

***Xanthomonas vesicatoria*'NIN ISSR MARKIRLARI
KULLANILARAK GENETİK TİPLENDİRMESİ**

**GENETIC TYPING OF *Xanthomonas vesicatoria* BY
USING ISSR MARKERS**

NAZİLA FARHANGZAD

PROF. DR. AFİFE İZBIRAK

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

Doğduğumdan bu yana elimi hiç bırakmayan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen

Canım Babam, Masoud Farhangzad

ve

Canım Annem, Fariba Amiraslani 'ye

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

26/12/2014

NAZİLA FARHANGZAD

ÖZET

***Xanthomonas vesicatoria*'NIN ISSR MARKIRLARI KULLANILARAK GENETİK TİPLENDİRMESİ**

Nazila FARHANGZAD

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Afife İZBIRAK

Aralık 2014, 58 sayfa

Xanthomonas vesicatoria domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum spp.*) bitkilerinin önemli bir patojenidir. Son yıllarda *Xanthomonas vesicatoria*'dan kaynaklanan bakteriyel leke hastalığı Türkiye'nin Doğu Akdeniz Bölgesi'nde görülen en önemli hastalıklardan biridir. Bu hastalık daha çok sıcak ve nemli bölgelerde verim kaybına neden olmaktadır.

Bu hastalıkların kaynağının saptanması ve uygun tedavi yönteminin belirlenmesi amacıyla bitki patojeni bakterilerin genetik tiplendirilmesine ihtiyaç vardır. Bakteri genomlarını karakterize etme ve tanımlamada kullanılan çeşitli markır sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerden birisi olan ISSR-PZR, bakteri türlerinde genetik tiplendirmede kullanılan etkin bir tekniktir.

Bu çalışmada, ABD ve Türkiye'de domates ve biberlerden izole edilmiş olan 29 adet *Xanthomonas vesicatoria* örneği öncelikle *rhs* geni içindeki 517 bp'lik fragmenti varlığı açısından, XCVF ve XCVR primerleri kullanılarak tanımlanmıştır. Ayrıca 5 farklı ISSR primeri ile de 29 adet izolatin genetik tiplendirmesi amaçlanmıştır.

ISSR primerlerinden elde edilen toplam 57adet PZR ürünü %100 polimorfik bulunmuştur. Bütün veriler Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu ile (UPGMA) değerlendirilerek, dendogram çizilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Xanthomonas vesicatoria*, genetik tiplendirme, ISSR-PZR, UPGMA, Bakteriyel leke hastalığı

ABSTRACT

GENETIC TYPING OF *Xanthomonas vesicatoria* BY USING ISSR MARKERS

Nazila FARHANGZAD

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Afife İZBIRAK

December 2014, 58 pages

Xanthomonas vesicatoria is a major pathogen of tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum spp.*). Bacterial spot caused by *Xanthomonas vesicatoria* is one of the most important diseases in the Eastern Mediterranean Region of Turkey in recent years. The disease causes considerable crop losses in areas of warmer and humid climate.

It is necessary to genetic typing of the plant pathogenic bacteria for detecting the source of the pathogens and defining appropriate management of disease. There are various marker systems to analyse and define the bacteria genomes. ISSR-PCR is one of the efficiently used technique for genetic typing among bacterial species.

In this study, first 29 samples of *Xanthomonas vesicatoria* isolates from tomato and pepper in Turkey and U.S.A have identified in the presence of 517 bp fragment of *rhs* gene by using XCVF and XCVR primers. In addition, genetic typing of the 29 isolates aimed by using five different ISSR primers. Of the total 57 amplification products, %100 were found to be polymorphic. All the data were

employed to construct dendograms using an unweighted pair-group method with arithmetical averages(UPGMA).

Keywords: *Xanthomonas vesicatoria*, genetic typing, ISSR-PCR, UPGMA, Bacterial spot disease

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana değerli bilgilerini ve yardımlarını sunan, bu dönem içerisinde karşılaştığım tüm zorluklar karşısında desteğini ve hoşgörüsünü eksik etmeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Afife İzbırak'a,
Çalışmamın deneysel aşamalarında değerli katkılarından çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nilüfer Aksöz'e ve Sayın Prof. Dr. Hatice Mergen'e
Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Çağatay Karaaslan'a,
Bakteri örneklerinin temin edilmesini sağlayan Muğla Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, öğretim üyesi Prof. Dr. Ömür Baysal'a,
Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı' ndaki tüm değerli hocalarıma ve asistanlara,
Bilgisayar programlarının kullanılmasında yardımcı olan Arş. Gör. Neslihan İDİL' e, Arkadaşlığı, bilgisi, tecrübesi ile her zaman yanımda olan ve tez çalışmalarımda süresince bana her türlü yardımını karşılıksız sunan sevgili Dr. Solmaz Mosayyebi' ye
Çalışmam boyunca yoğun temposu içerisinde zaman ayıran ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen arkadaşım Neşe Vardar'a, Arş. Gör. Dr. Demet Erdönmez, Kevser Yüceer'e ve
Tanıdığım ilk günden beri bana karşı güler yüzünü eksik etmeyen ve tez çalışmam süresince, her ihtiyacım olduğunda destekleri ile yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Hayriye AKEL'e ve Arş. Gör. Tuğçe Karaduman'a,
Uzaktan sevgi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım ablam Parya Farhangzad'a
Bugüne kadar beni her konuda destekleyip, bana güvenerek her zaman yanımda olan çok değerli ve sevgili babama ve sevgili anneme en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ankara, 2014

NAZILA FARHANGZAD

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Bitki Patojeni Mikroorganizmalar	4
1.1.2. Biki Patojeni Bakteriler.....	5
1.1.3. <i>Xanthomonas</i>	6
1.1.3.1. <i>Xanthomonas</i> ve Patovaryları	6
1.1.4. <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	8
1.1.5. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> 'nın İsimlendirilmesi	8
1.1.6. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> 'nın Genel Özellikleri	9
1.1.7. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> 'nın Genetik Yapısı	10
1.1.8. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> 'nın Bitki ile Etkileşimi	11
1.1.8.1. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> 'nın Tip III Salgı Sistemi	12
1.1.8.2. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> 'da <i>Hrp</i> Gen Grubunun Düzenlenmesi	13
1.1.9. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> ve Leke Hastalığı.....	13
1.1.10. Bakteriyel Leke Hastalığının Belirtileri	14
1.1.11. Hastalığın Dünya ve Türkiye'deki Dağılımı.....	16
1.1.12. Epidemiyolojisi.....	17
1.1.13. Hastalık Kontrolünde Bakırın Kullanımı	18
1.1.14. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> 'nın Tanısı	18
1.1.15. Moleküler Tanı.....	19
1.1.15.1. ISSR Tekniği	20
2. MATERYAL VE METOT	21
2.1. Materyal.....	21
2.1.1. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> İzolatları.....	21

