T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BİBERDEN ELDE EDİLEN *Xanthomonas* TÜRLERİNİN İZOLASYONU, KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI

Hazırlayan
Tuba GÜRTEN

Danışman
Doç. Dr. Sümer HORUZ

Yüksek Lisans Tezi

Aralık 2024
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BİBERDEN ELDE EDİLEN *Xanthomonas* TÜRLERİNİN İZOLASYONU, KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Tuba GÜRTEN

Danışman
Doç. Dr. Sümer HORUZ

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-2023-12296 kodlu proje ile desteklenmiştir

Aralık 2024
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Tuba GÜRTEN

İmza

"Biberden Elde Edilen *Xanthomonas* Türlerinin İzolasyonu, Klasik Ve Moleküler Yöntemlerle Tanısı" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan	**Danışman**
Tuba GÜRTEN	Doç. Dr. Sümer HORUZ

Bitki Koruma ABD Başkanı

Prof. Dr. Hacer Handan ALTINOK

TEŞEKKÜR

Bana çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, bilgi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan, bana her zaman destek olan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Sümer HORUZ'a, tezimi okuyan jüri üyelerime ve her zaman desteklerini hissettiğim canım aileme çok teşekkür ederim.

Tuba GÜRTEN

ARALIK, 2024, KAYSERİ

BİBERDEN ELDE EDİLEN *Xanthomonas* TÜRLERİNİN İZOLASYONU, KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI

Tuba GÜRTEN

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2024
Danışman: Doç. Dr. Sümer HORUZ

ÖZET

Dört farklı *Xanthomonas* spp. neden olduğu Biber bakteriyel leke hastalığı tüm dünyada biber yetiştirilen alanlarda tehditkar bir hastalık olarak yapraklarda kloroz ve nekrozlara meyvelerde lekelere yol açmaktadır. Bu çalışmada, 2021-2022 yıllarında Antalya, Kayseri, Kırşehir, Mersin, Nevşehir ve Yozgat illerinden temin edilen hasta biber örneklerinde bakteriyel leke hastalığına sebep olan *Xanthomonas* türlerinin izolasyonu, patojenite testi, klasik ve moleküler yöntemlerle tanısının yapılması amaçlanmıştır. Yapılan izolasyon çalışması sonucunda elde edilen 33 adet izolat Şili çeşidi biberde tipik hastalık belirtileri oluşturmuştur. Tüm izolatlar gram$^-$, aerobik, YDCA ve King B Besi yerlerinde sarı renkte ve mukoid tipte gelişmiş, esculinin hidrolizi testi pozitif, oksidaz testi negatif reaksiyon vermiştir. İzolatların levan oluşumu, nişastanın hidrolizi ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonları değişkenlik göstermiştir. PCR testi ile 30 izolatın *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, 3 izolatın ise *X. euvesicatoria* pv. *perforans* olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile *X. perforans*'ın Türkiye'de biberde patojen olduğu ilk kez ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas perforans*, tanı, biber

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PEPPER BACTERIAL LEAF SPOT DISEASE AGENTS (*Xanthomonas* spp.)

Tuba GURTEN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master Thesis, December 2024
Supervisor: Assoc. Prof. Sumer HORUZ

ABSTRACT

Bacterial leaf spot disease, caused by 4 different *Xanthomonas* species is the most common and destructive disease for peppers worldwide induces chlorosis and necrosis on leaves and spots on fruits. In this study, it was aimed to isolate pepper bacterial spot disease agent/s caused by *Xanthomonas* species from 2021 to 2022 in Antalya, Kayseri, Kırşehir, Mersin, Nevşehir and Yozgat provinces of Turkey and identify them using pathogenicity test, classical and molecular methods. Purified 33 putative bacterial strains were pathogenic on pepper seedlings (cv. Şili). All the strains were gram negative, aerobic, yielded yellow and mucoid colonies onto yeast dextrose calcium carbonate agar (YDCA) and King's B media, hydrolysis of esculine positive and negative for oxidase. Levan formation, hydrolysis of starch and HR on tobacco leaves (cv. Samsun) were varied. In PCR tests, 30 out of 33 strains were amplified with *Xanthomonas euvesicatoria* pv *euvesicatoria* and 3 strains were amplified with *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, respectively. To the best of our knowledge, this is the first study indicating that *X. euvesicatoria* pv. *perforans* is also pathogenic on pepper plants.

Key Words: *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas perforans*, identification, pepper

İÇİNDEKİLER

BİBERDEN ELDE EDİLEN *Xanthomonas* TÜRLERİNİN İZOLASYONU, KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANISI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK iii
KABUL VE ONAY iv
TEŞEKKÜR v
ÖZET vi
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER viii
KISALTMALAR xi
TABLOLAR LİSTESİ xii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii
GİRİŞ 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Problem Durumu 6
1.2. Literatür Çalışması 7
1.2.1. *Xanthomonas* Türlerinin Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesine Yönelik Çalışmalar 7
1.2.2. *Xanthomonas* Türlerinin Tanılanmasına Yönelik Son 20 Yılda Yapılan Bazı Çalışmalar 8

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal 20
2.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Bitkisel Materyaller 20
2.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Alet, Ekipman ve Kimyasallar 20
2.1.3. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Primerler 21
2.2. Yöntem 21
2.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması 21
2.2.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinden İzolasyon ve Saflaştırma 22

2.2.3. Bakteriyel İzolatların Patojenitesinin Belirlenmesi 23
2.2.4. İzolatların Klasik Yöntemlerle Tanısına Yönelik Testler 23
2.2.4.1. Morfolojik Gelişim 23
2.2.4.2. Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler 24
2.2.4.2.1. Levan Oluşumu 24
2.2.4.2.2. Oksidaz Testi 24
2.2.4.2.3. Potasyum Hidroksit (KOH) Testi 24
2.2.4.2.4. Aerobik/Anaerobik Gelişim Testi 25
2.2.4.2.5. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi 25
2.2.4.2.6. Nişastanın Hidrolizi 25
2.2.4.2.7. Jelatinin Hidrolizi 25
2.2.4.2.8. Esculinin Hidrolizi 26
2.2.5. İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanısı 26
2.2.5.1. DNA İzolasyonu 26
2.2.5.2. PCR Reaksiyonun Kurulması 27
2.2.5.3. PCR Ürünlerinin Jel Elektroforez Sisteminde Yürütülmesi 27

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Hastalıklı Bitkilerden Patojen İzolasyonu 29
3.2. Bakteriyel Etmenlerin Patojenitesi ve Re-İzolatların Eldesi 31
3.3. İzolatların Koloni Gelişimi Sonuçları 31
3.3.1. King B ve YDCA Besi Yerindeki Koloni Gelişimi Sonuçları 31
3.4. Re-İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları 32
3.4.1. Levan Oluşumu 32
3.4.2. Oksidaz Testi 32
3.4.3. Potasyum Hidroksit Testi (KOH) 32
3.4.4. Aerobik/Anaerobik Gelişim 32
3.4.5. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi 32
3.4.7. Jelatinin Hidrolizi 33
3.4.8. Esculinin Hidrolizi 34
3.5. *Xanthomonas* türlerinin Moleküler Tanılama Testi Sonuçları 35

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma **38**
4.2.Sonuç ve Öneriler **40**
KAYNAKÇA **43**
EKLER **52**
ÖZGEÇMİŞ **54**

KISALTMALAR

°C : Santigrat derece
µl : Mikrolitre
bp : Baz çifti
Da : dekar
DNA : Deoksiriboz Nükleik Asit
g : Gram
HCl : Hidroklorik Asit
King B : King's Medium B
KOH : Potasyum Hidroksit
ml : Mililitre
mm : Milimetre
NA : Nutrient Agar
NB : Nutrient Broth
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH : Hidrojen iyonu konsantrasyonu
pv : Patovar
SNA : Sükroz Nutrient Agar
spp : Türler
YDCA : Yeast dekstroz kalsiyum karbonat agar

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Dünyada biber üretim miktarı ve üretim alanının yıllar içerisindeki değişimi (FAO) 2
Tablo 2. 2022 yılında ülkelere göre biber üretim miktarı ve üretim alanı (FAO, 2022) 2
Tablo 3. Türkiyede biber çeşitlerinin yıllara göre üretim miktarı (TUİK, 2023) 3
Tablo 4. *Xanthomonas* türleri için türe özgü spesifik primer çiftleri 21
Tablo 5. Termocycler cihazında ayarlanan PCR programı 27
Tablo 6. Elde edilen bakteriyel izolatların listesi 30
Tablo 7. Nişastanın Hidrolizi ölçüm sonuçları 33
Tablo 8. Bakteriyel İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçlar 35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Biber fidesinde klorotik ve nekrotik lekeler 22
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan izolatların elde edildiği lokasyonlar 29
Şekil 3.2. King B besi yerine yapılan ilk izolasyonda bakteriyel koloni gelişimi 30
Şekil 3.3. Patojenite testi sonucunda oluşan hastalık belirtileri a) Su emmiş lekeler b) Etrafı klorozlu olan kahverengi lekeler c) Nem birikmesi sonucu yaprak kenarında nekrozlar d) Kahverengi lekelerin kuruması sonucu oluşan delik saçması 31
Şekil 3.4. İzolatların King B (a) ve YDCA (b) besi yerinde sarı-mukoid gelişimi ... 32
Şekil 3.5. Jelatinin Hidrolizi testinin pozitif ve negatif sonucu 34
Şekil 3.6. Esculinin Hidrolizi testinde pozitif ve negatif sonuçların görüntüsü 34
Şekil 3.7. (a) Levan testi, (b) Oksidaz testi, (c) KOH, (d) Aerobik/Anaerobik gelişim testi, (e) Tütünde HR testi, (f) Nişastanın hidrolizi testi 36
Şekil 3.8. Bazı *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* izolatlarının agaroz jelde 173 bp bant oluşumu 37
Şekil 3.9. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* izolatlarının agaroz jelde 300 bp bant oluşumu 37

GİRİŞ

Biber, Solanaceae familyasına ait olan *Capsicum* cinsinde yer alır. Biber sıcak iklim bitkisidir ve bu nedenle ılıman iklimler de tek yıllık, tropik ve subtropik iklimlerde ise çok yıllık bir kültür bitkisidir (Aybak, 2002; Pernezny vd. 2003). *Capsicum* cinsi geniş bir tür çeşitliliğine sahip olmasına rağmen, sadece 5 türün (*C. annuum, C. baccatum, C. chinense, C. pubescens, C. frutescens*) kültürü yapılmaktadır (Toğaç, 2018). Bunlar arasında en fazla yetiştiriciliği yapılan ve ekonomik olarak en fazla öneme sahip olan *Capsicum annuum* türüdür (Özalp, 2010).

Amerika kıtasının özellikle Orta ve Güney bölgeleri birçok biber türünün doğal habitatı olarak bilinmesine rağmen, yapılan sınıflandırma çalışmaları biber türlerinin farklı doğal habitatlara sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle acı biberin Güney Brezilya ile Bolivya kökenli olduğu bilinmektedir (McLeod vd. 1983, Pickersgill, 1984; Verit vd., 2001). Biberin ticari olarak üretimi 1600'lü yıllarda başlayıp, zaman içerisinde artış göstermiştir. Biberin, Amerika'dan Avrupa'ya, oradan da Hindistan ve Çin'e yayıldığı belirtilmiştir (Bosland ve Votava, 2012).

Biberin ülkemize nasıl girdiği konusunda ise çeşitli görüşler bulunmaktadır. Andrews (1999), biberin ülkemize girişinin üç farklı yöntemle gerçekleşmiş olabileceğini öne sürmüştür. Birinci yol, Amerika'dan gelen biber bitkisi, İspanya üzerinden Fas ve Mısır'a ulaşarak, buradan da İskenderun yoluyla İstanbul'a kadar yayılmıştır. İkinci bir senaryo ise, biberin deniz yoluyla İspanya'dan başlayarak Güney Afrika kıyılarına ulaştığı, oradan da Asya kıyılarına doğru yayılarak Kızıldeniz veya Basra Körfezi yoluyla Suriye'ye geçtiği ve oradan Türkiye'ye ulaşmış olabileceği şeklindedir. Üçüncü bir senaryoya göre ise biber, Hindistan'dan Asya kıtasına doğru yayılarak Afganistan ve İran üzerinden Türkiye'ye ulaşmış ve buradan İstanbul'a ve bazı Doğu Avrupa ülkelerine yayılmıştır.

Ekonomik açıdan oldukça değerli olan biber, içerdiği A, B1, B2, C, E ve P vitaminleri ile antioksidan açısından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Ekonomik değerinin beraberinde biyolojik olarak da oldukça değerli bir besindir. Biberin acı tadını oluşturan alkoloid yapıdaki capsaicin ($C_{18}H_{27}NO_3$) maddesidir. Capsaicin, biber meyvesinin septasında ve plasental

dokusunda bulunurken, meyve duvarında bulunmaz. Biber meyvesi olgunlaştıkça, meyvenin yapısında bulunan karbonhidrat, organik asit ve renk pigmentlerinin miktarı değişmektedir. Meyvede sarı, kırmızı ve yeşil renk oluşumu içerdiği karetonoid pigmentlerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Govindarajan, 1985; 1986).

Biber sadece taze olarak sofralık değil, insanoğlunun tüketim alışkanlıklarının değişmesi ve gelişen teknolojiyle birlikte kurutulmuş, konserve, turşu, baharat, ketçap, salça, dondurulmuş gıda ve hazır gıda olarak tüketilmektedir. Ayrıca bitki özsuyu farmakoloji ve kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır (Pernezny vd. 2003).

FAO'nun 2022 yılı verilerine göre; dünyada 2.020816 ha alanda toplam 36.972.494,42 ton biber üretimi gerçekleşmiştir (Tablo 1). Dünyada biber üretiminin en çok yapıldığı ülke 16.810.518,62 ton ile Çin'dir. Türkiye ise 3.018.775,00 ton üretim miktarı ile dördüncü sırada yer almaktadır (Tablo 2).

Tablo 1. Dünyada biber üretim miktarı ve üretim alanının yıllar içerisindeki değişimi (FAO, 2022)

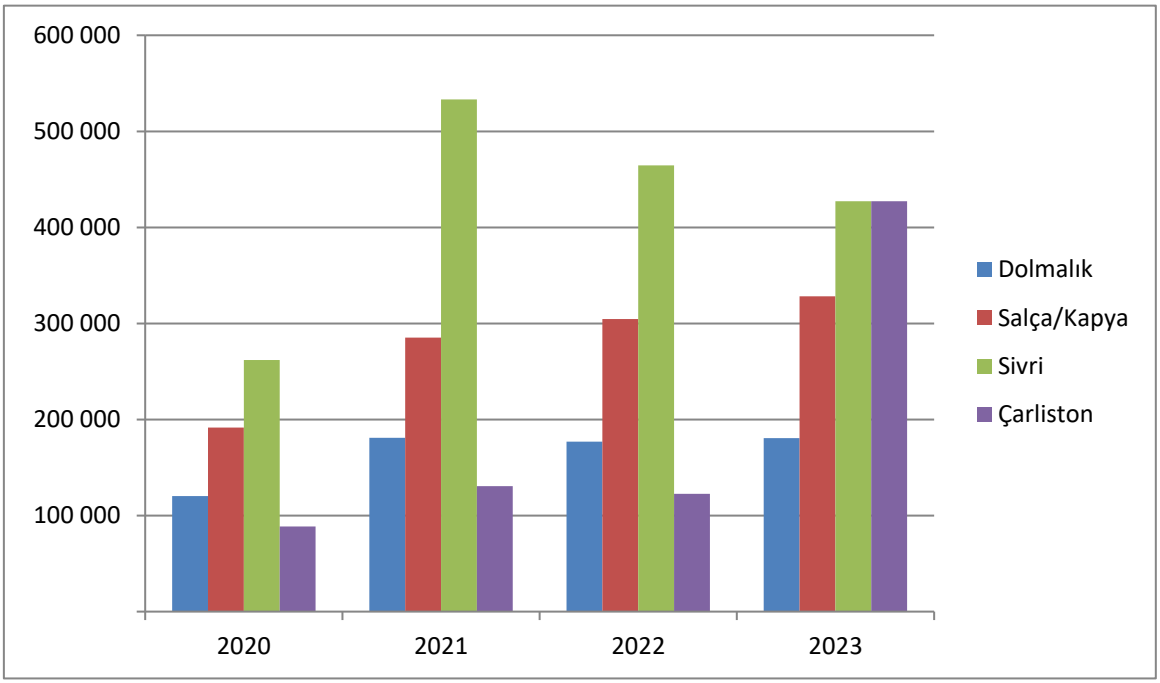
YILLAR	ÜRETİM MİKTARI (Ton)	ÜRETİM ALANI (ha)
2022	36.972.494,42	2.020.816
2021	36.286.643,77	2.055.310
2020	35.968.504,20	2.053.550
2019	35.494.089,64	1.960.460
2018	35.794.709,34	2.006.119

Tablo 2. 2022 yılında ülkelere göre biber üretim miktarı ve üretim alanı (FAO, 2022)

ÜLKELER	ÜRETİM MİKTARI (Ton)	ÜRETİM ALANI (ha)
ÇİN	16.810.518,62	757.377
MEKSİKA	3.113.244,27	156.718
ENDONEZYA	3.020.262,11	334.545
TÜRKİYE	3.018.775,00	76.398
İSPANYA	1.533.280,00	22.260

Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK) verilerine göre, ülkemizde en fazla üretimi yapılan biber çeşidinin sivri biber olduğu görülmüştür. Bunu sırasıyla salçalık/kapya, dolma ve çarliston biberi takip etmektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Türkiyede biber çeşitlerinin yıllara göre üretim miktarı (TUİK, 2023)



Biber, hem ülkemiz hem de dünya genelinde önemli bir gelir kaynağıdır. Biberin verim ve kalitesini olumsuz etkileyen bir dizi hastalık etmeni bulunmaktadır. Bu etmenler arasında başlıca bakteriyel hastalık etmenleri, *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas corrugata*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Ralstonia solanacearum*'dur. Fitopatolojik açıdan en önemli bakteriyel hastalık *Xanthomonas* türlerinin neden olduğu bakteriyel leke hastalığıdır (Potnis vd. 2015; Horuz, 2019).

