınarak çözeltiye batırılmıştır. Reaksiyon sonucunda hava kabarcıklarının çıkması izolatın pozitif reaksiyon verdiğini göstermiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.3.4. Oksidasyon – fermentasyon testi

Bu test, karbonhidratların oksijenli ve oksijensiz ortamda kullanımlarını tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

NH ₄ H ₂ PO ₄	1g
KCl	0.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g

Bromthymolblue	0.08 g
Saf su	900 ml
Agar	3 g

Maddeler agar haricinde tartılıp, erlenmayer içerisinde çözelti haline getirildikten sonra çözeltinin pH'sı % 40'lık NaOH ile 7.0 – 7.1'e ayarlanmıştır. Bu durumda ortamın rengi zeytin yeşili renge dönüşmüştür. Ortama agar ilave edildikten sonra otoklavda 121 °C'ye ısıtılarak maddelerin homojenizasyonu sağlanmıştır. Elde edilen karışım 7 ml'lik miktarlarda tüplere paylaştırılmış ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiş, dik şekilde bekletilerek donmaları sağlanmıştır.

Her izolat için oksijenli ve oksijensiz olmak üzere iki tüp kullanılmıştır. NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen izolatlardan bir öze dolusu alınarak tüplere batırılmış, daha sonra bu tüplerden birisinin üzerine % 3'lük agar dökülerek hava ile teması kesilmiştir. Tüplerin üzerleri etiketlendikten sonra ağzları pamukla kapatılmış ve izolatlar 24 – 26 °C'de bir hafta süreyle inkubasyona bırakılmıştır.

İnkubasyon süresi sonunda pozitif reaksiyon veren izolatlar glikozdan asit üretimi sonucu ortamın zeytin yeşil rengini portakal – sarı renge dönüştürmüştür.

3.3.5. Jelatini eritme testi

Xanthomonas türlerinin çoğunun jelatini hidrolize ettiği bilinmektedir. Ortam (Pepton 5 g, Beef extract 3 g, Jelatin 120 g, Saf su 1 L) 121 °C'de homojenize edildikten sonra 7 ml miktarda deney tüplerine paylaştırılmış, 121 °C'de 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen izolatlar öze yardımıyla tüplere aşılınıp etiketlenmiş ve 24 - 26 °C'de bir hafta süreyle inkubasyona bırakılmıştır. Jelatinin eritilip eritilmediğini anlamak için tüpler + 4 °C'de buzdolabında 30 dakika bekletilmiş, pozitif reaksiyon veren izolatların jelatini erittiği gözlemlenmiştir.

3.3.6. Nişastanın hidrolizi testi

Ortam (Yeast extract 5 g, Peptone 5 g, Beef extract 5 g, Agar 15 g, Eriyebilir nişasta 2 g, Saf su 1 g) 121 °C'de 20 dakika süreyle sterilize edilip ve petrilere dökülmüştür. NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen izolatlar petrilere çizilmiş, 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat inkubasyondan sonra petrinin üzerine Lugol solusyonu (İyot 1 g, Potasyum iyodür 2 g, Saf su 100 ml) dökülmüştür. Pozitif reaksiyonda siyah renge dönüşen ortamda gelişen kolonilerin etrafında renk açılması meydana gelmiştir.

3.3.7. Eskulinin hidrolizi testi

Bir glikozit olan eskulinin tüm *Xanthomonas campestris* pathovarları tarafından parçalanarak glikoz ve dihidrocumarin'e ayrıştırıldığı bilinmektedir.

<u>Ortam içeriği</u>	<u>(g / l)</u>
Yeast extract	5.0
NaCl	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	0.5
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
Ferric amonyum sitrat	50 mg
Esculin (Sigma)	
pH 6.8	

Ortam içeriği kullanılarak hazırlanan besi yerine çizilen izolatlar 28 °C'de 28 gün süreyle inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresince ortamdaki bakterilerin durumu her gün kontrol edilmiştir.

3.3.8. Karbon kaynaklarının kullanılması testi

<u>Ortam içeriği</u>	<u>g / L</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	5.0
Yeast Extract	0.8
Agar	12.0
Bromthymolblue	0.002
Karbon kaynağı	2.0

pH 6.8

Ortam içeriği agar haricinde hazırlanmış ve % 40'lık NaOH ile pH'sı 6.8'e ayarlandıktan sonra agar eklenip 121 °C'de homojenize edilerek tüplere paylaştırılmıştır. Tüpler 121 °C'de 20 dakika süreyle otoklavda sterilize edilerek eğik agar şeklinde dondurulmuştur. Bu testin uygulanmasında D (-) Arabinose, D (+) Galactose, Erythritol, D (+) Mannose, D (+) Xylose, L (+) Rhamnose, D (+) Trehalose, D – Sorbitol, L (+) Arabinose, Raffinose, Cellobiose, Mannitol, Glukoz, Maltoz, Gliserin karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

İzolatlar tüplere çizildikten sonra 24 – 26 °C sıcaklıkta bir hafta süreyle inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon süresi sonunda ortamda renk değişikliği olup olmadığı gözlenmiştir.

3.3.9. Tütünde aşırı duyarlılık testi

NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen izolatların 10⁶ – 10⁸ hücre/ml'lik süspansiyonları hazırlanmış, bu süspansiyonlar tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun N) bitkisi yaprağının alt yüzey damar aralarına enjektör yardımı ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan 24 - 48 saat sonra tütün bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonunun olup olmadığı kontrol edilmiştir (Klement et al., 1990).

3.3.10. Patojenite testi

Patojenite testi için 1 yıllık Palaz fındık çeşidinin fidanları kullanılmıştır. Bunun için NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen izolatların $10^6 - 10^8$ hücre / ml'lik süspansiyonları hazırlanmıştır. Denemeler 3 tekerrürlü ve 2 kez tekrarlanarak yapılmıştır. Bu süspansiyonlar yaprakların alt kısmının damar aralarına enjekte edilmiştir (Gardan and Devaux, 1987). Bakteriyel izolatların pozitif kontrolü için Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü'nden alınan Z5C isimli izolat, negatif kontrol olarak ise steril saf su kullanılmıştır. İzolatların inokule edildiği fidanlar iklim odasında 26 – 28 °C'de % 60 - % 70 orantılı nem koşullarında bir hafta süreyle inkube edilmiştir. Nekrotik lekelerin geliştiği bölgelerden tekrar izolasyon yapılarak, elde edilen izolatların biyokimyasal ve moleküler tanıları tekrar yapılmış ve teşhislerin doğruluğu kontrol edilmiştir. Denemeler 3 tekerrürlü ve 2 kez tekrarlanarak yapılmıştır.

3.3.11. Moleküler tanılama

İzolatların moleküler karakterizasyonu için touchdown koloni PCR'ı yapılmıştır. PCR işlemi için izolatların NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen kolonilerinden yararlanılarak PCR yapılmıştır. PCR çoğaltma işleminde 24 saatlik kolonileri geliştirilmiştir. PCR çoğaltma işleminde üç farklı uluslar arası izolat genomundan 'Primer 3 Input Version 4.0' programı kullanılarak acnB – F (ACATTCCGTTCATTCCGAAC), acnB – R (AACAGCACGTCCGACTTCAT), 935 – F (TGGAAGCTGTTGATGCTG), 935 – R (GTCGAAACGCAGCTGGTAG), LGM688 – F (TGGAAGCTGTTGATGCTG) ve LGM688 – R (GCATCTTCGATACGCACCTG) isimli baz dizileri elde edilmiş, bu baz dizileri özel bir firmadan primer olarak sentezletilmiştir.