2.2. Metot	23
2.2.1. Bakteri İzolatlarının Besiyerinde Çoğaltılması	23
2.2.1.1. Nutrient Agar Besiyerinde Üretim	23
2.2.1.2. Nutrient Broth Besiyerinde Üretim	23
2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu	23
2.2.3. İzole Edilen Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi.....	25
2.2.4. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> İzolatların PZR Testi ile Tanısı	26
2.2.5. ISSR-PZR.....	29
2.2.6. İstatistiksel Analizler	31
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	32
3.1. Kromozomal DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi	32
3.2. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> İzolatlarının <i>rhs</i> Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları.....	33
3.3. ISSR-PZR Sonuçları	33
3.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları	39
3.5. TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ	58

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Farklı konukçularda hastalık yapan <i>Xanthomonas</i> patovaryları	7
Tablo 1.2. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> ve bakteriyel leke hastalığı görülen ülkeler.....	16
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan <i>Xanthomonas vesicatoria</i> izolatlarının kod numaraları	22
Tablo 2.2. Nutrient agar ve Nutrient broth'ın hazırlanması.	23
Tablo 2.3. 10X TBE tamponu ve DNA yükleme tamponu hazırlanması	25
Tablo 2.4. Optimize edilen PZR reaksiyon karışımı.....	27
Tablo 2.5. <i>Rhs</i> geni içindeki bölgenin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin dizisi	27
Tablo 2.6. <i>Rhs</i> genlerin optimize edilen PZR reaksiyon koşulları.....	28
Tablo 2.7. ISSR primerleri ile baz dizilimleri ve DNA'ya bağlanma sıcaklıkları.....	29
Tablo 2.8. Optimize edilen ISSR-PZR reaksiyon karışımı	30
Tablo 2.9. Optimize edilen ISSR-PZR koşulları	30
Tablo 3.1. ISSR primerlerinin oluşturduğu polimorfizm oranları	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Türkiye’de yetiştirilen tarımsal ürünlerin üretim miktarlarına ilişkin tahminler.....	3
Şekil 1.2. Bikilerde hastalık yapan bitki patojeni mikroorganizmaların yüzdeleri	4
Şekil 1.3. Bitki patojeni bakteriler ve bitkiler üzerindeki çeşitli belirtileri	5
Şekil 1.4. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> ’nın YDC besiyerindeki koloni gelişimi.	10
Şekil 1.5. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> suşunun çembersel kromozom yapısı	11
Şekil1.6. Gram negatif bakterilerdeki Tip III salgı sisteminin yaprak enfeksiyonu oluşturmadaki rolü	12
Şekil 1.7. Bitki patojeni bakterilerde <i>hrp</i> gen grubunun düzenlenmesi	13
Şekil 1.8. Hastalık etmeninin domates ve biber yapraklarında oluşturduğu nekrotik ve yanıklık lekeleri.....	15
Şekil 1.9. Hastalık etmeninin meyvelerde oluştuğu belirtiler.....	15
Şekil 1.10. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) tarafından yayınlanan <i>X. vesicatoria</i> ’nın dünyadaki yaygınlığı.....	17
Şekil 2.1. Genomik DNA izolasyon kiti (QIAGEN) ile çalışma aşamaları.....	24
Şekil 2.2. <i>Rhs</i> geni içindeki PZR ile çoğaltılan bölge.....	28
Şekil 3.1. <i>Xanthomonas vesicatoria</i> örneklerinden izole edilen DNAların %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü	32
Şekil 3.2. <i>rhs</i> geni içindeki 517 bç’lik bölgenin XCVF ve XCVR primer ile amplifikasyon sonrası agaroz jeldeki görüntüsü	33
Şekil 3.3. p880 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	34
Şekil 3.4. p881 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	35
Şekil 3.5. I811 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	36
Şekil 3.6. A31 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	37
Şekil 3.7. D3 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	38

Şekil 3.8. A31 primeri ile ISSR-PZR analizi sonucu UPGMA metoduyla oluşturulan *Xanthomonas vesicatoria* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogram40

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
bç	Baz çifti
C	Sitozin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribo Nükleozit Trifosfat
ELISA	Enzyme linked immunorbent assay
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ERIC	Enterobacterial repeat intergenic consensus
EtBr	Etidyum Bromür
F	İleri primer (forward primer)
G	Guanin
Ha	Hektar
Hrp	Hypersensitive reaction and pathogenicity (Aşırı duyarlılık ve hastalık oluşturma)
ISSR	Inter Simple Sequences Repeats (basit dizi tekrarları arası)
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mg	Magnezyum
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
pv	Patovar
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Geri primer (reverse primer)
RAPD	Random Amplified polymorphic DNA (rastgele çoğaltılmış polimorfik)

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)
rhs	Rearrangment hot spot
rpm	Dakika başına devir sayısı
spp	Species (türler)
T	Timin
TBE	Tris-Borat-EDTA
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages (aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu)
UV	Ultraviyole
X	Xanthomonas
YDCA	Maya dekstroz kalsiyum karbonat agar

1. GİRİŞ

İnsanoğlu yaşamı için gerekli olan enerjinin bir bölümünü bitkilerden karşılamak için tarımsal üretim yapmaktadır. Her geçen gün artan dünya nüfusunu doyurmak amacıyla tarım alanlarını genişletmiş ve verimi artırmıştır. Verim artışını, başlangıçta geleneksel yöntemlerle (stn nitelik gösteren kültür bitkilerini seçmek ve bu kültür bitkilerini yeni ve geniş tarım alanlarında yetiştirerek) gerçekleştirmiştir. Ancak tarım yapılan alanlarda, kültür bitkilerinde zaman içerisinde hastalık ve zararlı sorunları başlamıştır. Bazı patojen mikroorganizmalar bitkilere zarar vermekte ve hastalık oluşturmaktadır. Başta virüsler olmak üzere bakteriler ve funguslar bitkilerde hastalık oluşturan mikroorganizmalardandır [1].