Domates ve biberde bakteriyel yaprak lekesine neden olan *Xanthomonas* türleri; (1) *Xanthomonas euvesicatoria pv. euvesicatoria* (eski adıyla; *Xanthomonas euvesicatoria*) (Constantin vd. 2016), (2) *Xanthomonas vesicatoria* (Jones vd. 2004), (3) *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* (eski adıyla; *Xanthomonas gardneri*) (Moriniere vd. 2020) ve (4) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (eski adıyla *Xanthomonas perforans*) (Constantin vd. 2016)'dır. Bu türler domates ve biber üretiminde dünya çapında büyük bir sorundur. Sıcaklık, yüksek nem ve yağmur ya da çiğ nedeniyle uzun süreli yaprak ıslaklığı hastalığın epidemi yapması için uygun çevre koşullarıdır. Bakteriyel etmen, uygun çevre koşullarında %50'ye varan verim kayıplarına neden olabilmektedir (McInnes vd. 1988; Araujo vd. 2010).

Xanthomonas spp., enfekteli dokudan nutrient agar (NA), Sükroz Pepton Agar (SPA) veya Yeast Deskroz Kalsiyum Karbonat (YDC) agar üzerine ekilerek kolayca izole edilmektedir ve sarı, mukoid ve konveks kolonilerle karakterize edilmektedir (Potnis vd. 2015). Sarı renk, dış membranda bulunan benzersiz bromlu, aril- polen, suda çözünmeyen pigment sınıfına ait olan ksantomonadinlerin varlığından kaynaklanmaktadır. *Xanthomonas* türleri, 0.6x1.0-1.5 µm büyüklüğünde, gram negatif ve çubuk şeklinde olup, tek kamçıya sahiptirler. King B besi yerinde flouresan pigmenti oluşturmazken, jelatini hidrolize eder. Oksidaz ve nitrat redüksiyonu negatif ve katalaz pozitif özelliğe sahiptir. Patojenin glikoz, mannase, arabinase, sellobioz ve trehalaseden asit üretimi de değişkenlik göstermektedir. Xanthan adı verilen ekstraselüler polisakkarit üretir. 4-37 °C'de gelişim gösterirken, optimum gelişim sıcaklığı 25-30 °C arasındadır (Schaad, 2001).

Xanthomonas spp., stoma veya hidatodlar gibi doğal açıklıklardan girerek genelde lokalize enfeksiyonlara neden olurlar. Simptom gelişiminin ilk aşamaları özellikle kotiledon yapraklarda su emmiş lekeler şeklinde ortaya çıkar. Bakteriyel etmen yaprak, gövde ve meyvelerde hastalık belirtileri oluşturur ve bu toprak üstü aksamlardaki klorotik hale ile çevrili nekrotik lekelerin varlığı etmen için karakteristiktir (Keinath, 2019; EPPO 2024a). Zaman içerisinde bu nekrotik lekeler kahverengileşir, kurur, dökülür ve bunun sonucunda yapraklar saçma ile delinmiş gibi bir görünüm alır. Şiddetli enfeksiyonlarda yaprak yanıklığı ve yapraklarda dökülmeler yaygın olarak gözlenir; ayrıca çiçek ve genç meyvelerde de dökülme sıklıkla karşılan diğer belirtileridir. Meyvelerdeki belirtiler su emmiş lekeler şeklinde başlar ve küçük, kahverengimsi-siyah, kabarcık benzeri lekeler şeklinde kendini gösterir. Bu lezyonların varlığı meyvelerde şekil bozukluklarına ve önemli verim kayıplarına neden olmaktadır (Horst, 2001; Stall vd. 2009).

Xanthomonas türlerinin neden olduğu bakteriyel yaprak lekesi hastalığı üretim alanlarına bulaşık tohum veya üretim materyalleri yoluyla bulaşır (Jones vd. 1986; Sijam vd. 1991). Etmen, biber tohumlarında 10 yıl, domateste 20 yıl canlı olarak kalabilmekte, toprakta kalıcılığı ise toprak yapısına bağlı olarak daha az olmaktadır. Bu nedenle, bakteriyel etmenin mücadelesinde en önemli strateji patojenden ari, sertifikalı tohum veya bitki materyali kullanımı olmalıdır. Tohumların sıcak su ile muamele edilmesi gibi önleyici tedbirler, tohumlardaki hastalık inokulumunu önemli ölçüde azaltmaktadır. Buna ek olarak, potansiyel konukçu bitkiler ve hastalıklı bitki artıklarının üretim alanından uzaklaştırılması ve bunların

bertaraf edilmesi, konukçu olmayan bitkilerle ürün rotasyonu yapılması kültürel önlemler açısından oldukça önemlidir (Horuz, 2019).

Kimyasal mücadele, bakteriyel leke hastalık etmeni için birincil odak noktası olmuştur ve bakır bazlı bakterisitler hastalık kontrolü için yaygın olarak kullanılmaktadır. Uzun yıllar boyunca üreticiler mancozeb veya maneb ile bakır bazlı bakterisitleri kombine şekilde kullanmışlardır (Horuz, 2019). 1980'lerde, bakır mancozeb kombinasyonlarının, tek başına bakırla karşılaştırıldığında çözünür bakır salınımının artması nedeniyle bakteriyel leke kontrolünde iyileşme sağladığı gözlenmiştir (Conover ve Gerhold, 1981; Marco ve Stall, 1983). Ancak, hastalık etmeninin piyasada kullanılan bakırlı bileşiklere dayanıklılık geliştirmiş olabileceği farklı araştırıcılar tarafından ortaya konmuştur (Areas vd. 2017; Roach vd. 2020). Yine de bakır içerikli fungisitler hastalığın üretim alanında yayılmasını engellemek için koruyucu amaçlı kullanılmaya devam edilmelidir. Bunun yanı sıra, bakteriyel hastalıkların önlenmesi zor olduğundan kültürel önlemlere daha fazla ağırlık verilmelidir (Obradovic vd. 2004).

Bu tez çalışmasının amacı; Türkiye'de biber üretimi yapılan altı farklı ilden (Antalya, Kayseri, Kırşehir, Mersin, Nevşehir, Yozgat) temin edilen hastalıklı biber fidelerinden izolasyon yapmak, biberde bakteriyel yaprak lekesine neden olan *Xanthomonas* türlerini biberde patojenite testi, klasik ve moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanısını yapmaktır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Problem Durumu

Biber, sağlık açısından potansiyel faydaları olan vitaminler, mineraller, flavonoidler, karetonoidler ve kapsaisinoid kimyasal bileşikler içerir. Hem ülkemiz hem de dünya genelinde önemli bir gelir kaynağıdır. Birçok hastalık etmeni biberde ekonomik zararlara neden olur. Biberde bakteriyel lekeye neden olan *Xanthomonas* türleri EPPO A2 listesinde yer alan oldukça tahripkar patojenlerdir (EPPO, 2024b). Tohum kaynaklı bir etmen olan bu bakteri, ilk önce yapraklarda su emmiş lekeler şeklinde kendini gösterir, daha sonra kahverengi etrafı sarımsı hale ile çevrili nekrozlara neden olur. Eğer hastalık şiddetli ise yapraklarda sararmalar, dökülmeler ve kurumalar meydana gelir. Meyvelerdeki belirtiler; küçük, kabuk benzeri kabarcıklar şeklindedir. Bu lekeler fungal ya da bakteriyel sekonder enfeksiyonlara zemin hazırlayarak meyvelerde çürümelere neden olabilir. Bu da biberin pazar değerini düşürür.

Biberde bakteriyel lekeye neden olan *Xanthomonas* türlerini bitki üzerindeki simptomlara bakarak birbirinden ayırmak oldukça zordur. Bu yüzden patojenite ve klasik yöntemlerin yanı sıra, moleküler testler gibi tanıyı destekleyici diğer yöntemlerden yararlanmak gerekir. *Xanthomonas* türleriyle mücadelenin en önemli yolu bakteriyel etmenin üretim alanına girmesine engel olunmasıdır. Çünkü mücadelesi oldukça zor olup, bakırlı bileşikler dışında ruhsatlı herhangi bir kimyasal ilaç bulunmamaktadır. Hastalıktan ari sertifikalı tohum kullanımı, varsa tolerant/dayanıklı çeşit seçimi, bitki artıklarının üretim alanında bırakılmaması, sanitasyon, gübreleme önlemleri ya da çeşitli tohum uygulamaları gibi kültürel önlemlere ağırlık verilerek hastalığın üretim alanına girmesi engellenmelidir. Ülkemizde biberde bakteriyel leke hastalığına neden olan etmen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* olarak bilinirken, son 20 yılda yapılan çalışmalar bu hastalığa dört farklı *Xanthomonas* türünün neden olduğunu ortaya koymuştur. Hastalık ülkemizde biberde çok yaygın olmasına rağmen, Türkiye'de son 20 yılda bu hastalığın klasik ve moleküler testler kullanılarak tanısının

yapılması üzerine çok az bilimsel çalışma yapılmıştır. Bu patojen/lerin tür seviyesinde tanılarının yapılması hastalıkla mücadele için alınacak önlemlere karar verilmesine yarar sağlayacaktır.

1.2. Literatür Çalışması

1.2.1. *Xanthomonas* Türlerinin Sınıflandırılması ve İsimlendirilmesine Yönelik Çalışmalar

Ethel M. Doidge (1921), Güney Afrika'da ilk olarak domateste (*Lycopersicum esculentum*) bakteriyel leke hastalığına neden olan patojeni *Bacterium vesicatorium* olarak tanılamıştır. Aynı yıl, Gardner ve Kendrick (1921) Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde domateste yaprak lekesine neden olan bir bakteri tespit etmişler ve bu patojene *Bacterium exitiiosum* adını vermeyi önermişlerdir. Ancak Doidge'in Güney Afrika'da benzer bir bakteriyi tanıladığını öğrendiklerinde, bu iki organizma arasındaki benzerlikler nedeniyle adını vermeyi ertelemişlerdir. Gardner ve Kendrick (1921), Doidge'nin izole ettiği izolatlar ile kendi izolatları arasında önemli bir farklılığa dikkat çekmiştir. Doidge (1921) tarafından izole edilen bakteriler zayıf amilolitik ya da hiç amilolitik özellikte değil iken, Gardner ve Kendrick (1921)'nin izolatlarının güçlü amilolitik özellikte olduğunu vurgulamışlardır. O dönemlerde bakterileri ayırt etmek için çok az teknik bulunduğundan bu fark, amilolitik izolatları farklı bir tür olarak tanılamak için yeterince önemli görülmemiştir. Amilolitik özellik gösteren ya da hiç göstermeyen bu izolatlar önce *X. vesicatoria* daha sonra *X. campestris* pv. *vesicatoria* olarak isimlendirilmiştir (Dye, 1939).

1990'larda Vauterin vd. (1990) ile Stall vd. (1994), *X. campestris* pv. *vesicatoria*'da genetik ve fenotipik olarak grup A ve grup B olarak farklı iki grubun var olduğunu belirlemişlerdir. Bouzar vd. (1994) Grup A'nın izolatlarının amilolitik ve pektolitik aktivite açısından zayıf ya da negatif olduğunu, Grup B'nin ise güçlü amilolitik ve pektolitik aktiviteye sahip izolatların yer aldığını doğrulamıştır. Bu sonuçlara bakılarak A ve B grubu izolatlarının tür düzeyinde ilişkili olmadığı anlaşılmış ve yeniden sınıflandırılmıştır. Böylelikle *X. campestris* pv. *vesicatoria*'yı iki türe ayırmışlardır: Grup A *Xanthomonas axanopodis* pv. *vesicatoria*, grup B ise *X. vesicatoria* olarak isimlendirilmiştir (Vauterin vd. 1995).

A ve B gruplarının belirlenmesinden birkaç yıl sonra C olarak adlandırılan yeni bir grup tanımlanmıştır. Grup C'nin serolojik ve patojenik olarak grup A ve B den ayrı olduğu

bildirilmiştir (Jones vd. 1998). DNA:DNA hibridizasyon testlerine göre C grubunun, A grubu ile ilişkili olduğu ve A grubunun bir alttürü olabileceği belirtilmiştir. C grubundaki bakteriler *Xanthomonas perforans* olarak isimlendirilmiştir. Sutic (1957) Yugoslavya'da domatesten elde ettiği farklı bir bakteriyi *Pseudomonas gardneri* olarak adlandırmıştır. Bu izolat daha sonraları diğer *Xanthomonas* izolatları ile karşılaştırılmış ve *P. gardneri*'nin *X. vesicatoria* ile sinonim olduğu sonucuna varılmış ve son grup olan D grubuna alınmıştır. Daha sonra yapılan morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda *Xanthomonas gardneri* olarak isimlendirilmiştir. A grubu bakteri izolatları *X. euvesicatoria*, B grubu *X. vesicatoria*, C grubu *X. perforans* ve D grubundakiler ise diğer *Xanthomonas* türlerinin herhangi biri ile %70'den daha az DNA benzerliği gösteren *X. gardneri* olarak isimlendirilmiştir (Jones vd. 2004).

Yeni moleküler analizlerin kullanımı *X. euvesicatoria* ve *X. perforans*'ın tek başına türler olarak net bir şekilde ayırt edilemediğini göstermiş ve bu nedenle *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ve *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* şeklinde aynı türün pathovarları olarak yeniden sınıflandırılmışlardır (Constantin vd. 2016). Son olarak Moriniere vd. (2020) *Xanthomonas gardneri*'yi *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* olarak sınıflandırmıştır. *Xanthomonas vesicatoria*'nın sınıflandırılmasında herhangi bir değişiklik olmamıştır (Osdaghi vd. 2021.) Son taksonomide yapılan sınıflandırmaya göre biber ve domateslerde bakteriyel leke hastalığına neden olan 4 bakteriyel etmen bildirilmektedir. Bu türler: 1) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, 2) *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, 3) *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* ve 4) *Xanthomonas vesicatoria*'dır (Palacio vd. 2024).

1.2.2. *Xanthomonas* Türlerinin Tanılanmasına Yönelik Son 20 Yılda Yapılan Bazı Çalışmalar

Koenraadt vd. (2009), 52 adet *X. euvesicatoria*, 9 adet *X. vesicatoria*, 6 adet *X. perforans*, 3 adet *X.gardneri* ve 8 adet grup dışı (biberden *Xanthomonas* türleri, *Xanthomonas hortorum* ve *X. campestris* patovarları) izolatları çeşitli bölgelerden toplanmıştır. 40 adet izolat daha önce tanılanması yapılmış olan Jeffrey Jones'un koleksiyonundan temin edilmiştir. İzolatlardan DNA izolasyonu yapılmış ve daha sonra Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) PCR yapılarak ardışık Jaccard analizine tabi tutulmuştur. Sadece bir BS (bakteriyel leke) türünün tüm izolatlarında bulunan ve dış grup izolatlarında bulunmayan gen bölgeleri seçilip dizilenmiştir. Bu türe özgü dizilere dayanarak PCR primerleri tasarlanmıştır. Primer setleri, BS türlerinin çoğu izolatından ve dış grup izolatlarından alınan DNA ile çeşitli annealing

sıcaklıkları kullanılarak değerlendirilmiştir. AFLP desenlerinin Jaccard analizi, BS izolatlarının farklı türleri temsil eden dört grupta da beklenen kümelenmesini göstermiştir. Çalışma ile biberde bakteriyel leke hastalığına yol açan dört farklı türü birbirinden ayırabilecek primer setleri geliştirilmiştir. Bu primer setleri; Bs-XeF/BsXeR (*X. euvesicatoria*), Bs-XvF/Bs-XvR (*X. vesicatoria*), Bs-XpF/Bs-XpR (*X. perforans*) Bs-XgF/Bs-XgR *(X. gardneri*) şeklinde isimlendirilmiştir.

Mirik ve Aysan (2009), 2002, 2003 ve 2004 yıllarında Adana ve Osmaniye'deki 29 farklı alandan biber tohumları elde edilmiştir. Bu biber tohumlarına yapılan immünoflorasan testi, Tween B besi yerinde izolasyonu ve ekimden 7-14 gün sonra kotiledon yapraklarındaki tipik bakteriyel leke belirtilerinin incelendiği fide tarama testi sonucunda toplam 37 bakteri izolatı elde edilmiştir. Elde edilen 37 bölge izolatının hiçbiri pektolitik ve amilolitik aktivite göstermemiştir. PCR testinde *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria'*ya özgü spesifik RST9-RST10 primerleri kullanılmış ve 355 bp'de bant oluşumu izolatların *Xav* olduğunu teyit etmiştir.

Lue vd. (2010), Bakteriyel leke, Tayvan'da önemli bir domates ve biber hastalığıdır. Tayvan'da domates ve biber bakteriyel lekesi (BSX) ile ilişkili *Xanthomonas* türlerini karakterize etmek için Tayvan'daki çeşitli yerlerden izole edilen 53 BSX izolatın (39 izolat domates ve 14 izolat biber) amilolitik ve pektolitik aktivitesi, türe özgü primerlerle PCR testi ve karbon kaynaklarının kullanımı analiz edilmiştir. Bu analizlerin sonucunda 53 BSX izolatı arasında 13 izolat hem amilolitik hem de pektolitik aktivite gösterirken, diğer 40 izolat nişastayı hidrolize edememiştir. Bu 53 BSX izolatını tanılamak için, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (=*Xanthomonas euvesicatoria*) ve *X. vesicatoria*'ya özgü sırasıyla RST13/14 ve C-2-2L/2R primer çifti kullanılmıştır. Amilolitik ve pektolitik aktivitesi negatif olan 40 izolat RST13/14 primer çifti kullanılarak PCR yapılmıştır ve 560 bp'de bant oluşumu gözlemlenmiş ve *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (=*Xanthomonas euvesicatoria*) olarak tanılanmıştır. Amilolitik ve pektolitik aktivite gösteren 13 izolat C-2-2L/2R primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucunda, 5 izolatın 407 bp'de bant oluşumu gözlemlenmiş olup *X. vesicatoria* olarak tanılanmıştır. Bununla birlikte, kalan 8 izolat her iki primer çifti tarafından da herhangi bir bant oluşumu gözlemlenmemiştir. 53 BSX izolatı, 13 farklı karbon kaynağı kullanım modeline dayalı olarak, iki gruba ayrılmıştır: A grubundaki 46 adet izolat karbon kaynağı olarak cis-aconitic asit kullanmaktadır. B grubunda yer alan 7 izolat ise cis-aconitic asit ve asetik asit kullanmayan, ancak gentibioz kullanabilen olarak gruplanmıştır. Jones vd. (2004)'de *X.*

perforans'ın %50 veya daha fazla izolatının aconitic asidi kullanabileceğini ve *X. perforans*'ın genellikle domatesle ilişkili olduğunu belirtmiştir. Tanılaması yapılamamış olan 8 izolatın tamamı domatesten izole edilmiştir. Tüm bu özellikler göz önüne alındığında, 8 izolatın tamamı *X. perforans*'a ait olmalıdır. Biyokimyasal ve moleküler testlerin sonuçlarına göre, Tayvan'da domates ve biberde bakteriyel leke hastalık etmenleri *X. euvesicatoria, X. perforans* ve *X. Vesicatoria* olup bu çalışmada *X. gardneri* saptanmamıştır.