PCR çoğaltma işleminde reaksiyon karışımı olarak; her bir PCR tüpü için 18.3 µl steril saf su, 2.5 µl 10X PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.0% Triton X 100), 1 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTPs (10 mM each dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 µl 20 µM ileri primer, 1 µl 20 µl ters primer ve 0.2 µl *Taq* polymeraz olarak toplam 25 µl'lik hacimde hazırlanmış ve bu tüplerin içerisine küçük gelişimli bakteri kolonisi ilave edilmiştir. PCR döngüsü işlemi Sambrook et al. (1989)'e göre yapılmıştır. Buna göre;

Touchdown PCR için kullanılan program şu şekildedir:

<u>Sıcaklık</u>	<u>Döngü</u>
95 °C	4'
95 °C	30"
65 °C	30"
	Decrease 1 döngü
72 °C	1.5'
	Cycle 2 – 9 kez
95 °C	30'
56 °C	30'
72 °C	30"
	Cycle 6 – 24 kez
18 °C	Forever

Elde edilen PCR ürünleri % 1'lik Agaroz – jelde koşturularak görüntüleri elde edilmiştir. Agaroz jelin hazırlanması için 0.9 g agaroz 90 ml'lik 1 x TAE tamponuna konulmuş, mikrodalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulan solusyona bantların görülmesi için 10 mg / ml ethidium bromür ilave edilmiş, tarafları yerleştirilen jel tepsisine dökülmüştür. Agaroz jelin donmasından sonra jel tankı içerisine jeli örtünceye kadar 1 x TBE buffer konmuştur. Daha sonra jeldeki tarak dikkatlice çekilerek çıkarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan agaroz jel çukurlarına 3µl loading buffer ve 12µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımı ile dikkatlice verilmiştir. Moleküler ağırlık işaretleyici olarak “Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder” kullanılmıştır. Elektroforez tankında agaroz jeldeki örnek hücrelerin bulunduğu yer güç kaynağının negatif (-) kutbuna denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve PCR ürünleri 100V elektrik akımında yaklaşık 1 saat süre ile koşturulmuştur. Daha sonra PCR ürünleri transliminatörde (302 nm) incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Survey Çalışmalarının Sonuçları

4.1.1. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın ilçelere göre yaygınlık ve şiddeti

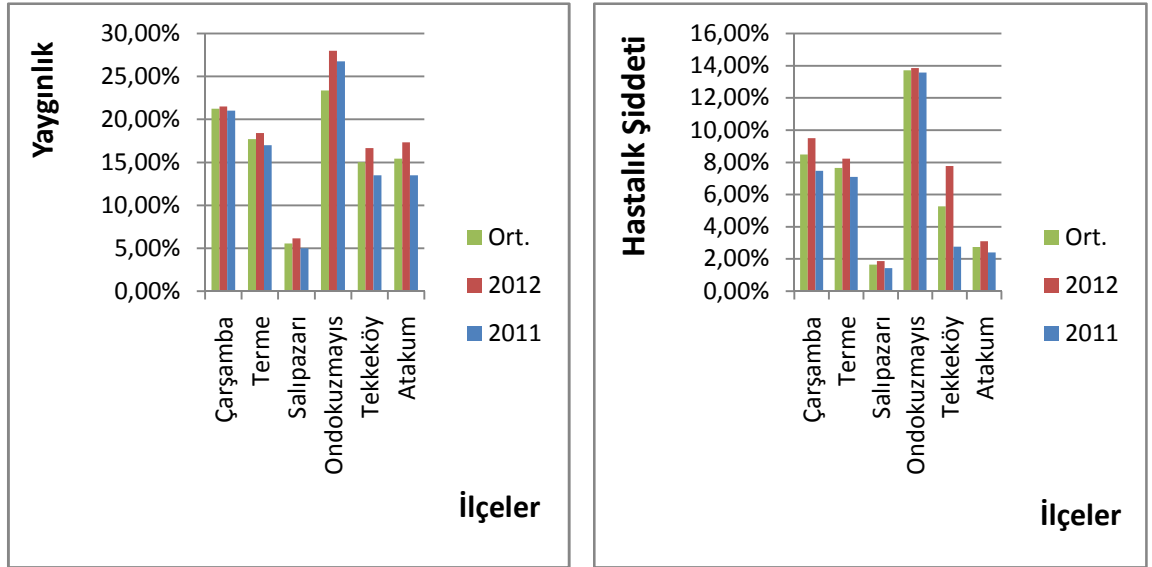
Samsun'da fındık üretiminin önemli ölçüde yapıldığı, Çarşamba, Terme, Salıpazarı, Ondokuzmayıs, Tekkeköy ve Atakum İlçelerinde 2011 ve 2012 Haziran – Ağustos ayları arasında fındık üretim alanlarında yapılan arazi çalışmaları sonucunda hastalık yaygınlığı tespit edilmiştir. 2011 ve 2012 yıllarının aritmetik ortalamasına göre hastalık yaygınlığı Çarşamba'da % 21.25, Terme'de % 17.70, Salıpazarı'nda % 5.57, Ondokuzmayıs'ta % 27.37, Tekkeköy'de % 15.03, Atakum'da % 15.41 seviyesindedir. Hastalığın şiddeti ise; Çarşamba'da % 8.48, Terme'de % 7.66, Salıpazarı'nda % 1.64, Ondokuzmayıs'ta % 13.71, Tekkeköy'de % 5.26, Atakum'da % 2.75 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın ilçelere göre yaygınlık durumu ve hastalık şiddeti *TÜİK 2011

İlçe	Fındık Üretim Alanı (da)*	İncelenen		Yaygınlık Oranı (%)		Ort. (%)	Hastalık Şiddeti (%)		Ort. (%)
		Bahçe (Adet)	Alan (da)	2011	2012		2011	2012	
Çarşamba	247.100	20	452	21	21,5	21,25	7,47	9,50	8,48
Terme	259.610	20	476	17	18,41	17,70	7,1	8,22	7,66
Salıpazarı	139.930	12	228	5	6,15	5,57	1,43	1,86	1,64
Ondokuzmayıs	27.140	8	86	26,75	28	27,37	13,58	13,85	13,71
Tekkeköy	54.880	9	103	13,5	16,66	15,08	2,76	7,77	5,26
Atakum	24.330	9	65	13,5	17,33	15,41	2,4	3,1	2,75
Toplam	752.990	78	1.410	Ort. 16,12	Ort. 18,00	17,06	Ort. 5,79	Ort. 7,38	6,58

Survey çalışması sırasında 1.410 da'lık alanda 6.476 ocak incelenmiş bu ocaklardan 1.042 adedinde fındık bakteriyel yanıklık etmeni belirtisine rastlanmıştır. İncelemeler sırasında yaşlı, dalları uzamış ve gençleştirme yapılmamış, sıra aralarına güneş ışığı almayan fındık ocaklarında hem meyve oluşumunun zayıf olduğu, hem de hastalık belirtisinin oluşmadığı gözlenmiştir. Hastalığın daha ziyade genç ocaklarda ve denize yakın olan nem oranı yüksek sahil kuşağında yaygın olduğu tespit edilmiştir.