Türkiye tarım sektöründe sebze üretiminde büyük bir paya sahiptir. Sebze retiminde ilk sıralarda yer alan Doğu Akdeniz Bölgesi'nde, yetiştiriciliği yapılan sebzeler domates ve biberdir. Çok sayıda hastalık ve zararlının konukçusu olan domates ve biberin üretiminde kalite ve verimi artırmak yetiştiricilik tekniklerinin iyi bir şekilde uygulanması ile mümkün olabilmektedir. Verimli ve kaliteli çeşit seçimi yanında, kaliteli ve sağlıklı tohum ve fide kullanımı, üretim alanlarının hastalık ve zararlılardan korunmasında üretimin miktar ve kalitesinin artırılmasında büyük öneme sahiptir [2].

Viral, bakteriyel ve fungal hastalıklar domates ve biber yetiştiriciliğinde karşılaşılan başlıca sorunlardandır. Örtüaltı domates yetiştiriciliğinde bakteriyel etmenlerin sebep olduğu kayıplara her yetiştirme sezonunda rastlanmaktadır. Bu etmenlerle mücadelede kullanılan bakır içerikli preparatların üreticiler tarafından bilinçsizce kullanılmasından dolayı, zamanla bakteriyel etmenler bakıra dayanıklı hale gelmektedir. Dolayısıyla, bakırlı preparatların bakteriyel etmenler üzerindeki etkisi gittikçe azalmaktadır. Örtüaltında kullanılan bakırlı preparatların bu bakteriyel hastalıklarla mücadelede etkisinin giderek azalması, aynı tür patojenin genetik karakterinin günden güne değişebileceği şüphelerini de uyandırmaktadır. Bu nedenle, aynı tür bakteriyel etmenler arasındaki genetik farklılığın tespiti için araştırmalar yapılması zorunluluğu doğmuştur [3,4].

Domates ve biber üretiminde problem olan hastalıklardan birisi de *Xanthomonas vesicatoria*'nın neden olduğu bakteriyel leke hastalığıdır. Patojenin konukçuları

arasında domates, biber gibi kültür bitkilerinin yanı sıra *Solanaceae* familyasından birçok yabancı ot türü de bulunmaktadır.

Dünya’da ticari olarak biber ve domates yetiştirilen yerlerde bakteriyel leke hastalığının görülebileceği, ayrıca çok yağmur alan ve yüksek sıcaklığa sahip iklimlerde de şiddetli bir hastalığa neden olabileceği bildirilmiştir. Bakteriyel leke hastalığının varlığı Türkiye’de ilk olarak domateslerde, daha sonra biberlerde saptanmıştır [5].

Bu hastalıkların kaynağının saptanması ve uygun tedavi yönteminin belirlenmesi için hastalık etmenini doğru tanımlamak ve tiplendirmek gerekmektedir. Hastalık etmenini tanımlamada fenotipik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Ancak bu yöntemler, zamanla gelişmesine rağmen, son dönemlerde yerini DNA’yı temel alan genotipik yöntemlere bırakmaya başlamıştır. Hastalık etkeni olan mikroorganizmaların tespiti ve popülasyon içindeki farklılıklarının belirlenmesinde kullanılan moleküler yöntemler her geçen gün artmaktadır. Moleküler yöntemlerin her biri belirli avantaj ve dezavantajlar içerir. Bu nedenle analizlerin seçiminde, yöntemin ayırım gücü, tekrarlanabilirliği, kullanım kolaylığı, maliyeti ve laboratuvar alt yapısı gibi kriterler göz önünde bulundurulmalıdır.

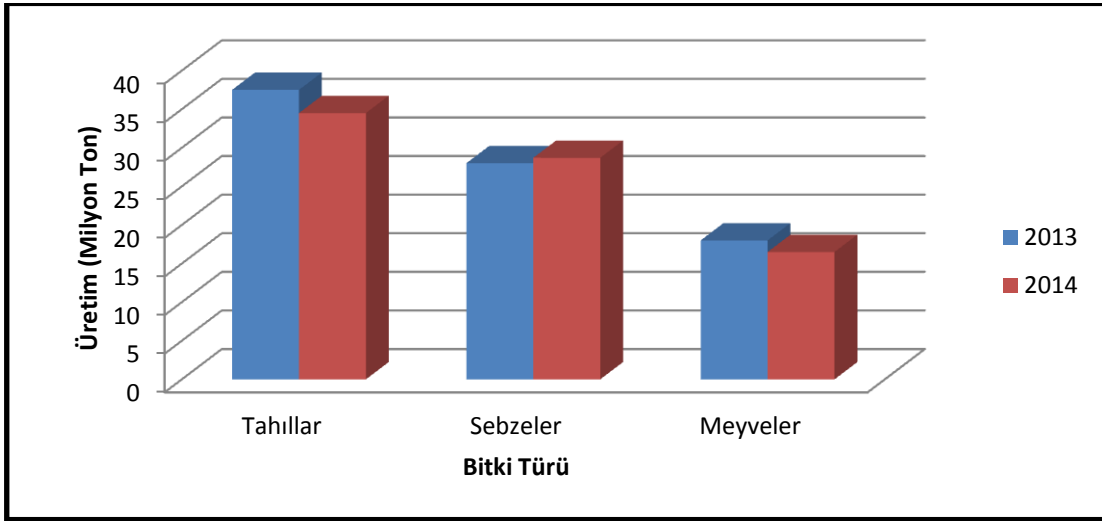
PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında oldukça fazla kullanılan gelişmiş bir moleküler yöntemdir. Patojenlerde, hastalığa bağlı genler, genlerdeki mutasyonlar ve ilaçlara karşı direnç kazanıp kazanmadığının belirlenmesinde PZR temelli yöntemlerden yararlanılmaktadır. PZR uygulamasında aynı tür içindeki farklı suşlarda primer bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları farklı olacağından, amplifiye edilen fragmentlerin elektroforez sonrası agaroz jel üzerindeki sayı ve büyüklükleri de farklı olacaktır. Amplifikasyon sonucunda, jelde gözlenen suşlara ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılarak değerlendirme yapılmaktadır [6].