Araújo vd. **(2012),** Brezilya'da domateste bakteriyel lekeye neden olan 160 adet izolata Koenraadt vd. (2009)'un geliştirmiş oldukları türe spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu çalışmada 4 adet referans izolat kullanılmıştır. Bunlar; *X. euvesicatoria* (IBSBF 2363= Xvp197), *X. vesicatoria* (IBSBF 2364= XV1111), *X. perforans* (IBSBF 2370= ATCC BAA-983) ve *X. gardneri* (IBSBF 2373= XCGA2)'dir. 160 izolat ve bu 4 referans izolat dahil olmak üzere toplam 164 izolata yapılan PCR sonucunda *X. euvesicatoria* (31 adet), *X. vesicatoria* (31 adet), *X. gardneri* (51 adet), ve *X. perforans* (51 adet) olarak tanılanmıştır.

Kizheva vd. (2013), tarafından yapılan çalışmada, Bulgaristan ve Makedonya'nın farklı bölgelerinden 1987-2010 yılları arasında domates ve biberde bakteriyel lekeye neden olan 136 patojenik *Xanthomonas* izolatını Koenraadt vd. (2009)'un geliştirmiş oldukları primer çiftleriyle PCR a dayalı test yöntemini kullanarak tür düzeyinde tanı yapmışlardır. Bulgaristan'daki domates tarlalarında bakteriyel lekeli domateslerden 62 adet ve simptom göstermeyen yabancı otlardan da 27 adet olmak üzere toplam 89 izolat izole edilmiştir. Biberden ise Bulgaristan'dan 30 adet ve Makedonya'dan 16 adet *Xanthomonas* spp. izolatı kullanmışlardır. Biberden elde edilen 32 izolat (Bulgaristan'dan 20 izolat ve Makedonya'dan 12 izolat) *Xanthomonas euvesicatoria*, 97 izolat (83 izolat domates ve 14 izolat biber) *Xanthomonas vesicatoria* ve 5 izolat (domates bitkisinden) *Xanthomonas gardneri* olarak tanılanmıştır. Bu çalışma ile Bulgaristan'da domateste *Xanthomonas gardneri* ve biberde *X. euvesicatoria*'nın varlığı ilk kez rapor edilmiştir. Domates ve biberde bakteriyel lekeye neden olan *Xanthomonas* türleri Bulgaristan'da *X. vesicatoria, X. euvesicatoria* ve *X. gardneri* iken, Makedonya'da ise *X. vesicatoria* ve *X. euvesicatoria* olarak bulunmuştur.

Areas vd. (2014), Brezilya'nın farklı biber üretimi yapılan bölgelerinden izole edilen 59 *Xanthomonas* türünün ve 4 referans izolatın (IBSBF 2363, IBSBF 2364, IBSBF 2370, IBSBF 2373) biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanısını yapmıştır. Çalışma sonucunda *X. vesicatoria* (IBSBF 2364) ve *X. perforans* (IBSBF 2370) izolatlarının kuvvetli amilolitik ve

pektolitik aktiviteye sahipken, *X. euvesicatoria* izolatlarının zayıf amilolitik ve pektolitik aktivite gösterdiği ve *X. gardneri* (IBSBF 2373) izolatlarının hiçbirinde bu aktivitelerin olmadığı görülmüştür. Bütün izolatlar, Karbon kaynakları olarak N-asetil-D-glukozamin ve α-D-laktoz, asetik asit, D-galaktoz, glisil-L-aspartik asit, glikojen, L-treonin, malonik asit ve propiyonik asitlere değişken reaksiyonlar göstermiştir. *X. euvesicatoria* izolatları bu çalışmada değerlendirilen 13 karbon kaynağının çoğunu kullanmıştır. PCR sonuçları, Koenraadt vd. (2009)'un geliştirmiş oldukları primer çiftleriyle karakterize edilen tüm izolatlar (59 adet), 173 bp' de bant oluşturdukları için *X. euvesicatoria* olarak tanılanmıştır. Brezilya'da biberde bakteriyel lekenin etmeni olarak *X.euvesicatoria*'nın yaygınlığını göstermiştir.

Kebede vd. (2014), Etiyopya'da 128 domates bitkisinden alınan hastalıklı bitki örneklerinden elde edilen 64 bakteri izolatının patojenite, ırk belirleme testi ve Multi Locus Sequence Typing (MLSA)'ya dayanarak, türler arası seviyelerde filogenetik ilişkilerini çözmek için karakterize etmeyi amaçlamıştır. Her izolat için tür tanımlaması, *hrpB* genlerinden elde edilen dizilerle birlikte amilolitik ve pektolitik aktiviteye dayalı olarak doğrulanmıştır. 31 patojenik izolattan yedi tanesi domates ırkı 2 (T2) ve *X. vesicatoria* olarak, on dört tanesi domates ırkı 3 (T3), bir tanesi domates ırkı 4 (T4) ve *X. perforans* olarak tanılanırken, dokuz izolat ise domates ırkı 2 (T2) ve *X. gardneri* olarak tanılanmıştır. Tüm *X. perforans* izolatları biber üzerinde patojenik olarak bulunmamıştır. *X. vesicatoria* ve *X. gardneri* izolatlarının ise biberdeki patojenite özellikleri değişkenlik göstermiştir. Amilolitik ve pektolitik aktiviteye sahip izolatlar, *hrpB* sekanslarına göre *X. vesicatoria* ve *X. perforans* olarak tanımlanırken, amilolitik veya pektolitik reaksiyon göstermeyen izolatlar *X. gardneri* olarak tanılanmıştır. Etiyopya'da domateslerde *X. euvesicatoria*'nın varlığına rastlanmamıştır. Birleştirilmiş dizilerin filogenetik analizi, *X. gardneri, X. vesicatoria* ve *X. perforans*'ın Etiyopya'da BST (Domateste bakteriyel leke) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. *X. gardneri* ve *X. perforans* izolatları arasında genetik çeşitlilik bulunmamıştır. Bununla birlikte, *X. vesicatoria*'nın Etiyopya'ya iki farklı inokulum kaynağından gelmiş olabileceğini vurgulamışlardır.

Şahin ve Küsek (2015), biberin yoğun olarak yetiştiği Gaziantep ve Kahramanmaraş illerinde biber bakteriyel leke hastalığı simptomu gösteren bitkilerden izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatların tanısı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre yapılmıştır. Biber bitkilerinden elde edilen 103 bakteriyel izolatın YDC besi yerinde sarı konveks, NA besi yerinde ise sarı, mukoid koloniler, Tween B besi yerinde yuvarlak, sarı, tümsek ve çevresinde temiz koloniler, King B besi yerinde açık sarı-krem renkli, floresan

özellik göstermeyen koloniler oluşturduğu gözlenmiştir. Oksidaz testinde tüm izolatlar negatif olarak değerlendirilmiştir. KOH testinde bakteriler özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturduğundan gram negatif olarak kabul edilmiştir. Oksidadif/fermantatif testinde elde edilen tüm izolatların oksidatif özellikte olduğu gözlenmiştir. Nişasta hidrolizi testinde tüm izolatlar zayıf pozitif, katalaz testinde pozitif, tütünde aşırı duyarlılık testine göre izolatların tümü pozitif reaksiyon göstermiştir. Tüm bu testlerin sonuçlarına göre 103 izolattan 100 tanesi referans izolatlarla benzer sonuçlar vermesi nedeni ile *Xanthomonas axonopodis* olarak teşhis edilmiş ancak alttür seviyesinde tanıları yapılmamıştır.

Araújo vd. (2015), Brezilya'da ticari tarlalarda domates bitkileri arasında doğal olarak yetişen ve yapraklarında bakteriyel leke belirtisi olan *Nicandra physaloides, Solanum americanum* ve *Euphorbia heterophylla* yabancı otları olduğunu tespit etmiştir. Hastalıklı yabancı ot yaprak örneklerinden yapılan izolasyonlarda *Xanthomonas* benzeri izolatlar elde edilmiştir. Bu izolatlar, NA besi yerinde gelişim, patojenite testi, BOX-PCR ve Koenraadt vd. (2009)'un geliştirmiş oldukları primer çiftleri kullanılarak tür seviyesinde tanılanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda NA besi yerinde yabancı otlardan elde edilen izolatlar, *Xanthomonas* cinsinin tipik koloni özelliklerini (sarı-pigmentli ve mukoid-yuvarlak şekil) göstermiştir. *N. physaloides* ve *S.americanum'*dan elde edilen izolatlar *X. perforans* olarak *E. heterophylla*'dan alınan izolatlar ise *X. gardneri* olarak tanılanmıştır.

Timilsina vd. (2015), Altı farklı house-keeping (*gapA, gyrB, gltA, lacF, lepA ve fusA*) gen bölgesini tanılayan multilokus sekans dizi analizini (MLSA) kullanarak, Güneybatı Hint Okyanusu (SWIO) adaları, ABD, Afrika ve Yeni Zelanda'dan toplanan domates ve biberde bakteriyel leke ile ilişkili olan dört *Xanthomonas* türünü temsil eden bakteri izolatları (*X. euvesicatoria*=63 adet izolat, *X. gardneri*=29 adet izolat, *X.perforans*= 47 adet izolat ve *X. vesicatoria*= 9 adet izolat) incelenmiştir. Dizilenen izolatlar, *X. vesicatoria* (Tİ= ATCC 35937) ve *X. gardneri*'nin (Tİ= ATCC 19865) tip izolatları ile *X. euvesicatoria* (Rİ= 85-10) ve *X. perforans* (Rİ= 91-118) ise referans izolatları ile karşılaştırılmıştır. 29 *X. gardneri* izolatından oluşan örneklemde, 28 izolat housekeeping geninde aynı dizilere sahiptir. Bunun istisnası 1980 yılında Yeni Zelanda'da izole edilen ICMP7383 izolatıdır. Bu izolat, *X. gardneri* tip izolatından *lacF, fusA, gyrB* ve *gapA* genlerinde sırasıyla 2, 4, 10 ve 12 nükleotid olmak üzere altı housekeeping genin dördünde farklı olarak bulunmuştur. 9 *X. vesicatoria* izolatı arasında üç multilokus haploidi gözlemlenmiştir. *X. vesicatoria*'nın tip izolatını da içeren multilokus haplotipi Yeni Zelanda (2 adet) ve Etiyopya (1 adet) izolatlarında bulunmuştur ve bu haplotipe

sahip izolatlar *X. vesicatoria* grup 1 (3 adet) olarak adlandırılmıştır. İkinci bir haplotip Güney Amerika'da izole edilen iki izolat da ve Etiyopya'dan bir izolatta tespit edilmiştir. Bu izolatlar *X. vesicatoria* grup 2 (3 adet) olarak adlandırılmıştır. Bu haplotip *gyrB* ve *gapA* genlerinde sırasıyla 1 ve 12 nükleotid farklılık göstermektedir. Üçüncü bir haplotip ise SWIO bölgesinde, özellikle de Afrika'daki Reunion (1 adet) ve Madagaskar (2 adet) adalarında tespit edilmiştir ve bu haplotipe sahip izolatlar *X. vesicatoria* grup 3 (3 adet) olarak adlandırılmıştır. Bu haplotip *gyrB* ve *fusA* genlerinde sırasıyla 1 ve 2 nükleotid, *gapA* ve *gltA* genlerinde ise 8 nükleotid farklılık göstermektedir. *GyrB* geni grup 2 ve 3'te aynı diziliş göstermiştir. *Xanthomonas euvesicatoria* (63 adet), grup 1 olarak temsil edilen ve 55 adet izolat içeren ilk haplotip, altı gen boyunca *X. euvesicatoria* referans izolatı (85-10) ile aynı diziliş göstermiştir. 8 izolat ise referans izolattan farklı haplotip göstererek grup 2 olarak adlandırılmıştır. *X. euvesicatoria* grup 2 izolatları *fusA* ve *gapA* genlerinde sırasıyla 2 ve 8 nükleotid farklılık göstermektedir. Soy ağaçları, *fusA* ve *gapA* varyant dizilerinin *X. perforans*-*X. euvesicatoria*'nın aynı ortak atadan geldiklerini ortaya koymuştur. *Xanthomonas perforans* (47 adet) izolatlarının çoğu 91-118 referans izolatı ile aynı haplotipe sahip olarak bulunmuştur ve grup 1 (33 adet) olarak adlandırılmıştır. Bireysel genlere dayalı filogenetik analiz ile, 2006-2012 yılları arasında Florida'dan izole edilen bazı *X. perforans* izolatlarının (14 adet) *X. euvesicatoria* izolatlarıyla aynı gapA ve *gyrB* dizilerine sahip olduğu bulunmuştur ve bu izolatlar toplu olarak *X. perforans* grup 2 olarak adlandırılmıştır. Bu çalışma ile *X. euvesicatoria* ve *X. perforans* arasında çoklu rekombinasyon olaylarına dair kanıtlar bulunmuştur.

Osdaghi vd. (2016), İran'ın kuzeybatısında, Doğu Azerbaycan Eyaleti, Marand İlçesinde, hobi bahçesinden ve ticari tarlalarda yetiştirilen 30 bitkiden 15 tane enfekteli biber bitkisi alınmıştır. Elde edilen izolatların tanısı patojenite testi, biyokimyasal ve fizyolojik testler, cins ve türe özgü PCR testleri ile yapılmıştır. Bu testlerin sonucunda NA besi yerinde iki tip koloni morfolojisi gözlenmiştir. Birinci grup, soluk sarı, kubbeli dairesel ve dış bukey koloniler oluştururken, 2. grupta krem ve koyu sarı koloni oluşumu görülmüştür ve birinci ve ikinci gruplardan sırasıyla 20 ve 7 adet izolat seçilmiştir. Birinci gruptaki 20 izolatın tamamı gram negatif, katalaz pozitif özellik göstermiş, Hepsi (birinci gruptaki 20 izolat) YDC besi yerinde sarı mukoid koloniler göstermiştir. Biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre birinci grup izolatlar (20 adet) *Xanthomonas* cinsi içerisinde yer almıştır. İkinci grup izolatları (7 adet) gram pozitif çıktığı için daha fazla fenotipik karakterizasyon için testler yapılmamıştır. *X. euvesicatoria* ve *X. gardneri*'nin tip izolatları herhangi bir amilolitik ve pektolitik aktivite

göstermezken, *X. perforans*'ın tip izolatı pozitif amilolitik ve pektolitik aktivite göstermiştir. Birinci grup (20 adet) izolatlarına Koenraadt vd. (2009)'un geliştirmiş oldukları primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda, 20 izolatın da 173 bp'de bant oluşturduğu görülmüş ve *X. euvesicatoria* olarak tanılanmıştır. Ayrıca bu izolatların *gyrB* ve *hrpB* genlerinin dizileri kullanılarak filogenetik analizleri ile *X. euvesicatoria*'nın biberde patojen olduğu İran'da ilk kez rapor edilmiştir.

Eryigit (2016), tamamladığı tez çalışmasında, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan, tütünde HR+ ve *Xanthomonas* cinsine ait olduğu düşünülen 10 izolatı klasik (genel besi yeri YDCA ve semi selektif besi yeri Tween B'de koloni gelişimi), fizyolojik ve biyokimyasal testler (KOH testi, LOPAT testleri, nişastanın hidrolizi, aerobik/anaerobik gelişim ve jelatinin hidrolizi) ile moleküler olarak PCR testi ile tanılamıştır. Testlenen 10 izolatın tümü YDCA besi yerinde sarı, mukoid koloniler ve Tween B'de karakteristik dairesel kabarık sarı renkte koloniler ve etrafında beyaz presipitasyon bantları oluşturarak gelişmiş, 10 *Xanthomonas* spp. izolatının 8'i biyokimyasal ve moleküler testlere göre *X. euvesicatoria,* 2'si ise biyokimyasal testlere göre *X. perforans* olarak tanılanmıştır.

Burlakoti (2018), Tayvan'da 27 yıl boyunca (1989-2016) domates (292 izolat) ve biberden (198 izolat) elde edilen bakteri koleksiyonunun tür düzeyinde tanısını yapmıştır. 1989-1999 yılları arasında izole edilmiş popüslasyonunda, biberden elde edilen 147 izolatın tümü ve domatesten elde edilen 198 izolatın %95'i *X. euvesicatoria* olarak tanılanırken, geri kalan %5'lik domates izolatının ise *X. vesicatoria* olduğu tespit edilmiştir. 2000-2009 yılları arasındaki popülasyonunda domatesten elde edilen 36 izolatın %22 si *X. perforans* ve geri kalanı *X. euvesicatoria,* 2010-2016 yıllarında elde edilenlerden, 50 biber izolatının %92'si *X. euvesicatoria* ve kalanı *X. perforans* olarak tanılanmıştır. Yine aynı yıllar arasında domatesten elde edilen 58 izolatın %99'u *X. perforans* olarak bulunmuştur. 1990-2006 yılları arasında domatesten toplanan *X. euvesicatoria* izolatları (n=25) T1 ırkında yer almış, biber izolatları arasında ise P1, P2, P7 ve P8 biber ırklarının varlığı tespit edilmiştir. 1989-1999 yılları arasında domatesten toplanan *X. vesicatoria* izolatlarının (n=8) T2 ırkı olduğu ve 2010-2016 yılları arasında toplanan domates *X. perforans* izolatlarının (n=12) %13 ü T3 ve %83'ünün T4 ırkı olduğu bulunmuştur. Biberden elde edilen dört *X. perforans* izolatı ise T4 ırkı olarak belirlenmiştir. Bütün *X. vesicatoria* ve *X. perforans* izolatları tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmuştur. Farklı zaman dilimlerinde toplanan ve üç *Xanthomonas* türünü

temsilen toplam 48 izolat (32'si domates ve 16'sı biber) biyokimyasal karakterizasyon için kullanılmıştır. Biyokimyasal karakterizasyonu sonucunda, *X. euvesicatoria*'nın tüm izolatları (n=25) 1989-1999 popülasyonundan bir biber izolatı hariç amilolitik olmadığı ve 25 izolatın hepsinin lipaz ve O/F testinde pozitif olduğu bulunmuştur. *X. vesicatoria* izolatları (n=2) amilolitik ve O/F testlerinde pozitif, lipaz testinde negatif bulunmuştur. Tüm *X. perforans* izolatları (n=21) her üç testte de pozitif reaksiyon göstermiştir. Farklı zaman dilimlerinde (1989-1999, 2000-2009 ve 2010-2016) domates ve biberden izole edilen tüm *X. euvesicatoria* izolatları benzer biyokimyasal reaksiyonlar göstermiştir ve bu durum *X. perforans* izolatları arasında da geçerlidir.