Hastalık yaygınlık ve şiddetinin yıllara göre karşılaştırması yapıldığında; 2011 yılında hastalık yaygınlık ve şiddetinin 2012'ye göre daha az olduğu görülmektedir. hastalık etmeninin 2011 Haziran – Ağustos ayları sıcaklık (24 °C) ve nem (% 68,5) ortalamalarının hastalık yaygınlık ve şiddetini (Ort. Yaygınlık %16,12; Ort. Şiddet % 5,76) teşvik ettiği, ancak 2012 yılı sıcaklık (24,5 °C) ve nem (% 77,45) ortalama verilerine bakıldığında hastalık yaygınlık ve şiddetinin (Ort. Yaygınlık % 18, Ort. Şiddet % 7,38) arttığı gözlenmiştir. Hastalık yaygınlık ve şiddetinin 2012 yılında artmasına sıcaklıkların aynı kalmasına rağmen nem faktörünün etkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 İlçelere göre hastalık şiddet ve yaygınlık grafiği

4.1.2. İlçelerde inceleme yapılan köyler ve elde edilen izolat sayıları

Çizelge 4.2. Elde edilen izolat sayılarının ilçeler ve köylere göre dağılımı

İlçe	Köy	Bahçe Sayısı	İzolat Sayısı	Xac. İzolat Adı
Atakum	Merkez Mh.	2	2	AT2, AT2/Z
	Erikli Köyü	3	3	AT7, AT8, AT8/Z
	Özören Köyü	3	2	-
	Yalı Mh.	1	2	-
Çarşamba	Ağcagüney Beld.	3	4	-
	Bafracalı	2	1	-
	Durusu	4	1	-
	Esençay	2	-	-
	Kirazbucağı	1	3	Ç1
	Şeyhgüven	3	1	-
	Ustacalı	1	1	-
	Yeni Karacalı	3	2	Ç16 – Ç20
Ondokuzmayıs	Esenyer	1	-	-
	Köselik	2	1	-
	Mimar Sinan Mh.	3	1	-
	Ormancık	2	-	-
Salıpazarı	Çiçekli	2	-	-
	Fındıklı	2	1	-
	Kalfalı	1	-	-
	Kocalar Mh.	1	-	-
	Kuşcağız	4	2	-
	Tepealtı	1	-	-
	Yavaşbey Mh.	2	-	-
Tekkeköy	Balcalı	3	3	-
	Kababürük	2	-	-
	Ulaş	1	1	TK3
	Yaylageriş	3	3	TK6/Z, TK7, TK7/Z
Terme	Akbucak	1	-	-
	Akçagün	1	1	-
	Bazlamaç Beld.	1	1	-
	Çardak	2	1	T20/Z
	Dibekli	1	1	T31
	Elmaköy	1	1	-
	Gündoğdu	1	1	T37/Z
	Kesikkaya	2	2	T8, T28/Z
	Kocaman Beld.	3	2	T1, T3
	Kocamanbaşı	3	3	T9, T9/Z, T26/Z
	Ortasöğütü	1	1	-
	Şuayp	1	-	-
	Yenicami	1	1	T13
	Yerli	1	1	T36/Z
Toplam	41 köy	78 bahçe	50 izolat	
		1560 örnek	24 Xac. izolatı	

Atakum’da 4 köyden 5, Çarşamba’da 8 köyden 3, Ondokuzmayıs’ta 4 köyden 0, Salıpazarı’nda 7 köyden 0, Tekkeköy’de 4 köyden 4, Terme’de 14 köyden 12 izolat olmak üzere toplam 24 *X. arboricola* pv. *corylina* izolatı elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

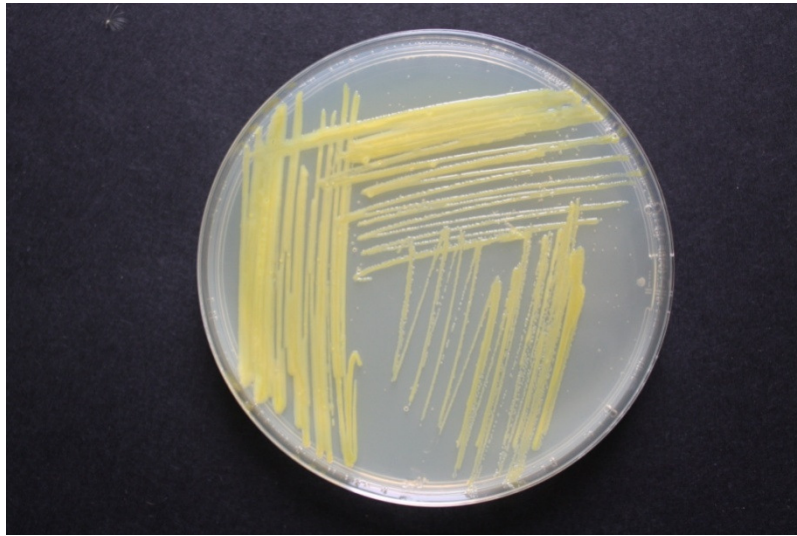
Surveylerde toplanan örneklerden laboratuvar çalışmaları sonucunda toplamda 50 bakteri izolatı elde edilmiştir. İzolasyon çalışmaları sırasında izolatların seçimi ve ayrımı ilk aşamada koloni renklerine göre yapılmıştır. Koloni rengine göre seçim yapılırken hedef bakteriyel etmenin sarı renkli koloni oluşturması nedeniyle bu renge

sahip izolatlar, tanısı yapılmak üzere ayrılmıştır. Koloni rengi portakal, pembe ve beyaz olan izolatların ise patojenik özelliğe sahip olup olmadıklarına bakılmıştır. Bunun için izolatlara tütünde aşırı duyarlılık ve fındıkta patojenite testleri yapılmıştır. Bu testler sonucunda tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu göstermeyen ve fındık yapraklarında nekroz oluşumuna yol açmayan izolatların patojenik özelliğe sahip olmadığına karar verilerek tanı testleri yapılmamıştır.

Sarı tonlarda gelişen tüm izolatların ise tanı testleri yapılmıştır. Buna göre 24 izolattan tamamının *X. arboricola* pv. *corylina* olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Laboratuvar Sonuçları

Arazi çalışması sonucunda hastalık belirtilerinin özellikle yapraklar ve çotanaklarda olduğu gözlenmiştir. Bitkinin bu yerlerinden toplanan ve laboratuvar ortamında izolasyonu yapılan *X. arboricola* pv. *corylina* için en uygun besi yerinin GYCA ve NGA olduğu bilinmektedir. GYCA ve NGA'ya aşıl原因 *X. arboricola* pv. *corylina*'nın 25 – 27 °C'de 3 – 4 gün inkubasyona bırakılması sonucunda gelişen kolonilerinin mukoid, sarı, parlak, akışkan formda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2, 4.3). Samsun İli fındık örneklerinden elde edilmiş izolatlar Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Z5C referans izolatıyla da karşılaştırıldığında, morfolojik olarak önemli ölçüde benzerlik taşıdıkları görülmüştür.



Şekil 4.2. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın NGA besi ortamında gelişimi



Şekil 4.3. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın GYCA besi ortamında gelişimi

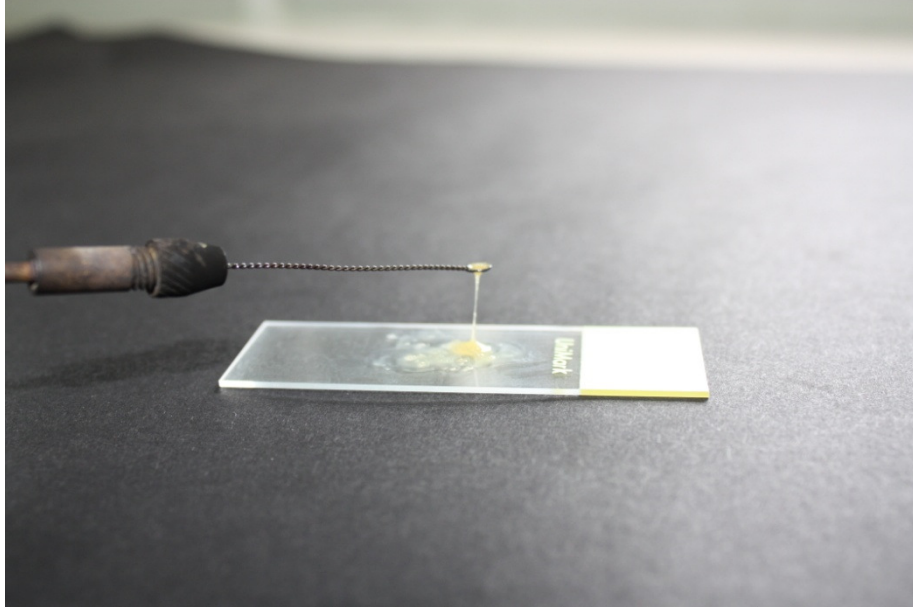
Tüm biyokimyasal testlerde; denemelere başlamadan önce sarı renkli koloniye sahip izolatlar, NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilmiştir.