Bu tez çalışmasında kullanılan *Xanthomonas vesicatoria* örnekleri “Batı Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Yetiştiriciliğinde Önemli Olan Domates ve Biberde Bakteriyel Leke (*Xanthomonas vesicatoria*) Hastalık Etmenlerinin Genetik Farklılıklarının Moleküler Yöntemlerle Tespiti” adlı proje kapsamında, Muğla Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırmacıları tarafından toplanmış ve mikrobiyolojik tanı testleri yapılarak tarafımıza ulaştırılmıştır. Elimize ulaşan 29

Xanthomonas vesicatoria izolatının moleküler yöntemlerle tanımlanması rhs genine özgü primerler kullanılarak, PZR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Aynı tür bakteriler arasındaki genetik tiplendirme ise ISSR-PZR tekniği ile yapılmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

Türkiye sahip olduğu coğrafi özellikleri nedeniyle, tarımsal üretim açısından, Dünya'daki önemli ülkelerden biri durumundadır. TÜİK verilerine göre Türkiye'de yılda 34.000.000 ton ile en fazla üretimi yapılan tarım ürünlerini tahıllar oluşturmaktadır. Türkiye ölçeğinde tahıllardan sonra ikinci sırada yer alan sebze üretimi ise, yaklaşık 800.000 hektar (ha) alanda yapılmakta olup, bu alandan yılda toplam 28.800.0000 ton ürün elde edilmektedir [Şekil 1.1] [2]. Anadolu toprakları, günümüzde kültüre alınmış ve tüm Dünya'da ekonomik öneme sahip çeşitli bitki türlerinin hem anavatanı hem de yetiştirme alanı olarak önem taşımaktadır.



Şekil 1.1. Türkiye'de yetiştirilen tarımsal ürünlerin üretim miktarlarına ilişkin tahminler [2].

Dünya'da 5.227.883 ha alanda yıllık ortalama 159.023.383 ton üretimi yapılan domates ve 1.656.000 ha alanda 24.000.000 ton üretimi yapılan biber de bu önemli ürünlerin içerisinde. Türkiye domates yetiştiriciliği bakımından Mayıs 2014 yılı verilerine göre 300.000 ha alanda 12.100.000 tonluk üretim değeriyle Çin, Hindistan ve ABD' den sonra dördüncü sırada yer almış olup, Dünya'da domates üretimi konusunda söz sahibi ülkeler arasındadır. TÜİK verilerine göre

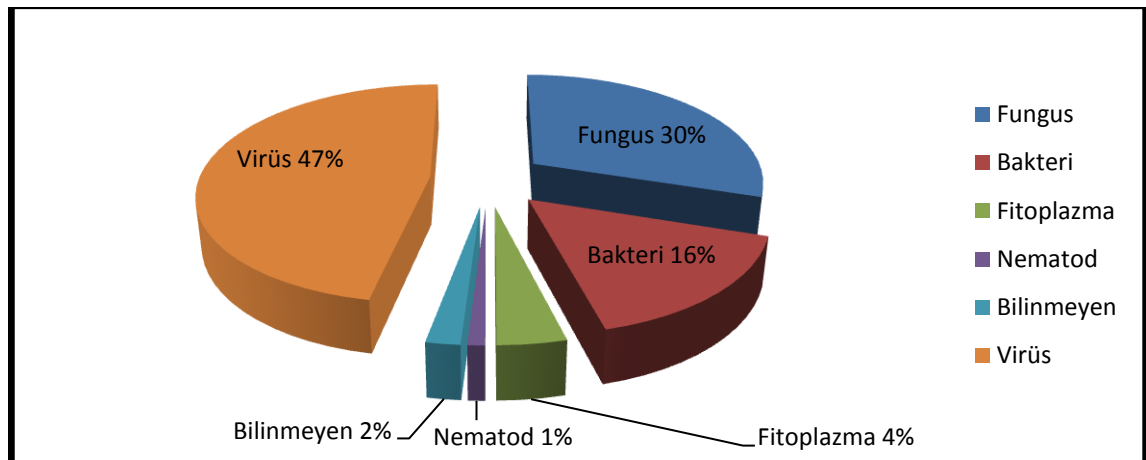
yaş sebze üretimi açısından domates birinci sırada yer almıştır. Domates iç piyasada taze olarak tüketilmesinin yanı sıra, gıda endüstrisinde de hammadde olarak kullanılmakta, dış pazarlara ise taze olarak veya işlenerek ihraç edilmektedir.

Dünyada biber üretimi yapılan önemli ülkeler sırasıyla Çin, Meksika, Türkiye. İspanya, Amerika Birleşik Devletleri, Nijerya, Mısır, İtalya ve Güney Kore'dir. Türkiye'de 2013 yılında salçalık, dolmalık ve sivri biber olmak üzere yaklaşık olarak toplam 2.200.000 ton biber üretimi yapılmıştır [7,8].

Hem yurtiçi tüketim hem de ihracat açısından önemli olan bu ürünler çeşitli hastalıklar nedeniyle önemli kayıplara uğrayabilmektedir. Çeşitli hastalıklar ülkeler veya bölgeler arası tohum alışverişiyle yayılma gösterebilmektedir. Son yıllarda tohumluğun ithalat ve ihracatındaki artış bazı avantajlar sağlamakla birlikte, tohum kaynaklı çeşitli hastalıkların da Türkiye'ye girmesine veya yeni salgınlar oluşmasına yol açmaktadır. Bu hastalıklar her yıl % 2-100 arasında değişen oranlarda ürün kaybına neden olmaktadır [9].

1.1.1. Bitki Patojeni Mikroorganizmalar















Bitkiler tüm gelişme dönemlerinde çeşitli bitki patojeni mikroorganizmalar tarafından istila edilirler. Yaklaşık 383 bitki cinsinde tohumla taşınan 2400 patojenin varlığı bilinmektedir. Bitkilerde hastalık meydana getiren en önemli etmenler virüsler, funguslar ve bakterilerdir [Şekil1.2] [10].



Şekil 1.2. Bitkilerde hastalık yapan bitki patojeni mikroorganizmalarının yüzdeleri [10].

1.1.2. Bitki Patojeni Bakteriler

Bitkilerde hastalık oluşturan 100'den fazla tanımlanmış bakteri genusu arasında *Agrobacterium*, *Xylella*, *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* yer almaktadır. Hastalık oluşturan diğer önemli bir bakteri genusu ise *Xanthomonas*'tır [Şekil1.3] [11].