Roach vd. (2018), Doğu Avustralya'daki domates, chilli biber ve *Capsicum* cinsi içerisindeki bitkilerde bakteriyel lekeye neden olan etmenin biyokimyasal testler ve moleküler analizleri (PCR, MLSA, NGS) yapılarak tanılanması amaçlamışlardır. Bu çalışmada 57 adet *Xanthomonas* benzeri bakteri izole edilmiş ve kontrol olarak 7 izolat da çalışmaya dahil edilmiştir. Bu 64 izolattan 10 u chilli biber, 21'i capsicum biberden, 31'i domatesten ve birer *Nicandra physalodes* ve *Solanum peruvianum*'dan elde edilmiştir. 64 izolatın tamamı YDCA'da sarı koloniler üretmiş ve KOH testi pozitif sonuç vererek bakterilerin gram negatif olduğu tespit edilmiştir. *X. euvesicatoria* (NCPPB 2968), *X. gardneri* (NCPPB 881) ve 28 Avustralya chilli ve capsicum biberi izolatlarının katalaz testi pozitif, nişastanın hidrolizi ve pektinin indirgenmesi testi negatif olarak bulunmuştur. *X. perforans* (NCPPB 4321), *X. vesicatoria* (NCPPB 422) ve domatesten elde edilen 18 Avustralya izolatının katalaz, nişasta hidrolizi ve pektinin indrgenmesi testleri pozitif sonuç vermiştir. Kalan Avustralya izolatları (18 adet izolat) dört farklı *Xanthomonas* türünden farklı biyokimyasal özelliklere sahiptir. Domatesten elde edilen bu izolatların 7'si nişastanın hidrolizi ve pektinin indirgenmesi pozitif ve katalaz negatiftir. *S. peruvianum*'dan 1, *N. physalodes*'den 1, capsicum biberden 1 ve domatesten 6 izolat (toplam 9 izolat) katalaz ve nişastanın hidrolizi pozitif ve pektinin indirgenmesi negatif olarak bulunmuştur. Capsicum biberden kalan 2 izolat katalaz, nişastanın hidrolizi ve pektinin indirgenmesi negatif olarak bulunmuştur. Bu izolatların (64 izolat ve 4 referans izolat) küme analizi yapıldığında 5 farklı grup içerisinde yer almışlardır. Dendrogramın 1. Grubunda nişastanın hidrolizi ve pektinin indirgenmesi pozitif olan 7 adet izolat, 2. Grubunda, grup 1'e en yakın kümelenmiş nişastanın hidrolizi ve pektinin indirgenmesi pozitif olan *X. vesicatoria* ve *X. perforans*'ın referans izolatları da dahil olmak üzere 20 izolatın olduğu gruptur. 3. Grupta katalaz, nişastanın hidrolizi ve pektinin indirgenmesi negatif olan 2

adet izolat yer almıştır. 4. Grupta ise, nişastanın hidrolizi pozitif ve pektinin indirgenmesi testi negatif olan 9 adet izolat kümelenmiştir. 5. Grupta *X. euvesicatoria* ve *X. gardneri*'nin referans izolatlarınında yer aldığı, nişastanın hidrolizi ve pektinin indirgenmesi negatif olan 30 adet izolat bulunmuştur. Grup 1, 2 ve 4 deki izolatlar domatesten elde edilmiştir, ancak grup 4 aynı zamanda *N. physalodes* ve *S. peruvianum* izolatları da içermektedir. Grup 2 ve 5 capsicum ve chilli biber izolatları içermektedir. Chilli biber ve capsicum türlerinden elde edilen 31 izolat 173 bp'de bant oluşturarak *X. euvesicatoria,* 8 izolat 138 bp'de bant oluşturarak *X. vesicatoria* olarak belirlenmiştir. Bunlardan 7 si domatesten ve 1'i *S. peruvianum*'dan izole edilmiştir. Geri kalan 25 adet patojenik ve patojenik olmayan izolatlar Koenraadt vd. (2009) da geliştirmiş oldukları primer çiftleri ile PCR yapılmasına rağmen herhangi bir bant oluşumu gözlemlenmemiştir.

Egel (2018), çalışmasında 2 yıl boyunca İndiana/ABD'de bakteriyel leke ile enfekteli olduğu düşünülen 22'si pazardan, 24'ü işletmelerden ve 3'ü tarladan olmak üzere 49 *Xanthomonas* izolatını 27F ve 1492R primer setini kullanarak 16S rRNA amplifiye etmiştir. Toplanan 49 izolattan %78'i *Xanthomonas perforans*, %20'si *Xanthomonas gardneri* ve 1 izolat ise *Xanthomonas euvesicatoria* olarak bulunmuştur.

Horuz (2019), 2016-2017 yıllarında Kayseri ilinde biber üretim alanlarından biberde bakteriyel leke hastalığına neden 12 *Xanthomonas* spp. izolatı elde etmiş, klasik ve moleküler yöntemlerle tanılarını yapmıştır. Bu testler sonucunda tüm izolatlar YDCA besi yerinde sarı, mukoid koloniler oluşturmuş ve nişastayı hidrolize ederek güçlü amilolitik aktivite göstermiştir. Moleküler testte tüm izolatları *X. euvesicatoria* olarak tanılamış ve Kayseri ilinde biber bakteriyel leke hastalığına *X. euvesicatoria*'nun neden olduğu sonucuna varmıştır.

Kayaaslan (2021), doktora tezinde, 2016-2017 yıllarında Tokat ilinde yoğun olarak biber üretimi yapılan alanlardan bakteriyel yaprak lekesi hastalık etmeni ile enfekteli biber örneklerinden 69 izolata morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testler yapmıştır. Yapılan testler sonucunda; bütün izolatlar, YDC besi yerinde sarı renkli ve mukoid, NA besi yerinde açık sarı ve yuvarlak, Tween B besi yerinde yuvarlak, sarı, tümsek ve çevresinde temiz haleli koloniler oluşturmuştur. Ayrıca bütün izolatların HR, katalaz ve levan oluşumu pozitif iken, oksidaz testi negatif olarak bulunmuştur. Nişastanın hidrolizi testinde 54 izolat negatif, 15 adet izolat zayıf amilolitik aktivite göstermiştir. RT65-RST69, XCVF-XCVR, Bs-XeF-Bs-

XeR ve Bs-XgF-BsXgR primerleri ile PCR testi yapılmıştır. Yapılan PCR sonucunda; bütün izolatlarda, 173 bp büyüklüğünde bant gözlenmiş ve *X. euvesicatoria* olarak tanılanmıştır.

Hernandez (2021), Chihuahua/Meksika'da 30 farklı biber ekim alanından 43 adet hastalıklı biber örneği toplamıştır. İzolasyonda elde ettiği 43 izolatın klasik ve moleküler yöntemlerle tanısını yapmış, tüm izolatların YDCA besi yerinde sarı, mukoid, dairesel ve dış bükey tipte koloniler oluşturduğu, gram negatif özellikte, katalaz ve KOH testleri pozitif olarak bulunmuştur. Ayrıca 37 izolat (%87) güçlü amilolitik aktivite gösterirken, 6 izolat (%13) amilolitik aktiviteye sahip olmadığı gözlenmiştir. Bu 37 izolat, 197 bplik bant oluşturarak *X. perforans* olarak, 6 izolat ise Bs-XeF/ BsXeR primerlerinin kullanımıyla 173bp'lik amplifikasyon oluşturmuş ve *X. euvesicatoria* olduğu bulunmuştur.

Soliman (2022), biber meyvelerinden izole edilen izolatlar, NA, YDCA ve mTMB ortamı üzerinde tipik büyüme sergilemiştir. Koloniler dışbükey, mukoid, parlak, ıslak ve dairesel, tüm kenarı sarı pigmentlidir. Bakteriyel izolatlar, mikroskobik ve biyokimyasal testlerde *Xanthomonas* türleri ile eşleştirilmiştir. İzolatlar, katalaz ve KOH testinde pozitif reaksiyon gösterirken nişastayı hidrolize etmede ve pektatı parçalamada zayıf bir performans göstermişlerdir. Patojenite testinde ilk reaksiyon olarak biber bitkilerinin yaprakları su emmiş lekeler şeklinde kendini göstermiştir. Lekeler koyu nekrotik lezyonlara dönüşmüştür ve kurumuş olan lekeler düşmüştür ve yapraklar delinmiştir. Gövde üzerinde nekrotik lezyonlar belirmiş ve zamanla koyu renge dönüşmüştür, ayrıca meyvelerin yüzeyindeki lekeler koyu renge dönüşmüştür. Patojenik izolat (1X olarak adlandırılmıştır) kimliğinin teyidi, *X. euvesicatoria* için spesifik primerler olan BSXeF/BSXeR ile gerçekleştirilmiş ve 173 bp'de bant oluşumu gözlemlenmiştir. NCBI GenBank veri tabanında 16S rDNA dizilimi ile yapılan BLAST taraması sonucu, Mısır'daki biber bakteriyel lekesinden elde edilen bu bakteriyel izolatın nükleotid dizisinin *X. euvesicatoria'*ya %96.49 homolog olduğunu göstermiştir. Test edilen izolatın nükleotid dizisi, MZ540733 erişim numarasıyla NCBI GenBank'ta saklanmıştır.

Barrera (2023), Sinaloa/Meksika'da farklı belediyelerin ticari alanlarından tipik bakteriyel leke belirtileri gösteren domates ve kırmızı biberden 93 bakteri izole etmiştir. Yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda bu 93 izolattan 47'sinin YDCA besi yerinde yuvarlak, dışbükey, sarı ve mukoid koloni oluşturduğu, ayrıca gram ve oksidaz negatif oldukları belirlenmiştir. 47 izolattan 32'sinin amilolitik aktivite göstermediği kaydedilmiştir. Türe özgü

primerler kullanılarak yapılan moleküler analiz sonucunda 47 izolatın %83'ü *Xanthomonas euvesicatoria*, %10.60'sı *X. perforans* ve %6.30'u *X. vesicatoria* olarak tanılanmıştır.

Zivkovic (2023), Sırbistan'ın Smederevska Palanka bölgesinden 2021 sezonunda 27 adet farklı biber tohumu toplamıştır. Bu biber tohumlarının her birine bakteri ekstraksiyonu yapılarak 27 adet izolat elde edilmiştir. Bu izolatların tür düzeyinde tespiti için iki geleneksel dubleks PCR testi kullanılmıştır. Amplifikasyon, Koenraadt vd. (2009)'un geliştirmiş oldukları primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir: 27 izolatın moleküler analizi sonucunda, 13 ünün 173 bp'de bant oluşturması sonucunda *X. euvesicatoria* olduğu bulunmuştur. Kalan 14 izolatın hiçbirinde herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir.

Akbaba vd., (2024), Iğdır Ovasından tipik bakteriyel leke simptomları gösteren 35 örnek toplanmış ve domates bitkilerinin yaprak ve meyvelerinden yapılan izolasyon sonucunda 10 bakteri izolatı başarılı şekilde izole edilmiştir. Bu izolatların; patojenite değerlendirmeleri, biyokimyasal testler, FAME profili oluşturma, türe özgü primerler kullanılarak PCR ve *hrpB* gen dizilerinin filogenetik analizini kapsayan bir dizi analizler yapılmıştır. Bu analizlerin sonucunda; YDCA besi yerine çizilen bakteriyel izolatlar belirgin sarı, yuvarlak ve mukoid tipte geliştikleri gözlemlenmiştir. İzolatların tümü gram negatif özellikte, tütünde aşırı duyarlılık oluşturmuş, oksidaz testi negatif ve katalaz testi pozitif sonuç vermiştir. 10 bakteriyel izolattan 5 tanesi pozitif, 1 tanesi kuvvetli pozitif ve 4'ü ise negatif amilolitik aktivite göstermiştir. İzolatların neden olduğu hastalık şiddeti %33.91 ile %74 arasında değişkenlik göstermiştir. PCR testi sonucunda; 4 bakteriyel izolat BS-XeF/BS-XeR primerler çiftine göre *X. euvesicatoria pv. euvesicatoria* olarak tanılanırken, 6 bakteriyel izolat *hrpB* geninin dizilenmesi ile *X. euvesicatoria pv. perforans* ile benzerlik göstermiştir.

Scherer (2024), 2018 ve 2019 yıllarında Batı Kuzey Kaliforniya'daki Buncombe, Haywood, Henderson, Madison, McDowell, Mecklenburg, Rowan ve Swain ilçelerindeki domates üretim tesislerinden hastalıklı bitki örnekleri toplamıştır. Toplanan bu izolatlar *Xanthomonas* spp. olduğu varsayılan sarı, mukoid tipte NA besi yerinde gelişmiş ve Real-Time PCR ile *X. perforans* olarak tanılanmıştır.

Liu vd. (2024), Çin'in serada patlıcan üretim tesisinde patlıcan fidesi yapraklarında suda ıslanmış sarımsı lekeler şeklinde başlayan ve ilerleyen dönemlerde kahverengi-siyah lekelere dönüşen hastalıklı patlıcan yapraklarından örnekler alınarak, bakteriyel etmenin izolasyonu, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler testlerle tür düzeyinde tanısını yapmışlardır. Elde edilen

bakteriyel izolatların tümü, çubuk şeklinde, gram negatif bakteri olup, NA besi yerinde 48 saat sonunda soluk sarı, mukoid, pürüzsüz, 1-2 mm çapında kubbeli dairesel koloniler oluşturmuştur. Oksidaz, üreaz ve arginin dihidrolaz testlerinin yanı sıra, indol üretimi ve nitrat indirgeme testlerinde de negatif reaksiyon göstermiştir. B-galaktosidaz, jelatinin hidrolizi ve esculinin hidrolizi testlerinde pozitif reaksiyon göstermiştir. Karbon kaynağı kullanımına ilişkin test sonuçları ise, D-selobiyoz, D- glukuronik asit, α-D-glukoz, D-mannaz, D-galaktoz, jelatin, D-trehaloz, pektin ve Tween 40'ı kullanabildiğini göstermiştir. Elde edilen bakteri izolatları 173 bp'lik bir bant amplifikasyonu ile *X. euvesicatoria* olarak tanılanmıştır. Bu çalışma ile, Çin'de patlıcanda *X. euvesicatoria*'nın varlığı ilk kez rapor edilmiştir.

Aktepe vd. (2024), 2004-2021 yılları arasında Adana, Antalya ve Mersin illerinde tarla ve örtü altında yetiştirilen biber ve domatesten izole edilmiş 66 adet *Xanthomonas* spp. izolatını Koenraadt vd. (2009)'un geliştirmiş oldukları primer çiftleri kullanılarak klasik PCR testi ile tekrardan sınıflandırmıştır. Yapılan PCR testi sonucunda 60 adet izolat 173 bp'de bant oluşturarak *Xanthomonas euvesicatoria* olarak, 6 adet izolat ise 197 bp'de bant oluşturarak *Xanthomonas perforans* olarak sınıflandırılmıştır. *X. euvesicatoria* olarak tanımlanan 60 izolatın (30'u domates ve 30'u biber) 45 adedi fidelikten, 5 adeti tohum, 9 adedi tarladan ve 1 adeti ise örtü altından, *X. perforans* olarak tanımlanan 6 adet izolatın (hepsi domatesten) 5 adedi fidelikten ve 1 adedi ise tarladan izole edilmiştir.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Bitkisel Materyaller

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak, 2021-2022 yıllarında Antalya, Kayseri, Kırşehir, Mersin, Nevşehir ve Yozgat illerinden Haziran-Temmuz aylarında temin edilen biber yapraklarının yüzeyinde nemli koşullarda su emmiş gibi görünen küçük sarı-yeşil, etrafı sarımsı hale ile çevrili lekeler ve merkezi kahverengi-siyah olan genel sarılık simptomu olan 100 adet biber yapraklarından alınan örnekler, Patojenite testi için ilaçsız Şili Biber Tohumu (Sunagri Tohumculuk/Türkiye), Aşırı duyarlılık testi için tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) kullanılmıştır.

2.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Alet, Ekipman ve Kimyasallar

Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi araştırma binasında bulunan sıcak su banyosu (BS-31), hassas terazi (IKA), sterilizatör (Steri) mikropipet seti (Eppendorf), otoklav (Hirayama Hv-50), tüp karıştırıcısı (Heidolph), thermocyler (BIO-RAD), manyetik ısıtıcılı karıştırıcı (Heidolph), pH metre (HANNA), inkübatör (Nüve), dairesel çalkalayıcı (Sartorius), steril kabin (Nüve), buzdolabı ve derin dondurucu (Thermo), santrifüj (Eppendorf), thermalcycler (Bio-Rad), elektroforez jel tankı ve görüntüleme cihazı (Bio-Rad), çeşitli cam, plastik ve metal malzemeler kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında besi yerlerinin hazırlanmasında; Proteose peptone (Acumedia), Tryptone enzymatic digest from casein (Sigma-Aldrich), Dipotasyum hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (Merck), Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_47H_2O$) (Merck), Agar (Sigma-Aldrich), Glycerol solution %84-88 (Sigma-Aldrich), Yeast-Extract (Merck), Glucose (Carlo Erba), $CaCO_3$ (Merck), Nutrient Broth (Merck), Potasyum Hidroksit (KOH) (Merck), Nutrient Agar

(Merck), Sucrose (Carlo Erba), N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloridae (Sigma-Aldrich), lodine Sublimated (Isolab), NaCl (Merck), Bromthymol blue (Sigma-Aldrich), Beef extract (Sigma-Aldrich), Ferric ammonium citrate, Esculin (Sigma) gibi kimyasallar kullanılmıştır.