4.2.1. Gram boyama testi

NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen 24 izolata Gram, 1884'e göre uygulanan Gram Boyama testi sonucunda izolatların tamamının Gram (-) olduğu tespit edilmiştir.

4.2.2. KOH testi

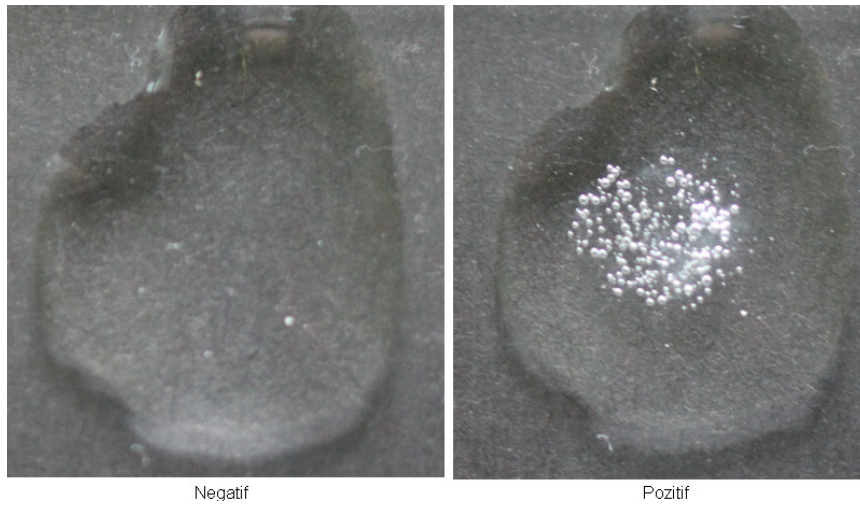
NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen sarı renkli koloniye sahip 24 izolatın test sonucunda pozitif reaksiyon verdiği, diğer bir ifadeyle KOH çözeltisi ile muamele edilen izolatlarda ipliğimsi bir sünmenin meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. KOH testi: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın pozitif reaksiyonu

4.2.3. Katalaz testi

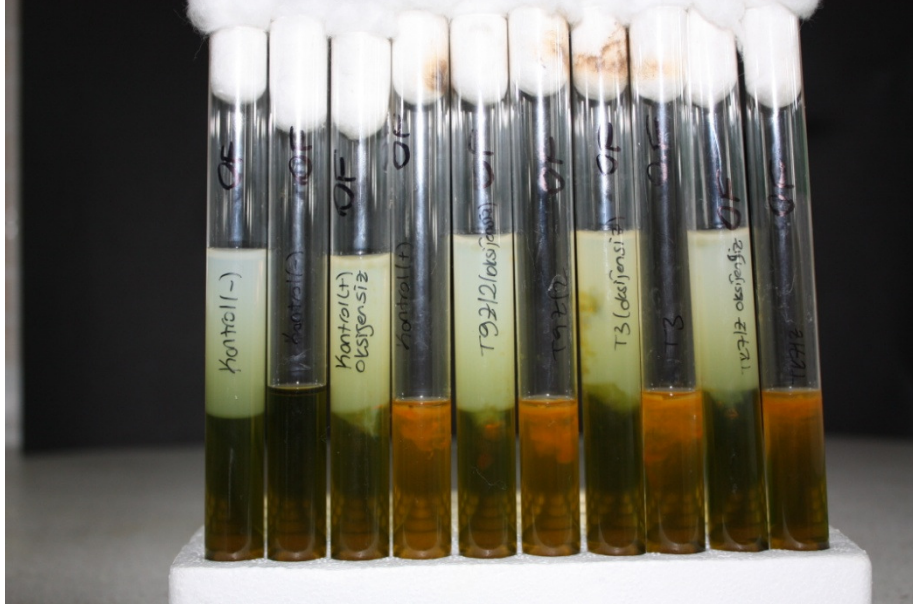
NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen sarı renkli koloniye sahip izolatlar bir lam üzerine damlatılmış H_2O_2 ile muamele edildiğinde çözeltide hava kabarcıklarının oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). Bu nedenle tüm izolatların teste pozitif reaksiyon verdiği kabul edilmiştir.



Şekil 4.5. Katalaz testi: pozitif reaksiyon; hava kabarcıkları oluşumu

4.2.4. Oksidasyon / fermentasyon testi

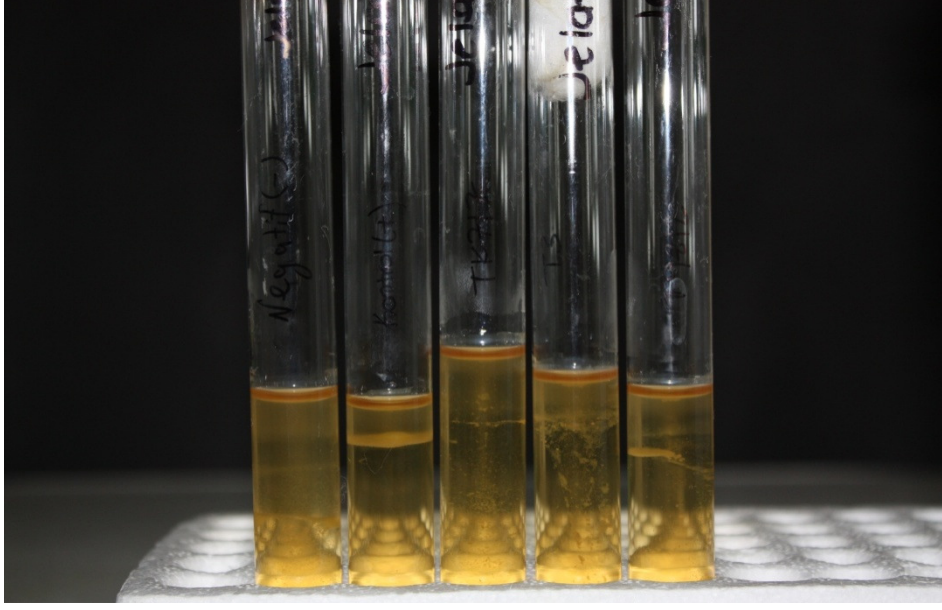
NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen sarı renkli koloniye sahip izolatlar oksijenli ve oksijensiz ortamlara aşılandığında 24 – 26 °C'de bir haftalık inkubasyon sonucunda tüm izolatların oksijenli ortamda geliştiği, diğer bir ifadeyle glukozdan asit üretimi sonucu ortamın zeytin yeşili renginin sarımsı – portakal rengine dönüştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Oksidatif – fermentatif reaksiyon testi: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın oksijenli koşullarda glukozdan asit üretimi