 Agrobacterium	 Kök tümörü İnce Dal Kanseri Böğürtlen Tümör Hastalığı Kök Ürü
 Clavibacter	 Patates Halka Çürüklüğü Domates Bakteriyel Kanseri Leke Hastalığı Fasciation
 Erwinia	 Ateş Yanıklığı Bakteriyel Yumuşak Çürüklük Hastalığı
 Pseudomonas	 Benek Hastalığı Zeytin Dalı Kanseri Muz Solgunluk Hastalığı Bakteriyel Yanıklık
 Xanthomonas	 Benek Hastalığı Kök Çürüklüğü Lahana Siyah Damar Çürüklüğü Beyaz Çürüklük Hastalığı Turunçgil Kanseri Ceviz Bakteriyel Yanıklığı
 Streptomyces	 Patates Adi Uyuz Hastalığı Tatlı Patateste Çürüklük Hastalığı
 Rhizobium	 Kök Boğazı Nekrozu

Şekil 1.3. Bitki patojeni bakteriler ve bitkiler üzerindeki çeşitli belirtileri [11].

1.1.3. *Xanthomonas*

Xanthomonas grubu üyeleri, Prokaryota alemi Gamma Proteobacteria sınıfından Xanthomonadaceae ailesine ait Gram negatif bakterilerdir [12]. *Xanthomonas* fitopatolojik çeşitliliği ve fenotipik farklılıklar açısından dikkatleri üzerine çeken bir genustur. Ekonomik önemi nedeni ile, geniş kapsamlı taksonomi çalışmalarına konu olan bu genus üyelerinin sınıflandırma ve adlandırılmasında çok fazla tartışma ortaya çıkmıştır. Başlangıçta, farklı konukçu dağılımı gösteren ve farklı hastalık belirtileri oluşturan her *Xanthomonas* varyantı ayrı bir tür olarak sınıflandırılmıştır. Yakın zamanda *Xanthomonas* genusu içinde 140'dan fazla patovar tanımlanmıştır [13]. Protein elektroforez şemaları ve hücresel yağ asidi içeriklerinin karşılaştırması ile elde edilen sonuçlar, *Xanthomonas* patovalarının daha önce ortaya çıkarılanlara oranla fenotipik olarak çok daha heterojen olduğunu göstermektedir [14,15].

1.1.3.1. *Xanthomonas* ve Patovaları

Bitkilerde hastalık oluşturan *Xanthomonas* geniş bir konukçu dizisine sahip patojenlerden biridir. Bu bakteriler genellikle yaprak lekesi, yaprak ve gövde yanıklığı belirtileri oluşturarak ürünün pazar değerini düşürür ve önemli ekonomik kayıplara yol açar [16-19].

Bu gruptaki patojenler özellikle marul çeşitlerinde, ceviz, lahana, patlıcan, muz, çilek, buğday, karnabahar, havuç, patates, susam, pamuk, hububat, süs bitkileri, meyve ve fındık ağaçları, domates ve biberde hastalık oluşturur. Çok sayıda alt grup ve ırkı olan bu patojen özellikle meyve ağaçlarında, çeşitli belirtileri olan hastalıklara yol açmaktadır [20-23]. *Xanthomonas*'ın farklı konukçularda hastalık yapan patovaları Tablo 1.1.'de görülmektedir [24,25].

Tablo 1.1. Farklı konukçularda hastalık yapan *Xanthomonas* patovaryları [24,25].

Patovar	Konukçu
<i>pv. alfalfae</i>	Yonca
<i>pv. armoraciae</i>	Turp
<i>pv. campestris</i>	Lahanagiller
<i>pv. carota</i>	Havuç
<i>pv. cucurbitae</i>	Kabakgiller
<i>pv. citri</i>	Turunçgiller
<i>pv. corylina</i>	Fındık
<i>pv. fragariae</i>	Çilek
<i>pv. glycine</i>	Soya
<i>pv. graminis</i>	Yem otları
<i>pv. hyacinthi</i>	Sümbül
<i>pv. juglandis</i>	Ceviz
<i>pv. mangiferaeindicae</i>	Mango
<i>pv. malvacearum</i>	Pamuk
<i>pv. musacearum</i>	Muz, Mısır
<i>pv. pelargonii</i>	Sardunya
<i>pv. phaseoli</i>	Fasulye
<i>pv. populi</i>	Kavak
<i>pv. pruni</i>	Erik
<i>pv. raphani</i>	Turpgiller
<i>pv. sesami</i>	Susam
<i>pv. translucens</i>	Arpa, Buğday, Çavdar, Triticale
<i>pv. vesicatoria</i>	Biber, Domates, Patlıcangiller
<i>pv. viticola</i>	Asma

1.1.4. *Xanthomonas vesicatoria*

Xanthomonas'ın bir patovarı olan *Xanthomonas vesicatoria*, domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum*) türlerinin hastalık etmenlerinden birisidir [26].

1.1.5. *Xanthomonas vesicatoria*'nın İsimlendirilmesi

Bakteriyel leke hastalığı ilk kez 1921 yılında Doidge tarafından Güney Afrika'da domateste saptanmış ve etmeni *Bacterium vesicatorium* olarak isimlendirilmiştir. Aynı yıllarda Gardner ve Kendrick de hastalığı Amerika Birleşik Devletleri'nde saptamışlar ve etmeni *Bacterium exitiosum* olarak isimlendirmişlerdir. Daha sonra kendi bakteri izolatının, Doidge'nin izolatına göre güçlü bir amilolitik özellik göstermesine rağmen bu bakterinin ismini *Bacterium vesicatorium* olarak değiştirmişlerdir. Gardner ve Kendrick iki sene sonra domateste bakteriyel lekeye neden olan etmenin biberde de benzer belirtiler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda etmen biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri göz önüne alınarak *Xanthomonas* genusu içerisine alınmış ve *Xanthomonas vesicatoria*, 1978 yılında ise Dye tarafından *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*X. c. vesicatoria*) olarak isimlendirilmiştir. 1960'ların başında organizma içerisinde çok fazla fenotipik farklılıkların olduğu ortaya çıkmış, ancak 1990'lara kadar domates ve biber hastalıklarından sorumlu olan sadece bir tür *Xanthomonas* bildirilmiştir. 1990'ların başında ise 3 farklı türün biber ve domateste bakteriyel yaprak leke hastalığından sorumlu olduğu rapor edilmiştir [27]. Vauterin ve ark, [20] ve Stall ve ark. [28] *Xanthomonas vesicatoria* içerisinde iki farklı genetik grubun varlığını belirlemişler ve bunları grup A ve grup B olarak isimlendirmişlerdir. Vauterin ve ark. (1995) yaptıkları moleküler çalışmalar sonucunda *Xanthomonas* cinsine dahil olan bakterileri tekrar sınıflandırmış ve *Xanthomonas vesicatoria*'yı *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Grup A) ve *Xanthomonas vesicatoria* (Grup B) olarak iki türe ayırmışlardır.