2.1.3. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Primerler

DNA İzolasyon Kiti (NGE001, NucleoGene), PCR Master Mix (K0172, Thermo Scientific), Water Nukleaz free (Thermo Scientific), Ethidium Bromür (Fluka), Agar (Sigma), TBE buffer (Sigma) ve *Xanthomonas* türlerine özgü spesifik primerler (Tablo 4) kullanılmıştır.

Tablo 4. *Xanthomonas* türleri için türe özgü spesifik primer çiftleri

Bs-XeF	5'-CAT GAA GAA CTC GGC GTA TCG-3'	173bp	Koenraadt vd. 2009
Bs-XeR	5'-GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATA C-3'		
HpaF-f	5'-GTG GCA GGC AGG CAA TCG ACG-3'	300bp	Ning, 2012
HpaF-r	5'-CCG GCA CGT CGA CGC CTG GAA ACC-3'		
Bs-XvF	5'-CCA TGT GCC GTT GAA ATA CTT G-3'	138bp	Koenraadt vd. 2009
Bs-XvR	5'-ACA AGA GAT GTT GCT ATG ATT TGC-3'		
Bs-XgF	5'-TCA GTG CTT AGT TCC TCA TTG TC-3'	154bp	Koenraadt vd. 2009
Bs-XgR	5'-TGA CCG ATA AAG ACT GCG AAA G-3'		

2.2. Yöntem

2.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Kayseri'de bulunan biber üretimi yapılan seralar, bahçeler, fidelikler ve biber fidesi satan işletmeler gezilmiştir ve biber yapraklarının yüzeyinde nemli koşullarda su emmiş gibi görünen küçük sarı-yeşil, etrafı sarımsı hale ile çevrili lekeler ve merkezi kahverengi-siyah olan genel sarılık simptomu olan bitkilerden örnekler alınmıştır. Fideliklerden alınan örnekler viyollerle laboratuvara getirilmiştir (Şekil 2.1). Tarlalardan toplanan örnekler ise temiz bir kağıt havlunun içerisine yerleştirilip daha sonra bir buzdolabı poşetinin içerisine konulmuştur. Bu poşetler buzdolabında +4 °C' de izolasyonları yapılana kadar saklanmıştır.



Şekil 2.1. Biber fidesinde klorotik ve nekrotik lekeler

2.2.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinden İzolasyon ve Saflaştırma

Hastalık belirtisi bulunan bitkilerden alınan yaprak örneklerini bakırdan ve topraktan arındırmak için yaprakların üst yüzeyi nazikçe çeşme suyundan geçirilmiş ve kurutma kağıdının üzerinde oda sıcaklığında kuruyuncaya kadar bekletilmiştir. Yaprak örneklerinden enfekteli ve sağlıklı dokuyu içerecek şekilde parçalar (3-4mm) kesilmiştir. Kesilen parçaların yüzeyden dezenfeksiyonu için steril pamuk içerisinde %70'lik alkol püskürtülerek 1 dakika pamuk arasında bekletilmiştir. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan örnekler, steril havanlar içerisine alınarak havan eli ile ezilmiştir ve üzerine 2-3 ml steril saf su eklenerek süspanse edilmiştir. Yaklaşık 15 dakika sonra süspansiyondan bir öze dolusu alınarak King B (King vd. 1954) besiyerine iki tekrar olacak şekilde üç çizgi yöntemi ile çizilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Petriler 25 °C'de inkübatörde 2-3 gün inkübe edildikten sonra gelişen koloniler incelenmiştir.

Gelişen kolonilerden; yuvarlak, sarı renkli ve mukoid yapıda olan farklı tipteki koloniler steril öze ile alınarak yeni petrilere çizgi ekim yapılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırılan izolatlar +4 °C'de buzdolabında ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere cam tüplere (16x160

mm) eğik olarak hazırlanmış YDCA besi yerinde ve -20°C'de 1:1 oranında hazırlanan gliserin (% 40) ve nutrient broth (8 g/L) içerisinde dondurucuda saklanmıştır.

2.2.3. Bakteriyel İzolatların Patojenitesinin Belirlenmesi

Fide Hazırlığı: Bakteriyel hastalık etmeni ile enfekteli biber bitkilerinden izole edilen bakteri izolatlarının patojenitesinde 28 gözlü steril torf içeren viyollere ekimi yapılan Şili Biber (Sun Agri Tohumculuk/Türkiye) tohumu kullanılmıştır. Fideler 3-5 gerçek yapraklı döneme geldiğinde steril torf içeren saksılara şaşırtılmıştır. Bitkiler ortam sıcaklığının 28-32 °C ve oransal nemin %70- %80 olduğu Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dekanlığına ait ısıtmalı seralarda tutulmuştur.

İnokulum Hazırlanması ve Bitkilere Uygulanması: Elde edilen bakteri izolatları ile 3-5 gerçek yapraklı dönemdeki biber bitkileri kullanılarak patojenite testleri yapılmıştır. Bunun için 36-48 saatlik taze bakteri kültürlerinden hazırlanan 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyon biber yaprak alt yüzeyine el pülverizatörü kullanmak suretiyle püskürtme yöntemi ile inokule edilmiştir. Bitkiler hastalık belirtileri gözleninceye kadar günlük olarak takip edilmiştir. Değerlendirmeler inokulasyonlardan yaklaşık üç hafta ve bir ay sonra yapraklardaki küçük sarı klorozlar, ilerleyen dönemde kahverengileşen etrafı sarımsı haleler ile çevrili lekelerin oluşumuna göre yapılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987).

Re-İzolatların Elde Edilmesi: Hastalık belirtisi gösteren bitkilerden bakteriyolojik yöntemlere göre King B besi yerine re-izolasyonlar yapılmıştır. Petride gelişen koloniler ilk izolatlarla karşılaştırılmış, benzer olduğu tespit edilenlerden en az dört adet re-izolat saflaştırılarak izolatların KOCH Postulatı işlemleri tamamlanmıştır. Re-izolatlar eğik olarak YDCA besi yerinde +4 °C'de ve gliserin+nutrient broth içerisinde derin dondurucuda saklanmıştır. Klasik ve moleküler tanı çalışmalarında bu re-izolatlar kullanılmıştır.

2.2.4. İzolatların Klasik Yöntemlerle Tanısına Yönelik Testler

2.2.4.1. Morfolojik Gelişim

Biber bitkilerinden elde edilen re-izolatların King B ve YDCA besi yerlerinde koloni gelişimleri izlenmiştir.

King B (Ek 1.1) ve YDCA (Ek 1.2) besi yerine ekilen izolatların 24-48 saat 25°C'de inkübasyonundan sonra sarı koloni ve mukoid tipte gelişimlerine göre değerlendirilme yapılmıştır (Schaad vd. 2001). YDCA besi yerinde pozitif kontrol olarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Yeşilyurt CMM) izolatı kullanılmıştır.

2.2.4.2. Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler

Biber bitkilerinden re-izolasyonu yapılan *Xanthomonas* türlerinin klasik yöntemlerle tanısı için Levan oluşumu, Oksidaz testi, Potasyum Hidroksit (KOH) testi, Aerobik/Anaerobik Gelişim testi, Tütünde Aşırı Duyarlılık testi, Nişastanın Hidrolizi, Jelatinin Hidrolizi ve Esculinin Hidrolizi testleri yapılmıştır.

2.2.4.2.1. Levan Oluşumu

Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) (Ek 1.3) besi yerinde 2-3 gün sonunda gelişen sarı, kubbemsi, mukoid yapı oluşturan bakteri kolonileri levan pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schaad vd. 2001). Pozitif kontrol olarak *Erwinia amylovora* (Elma Z. Bahçe) izolatı kullanılmıştır.

2.2.4.2.2. Oksidaz Testi

King B besi yerinde24-48 saat önceden ekilen taze bakteri kolonilerinden, kurutma kağıdının üzerine %1'lik tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride solüsyonundan bir damla damlatılmıştır. Damlatılan solüsyonun üzerine bir öze dolusu bakteri kültürü alınarak bu bölgeye sürülmüştür. Kurutma kağıdında 10 saniye içerisinde mor renge dönen koloniler pozitif (+) sonuç olarak değerlendirilmiştir (Schaad vd. 2001). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas corrugata* (MD 1-5) kullanılmıştır.

2.2.4.2.3. Potasyum Hidroksit (KOH) Testi

Taze hazırlanan % 3'lük Potasyum Hidroksit solüsyonundan bir damla lam üzerine damlatıldıktan sonra 48 saat boyunca taze gelişmiş olan bakteri kültürlerinden bir öze dolusu alınarak dairesel hareketlerle solüsyon içerisinde homojenize edilmiştir. Öze yukarı doğru kaldırıldığında sakız gibi uzama görülen izolatlar Gram Negatif (-) özellikli olarak değerlendirilmiştir (Schaad vd. 2001). Kontrol olarak Gr^{+} bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (RB1-1) ve Gr^{-} bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (D1-2) kullanılmıştır.

2.2.4.2.4. Aerobik/Anaerobik Gelişim Testi

Taze geliştirilmiş 48 saatlik bakteriyel izolatlar (Ek 1.4)'de verilen çözeltiye nokta aşılama ile inoküle edilmiştir ve üzerine 5 mm kalınlığında steril parafin eklenerek yüzeyi kapatılmıştır. 5-6 gün süreyle 28 °C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra başlangıçta yeşilimsi-mavi olan ortam renginin sarıya dönmesi aerobik gelişim olarak değerlendirilmiştir (Klement vd. 1990). Pozitif kontrol olarak *Erwinia amylovora* (Elma Z. Bahçe) izolatı, negatif kontrol olarak aşılanmamış besi yerleri kullanılmıştır.

2.2.4.2.5. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi

Bakteri izolatları King B besi yerine çizilerek 25°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İçerisinde sıvı broth bulunan cam tüplere bu taze bakteri izolatlarından aktarılmıştır. Tüpler vortekslenerek solüsyonun homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) bitkisi yaprağının alt yüzeyindeki damar aralarına, taze bakteri izolatlarının 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu steril bir enjektör yardımı ile inoküle edilmiştir. 24-48 saatlik inkübasyondan sonra inoküle edilmiş alanlarda oluşan nekrotik ve su emmiş görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Klement vd. 1990). Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (CG-6-1r 1R Pst) izolatı, Negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır.

2.2.4.2.6. Nişastanın Hidrolizi

Bakteriyel izolatlar (Ek 1.5)'de verilen içerisinde %1.5 nişasta içeren Nutrient Agar (NA) besi yerine T şeklinde çizildikten sonra 24-26 Cº'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra izolatların üzerine lugol çözeltisi ((1g iodine ve 2g KI (potasyum iodine), 300 ml distile suda eritilmiştir)) dökülmüştür. Bu çözeltinin dökülmesiyle nişastayı hidrolize edebilen yani amilolitik özellikte olan bakteri kolonilerinin etrafında açık alanların oluşması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lue vd. 2010). Pozitif kontrol olarak *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe 75), negatif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Dom P1 Tabaklar Pst) izolatları kullanılmıştır.

2.2.4.2.7. Jelatinin Hidrolizi

Ek (1.6)'da verilen ortama bakteriyel izolatlar çubuk iğne ile aşılanmıştır ve 24 °C'de 7-14 gün bekletilmiştir. Jelatin hidrolizi kontrol edilmeden önce tüpler 30 dakika kadar +4 °C'de buzdolabında bekletilmiştir. Tüplerdeki jelatin akıcı halde ise pozitif, katı halde ise negatif

olarak değerlendirilmiştir (Zimbro vd. 2009). Pozitif kontrol için *Erwinia amylovora* (Elma Z. Bahçe), negatif kontrol olarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Yeşilyurt CMM) izolatları kullanılmıştır.

2.2.4.2.8. Esculinin Hidrolizi

Bakteriyel izolatlar (Ek 1.7)'de verilen ortama aşılanmıştır ve 28 ºC'de çalkalayıcıda 28 gün bekletilmiştir. 28 günün sonunda besi yerinin rengi kahverengi-siyah arası bir renk alırsa pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sneath, 1956). Pozitif kontrol olarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (RB1-1), negatif kontrol olarak aşılanmamış besi yeri kullanılmıştır.

2.2.5. İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanısı

Klasik, Biyokimyasal ve Fizyolojik testlere göre *Xanthomonas* spp. olarak tanılanan 33 re-izolatın tanılarını desteklemek ve kesinleştirmek amacıyla türe spesifik primerler kullanarak PCR'a dayalı moleküler testler yapılmıştır.

2.2.5.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, NucleoGene marka kit kullanılarak yapılmıştır. NucleoGene DNA izolasyon kitinin belirlediği protokole göre;

King B besi yerinde 25 °C'de 48 saat gelişen saf bakteri kültürlerinden tek bir koloni alınarak cam tüplerdeki 5 ml'lik NB besi yerine aşılanmıştır. Aşılanan tüpler çalkalayıcıda 16-24 saat 25°C de 250 rpm hızda çalkalanmıştır. Ertesi gün gelişen bakteri kültüründen 1000 µl alınmış ve 1.5 ml hacimli santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Her bir bakteriyel süspansiyon 10.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve Süpernatant (üstteki sıvı kısım) atılmıştır. Bakteriyel hücre pelletine 400 µl Lysis Buffer ve 20 µl Proteinaz K eklenmiştir. Daha sonra su banyosunda 550 rpm'de 60 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra santrifüj tüplerine 400 µl Binding Buffer eklenmiş ve tüpler 15 saniye boyunca vortekslenmiştir. Vortekslenen örneklerin 800 µl'si spin column'lara aktarılmış ve 2 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Altta kalan collection (toplama) tüpü atılmıştır ve column yeni bir collection tüpüne yerleştirilmiştir. Spin column'a 500 µl Wash I Buffer eklenmiş ve 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Sıvıyı içeren alt tüp atılmış ve spin column yeni bir collection tüpüne yerleştirilmiştir. Spin column'a 750 µl Wash II Buffer eklenmiş ve yeniden 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Sıvıyı içeren alt tüp atılmış ve spin

column yeni bir collection tüpüne yerleştirilmiştir. Spin columndaki etanol kalıntısını uzaklaştırmak için tüpler 3 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Spin column steril bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiştir. Spin column'un merkezine 200 µl Elüsyon Buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından Spin column 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Spin column atılmış ve 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerdeki DNA steril kabinde alkolün iyice uçması için bir saat bekletilmiş ardından -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

2.2.5.2. PCR Reaksiyonun Kurulması

PCR reaksiyonunun içeriği her bir örnek için 25 µl olacak şekilde (12.5 µl PCR Master Mix, 2'şer µl Forward ve Reverse primerler, 6,5 µl ultra saf su, 2 µl genomik DNA) hazırlanmıştır. Bir ependorf tüpe DNA hariç diğer malzemeler eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra PCR tüplerinin her birinde 23 µl olacak şekilde bölüştürülmüştür. 23 µl olan PCR tüplerinin içerisine 2 µl bakteri DNA'sı eklenerek 25 µl'ye tamamlanmıştır. Negatif kontrol tüplerine sadece PCR karışımı eklenmiştir. Daha sonra tüm örnekler thermocycler cihazına yerleştirilmiş ve PCR programı ayarlanarak DNA'nın çoğalması sağlanmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Termocycler cihazında ayarlanan PCR programı

Program Adımları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	2 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	35
Primer Bağlanması	65	30 saniye	35
Uzama	72	30 saniye	35
Son Uzama	72	10 dakika	1
Bekleme	4	Süresiz	1

2.2.5.3. PCR Ürünlerinin Jel Elektroforez Sisteminde Yürütülmesi

100 ml'lik 1X TBE buffer içerisine 1.2 gr agaroz eklenmiş ve mikro dalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Jel 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra elektroforez tankına taraklar yerleştirilmiş ve % 1.2'lik agaroz jel dökülmüştür. Agaroz jel yaklaşık yarım saat içerisinde donduktan sonra taraklar yavaşça, dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Daha sonra tankın içerisine agaroz jeli örtecek şekilde TBE buffer eklenmiştir. Agaroz jeldeki kuyucukların her birine 5 µl

olacak şekilde PCR sonucu elde edilen ürünlerden mikropipetle aktarılmıştır. İlk ve son kuyucuğa oluşan bantların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla 2 µl 100 bp'lik markır (moleküler işaretleyici) ve son kuyucuğa pozitif kontrol (Xe 75 ve Xp GEV485) eklenmiştir. Agaroz jel 1.5 saat boyunca 110 voltta 70 miliamper akım uygulanarak koşturulmuştur. Daha sonra jel etidyum bromür (10mg/ml) bulunan bir kap içerisinde 5-10 dakika bekletilerek oluşan bantların boyama işlemi yapılmıştır. Boyama işleminden sonra UV ışığı yayan transliminatörde oluşan bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Örneklerde *X. euvesicatoria* için 173 bp, *X. perforans* için 300 bp büyüklüğünde bant olup olmadığı incelenmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1.Hastalıklı Bitkilerden Patojen İzolasyonu

40 adet biber fidesinden yapılan izolasyonlar sonucunda petride sarı renkte mukoid tipte saf kolonilerin geliştiği 28 izolat 2021 yılına ve 5 izolat ise 2022 yılına ait olmak üzere 33 adet izolat elde edilmiştir. İzolatların % 66.67'si (22 adet) tarladan ve % 33.33'ü (11 adet) fidelikten temin edilen hasta biber fidelerinden izole edilmiştir. İzolatların illere göre dağılımına bakacak olursak; % 51.52'si Kayseri (17 adet), % 18.18'i Antalya (6 adet), % 15.15'i Mersin (5 adet), % 6'sı Yozgat (2 adet), % 6'sı Kırşehir (2 adet) ve %3.03'ü Nevşehir (1 adet)'den elde edilmiştir (Şekil 3.1). Her bir örnek yerini temsil edecek şekilde dörder adet koloni yeni bir King B besiyerine saflaştırılmıştır (Şekil 3.2). Elde edilen izolatların listesi Tablo 6'da verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan izolatların elde edildiği lokasyonlar