4.2.5. Jelatin eritme testi

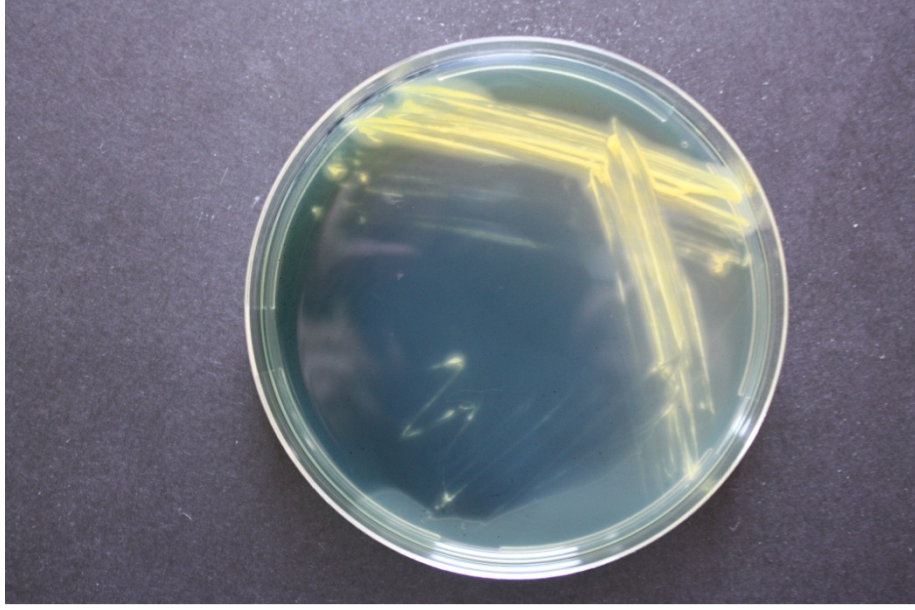
NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen sarı renkli koloniye sahip izolatlar tüplere aşılandıktan sonra 24 – 26 °C'de bir hafta süreyle inkube edilmiştir. Jelatin içeren ortam 24 – 26 °C'de sıvı ortama dönüşebildiğinden izolatların jelatini eritip eritmediğini anlamak amacıyla + 4 °C'de 30 dakika süreyle buzdolabında bekletilmiştir. Böylece jelatin içeren ortam katı forma dönüşürken, izolatların jelatini eritmesi sonucu üst kısımları sıvı forma dönüşmüştür. 24 izolatın tamamı jelatini eritmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Jelatin eritmesi testi: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın jelatini sıvılaştırması

4.2.6. Nişastanın hidrolizi testi

NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen sarı renkli koloniye sahip izolatlar nişasta içeren ortama aşılanmış ve 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle inkube edilmiştir. Koloni gelişimi olan petrilere logol solusyonu döküldüğünde ortam rengi siyaha dönüşmüştür. Pozitif reaksiyon sonucu kolonilerin bulunduğu bölgelerde renk açılması meydana gelmiştir (Şekil 4.8). Sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8. Nişastanın hidrolizi testi: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın pozitif reaksiyonu

4.2.7. Eskulin'in hidrolizi

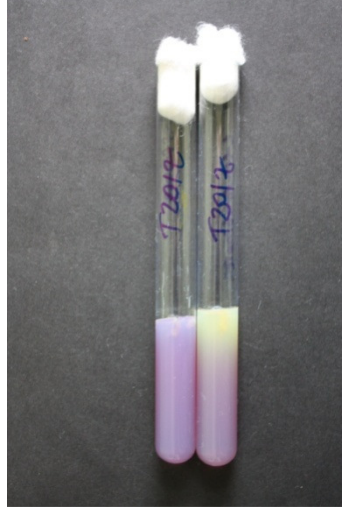
Besi yerine çizilen izolatlar 28 °C'de 28 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Eskulinin ayrışarak bakteri kolonilerinin etrafında siyahlanma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9). Bu gelişme pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9. Eskulin'in hidrolizi: siyahlanma oluşumu

4.2.8. Karbon kaynaklarının kullanılması testi

NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen sarı renkli koloniye sahip izolatlar, karbon kaynaklarının bulunduğu tüplere aşılandıktan sonra 24 – 26 °C'de bir hafta süreyle inkubasyona bırakılmıştır. Pozitif reaksiyon sonucunda ortamın mor rengi krem rengine dönüşmüştür (Şekil 4.10). Karbon kaynakları testinde 15 adet karbon kaynağı kullanılmıştır (Çizelge 4.3).



Şekil 4.10. Karbon kaynaklarının kullanılması testi: pozitif reaksiyon sonucu renk değişimi

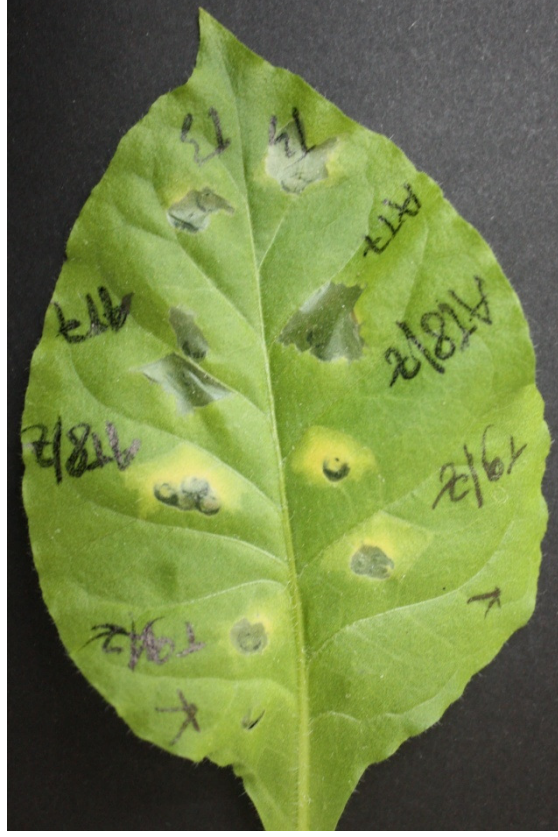
Çizelge 4.3. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın karbon kaynaklarını kullanım sonuçları

İzolat Kodu / Karbon Kaynağı	D-Arabinose	L-Arabinose	Glukoz	Galaktoz	Mannoz	D-Trehalose	D-Cellobiose	Gliserin	D-Xylose	L-Rhamnose	Raffinose	Adonitol	D-Mannitol	D-Sorbitol	Erythritol
EPPO	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
AT2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
AT2/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
AT7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
AT8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
AT8/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ç1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ç16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ç20	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
TK3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
TK6/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
TK7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T20/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T31	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T37/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T28/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T9/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T26/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T36/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

İzolatların tamamı Çizelge 4.3'teki karbon kaynakları kullanımlarına göre hem referans kültür hem de EPPO (2009)'ya göre % 100 uyumlu olduğu görülmüştür.

4.2.9. Tütünde aşırı duyarlılık testi

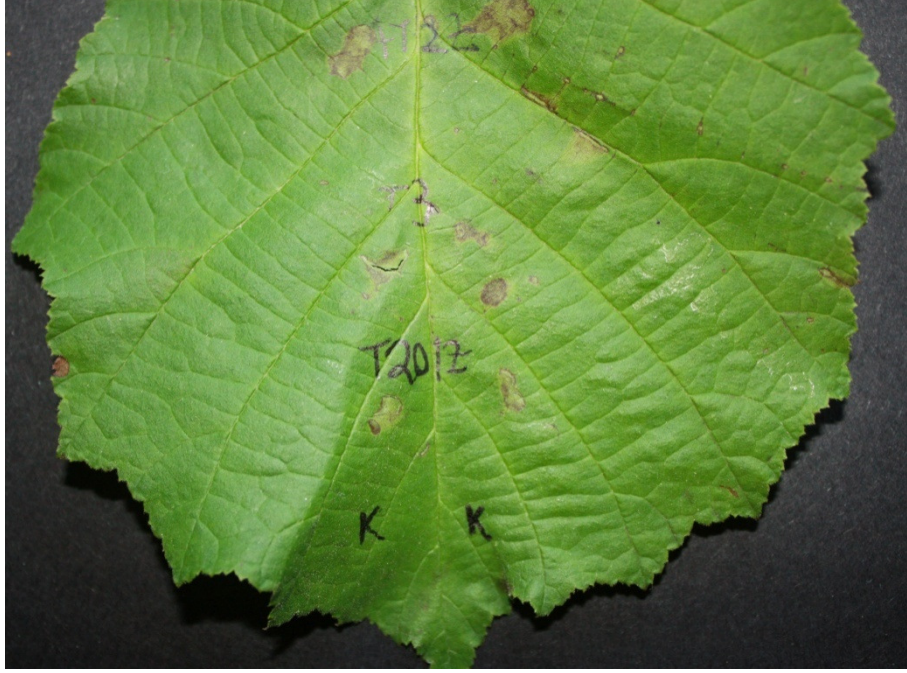
NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen izolatlar tütün bitkisinin (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun N) alt yaprak damar aralarına enjektör yardımıyla inokule edildikten sonra 24 – 26 °C'deki 3 günlük inkubasyon periyodunda sarı renkli kolonilere sahip 24 adet izolattan tamamı aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Tütünde aşırı duyarlılık testi: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın tütünde aşırı duyarlılık simptomsu

4.2.10. Patojenite Testi

NGA'da 24 – 26 °C'de 24 – 48 saat süreyle geliştirilen izolatların Palaz fındık çeşidinin alt yapraklarına enjektör yardımıyla izolatlar ve referans kültür, inokule edildikten bir hafta sonra yaprak yüzeylerinde nekrotik lekeler meydana getirmiştir (Şekil 4.12). Nekrotik leke gelişen bölgelerden tekrar izolasyon yapılarak, elde edilen izolatın biyokimyasal ve moleküler tanıları tekrar yapılmış ve yeniden elde edilen izolatların da *X. arboricola* pv. *corylina* oldukları saptanmıştır.