Bouzar ve ark, çeşitli bölgelerden topladıkları izolatlarla bir kütüphane oluşturmuşlar ve elde ettikleri tüm izolatların fenotipik farklılıklarını ortaya koymuşlardır [29]. Bouzar ve ark, yaptıkları çalışmada izolatların karbon kaynaklarından yararlanma, yağ asit profil farklılıklarını belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar farklı ülkelerden topladıkları 252 izolatın fenotipik bir özellik olan nişastayı hidrolize etme yeteneklerini karşılaştırmışlardır. *X. vesicatoria* (grup B)

grubu içersine giren izolatlar nişastayı 2 günden daha az sürede hidrolize ederken, A grubuna dahil olan izolatların nişastayı hidrolize edemedikleri görülmüştür [30-31]. O'Garro (1998) yaptığı çalışmada Grup A'nın nişastayı indirgeme yeteneğine sahip olmadığını, Grup B'nin ise nişastayı indirgeme yeteneğine sahip olduğunu saptamıştır. Jones ve ark, (1998) grup A (*Xav*) ve grup B (*X.vesicatoria*)'den serolojik olarak ayrılan ve farklı bir DNA yapısına sahip olan patojenik izolatları grup C olarak isimlendirmişlerdir. Yine aynı şekilde DNA:DNA hibridizasyon testlerine göre Grup D olarak isimlendirilen ve *X. gardneri* izolatlarını kapsayan yeni bir grup saptamışlardır [32]. Sutic tarafından 1957 yılında domateste saptanan ve *Pseudomonas gardneri* olarak isimlendirilen etmen 1966 yılında Dye tarafından yapılan morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda *Xanthomonas* cinsine dahil edilmiştir. Patojen *Xanthomonas vesicatoria*'nın bir sinonimi olan *Xanthomonas gardneri* olarak isimlendirilmiştir. DNA-rRNA hibridizasyon testleri ile de bu sınıflandırma desteklenmiştir. Bununla birlikte DNA-DNA hibridizasyon testleri *X. gardneri* ile *X. campestris pv. vesicatoria* arasında çok düşük değerde akrabalık ilişkisi olmasına rağmen, *X. gardneri* ve *X. vesicatoria* arasında %60'ın üzerinde bir benzerlik olduğunu göstermiştir [33,34].

Jones ve ark, (2000) *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*'nın beş farklı alt grubunun [*Xav* (grup A, A1 ve C), *X. vesicatoria* (grup B) ve *X. gardneri* (grup D)] olduğunu belirlemişlerdir. Bu gruplandırmayı izolatların nişastayı indirgeme özelliklerindeki farklılıklara dayandırmışlardır [27].

Jones ve ark, (2004) biber, domates ve her iki kültür bitkisinde bakteriyel leke hastalığına neden olan dört farklı fenotipik *Xanthomonas* grubunun bulunduğunu bildirmişler ve DNA homolojisine göre hastalığa neden olan etmenleri *X.euvesicatoria* (grup A), *X. vesicatoria* (grup B), *X. perforans* (grup C) ve *X. gardneri* (grup D) olarak isimlendirmişlerdir [26].

1.1.6. *Xanthomonas vesicatoria*'nın Genel Özellikleri

Gram negatif, 0.6x1.0-1.5 µm büyüklüğünde, çubuk şeklinde tek kamçıya sahip, sarı renkli, King B besiyerinde üreyen ve *Pseudomonas* cinslerinin aksine floresan pigment oluşturmeyen bir bakteridir. *Xanthomonas vesicatoria* Nutrient Agar (NA) besiyerlerinde açık sarı ve Maya–dekstroz–kalsiyum karbonat agar (YDC)

besiyerinde ürettiğinde koloniler büyük, yumuşak, kubbeli, akışkan-sümüksü ve tüm kenarları sarı görünümündedir [Şekil 1.4] [5,35,36].



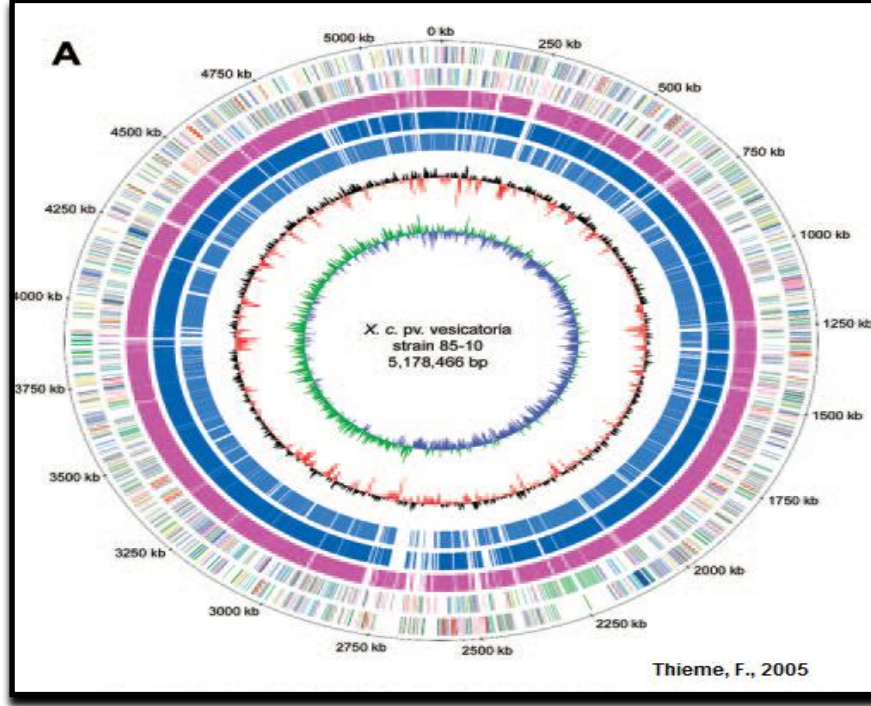
Şekil 1.4. *Xanthomonas vesicatoria*'nın YDC besiyerindeki koloni gelişimi [35].

Sarı renkli koloni oluşumu ksanthomonadin pigmentinden kaynaklanmaktadır. Bu pigment görünür ışık hasarına karşı bakteriyi koruyarak, hayatta kalmasına yardımcı olur. Çeşitli *Xanthomonas* suşlarının sınıflandırılmasında ksanthomonadin pigmentinden de yararlanılmaktadır [37-40].