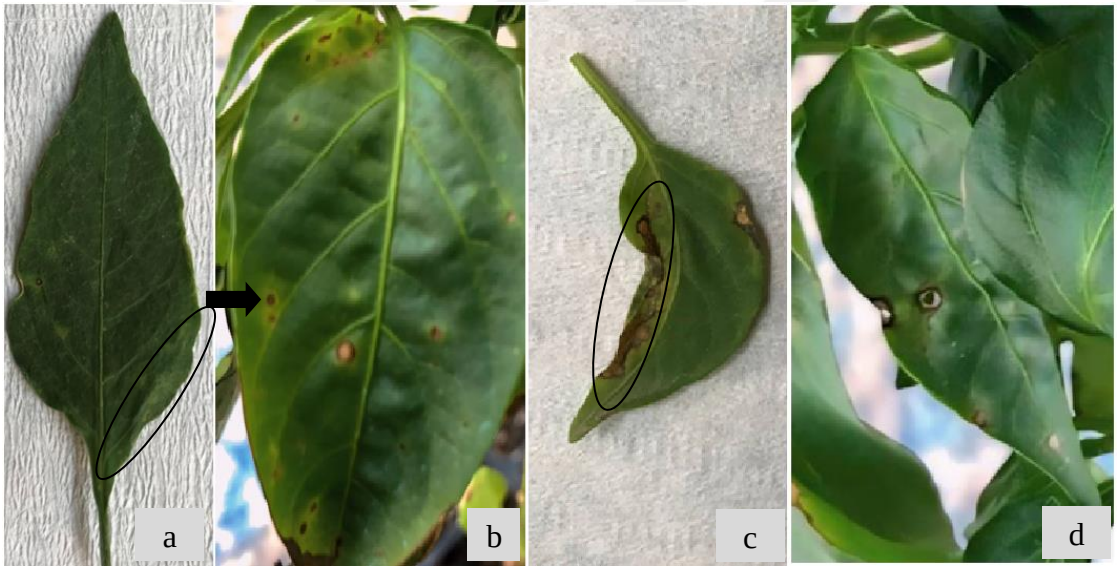
Şekil 3.2. King B besi yerine yapılan ilk izolasyonda bakteriyel koloni gelişimi

Tablo 6. Elde edilen bakteriyel izolatların listesi

İzolat kodu	Alındığı yer (İlçe/İL)	Fidelik/Tarla	İzolasyon yılı
TG1-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG2-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG3-2	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG4-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG5-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG6-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG7-1	Boğazlıyan/YOZGAT	Tarla	2021
TG8-1	Boğazlıyan/YOZGAT	Tarla	2021
TG9-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG10-1	Tarsus/MERSİN	Fidelik	2021
TG11-1	Aksu/ANTALYA	Fidelik	2021
TG12-1	Tarsus/MERSİN	Fidelik	2021
TG13-1	Tarsus/MERSİN	Fidelik	2021
TG14-1	Aksu/ANTALYA	Fidelik	2021
TG15-1	Serik/ANTALYA	Fidelik	2021
TG16-1	Aksu/ANTALYA	Fidelik	2021
TG17-1	Tarsus/MERSİN	Fidelik	2021
TG18-1	Tarsus/MERSİN	Fidelik	2021
TG19-1	Cırgalan/KAYSERİ	Tarla	2021
TG20-1	Karahıdır/KIRŞEHİR	Tarla	2021
TG21-1	Karahıdır/KIRŞEHİR	Tarla	2021
TG22-1	Serik/ANTALYA	Fidelik	2021
TG23-1	Aksu/ANTALYA	Fidelik	2021
TG24-1	NEVŞEHİR	Tarla	2021
TG25-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2022
TG26-1	Kocasinan/KAYSERİ	Tarla	2021
TG27-1	Kocasinan/KAYSERİ	Tarla	2022
TG28-1	Kocasinan/KAYSERİ	Tarla	2021
TG29-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG30-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2021
TG31-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2022
TG32-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2022
TG33-1	Talas/KAYSERİ	Tarla	2022

3.2. Bakteriyel Etmenlerin Patojenitesi ve Re-İzolatların Eldesi

Her bir yeri temsil etmesi açısından birer izolat patojenisite testinde kullanılmıştır. 15-30 gün sonra ilk belirtiler; yaprakların alt yüzeyinde su emmiş lekeler şeklinde kendini göstermiştir (Şekil 3.3a). Daha sonra yaprakların üst yüzeyinde etrafı klorozlu olan kahverengi lekeler ortaya çıkmıştır (Şekil 3.3b). Bu yaprak lekelerinin çoğu nem birikmesinden dolayı yaprak kenarı ya da uç kısımlarında toplanma eğilimi göstermiştir (Şekil 3.3c). Bu kahverengi lekeler zamanla kuruyarak dökülmüş ve yaprak yüzeyinde saçma ile delinmiş bir görünüm ortaya çıkmıştır (Şekil 3.3d). Enfekteli bitkilerden elde edilen 33 adet izolat ile yapılan patojenite çalışması sonucunda re-izolasyon yapılmış ve petride sarı renkte ve mukoid tipte bakteriler gelişmiştir. Bu sonuçlara göre KOCH postulatları tamamlanmış ve 33 adet izolatın da patojen olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Patojenite testi sonucunda oluşan hastalık belirtileri a) Su emmiş lekeler b) Etrafı klorozlu olan kahverengi lekeler c) Nem birikmesi sonucu yaprak kenarında nekrozlar d) Kahverengi lekelerin kuruması sonucu oluşan delik saçması

3.3. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Test Sonuçları

3.3.1. King B ve YDCA Besi Yerindeki Koloni Gelişimi Sonuçları

33 re-izolatın King B (Şekil 3.4a) ve YDCA (3.4b) besi yerinde koloni gelişimi incelenmiş ve hepsinde sarı renkte ve mukoid tipte gelişim gözlenmiştir.



Şekil 3.4. İzolatların King B (a) ve YDCA (b) besi yerinde sarı-mukoid gelişimi

3.3.2 Re-İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları

3.3.2.1. Levan Oluşumu

Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besiyerine çizilen bakterilerin sükrozu kullanması sonucunda petride kubbemsi ve mukoid şekilde gelişen koloniler incelenmiştir. Tablo 8.'de görüldüğü gibi 33 izolattan 3 tanesi güçlü kubbemsi yapı gösterirken, 30 tanesi zayıf kubbeli levan tipte koloni yapısı göstermiştir (Şekil 3.5a).

3.3.2.2. Oksidaz Testi

33 tane re-izolatın oksidaz test solüsyonu dökülmüş filtre kağıtlarına çizilmesi sonucunda hiçbir renk değişimi göstermediği (Şekil 3.5b) için oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 8).

3.3.2.3. Potasyum Hidroksit Testi (KOH)

Bu test sonucunda 33 re-izolatın hepsinde öze kaldırıldığında sümüksü bir yapı görülmüştür (Şekil 3.5c). Bunun sonucunda; reaksiyon pozitif, bakteri ise gram negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Tablo 8).

3.3.2.4. Aerobik/Anaerobik Gelişim

Re-izolatların 25ºC'de 5-6 günlük inkübasyonundan sonra ortam sarı renge dönmüştür (Şekil 3.5d) ve aerobik gelişim olarak değerlendirilmiştir (Tablo 8).

3.3.2.5. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi

İnokülasyondan 24 saat sonra uygulama yapılan alanlarda su emmiş şeklinde görülen lekeler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.5e). 31 izolattan 13'ü HR^+, 18 izolat ise HR^- olarak değerlendirilmiştir (Tablo 8).

3.3.2.6. Nişastanın Hidrolizi

Bu test 7-14 günlük inkübasyon sonunda amilaz enziminin varlığını/yokluğunu belirlemek amacıyla yapılmıştır. İzolatların amilolitik özelliği güçlü amilolitik, zayıf amilolitik ve negatif olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. (Şekil 3.5f)'de gösterilen NH (Nişastanın hidrolizi) değeri cetvel yardımıyla ölçülmüş ve bu değerler Tablo 7'de verilmiştir. Bu değerlerden; NH≥1 olarak ölçülen izolatların güçlü amilolitik özellikte, 0<NH<1 aralığında ölçülen izolatların zayıf amilolitik özellikte ve NH=0 olarak ölçülen izolatların ise negatif özellikte olduğu şeklinde bir değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirmeler sonucunda; 33 re-izolattan 9 tanesinin güçlü amilolitik özellikte, 15 izolatın zayıf amilolitik özellikte ve 9 izolatın ise negatif amilolitik özellik gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 8).

Tablo 7. Nişastanın Hidrolizi testi ölçüm sonuçları

	Nişastanın Hidrolizi (NH cm)		Nişastanın Hidrolizi (NH cm)		Nişastanın Hidrolizi (NH cm)
TG1-1	1.0	**TG13-1**	0.8	**TG25-1**	0.0
TG2-1	1.0	**TG14-1**	0.0	**TG26-1**	0.5
TG3-2	0.8	**TG15-1**	1.0	**TG27-1**	1.6
TG4-1	0.0	**TG16-1**	0.9	**TG28-1**	0.6
TG5-1	0.0	**TG17-1**	0.3	**TG29-1**	1.5
TG6-1	0.8	**TG18-1**	0.0	**TG30-1**	1.6
TG7-1	1.5	**TG19-2**	0.5	**TG31-1**	0.0
TG8-1	0.5	**TG20-1**	0.3	**TG32-1**	1.4
TG9-2	0.0	**TG21-1**	0.5	**TG33-1**	0.0
TG10-1	0.7	**TG22-1**	0.6	**Xe75***	1.4
TG11-1	0.0	**TG23-1**	1.4	**Xp GEV485***	1.4
TG12-1	0.6	**TG24-1**	0.5		

*: Referans izolatlar

3.3.2.7. Jelatinin Hidrolizi

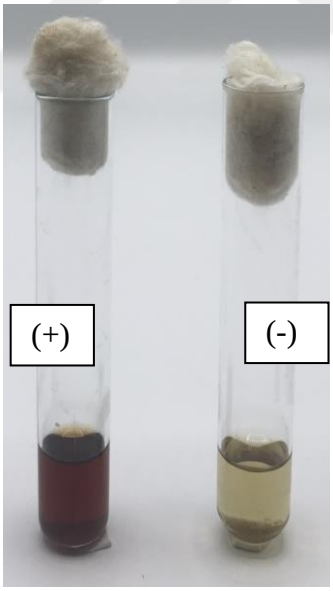
Ortama aşılanmış olan 33 re-izolatın hepsinde jelatin akıcı özellik göstermiş ve sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 8). Negatif kontrol olarak kullanılan tüplerde hiçbir akıcılık gözlenmemiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Jelatinin Hidrolizi testinin pozitif ve negatif sonucu

3.3.2.8. Esculinin Hidrolizi

Bu test, bakteri izolatlarının Beta-Glukozidaz (β-Glucosidase) veya eskülinaz enzimi üreterek esculini hidrolize etme yeteneklerinin olup olmadığını belirleyebilmek amacıyla yapılmıştır ve tüplere aşılanmış 33 bakteri izolatının hepsinde kahverengi-siyah arası bir renk değişimi görüldüğü için pozitif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol tüplerinde herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir (Şekil 3.7).

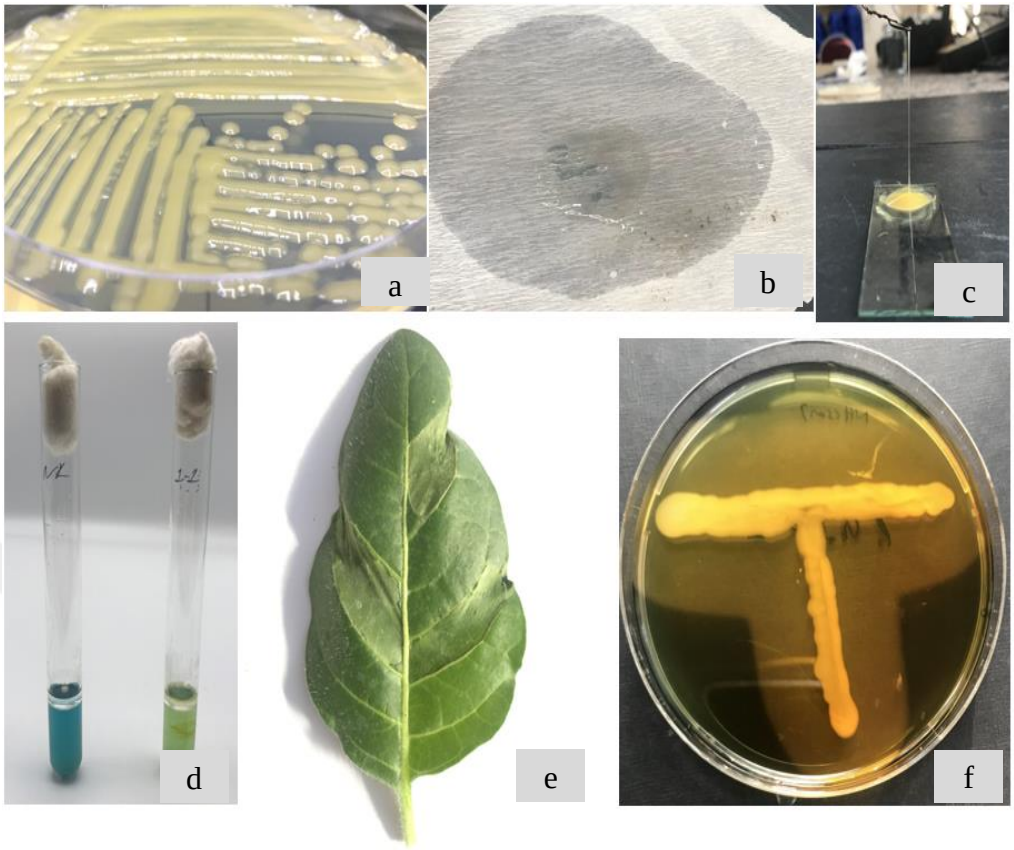


Şekil 3.6. Esculinin Hidrolizi testinde pozitif ve negatif sonuçların görüntüsü

Tablo 8. Bakteriyel İzolatların Fizyolojik ve Biyokimyasal Test Sonuçları

İzolat no	Levan	Oksidaz	KOH	Aerobik/ Anaerobik	Tütünde HR	Nişasta Hidrolizi	Jelatin Hidrolizi	Esculin Hidrolizi
TG1-1	Z	-	+	Aerobik	+	G	+	+
TG2-1	Z	-	+	Aerobik	+	G	+	+
TG3-2	Z	-	+	Aerobik	+	Z	+	+
TG4-1	Z	-	+	Aerobik	+	-	+	+
TG5-1	Z	-	+	Aerobik	-	-	+	+
TG6-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG7-1	Z	-	+	Aerobik	+	G	+	+
TG8-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG9-2	Z	-	+	Aerobik	-	-	+	+
TG10-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG11-1	Z	-	+	Aerobik	+	-	+	+
TG12-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG13-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG14-1	Z	-	+	Aerobik	-	-	+	+
TG15-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG16-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG17-1	Z	-	+	Aerobik	+	Z	+	+
TG18-1	Z	-	+	Aerobik	-	-	+	+
TG19-2	Z	-	+	Aerobik	+	Z	+	+
TG20-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG21-1	Z	-	+	Aerobik	+	Z	+	+
TG22-1	Z	-	+	Aerobik		Z	+	+
TG23-1	Z	-	+	Aerobik	+	G	+	+
TG24-1	Z	-	+	Aerobik	+	Z	+	+
TG25-1	Z	-	+	Aerobik	+	-	+	+
TG26-1	Z	-	+	Aerobik	+	Z	+	+
TG27-1	K	-	+	Aerobik		G	+	+
TG28-1	Z	-	+	Aerobik	-	Z	+	+
TG29-1	K	-	+	Aerobik	-	G	+	+
TG30-1	K	-	+	Aerobik	-	G	+	+
TG31-1	Z	-	+	Aerobik	-	-	+	+
TG32-1	Z	-	+	Aerobik	-	G	+	+
TG33-1	Z	-	+	Aerobik	-	-	+	+

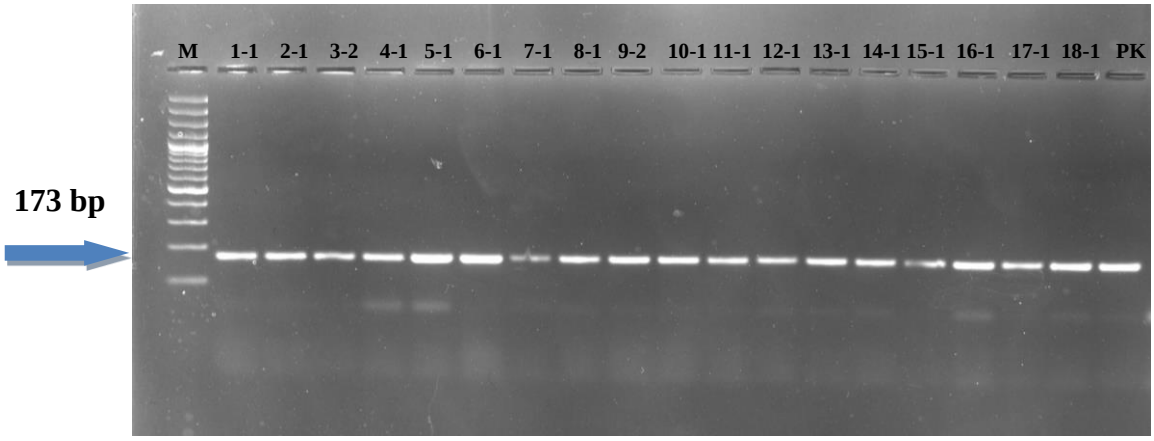
(Z): Zayıf **(K):** Kuvvetli **(G):** Güçlü **(+):** Pozitif **(-):** Negatif