Şekil 4.12. Patojenite testi: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın fındık yapraklarında meydana getirdiği nekrotik lekeler

İzolatların teşhisine yönelik yapılan tüm biyokimyasal testler, tütünde aşırı duyarlılık ve patojenite testi sonuçları, EPPO (2009)'nun tanı kriterlerine % 100 uyumlu olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4).

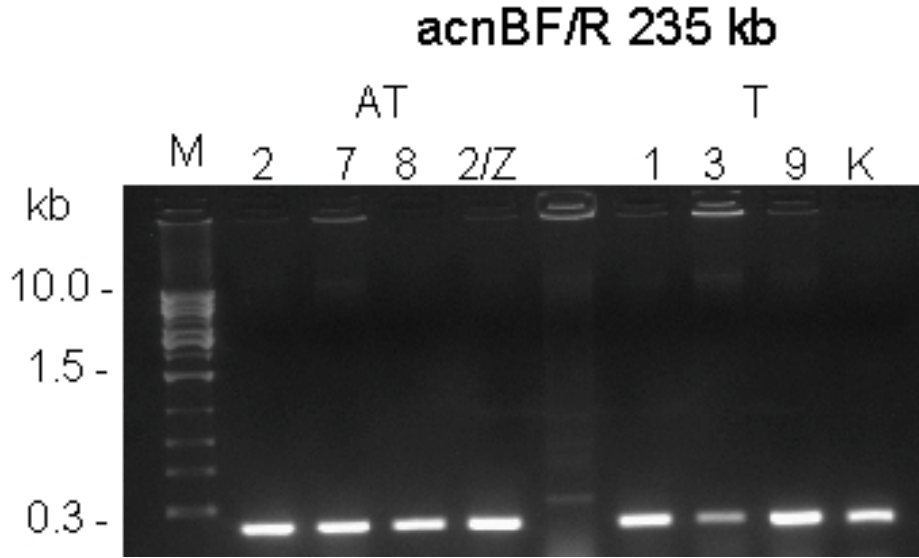
Çizelge 4.4. Fındık bakteriyel yanıklık etmeni izolatlarının tanı test sonuçları

İzolat Kodu/Test Adı	Gram Reak.	KOH Testi	Katalaz Testi	O/F	Jelatini Eritme Testi	Nişastanın Hidrolizi	Tütün HR	Patojenite	Moleküler Tanı
AT2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT2/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AT8/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ç1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ç16	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ç20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TK3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TK6/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TK7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T20/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T31	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T37/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T28/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T9/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T26/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T36/Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.2.11. Moleküler tanılama

Biyokimyasal testler sonucunda *X. arboricola* pv. *corylina* izolatı olarak belirlenen 24 adet izolatın kesin teşhisi amacıyla moleküler tanı için üç farklı uluslar arası izolat genomundan ‘Primer 3 Input Version 4.0’ programı yardımıyla acnB – F (ACATTCCGTTTCATTCCGAAC), acnB – R (AACAGCACGTCCGACTTCAT), 935 – F (TGGAAGCTGTTGATGCTG), 935 – R (GTCGAAACGCAGCTGGTAG), LGM688 – F (TGGAAGCTGTTGATGCTG) ve LGM688 – R (GCATCTTCGATACGCACCTG) isimli baz dizileri elde edilmiş ve bu baz dizileri özel bir firmada primer olarak sentezletilerek Touchdown Koloni PCR yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri % 1’lik agaroz jelde koşturularak transilatör

yardımıyla görüntüleri elde edilmiştir. Buna göre 24 adet izolatın tamamının *X. arboricola* pv. *corylina* olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* izolatlarının acnBF/R primerleri ile elde edilmiş PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada Samsun bölgesinde fındık üretim alanlarında *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın yaygınlık durumu ve hastalığın şiddetinin saptanması amaçlanmıştır. Survey çalışmalarından 6 ilçeye ait 78 fındık bahçesinden toplam 50 bakteri izolatu elde edilmiş, yapılan biyokimyasal ve moleküler testler sonucunda; bunlardan 24 tanesinin *X. arboricola* pv. *corylina* olduğu sonucuna varılmıştır.

Samsun'da fındık üretiminin önemli ölçüde yapıldığı, Çarşamba, Terme, Salıpazarı, Ondokuzmayıs, Tekkeköy ve Atakum ilçelerinde 2011 ve 2012 Haziran – Ağustos ayları arasında fındık üretim alanlarında yapılan arazi çalışmaları sonucunda fındık bakteriyel yanıklık hastalığının yaygınlık ve şiddet ortalamaları ilçelere göre belirlenmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Fındık bakteriyel yanıklık etmeninin 2011 – 2012 Haziran – Ağustos aylarına ait ortalama hastalık yaygınlık ve şiddet oranları.

	Yaygınlık Oranı (%)		Ort.	Hastalık Şiddeti (%)		Ort.	İklim Koşulları			
							2011		2012	
	2011	2012		2011	2012		Sıcaklık (°C)	Nem (%)	Sıcaklık (°C)	Nem (%)
Çarşamba	21	21,5	21,25	7,47	9,50	8,48	24	68,5	24,5	77,45
Terme	17	18,41	17,7	7,1	8,22	7,66				
Salıpazarı	5	6,15	5,57	1,43	1,86	1,64				
Ondokuzmayıs	26,75	28	27,37	13,56	13,85	13,71				
Tekkeköy	13,5	16,66	15,08	2,76	7,77	5,26				
Atakum	13,5	17,33	15,41	2,4	3,1	2,75				
Samsun	16,12	18	17,06	5,76	7,38	6,58				

Yapılan araştırmalarda hastalık etmeni *X. arboricola* pv. *corylina*'nın 1 - 4 yaş arası genç ağaçlarda zarar meydana getirdiği, bu ağaçlarda % 10 oranında ölüme neden olduğu ve meyvede meydana getirdiği zararlanmalar nedeniyle % 25 verim düşüklüğüne yol açtığı belirlenmiştir (EPPO, 2004). Bu çalışmada da surveyler sonucunda yaşlı fındık ağaçlarında hastalık belirtilerine rastlanılmamış, buna karşın yeni dikilmiş fidanlarda ve genç fidanlarda özellikle yaprak, zuruf ve meyvede hastalık belirtilerine rastlanmıştır.

Hastalık yaygınlık ve şiddetinin yıllara göre karşılaştırması yapıldığında; 2011 yılında hastalık yaygınlık ve şiddetinin 2012'ye göre daha az olduğu görülmektedir.

hastalık etmeninin 2011 Haziran – Ağustos ayları sıcaklık (24 °C) ve nem (% 68,5) ortalamalarının hastalık yaygınlık ve şiddetini (Ort. Yaygınlık % 16,12; Ort. Şiddet % 5,76) teşvik ettiği, ancak 2012 yılı sıcaklık (24,5 °C) ve nem (% 77,45) ortalama verilerine bakıldığında hastalık yaygınlık ve şiddetinin (Ort. Yaygınlık % 18, Ort. Şiddet % 7,38) arttığı gözlenmiştir. Hastalık yaygınlık ve şiddetinin 2012 yılında artmasına sıcaklıkların aynı kalmasına rağmen nem faktörünün etkili olduğu düşünülmektedir.