Bu bakteriler glukoz içeren ortamlarda fermentasyon sonucu ksantan zamkı adı verilen hücre dışı bir polisakkarit üretir. Ksantan zamkı gıda ve ilaç üretiminde stabilizatör, emülgatör, koyulaştırıcı, süspansiyon oluşturucu veya köpük artırıcı olarak kullanılmaktadır [41]. Biyokimyasal olarak oksidaz negatif, nitrat redüksiyonu negatif ve katalaz pozitif reaksiyonuna sahiptir. Jelatini hidrolize eder ve glukoz, arabinoz, mannoz, trehaloz ve sellobiozdan asit üretir [5,35,42].

1.1.7. *Xanthomonas vesicatoria*'nın Genetik Yapısı

Genetik özellikleri açısından *Xanthomonas vesicatoria* tek bir çembersel kromozom ile dört plazmid taşımaktadır. [Şekil 1.5]. Ortalama (G+C) içeriği kromozom için %64.75, plazmidler için %56.59 ile %60.73 arasında değişmektedir [43,44].



Şekil 1.5. *Xanthomonas vesicatoria* suşunun çembersel kromozom yapısı [43].

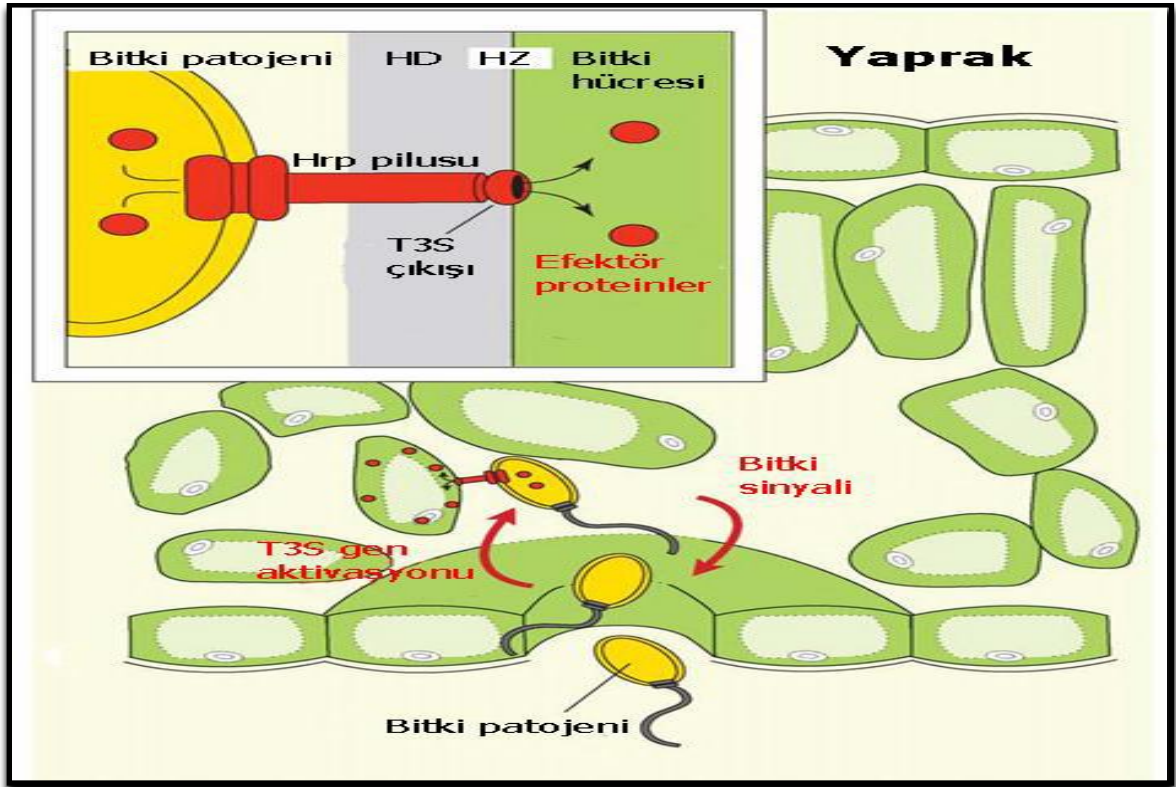
Bitki patojeni olan *Xanthomonas* türleri insan ve hayvanlarda hastalık yapmaz; ancak *X. vesicatoria*'nın en büyük plazmidi tarafından kodlanan Tip IV salgı sisteminin *Legionella pneumophila* ve *Coxiella burnetii* gibi insan patojenlerinde bulunan salgı sistemine çok benzediği saptanmıştır [45,46].

1.1.8. *Xanthomonas vesicatoria*'nın Bitki ile Etkileşimi

Konukçu ile patojenin etkileşimi sonucunda çeşitli yapısal ve biyokimyasal mekanizmalar aktive olmaktadır. *Xanthomonas vesicatoria* bitkilerde hastalığa neden olan proteinlere sahiptir ve bu proteinleri kendine özgü salgı sistemleri aracılığı ile bitki hücresi içine aktarır. Baz dizisi analizlerine göre, bitki ve hayvanlardaki patojen bakterilerin sahip oldukları hücre dışı salgı sistemleri büyük ölçüde benzerlik göstermektedir [47,48]. Gram negatif bitki patojeni bakterilerin çoğu ve özellikle *Xanthomonas* türleri Tip III salgı sistemine sahiptir. Bu salgı sistemi *hrp* (aşırı duyarlılık ve hastalık oluşturma) genleri tarafından kodlanır ve bu genler hassas bitkilerde hastalık oluşumuna, dayanıklı bitkilerde ise aşırı duyarlılığa sebep olur [49-51].

1.1.8.1. *Xanthomonas vesicatoria*'nın Tip III Salgı Sistemi (T3SS)

Bitki patojeni olan Gram negatif bakterilerin konukçu bitkilerle ilişkisinde Tip III salgı sistemi çok önemli bir yer tutar. Tip III salgı sistemi, Gram negatif bitki patojeni olan *Erwina*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* türlerinde bulunur. Bu salgı sistemi bakterideki efektör proteinlerin bitki hücresi içine doğrudan aktarılmasında görev alır. Efektör proteinlerin bitki hücreleri içine aktarımı bakteri hücrelerinin dışında yer alan Hrp (hypersensitive response and pathogenicity) pilus aracılığı ile gerçekleşir ve bu pilus membranı baştan başa geçen T3SS aygıtı ile ilişki içindedir [Şekil 1.6] [51-56]. Bu sisteme sahip olmayan mutant bitki patojeni bakteriler ise bitki dokularında veya hücrelerinde koloni oluşturma veya yayılma gösterir ancak hastalık oluşturmazlar. Bu nedenle Tip III salgı sistemi (T3SS) hastalık oluşturmada çok önemli bir belirleyici faktör olarak değerlendirilmiştir [57].