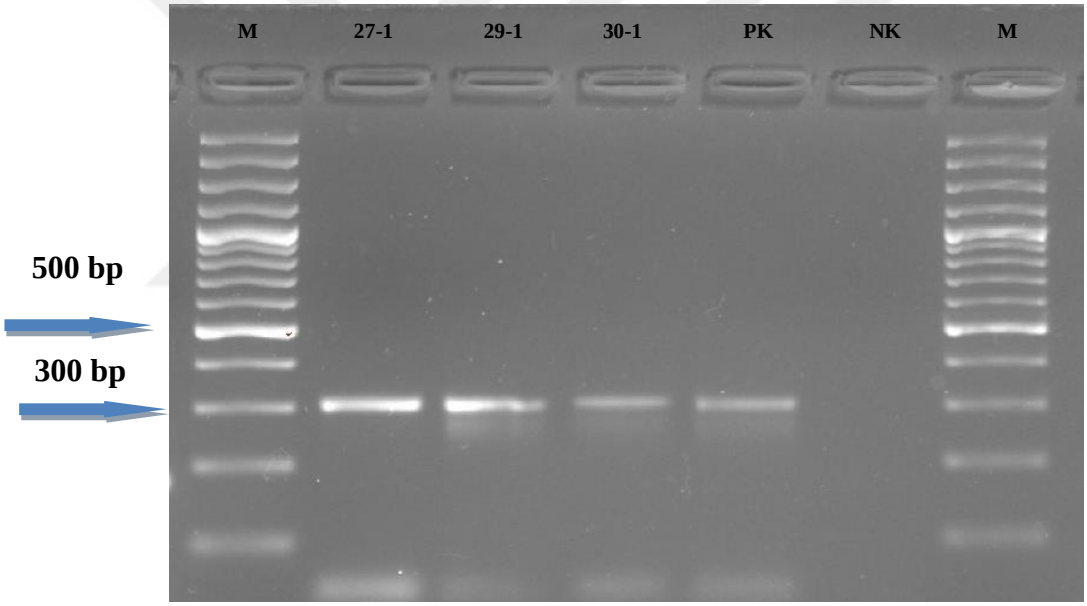
Şekil 3.7. (a) Levan testi, (b) Oksidaz testi, (c) KOH, (d) Aerobik/Anaerobik gelişim testi, (e) Tütünde HR testi, (f) Nişastanın hidrolizi testi

3.3.3. *Xanthomonas* türlerinin Moleküler Tanılama Testi Sonuçları

Klasik, Biyokimyasal ve Fizyolojik tanı yöntemlerinin sonucunda 33 adet re-izolat *Xanthomonas* spp. olarak tanılanmıştır. Tanılanmış olan bu re-izolatların kesin olarak tür bazında tanılanması için türe özgü primerler olan: Bs-XeF/Bs-XeR, Bs-XgF/Bs-XgR, Bs-XvF/Bs-XvR ve HpaF-f/HpaF-r primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Yapılan PCR sonucunda; 30 bakteriyel izolatın *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* için spesifik olan Bs-XeF/Bs-XeR primerlerinde 173 bp'de bant oluşturduğu (Şekil 3.7), 3 bakteriyel izolatın ise *X. euvesicatoria* pv. *perforans* için spesifik olan HpaF-f/HpaF-r primerleriyle 300 bp'de bant oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.8)



Şekil 3.8. Bazı *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* izolatlarının agaroz jelde 173 bp bant oluşumu



Şekil 3.9. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* izolatlarının agaroz jelde 300 bp bant oluşumu

4. BÖLÜM
TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma

İnsanlık tarih boyunca yaşamlarını sürdürebilmek için gereken enerjiyi sağlamak amacıyla bitkisel üretim faaliyetlerine başvurmuştur. Bu süreçte, artan insan nüfusunun ihtiyaçlarını karşılamak için tarımsal alanlar genişlemiş ve bu sayede elde edilen ürün miktarı artmıştır. Bununla beraber tarım yapılan alanlarda, kültür bitkilerinin sağlığını olumsuz etkileyen hastalık ve zararlılar baş göstermeye başlamıştır.

Biber hem ülkemizde hem de dünyada oldukça önemli bir kültür bitkisi olup her geçen gün üretim miktarı artmaktadır. Biberin verim ve kalitesini etkileyen birçok hastalık etmeni bulunmaktadır. Bunlardan en önemlilerinden birisi *Xanthomonas* spp. neden olduğu bakteriyel yaprak lekesi hastalığıdır. Bakteriyel leke hastalığı son yıllarda ülkemizde biber ve domates üretim alanlarında giderek büyük bir sorun haline gelmiştir (Eryiğit, 2016).

Bakteriyel leke, ilk olarak 1914 yılında Güney Afrika'da domateste tespit edilmiştir (Doidge, 1920) ve daha sonra ABD'nin Indiana eyaletinden rapor edilmiştir (Gardner ve Kendrick, 1921). O zamandan bu yana hastalığın varlığı dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilmiş ve bugüne kadar, bakteriyel leke hastalığı biber ve domatesin yetiştirildiği tüm bölgelerde mevcuttur (Potnis vd. 2015). Hastalığın rapor edildiği yerler; Kuzey Amerika (Jones vd. 2004; Kim vd. 2010), Güney Amerika (Areas vd. 2014), Avrupa (Beran vd. 2014), Afrika (Kebede vd. 2014), Avustralya (Martin vd. 2004) ve Asya'dır (Mirik vd., 2009; Hamza vd. 2010). Bakteriyel leke patojeninin küresel ölçekte bu kadar hızlı yayılması muhtemelen kontamine olmuş tohum kaynaklarının küresel ticaretinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Potnis vd. 2015).

Xanthomonas türlerinin patojenitesi ile ilgili yakın zamana kadar *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria* ve *Xanthomonas gardneri*'ye ait izolatların hem domates hem de biberde patojenik olduğuna inanılırken, *Xanthomonas perforans*'ın sadece domateste patojenik

olduğu rapor edilmiştir (Jones vd. 2004). Aktepe vd., (2024) çalışmasında izolatların patojenite test sonuçlarından bahsetmemiş, fakat domatesten elde ettiği izolatlar *X. perforans* olarak tanılanmıştır. Yakın zamanda Florida'daki bir biber tarlasından izole edilen bir *X. perforans* izolatı bu türün son zamanlarda biberi de hastalandırdığına işaret etmiştir (Potnis vd. 2015). Bu tez çalışmasının patojenite test sonuçları da *X. perforans* izolatlarının sadece domatesi değil, biberi de enfekte edebildiğini göstermiştir.

Ülkemizde son yıllarda domates ve biberde bakteriyel lekeye neden olan *Xanthomonas* spp. tür düzeyinde tanılamak amacıyla çeşitli illerde domates ve biber üretim materyalleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları sadece domates (Eryiğit, 2016; Akbaba vd., 2024) bazıları domates ve biberden elde edilen izolatlar (Aktepe vd., 2024), bazıları ise bu tez çalışmasında olduğu gibi sadece biberden elde edilen (Horuz, 2019; Kayaaslan, 2021) hastalıklı bitki materyallerinden elde edilmiştir. Biberlerde yürütülen çalışmalarda farklı *Xanthomonas* türlerinin elde edildiği bölge izolatlarına bakıldığında; Kayseri (Horuz, 2019), Tokat (Kayaaslan, 2021), Adana, Mersin, Antalya (Aktepe vd., 2024) ve Iğdır (Akbaba vd., 2024) şeklindedir. Kayseri ve Tokat'ta yürütülen çalışmalarda tüm izolatlar *X. euvesicatoria* olarak tanılanırken, diğer şehirlerde yapılan çalışmalarda izolatlar *X. euvesicatoria* ve *X. perforans* olarak tanılanmıştır. Bu tez çalışmasında tanısı yapılan *Xanthomonas* izolatları (33 adet) 2021-2022 yıllarında, Kayseri'de biber üretimi yapılan seralar, bahçeler, fidelikler ve biber fidesi satan işletmeler gezilerek hastalık etmeni olduğu düşünülen bitkilerden toplanmıştır. Bu örneklerin büyük çoğunluğunu Kayseri'de yetiştirilen hastalıklı bitki örnekleri oluştururken (17 adet), kalanlar Antalya, Kırşehir, Mersin, Nevşehir ve Yozgat'tan Kayseri'ye getirilen fide ve hastalıklı bitki örneklerinden alınmış bölge izolatları oluşturmuştur.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda (Eryiğit, 2016, Horuz, 2019, Kayaaslan, 2021, Akbaba vd., 2024, Aktepe vd., 2024) tüm re-izolatlar YDCA ve King B besi yerlerinde yuvarlak, sarı, mukoid özellikte gelişmiş, esculin ve jelatinin hidrolizi testleri pozitif, oksidaz testi ise negatif sonuçlar vermiştir. Bulgular bu tez çalışmasındaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Eryiğit (2016), Kayaaslan (2021) ve Akbaba vd. (2024)'ün *X. euvesicatoria* izolatları zayıf amilolitik ya da negatif aktivite gösterirken, Horuz (2019), Aktepe vd. (2024)'ün çalışmasında *X. euvesicatoria* izolatları amilolitik özellik göstermiştir. Bu tez çalışmasındaki *X. euvesicatoria* izolatlarının sadece 6 adedi güçlü amilolitik özellik gösterirken, geriye kalanlar zayıf ya da negatif amilolitik özellik sergilemiştir. *X. euvesicatoria* ve *X. gardneri* zayıf veya negatif amilolitik özellik ve pektolitik aktivite gösterirken, *X. vesicatoria* ve *X. perforans* güçlü

amilolitik özellik ve pektolitik aktivite gösterdiği bildirilmişken (Jones vd. 2004), bu tez çalışması Jones vd. (2004) sonuçlarının aksine *X. euvesicatoria* olarak tanımlanan bazı izolatların da güçlü amilolitik özellikte olabileceğini göstermiştir. Aynı şekilde Grenada (Hamza vd. 2010) ve Brezilya'da (Areas vd. 2014) biberden izole edilen *X. euvesicatoria* izolatlarının da güçlü amilolitik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Türkiye'de 2016-2024 arasında yürütülen çalışmalarda kullanılan tüm izolatların tütünde aşırı duyarlılık gösterdiği bildirilirken, bu çalışmada HR^+ ve HR^- özellikte izolatların varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, biber ve domateste bakteriyel lekeye neden olan *Xanthomonas* spp. yüksek fenotipik çeşitlilik gösterdiği bir kez daha bu çalışmayla da ortaya konmuştur.

Yine ülkemizde tamamlanan çalışmalarda biberde *Xanthomonas* spp. tanısında Koenraadt vd. (2009)'un geliştirmiş olduğu türe spesifik primer çiftleri kullanılarak PCR testleri yapılmış ve tüm izolatlar *X. euvesicatoria*'yı tanılayan primerlerle reaksiyon vermiştir. Aynı şekilde, bu tez çalışmasında Bs-XeF/Bs-XeR primer çiftinde 30 izolat 173 bp bant oluşturmuş ve *X. euvesicatoria* olarak tanılanmıştır. Üç izolat ise Bs-XpF-BsXpR primer çiftleri ile amplifiye olmamış, bu nedenle izolatları tanılamada yetersiz kalmıştır. Bu nedenle Ning, (2012)'nin geliştirdiği HpaF-f/HpaF-r primer çiftleri kullanıldığında amplifikasyon gerçekleşmiş ve 300 bp büyüklüğünde bant oluşturarak *X. perforans* olarak tanılanmıştır. Bu primer çifti ilk kez bu tez çalışmasında denenmiş ve Koenraadt vd. (2009)'un *X. perforans* tanısı için geliştirmiş olduğu primer çiftlerinin sonuç vermediği izolatlarda kullanılabileceği ortaya konmuştur. Akbaba vd., (2024)'ün *X. perforans* izolatları da Bs-XpF/BsXpR primer çiftlerinde bant oluşturmamış ve ancak *hrpB* geninin dizilenmesi ile *X. perforans* olarak tanılanmıştır. Daha önce Horuz (2019) da yapmış olduğu çalışma ile Kayseri ilinde X. euvesicatoria'nın varlığını ilk kez tespit etmiştir. Bu tez çalışmasıyla Kayseri ilinde X. perforans'ın da biberlerde varlığı saptanmıştır. Yapılan tüm testler sonucunda bu tez çalışmasında, Türkiye'de biberlerde *X. perforans*'ın varlığı ilk kez rapor edilmiştir.

4.2. Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışmasındaki izolatlara yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçlarına bakıldığında; 33 adet izolatın tümü YDCA besi yerinde yuvarlak, sarı, mukoid özellikte gelişmiş, KOH testi, Jelatinin hidrolizi ve Esculinin hidrolizi testleri pozitif ve oksidaz testleri negatif sonuç vermiştir. SNA besi yerinde 33 adet izolattan 3'ü güçlü kubbemsi yapıda levan oluştururken, 30 izolatın zayıf kubbemsi özellikte olduğu görülmüştür. Özellikle *X. perforans*'a

ait izolatların (TG27-1, TG29-1, TG30-1) *X. euvesicatoria* izolatlarına göre daha güçlü levan oluşumuna neden oldukları gözlemlenmiştir. Tütün bitkilerine inokule edilen 31 izolattan 24 saat sonra sadece 13 tane izolatın aşırı duyarlılık reaksiyonu verdiği belirlenmiştir. 33 izolattan 9 izolat negatif amilolitik özellik, 15 izolat zayıf amilolitik özellik ve 9 izolat da güçlü amilotik özellik göstermiştir. PCR sonuçlarına bakıldığı zaman *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* ve *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* olmak üzere 2 türün biberde patojen oldukları tespit edilmiştir.

Bölgede yaygın olarak yetiştirilen biber çeşitlerinin *Xanthomonas euvesicatoria* ve *Xanthomonas perforans*'a karşı dayanıklılık durumlarının araştırılması ve eğer varsa bu dayanıklı çeşitlerin tercih edilmesi önemlidir.

1. Biberde bakteriyel leke hastalığının yayılmasını önlemek içim sertifikalı ve hastalıktan ari tohum ve fide kullanımı önem taşımaktadır çünkü hastalıklı tohumlar hem tohum üzerinde hem de içerisinde bakteri barındırabilir ve bu tohumlarda patojen bakteriler 10 yıla kadar hayatta kalabilmektedir.

2. Tohumlarda yapılacak mücadele yöntemleri, bakteriyel leke hastalığının kontrol altına alınmasında büyük önem taşır. Çünkü hastalığın primer inokulum kaynağı genellikle bulaşık tohumlardır. Tohumlara ugulanabilecek mücadele yöntemleri olarak; çeşitli biyolojik ve kimyasal ürünlerle tohum dezenfeksiyonu, sıcak su uygulamaları ve tohumların bitki gelişimini teşvik eden bakterilerle (PGPR) kaplanması önerilebilir.

3. Hastalığın görüldüğü alanlarda, inokulum kaynaklarını azaltmak amacıyla 3 yıllık bir ürün rotasyonu uygulamak önerilmektedir.

4. Sanitasyon önlemleri olarak üretim alanlarının temiz tutulması, bitki artıklarının üretim alanından uzaklaştırılıp imha edilmesi, toprak işleme ve budama aletlerinin sterilizasyonu hastalığın yayılmasını önlemede önemli rol oynar.

5. Yağmurlama sulama yerine damlama sulama kullanımı yaprakların nemli kalmasını engelleyerek hastalığın oluşmasını ve yayılmasının önüne geçmektedir. Ayrıca hastalıklı bitkiden sağlıklı bitkiye su sıçraması yoluyla bakteriyel etmenin inokulasyonunun önüne geçilebilmektedir.

6. Yüksek sıcaklık ve nem oranları hastalığın gelişimini hızlandırdığı için iklim koşullarının düzenli olarak takip edilmesi ve gerekli önlemlerin alınması önemlidir.

7. Bitkilerin optimum sıcaklık, su rejimi ve besin maddelerine sahip olması hastalıklara karşı direncini artıracağı için optimum yetiştirme koşulları sağlanmalıdır.

8. Kimyasal mücadele olarak bakır içerikli fungisitlerin dönüşümlü olarak koruma amaçlı kullanılması önerilmektedir. Fakat bakır bazlı ilaçların sürekli kullanımı ile bakıra dirençli izolatların ortaya çıkmasına neden olabileceği göz önünde bulundurulmalı ve bu nedenle entegre mücadele yöntemleri tercih edilerek kimyasal ilaç kullanımı minimum düzeye indirilmelidir.

9. Kimyasal mücadeleye alternatif olarak, Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler (PGPR), endofit fungus ve bakteri kullanımı, bakteriyoflar gibi biyotik ve ayrıca abiyotik elisitörler bitkinin kendi savunma mekanizmalarını uyarılmasına da yardımcı olacağından hastalığa karşı direnci artırabileceği, hastalık etmeninin gelişimini baskılayabileceği ve dolayısıyla bitki sağlığını destekleyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla ilgili daha fazla bilimsel çalışmalar yapılmalı ve biyolojik mücadele hastalıkla mücadele programlarına entegre edilmelidir.

10. Bitki yüzeyinde yaşayan epifitik bakterilerin antagonistik etkileri, hastalık etmeninin popülasyonunu azaltmada etkili olabilir.

11. EPPO A2 karantina listesinde olan bu bakteriyel etmenin, ülkemizde epidemi yapmaması, hastalığın etkili bir şekilde kontrol altına alınması ve verim kayıplarının önlenmesi açısından üreticilerin, Tarım ve Orman Bakanlığı bünyesinde çalışan personeller tarafından bu bakteriyel etmen hakkında bilgilendirilmesi/eğitilmesi oldukça önemlidir. Bu eğitimlerde üreticilere, *Xanthomonas* türlerinin neden olduğu bakteriyel leke etmenleri hakkında detaylı bilgiler verilmeli ve hastalığın bitkinin farklı organlarında nasıl belirtiler gösterdiği, bu belirtilerin diğer hastalıklarla nasıl ayırt edilebileceği anlatılmalıdır.

KAYNAKÇA

Akbaba, M., Dönmez, M. F., Hürkan, K., 2024. Characterization of causal agents of bacterial spot on tomato fields in Iğdır plain (Turkiye). **Journal of Agricultural Science and Technology**, accepted.

Aktepe, B. P., Yıldız, R. C., Aysan, Y., 2024. Bakteriyel leke hastalığına neden olan *Xanthomonas* izolatlarının tür düzeyinde tanısı. **Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 29** (2): 439-449.