Alay ve ark. (1973) tarafından Samsun Merkez, Çarşamba ve Terme'deki fındık bahçelerinde yapılan survey çalışmalarında fındık bakteriyel yanıklık etmeni *X. arboricola* pv. *corylina*'ya ait izolatların elde edildiği bildirilmiş, hastalığın yaygınlık durumunun % 100 olduğu belirtilmiştir. Ancak o dönemdeki tanı kriterleri günümüzdeki tanı kriterleri ile karşılaştırıldığında gerçekte izole edilen bakteriyel etmenin *X. arboricola* pv. *corylina* olduğu tartışma konusudur. Ayrıca eğer doğru bir tanı yapılmışsa hastalık yaygınlık oranının % 100 olmasının optimum koşullar altında hastalık etmeninin epidemi yapabileceğini göstermektedir. Yapılan bu çalışma ile yaygınlık (% 17,06) ve şiddetin (% 6,58) düşük olması epideminin sadece optimum çevre koşullarına bağlı olmadığı, hastalığa karşı konukçu hassasiyeti ve hastalık etmeninin virülenslik özelliğinin yüksek olmasına da bağlı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Başka bir deyişle bu survey çalışmaları sırasında uygun çevre koşullarının hastalığın epidemi yapmasına yeterli olmadığı, etmenin virülenslik özelliğinin yüksek olması ve gezilen bahçelerdeki fındık ağaçların hastalığa karşı çeşit özelliği ve yaşına bağlı olarak dayanıklılığının söz konusu olduğu düşünülmektedir.

X. arboricola pv. *corylina*'nın teşhisi ile ilgili olarak şimdiye kadar biyokimyasal testlerin yanında ERIC, BOX ve REP primer setleri kullanılarak tekrarlı PCR yöntemi ve hücre protein analizleri uygulanmıştır. Laboratuvarımızda tanı ile ilgili moleküler analiz yapma imkanı olmadığından ve literatür taramaları sırasında etmene özel spesifik primer bulunamadığından 'The National Center For Biotechnology Information' web sitesinden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) etmenin üç farklı uluslar arası izolata genomlarından 'Primer 3 Input Version 4.0' programı yardımıyla acnB – F (ACATTCCGTTTCATTCCGAAC), acnB – R (AACAGCACGTCCGACTTCAT), 935 – F (TGGAAGCTGTTGATGCTG), 935 – R (GTCGAAACGCAGCTGGTAG), LGM688 – F (TGGAAGCTGTTGATGCTG) ve LGM688 – R (GCATCTTCGATACGCACCTG) isimli baz dizileri elde edilmiştir. Bu baz dizilişleri

özel bir firmada sentezletilerek 6 adet primer elde edilmiştir. Böylece bu primerler kullanılarak touchdown koloni PCR yöntemiyle surveyler sırasında elde edilen izolatların tanısı yapılmıştır. İzolatlar arasındaki ırk farklılıklarının olup olmadığı ise bu çalışmada belirlenememiştir. Ancak konuyla ilgili daha sonraki çalışmalarda 16S rRNA sekans analizi kullanılarak izolatlar arasındaki farklılıkların ortaya konması hedeflenmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Fındık üretim alanlarında bir azalma olmamasına rağmen, fındık üretim miktarında önemli ölçüde düşüş yaşanmaktadır. Türkiye fındık üretim miktarındaki bu düşüş dünya fındık üretiminde % 70’lik paya sahip olduğu için dünya fındık üretimini de doğrudan düşürmektedir.

Fındık tüm dünyada ticari önemi olan, kullanım alanı geniş (pastacılık, çikolata, şekerleme, yağ elde edilmesi, ahşap üretimi, hayvan yemi, gübre, kozmetik, vb...) bir meyve olduğundan verimin artırılması lehte bir durum olacaktır. Dünya fındık üreticileri Türkiye’ye nazaran çok daha küçük alanlarda fındık üretimi yapmalarına rağmen dekara alınan verim neredeyse iki kat daha fazladır. Budama, gübreleme, yabancı ot mücadelesi, hastalığın bulaşmasını önleme ve ilaçlama gibi yöntemlerle verimi artırmayı başarmışlardır. Bu nedenle Türkiye’de fındık hastalık ve zararlılarından meydana gelecek kaybın minimuma indirilmesi gerekmektedir.

Fındığın fazla emek gerektirmeden yetiştiriyor olması, bakımsız bahçeleri de beraberinde getirmektedir. Survey çalışmalarında yabancı ot, zararlı, hastalık mücadelesi, budama ve gençleştirme yapılmamış pek çok bahçeye rastlanmıştır. Bu da hastalık ve zararlıların yayılmasının temel sebebini oluşturmaktadır.

X. arboricola pv. *corylina* sebebiyle meydana gelen kayıpların önlenmesi için bulaşık olmayan ve dayanıklılık gösteren sağlıklı fidanların tercih edilmesi temel önlemdir. Bulaşık materyallerin yok edilmesi ve ortadan kaldırılması, budama ekipmanlarının temizliğine dikkat edilmesi, bir ocaktan diğerine geçerken budama aletlerinin % 10’luk NaOCl çözeltisine batırılması, bakırlı preparatların kullanılması ve yeni dikilen fidanların dayanıklı çeşitler olmasına dikkat edilmesiyle kontrol altına alınması gerekmektedir. Üreticilere *X. arboricola* pv. *corylina*’nın bahçelerindeki yaygınlık durumuyla ilgili olarak bilgilendirme yapılarak, önlem almalarının sağlanması gerekmektedir. Hastalıkla bulaşık dalların budanarak yakılması, kış ve ilkbahar dönemlerinde Bordo Bulamacı kullanılması önlemleri tavsiye edilerek, hastalığa karşı mücedele edilmesiyle, yaygınlık durumunun bir nebze olsun azalması sağlanmalı veya yayılması önlenmelidir. Bakımlı ve sağlıklı fındık bahçeleri de doğrudan fındık veriminin artmasını sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Alay, K., Altınyay, N., Hancıoğlu, Ö., DüNDAR, F., Ünal, A., 1973. Karadeniz Bölgesinde Fındık Dal Kurumaları Üzerine Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni 13, 202 - 213.
- Anonymous, 1986. OEPP/EPPO Data sheets on quarantine organisms. No. 134, *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*. OEPP/EPPO Bulletin 16, 13 - 16.
- Anonymous, 1990. OEPP/EPPO Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents No. 1008.
- Anonymous, 2004. Bulletin OEPP / EPPO Bulletin 34, 179 – 18.
- Anonymous, 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları. Cilt 5, Fındık Bakteriyel Yanıklığı *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*.
- Anonymous, 2009. Fiskobirlik Ülkelere Göre Dünya Kabuklu Fındık Üretim Alanları. <http://www.fiskobirlik.com.tr/default2.asp?lang=tr&id=151> (20.09.2012)
- Anonymous, 2010. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (20.09.2012)
- Anonymous, 2011a. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Fındık Hastalık ve Zararlıları İle Mücadele, Ankara, 2011. S. 9 – 10.
- Anonymous, 2011b. Australian Government Review of policy: importation of hazelnut (*Corylus* species) propagative material from Chile.
- Anonymous, 2012a. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> (01.10.12)
- Anonymous, 2012b. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (20.09.2012)
- Anonymous, 2012c. www.samsun.gov.tr (07.09.2012)
- Anonymous, 2012d. Samsun Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü 2011 yılı verileri
- Ayfer, M., Uzun, A., Baş, F., 1986. Türk Fındık Çeşitleri. Ankara, 95s.