Andrews, J., 1999. The Pepper Trail History & Recipes from Around the World. Denton, Texas, United States University of North Texas Press. 272 pp.

Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V., Quezado-Duval, A. M., 2012. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology, 113** (6): 1479-1490.

Araújo, E. R., Costa, J. R., Pontes, N. C., Quezado-Duval, A. M., 2015. *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. **European Journal of Plant Pathology, 143**: 543-548.

Areas, M. S., Gonçalves, R. M., Soman, J. M., Sakate, R. K., Gioria, R., da Silva Júnior, T. A., Maringoni, A. C., 2014. Prevalence of *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper in Brazil. **Journal of Phytopathology, 163** (11-12): 1050-1054.

Areas, M. S., Goncalves, R. M., Soman, J. M., Souza Filho, R. C., Gioria, R., Silva, T. A. D., Maringoni, A. C., 2017. Resistance of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from Brazilian pepper to copper and zinc sulfates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **90** (2 suppl 1): 2375-2380.

Aybak, H. Ç., 2002. Biber Yetiştiriciliği Hasad Yayıncılık. Çekmeköy, İstanbul 155 s.

Beran, P., Mraz, I., Kokoskova, B., Bohata, A., 2014. Monitoring the occurrence of bacterial spot of tomato and pepper in the Czech Republic and development of new PCR primers

for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. **European Journal of Plant Pathology, 141** (3): 617-621.

Bosland, P. W., Votava, E. J., Votava, E. M., 2012. Peppers Vegetable and Spice Capsicums. Cabi Dijital Library, 219 pp.

Bouzar, H., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Scott, J. W., 1994. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. **Phytopathology, 84** (1): 39-44.

Burlakoti, R. R., Hsu, C. F., Chen, J. R., Wang, J. F., 2018. Population dynamics of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper during 27 years across Taiwan. **Plant disease, 102** (7): 1348-1356.

Conover, R. A., Gerhold, N. R., 1981. Mixtures of copper and maneb or mancozeb for control of bacterial spot of tomato and their compatibility for control of fungus diseases. **Florida Online Journals 94**: 154-156

Constantin, E. C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P., Cottyn, B., 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology, 65** (5): 792-806.

Doidge, E. M., 1921. A tomato canker. **Annals of Applied Biology, 7** (4): 407-30.

Dye, D. W., 1978. The genus xanthomonas Dowson 1939. In A Proposed Nomenclature and classification for Plant Pathogenic Bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research, 21**: 153-177.

Egel, D. S., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Creswell, T., Ruhl, G., Maynard, E., Marchino, C., 2018. Distribution and characterization of *Xanthomonas* strains causing bacterial spot of tomato in Indiana. **Plant health progress, 19** (4): 319-321.

EPPO, 2024a. European and Mediterraen Plant Protection Organization (Web Sitesi: **https://gd.eppo.int/taxon/XANTEU/datasheet**) (Erişim tarihi: Eylül 2024).

EPPO, 2024b. European and Mediterraen Plant Protection Organization (Web Sitesi: **https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list**) (Erişim tarihi: Eylül 2024).

Eryiğit, G. 2016. Domates ve Biberde Bakteriyel Leke Hastalığına Neden Olan *Xanthomonas* türlerinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Tanısı. Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 64s.

FAOSTAT, 2022. Food and Organization Of United Nation Statistic Data (Web Sitesi: **https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL**) (Erişim tarihi: Eylül 2024).

Gardner, M., 1921. Bacterial spot of tomato. **Journal of Agricultural Research, 21:** 123-155

Govindarajan, V. S., & Salzer, U. J., 1985. Capsicum-production, technology, chemistry, and quality part 1: History, botany, cultivation, and primary processing. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 22** (2): 109-176.

Govindarajan, V. S., Salzer, U. J., 1986. Capsicum production, technology, chemistry, and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma, and pungency stimuli. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 24** (3): 245-355.

Hamza, A. A., Robène-Soustrade, I., Jouen, E., Gagnevin, L., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Pruvost, O., 2010. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. **Plant Disease, 94** (8): 993-999.

Hernández-Huerta, J., Tamez-Guerra, P., Gomez-Flores, R., Delgado-Gardea, M. C. E., García-Madrid, M. S., Robles-Hernández, L., Infante-Ramirez, R. 2021. Prevalence of *Xanthomonas euvesicatoria* (formally *X. perforans*) associated with bacterial spot severity in *Capsicum annuum* crops in South Central Chihuahua, Mexico. **PeerJ, 9:** e10913.

Horst, R.K., 2001, Westcott's Plant Disease Handbook Sixth Edition (Revised by R. Kenneth Horst), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1028pp.

Horuz, S., 2019. Identification of *Xanthomonas* spp. disease agent/s and the effect of chemical seed treatments to control bacterial spot of pepper. **Fresenius Environmental Bulletin, 28:** 6786-6792.

Jones, J. B., & Jones, J. P., 1985. The effect of bactericides, tank mixing time and spray schedule on bacterial leaf spot of tomato. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 98:** 244-247.

Jones, J. B., Pohronezny, K. L., Stall, R. E., Jones, J. P., 1986. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology, 76** (4): 430-434.

Jones, J. B., Stall, R. E., Bouzar, H., 1998. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology, 36** (1): 41-58.

Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Schaad, N. W., 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and applied microbiology, 27 (6)**, 755-762.

Kayaaslan, Z., 2021. Tokat İli Biber Üretim Alanlarında Bakteriyel Leke Hastalığı Etmeni (*Xanthomonas euvesicatoria*)'nin Tanılanması, Epidemiyolojisi ve Biyolojik Mücadelesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doktora Tezi, Tokat, 148s.

Kebede, M., Timilsina, S., Ayalew, A., Admassu, B., Potnis, N., Minsavage, G. V., Vallad, G. E., 2014. Molecular characterization of *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot of tomato in Ethiopia. **European journal of plant pathology, 140**: 677-688.

Keinath AP. 2019. Controlling bacterial spot on tomato and pepper. Land-Grant Press by Clemson Extension. (Web sayfası: **http://lgpress.clemson.edu/publication/controlling-bacterial-spot-on-tomato-and-pepper)**. (Erişim tarihi: Haziran 2024).

Kim, S. H., Olson, T. N., Peffer, N. D., Nikolaeva, E. V., Park, S., Kang, S., 2010. First report of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas gardneri* in Pennsylvania. **Plant Disease, 94** (5): 638-638.

Kizheva, Y., Vancheva, T., Hristova, P., Stoyanova, M., Stojanovska, M., Moncheva, P., Bogatzevska, N., 2013. Identification of *Xanthomonas* strains from tomato and pepper and their sensitivity to antibiotics and copper. **Bulgarian Journal of Agricultural Science, 19** (2): 80-82.

Klement, Z., Mavridis, A., Rudolph, K., Vidaver, A., 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, 568pp.

Koenraadt, H., Van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J. B., Oosterhof, J., 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato, 808 (pp. 99-102). In *II International Symposium on Tomato Diseases October 8-12, 2007, Kuşadası, Turkey.*

Lelliott, R. A., Stead, D. E., 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Black Well Scientific Puplication, Oxford/USA, 157 pp.

Liu, L., Ao, Y., Yu, S., Huang, Y., Guan, T., Li, B., Wang, H., 2024. Isolation and identification of *Xanthomonas euvesicatoria* causing bacterial spot of egg plant in China. **Applied Ecologyand Enviromental Research, 22** (5): 4841-4849.

Lue, Y. S., Deng, W. L., Wu, Y. F., Cheng, A. S., Hsu, S. T., Tzeng, K. C., 2010. Characterization of *Xanthomonas* associated with bacterial spot of tomato and pepper in Taiwan. **Plant Pathology Bulletin, 19** (3): 181-190.

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**): 779–81

Martin, H. L., Hamilton, V. A., Kopittke, R. A., 2004. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. **Plant disease, 88** (9): 921-924.

McInnes, T. B., Gitaitis, R. D., McCarter, S. M., Jaworski, C. A., Phatak, S. C., 1988. Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. **Plant Disease, 72** (7): 575-579.

McLeod, M. J., Guttman, S. I., Eshbaugh, W. H., Rayle, R. E., 1983. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). **Evolution, 37** (3): 562-574.

Mirik, M., Aysan, Y., 2009. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in naturally infected pepper seeds in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, **91** (2): 433-436.

Morinière, L., Burlet, A., Rosenthal, E. R., Nesme, X., Portier, P., Bull, C. T., Bertolla, F., 2020. Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol vd. 2000 emend. Timilsina vd. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin vd. 1995. **Systematic and Applied Microbiology**, **43** (4): 126087.

Ning, F. Y., 2012 Identification and Detection of *Xanthomonas perforans* by the Polymerase Chain Reaction Technique and Characterization of *X. perforans*Strains in Taiwan by DNA Polymorphism. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, A master Thesis, Taiwan.

Obradovic, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijevic, M., Jones, J. B., Wang, J. F., 2004. Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonascampestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. **European Journal of Plant Pathology, 110:** 285-292.

Osdaghi, E., Jones, J. B., Sharma, A., Goss, E. M., Abrahamian, P., Newberry, E. A., Vallad, G. E., 2021. A centenary for bacterial spot of tomato and pepper. **Molecular Plant Pathology, 22** (12): 1459-1696

Özalp, R., 2010. Ülkemizde biber üretimi ve örtüaltı biber yetiştiriciliği. **Tarım Türk Dergisi, 24** (5): 29-32.

Palacio Bielsa, A., Cubero, J., Garita Cambronero, J., 2024. *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (XANTEU). (Web sayfası**: http://hdl.handle.net/10532/7123**) (Erişim tarihi: Eylül 2024).

Pernezny, K., Robert, P. D., Murphy, J. F., Goldberg, N. P. 2003. Compendium of Pepper Diseases. The American Phytopatholgical Society St. Paul Minnesota 55121-2097, USA, 62pp.

Pickersgill, B., 1984. Migration of chili peppers, *Capsicum* spp, in the Americas. **Pre-Columbian Plant Migration, 71** (3): 275-287.

Potnis, N., Timilsina, S., Strayer, A., Shantharaj, D., Barak, J. D., Paret, M. L., Vallad, G. E. and Jones, J. B., 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. **Molecular plant pathology, 16** (9): 907-920.

Roach, R., Mann, R., Gambley, C. G., Shivas, R. G., Rodoni, B., 2018. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. **European journal of plant pathology, 150**: 595-608.

Roach, R., Mann, R., Gambley, C. G., Shivas, R. G., Chapman, T., Rodoni, B., 2020. Pathogenicity and copper tolerance in Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot. **Crop Protection, 127:** 104923.

Schaad, N. W., Jones, J. B., & Lacy, G. H., 2001. Gram negative bacteria, *Xanthomonas*. P: 175-193. In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition) (Eds: Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W.) APS Press. St. Paul, Minnesota.

Sijam, K., Chang, C. J., Gitaitis, R. D., 1991. An agar medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. **Phytopathology, 81** (8): 831-834.

Sneath, P. H. A., 1956. Cultural and biochemical characteristics of the genus Chromobacterium. **Microbiology, 15** (1): 70-98.

Soliman, M. A., 2022. *Xanthomonas euvesicatoria* associated with bacterial spot on pepper fruits in Egypt. **Journal of Plant Protection and Pathology, 13**(1): 37-45.

Stall, R. E., Beaulieu, C., Egel, D., Hodge, N. C., Leite, R. P., Minsavage, G. V., Benedict, A. A., 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 44 (1):** 47-53.

Stall, R. E., Jones, J. B., Minsavage, G. V., 2009. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot**. Annual Review of Phytopathology, 47**: 265-284.

Strayer-Scherer, A. L., Sharpe, S. R., Louws, F. J., Meadows, I. M., 2024. Evaluation of systemic acquired resistance inducers for the management of copper and streptomycin resistant strains of *Xanthomonas perforans* on tomato. **Crop Protection, 175**, 106430.

Sutic, D. 1957. Bakterioze crvenog patlidzana (tomato bacteriosis) posebna izd. inst. zasht. bilja, Beograd. **Review of Applied Mycology, 36:** 734-735.

Şahin, A., Küsek, M. 2015. Kahramanmaraş ilinde yetiştirilen biberlerde biber bakteriyel leke hastalığı etmeninin belirlenmesi. **KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi, 18** (3): 37-43.

Tapia-de la Barrera, L. B., Báez-Sañudo, M. A., García-Estrada, R. S., Tovar-Pedraza, J. M., Carrillo-Fasio, J. A., 2023. Identification of species and physiological races of *Xanthomonas* isolated from tomato (*Solanum lycopersicum*) and chili pepper (*Capsicum annuum*) in Sinaloa, Mexico. **Revista mexicana de fitopatología, 41** (3): 326-342.

Timilsina, S., Jones, J. B., Potnis, N., Goss, E., Minsavage, G. V., Hong, J. C., Kebede, M., 2015. Multilocus sequence analysis of a worldwide collection of *Xanthomonas* strains, causing bacterial leaf spot. **Acta Horticulturae, 1069**: 27-31.

Toğaç, S., 2018. Biber Kök Boğazı Yanıklığı Hastalığına Dayanıklı Biber Genotiplerinin Yardımı ile Doğrulanması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 51s.

TUİK, 2023. Türkiye İstatistik Kurumu (Web Sitesi: **https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1**) (Erişim tarihi: Ocak 2024).

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J., 1995. Reclassification of *Xanthomonas.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 45** (3): 472-489.

Verit, A., Yeni, E., Ünal, D., 2001. Tarihten günümüz ürolojisine kırmızı acı biber. **Türk Üroloji Dergisi, 27** (4): 399-402.

Zimbro, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., Johnson, J. A., 2009. Difco & BBL Manual of Microbiological Culture Media. Becton, Dickinson and Company, Maryland. 686pp.

Živković, I., Iličić, R., Barać, G., Damnjanović, J., Cvikić, D., Trkulja, N., Milovanović, T. P., 2023. Influence of *Xanthomonas euvesicatoria* on quality parameters of pepper seed from Serbia. **Pesticides and Phytomedicine/Pesticidi i fitomedicina, 38**(1), 1-9.

EKLER

EK 1. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN BESİ YERLERİ

1.1. King B Besi Yeri :10 g Protose Pepton (Acumedia), 10g Tryptone, 1,5g K_2PO_4 (Merck), 1,5g $MgSO_47H_2O$ (Merck), 10ml Gliserol (Sigma- Aldrich) 1000ml saf su içerisinde çözdürülmüştür ve pH: 7.2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besi yeri cam şişelere eklenmiştir ve litreye 16gr Agar (Sigma- Aldrich) olacak şekilde şişelere eklenmiştir ve 121 °C 'de 20 dakika otoklavlanmıştır (King vd. 1954).

1.2. Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agar (YDCA): 10g Yeast extract, 20g Glucose, 20g CaCO3, 16g agar 1000ml saf su içerisinde çözdürülmüştür. Karışım 10 ml'lik cam tüplere bölüştürülmüştür ve 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Otoklav 50 °C düştüğü zaman cam tüpler çıkartılarak vortexlenmiştir ve tüpler eğik şekilde donmaya bırakılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

1.3. Sakkaroz Nutrient Agar (SNA): 13 g hazır Nutrient Agar (Merck), 50g Sucrose 1000ml saf su içerisinde çözdürülmüştür. 121 °C' de 20 dakika otoklavlandıktan sonra steril kabin içerisinde petrilere dökülüp donmaya bırakılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987).

1.4. Aerobik/Anaerobik Gelişim Testi: 2g Pepton, 5g NaCl, 0,3g KH_2PO_4, 3g Agar, 3 ml Bromthymol blue (%1'lik solüsyon) 1000ml saf su içerisinde çözdürülmüştür ve pH: 7.1'e ayarlanmıştır. Çözelti cam tüplere 5 ml olarak aktarılmıştır. 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. 50 °C'ye düşen otoklavdan cam tüpler çıkartılarak bakteri filtresinden geçirilen%10'luk glikoz solüsyonları otoklavlanmış her bir cam tüpe 0.5 ml olacak şekilde ilave edilmiştir (Klement vd. 1990).

1.5. Nişastanın Hidrolizi: 1000 ml su içerisine 28g Nutrient Agar hazır olarak kullanılmıştır. %1.5 oranında eriyebilir patates nişastası içeren Nutrient Agar (NA) besi yerine izolatların ekimi gerçekleştirilmiştir (Lue vd. 2010).

1.6. Jelatinin Hidrolizi: 5g Peptone, 3g Beef extract, 120g Gelatin karışımı tartıldıktan sonra, jelatinin erimesi için 50°C'de su banyosuna konulmuştur ve sonra bu çözelti 5 veya 10 ml olarak deney tüplerine aktarılmıştır. 121 °C'de otoklavda 20 dakika sterilize edilmiştir (Zimbro vd. 2009).

1.7. Esculin Hidrolizi: 5.0g Yeast extract, 5.0g NaCl, 0.2g $MgSO_4/7H_2O$, 0.5g K_2HPO_4, 0.5g $NH_4H_2PO_4$, 50mg Ferric ammonium citrate, 1.0g Esculin (sigma), 1000 ml distile suya hazırlanan besi yerinin pH değeri 6.8'e ayarlanmıştır ve tüplere 7 ml konmuştur, otoklavda 121 ^oC'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Tüplere bakteri aşılanmıştır ve 28 ^oC'de çalkalayıcıda 28 gün kadar bekletilmiştir. Kontrol: Besi yeri rengi kahverengi-siyah arası bir renk alırsa pozitif olarak değerlendirilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Tuba GÜRTEN
Uyruğu: Türkiye (T.C)
Doğum Tarihi ve Yeri:
Medeni Durum:
e-mail:
Yazışma Adresi:

EĞİTİM

Derece	**Kurum**	**Mezuniyet Tarihi**
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Bitki Koruma	2024
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Bitki Koruma	2020
Lise	Özel Hisarcıklıoğlu Fen Lisesi, KAYSERİ	2014

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Gürten, T. (2023). Isolation and identification of pepper bacterial leaf spot disease agents (*Xanthomonas* spp.) in Kayseri province, Turkey, 60-62 *12th International Molecular Biology and Biotechnology Congress*, 13-15 December 2023, Erciyes University, Kayseri, 165s.