- Barss, H.P., 1913. A new filbert disease in Oregon. Oregon Agricultural Experiment Station Biennial Crop Pest and Horticulture Report No. 14, pp. 213-223.
- Bradbury, J.F., 1987. *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 896. CAB International, Wallingford, UK.
- Bora, T., Karaca, İ. 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Bornova Ege Üniversitesi Matbaası, 1970, Yayın No: 167 Yardımcı Ders Kitabı.
- Çalışkan, T., 1995. Fındık Çeşit Kataloğu. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, TÜGEM, Ankara
- Demir, T., 2005. Türk Fındık Çeşitlerinin Rapd Markörleri ve Pomolojik Özellikleri ile Tanımlanarak Çeşitler Arasındaki Akrabalık İlişkilerinin Belirlenmesi. OMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Samsun.
- EPPO, 1986. Data sheets on quarantine organisms No. 134, *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 16, 13-16.
- EPPO, 1990. Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents No. 1008.
- EPPO, 2004. Diagnostic Protocols for Regulated Pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34 , 179 –181.
- Erdoğan, V., Mehlenbacher, S. A., 2000. Phylogenetic relationships of *Corylus* species (Betuleaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS region and chloroplast *matK* gene sequences. Systematic Botany (2000), 25 (4): 727 – 737.
- Farr, D.F., Rossman, A.Y., 2011. Fungal databases, Systematic mycology and Microbiology, laboratory, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/> (20.09.2012).
- Gardan, L., 1982. La bactériose du noisetier. In: 3èmes journées françaises d'études et d'informations sur les maladies des plantes, 489 - 495. ACTA, Paris, France.
- Gardan, L., 1983. Bacterial blight of hazelnut caused by *Xanthomonas corylina*. Convegno Internazionale sul Nocciolo Avellino, 443 - 450. Settembre 1983, Italy.
- Gram, H. C., 1884. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt – und Trockenpräparaten. Fortschritte der Medizin 2, 185 - 89.

- Guerrero, C.J., Lobos, A.W., 1987. *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*, causal agent of bacterial blight of hazel in region IX, Chile]. Agricultura Tecnica Santiago 47, 422- 426.
- Hartney, S., Glawe, D.A., Dugan, F., Ammirati, J., 2005. First report of powdery mildew on *Corylus avellana* caused by *Phyllactinia guttata* in Washington State. Online. Plant Health Progress doi:10. 1094/PHP-2005-1121-01-BR.
- Hugh, R., Leifson, E., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. J. Bacteriol, 66, 24–26.
- Janick, J., Paull, R. E., 2008. The encyclopaedia of fruit and nuts. CAB International, Wallingford, UK.
- Karadeniz T., Bostan S.Z., Tuncer C., Tarakçıoğlu C., 2008. Fındık Yetiştiriciliği. Ordu.
- Keča, N., Karadžić, D., Woodward, S., 2009. Ecology of *Armillaria* species in managed forests and plantations in Serbia. *Forest Pathology* 39: 217–231.
- Klement, Z., Mavridis, A., Rudolph, K., Vidaver, A., 1990. Inoculation of Plant Tissues. Methods in phytobacteriology, Eds: Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. Akademia Kiado Budapest, 95-124 pp.
- Koval, G.K., 1978. Diseases of hazel. Zashchita Rastenii No. 8, pp. 44-45.
- Köksal, A. İ., 2002. *Türk Fındık Çeşitleri*. s. 19 - 27, Ankara.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E., 1987. Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants (Methods in Plant Pathology). Oxford, U.K., 1- 200 pp.
- Locke, T., Barnes, D., 1979. New or unusual records of plant diseases and pests. *Xanthomonas corylina* on cob-nuts and filberts. Plant Pathology 28, 53.
- Luisetti, J., Jailloux, F., Germain, E., Prunier, J.P., Gardan, L., 1976. Caractérisation de *Xanthomonas corylina* responsable de la bactériose du noisetier récemment observée en France. Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France 62, 845-849.

- Lushaj, B. M., Woodward, S., Keča, N., Intini, M., 2010. Distribution, ecology and host range of *Armillaria* species in Albania. *Forest Pathology* 40: 485–499.
- Mehlenbacher, S. A., 1991. Hazelnuts (*Corylus*). Genetic resources of temperate fruit and nut crops, *Acta Horticulturae* 290: 791 – 836.
- Miller, P. W., Bollen, W. B., Simmons, J.E., 1949. Filbert bacteriosis and its control. Oregon Agricultural Experiment Station Technical Bulletin No. 16.
- Minter, D.W., Peredo Lopez, H., 2006. Fungi of Chile, www.cybertruffle.org.uk/chilfung
- Noviello, C., 1969. Infectious diseases of hazel. *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie della Università degli Studi di Napoli Portici* 3, 11-39.
- Okay, A. N., Kaya, A., Küçük, V. Y., Küçük, A., 1986. Fındık Tarımı. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Teşkilatlanma ve Destekleme Genel Müdürlüğü, Yayın no: Genel 142, TEDGEM, 12 – 85 s.
- Özbek, S., 1978. Özel Meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 128. Ders Kitabı: 11. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- Prunier, J.P., Luisetti, J., Gardan, L., Germain, E., Sarraquigne, J., 1976. La bactériose du noisetier (*Xanthomonas corylina*). *Revue Horticole* No. 170, pp. 31, 40.
- Pulawska, J., Kaluzna, M., Kolodziejaska, A., Sobiczewski, P., 2010. *Journal of Plant Pathology* 2010, 93, 803 – 806.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sands, D. C., 1990. Physiological criteria-determinate tests. In *Methods in Phytopathology*. (Edts. Klement, Z.; Rhudolp, K.; Sands, D. C.) Academia Kiado, Budapest, Hungary.

- Saruhan, İ. ve C. Tuncer, 2010. Fındık Kokarcası (*Palomena prasina* L. Heteroptera: Pentatomidae)'nın Fındık Meyvelerindeki Zarar Şekli ve Oranı. Ondokuzmayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Anadolu Tarım Bilim. Derg., 2010, 25(2): 75 - 83.
- Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R., Holderness, M., Burger, B., eds. 1997. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*. In: Quarantine Pests for Europe, 2nd edn. Wallingford, UK: CAB International in association with EPPO, 1092–5.
- Snare, L., 2006. Pests and disease analysis in hazelnuts. NSW Department of Primary Industries, http://www.dpi.nsw.gov.au/data/assets/pdf_file/0003/117984/pest-and-disease-analysis-in-hazelnuts.pdf (01.02.2011)
- Sutic, D. 1956. Bacterial canker of hazel. Zastita Bilja 37, 47, 53.
- Scortichini, M., Rossi, M. P., Marchesi, U., 2002. Plant Pathology; Genetic, phenotypic and pathogenic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* strains question the representative nature of the type strain. 51, 374 – 381.
- TÜİK, 2011. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- TÜİK, 2012. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Vauterin, L. Hoste, B., Kersters, K., Swings, J., 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 45, 472 - 489.
- Viggiani G., 1994. Current management of hazelnut diseases and pests. Acta Horticulturae 276: 531-541.
- Wimalajeewa, D.L.S., Washington, W.S., 1980. Bacterial blight of hazelnut. Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific. Kiado, Budapest, Hungary. <http://www.daff.gov.au/data/assets/pdffile/0003/1916715/FinalDraftHazelnutRiskAssessmentChile08062011.pdf> (20.09.2012)

8.ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Çiğdem KARA

Doğum Yeri : Samsun

Doğum Tarihi : 23.08.1987

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Samsun Anadolu Lisesi, 2004

Lisans : OMÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 2008

Yüksek Lisans : OMÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma A.B.D., 2012

İletişim Bilgileri : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Bölümü 55139 Kurupelit, Samsun.
E-posta: cigdkara@hotmail.com