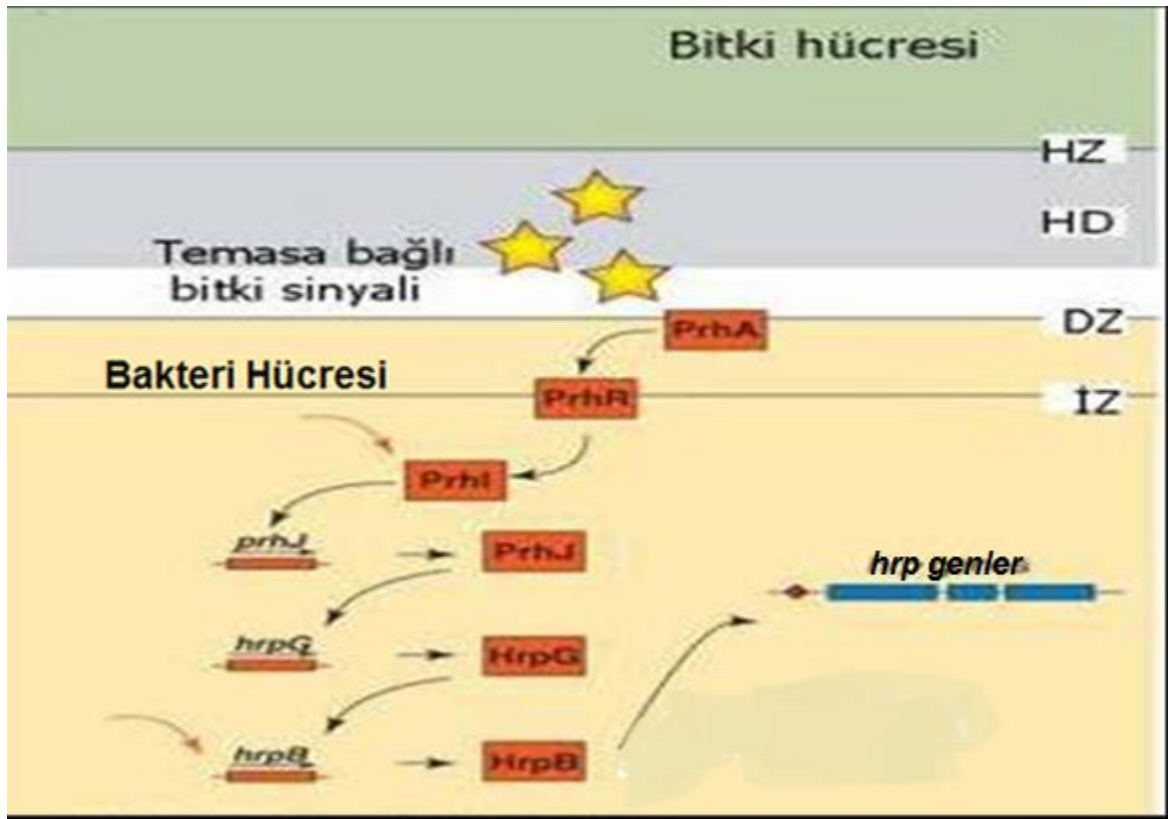


Şekil 1.6. Gram negatif bakterilerdeki Tip III salgı sisteminin yaprak enfeksiyonu oluşturmadaki rolü (HD: hücre duvarı, HZ: hücre zarı) [61].

1.1.8.2. *Xanthomonas vesicatoria*'da *Hrp* Gen Grubunun Düzenlenmesi

Xanthomonas'ın bitki hücresi ile temas etme sinyali bakterinin dış zar proteini olan PrhA'ya iletilir. Daha sonra bu sinyal iç zar proteini olan PrhR'ye ve sinyal aktarıcı diğer proteinlere iletilir. Sinyal aktarıcı olan HrpB, promotora bağlanarak *hrp* ve efektör proteinlere ait genleri aktif hale getirir [Şekil 1.7] [58-61].

Xanthomonas vesicatoria'nın bitkiden aldığı sinyal ve Tip III'e bağlı efektörlerin moleküler fonksiyonları ve mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir [62-64].



Şekil 1.7. Bitki patojeni bakterilerde *hrp* gen grubunun düzenlenmesi (HZ: hücre zarı, HD: hücre duvarı, DZ: dış zar, İZ: iç zar) [61].

1.1.9. *Xanthomonas vesicatoria* ve Leke Hastalığı

Xanthomonas vesicatoria domates ve biberde bakteriyel leke hastalığının etmenidir. Domateslerde fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanı sıra pek çok bakteriyel etmen de önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Dünya'da domates ve biber üretilen tüm alanlarda verim kaybına neden olan ve yetiştiriciliği etkileyen önemli hastalıklardan biri de bakteriyel leke hastalığıdır [65-66]. Bakteriyel leke hastalığının varlığı domateste ilk 1921 yılında Amerika ve Güney Afrika'da,

biberlerde ise ilk defa Florida'da tanımlanmıştır [27]. Türkiye'deki varlığı ise ilk olarak domateslerde [67], daha sonra biberlerde [68] tespit edilmiştir. Hastalık etmeni biber ve domates tohumlarının yanı sıra, toprakta, enfekte bitki kalıntılarında, *Solanaceae* familyasına ait bazı bitki türlerinde ve yabancı otlarda canlılığını sürdürmektedir [69-70]. Bu hastalık, yağmur damlalarının sıçraması, yağmurlama sulama, ıslak bitkiye değme gibi her türlü su ve rüzgar hareketiyle hastalıklı bitkiden yakınındaki sağlıklı bitkilere yayılmaktadır. Uzun süre bitkilerin ıslak kalması, rüzgar veya yüksek basınçla spreyleme sonucu oluşan yaralar, patojenin girişini ve enfeksiyonların oluşumunu kolaylaştırır [71-72]. Bakteri yaprakta bulunan stomalardan veya yaprak kenarlarında bulunan hidatodlardan ve zarar görmüş epidermal hücrelerden bitkiye giriş yapar [73]. Hastalık bitkinin yaşına ve hangi büyüme aşamasında olduğuna bağlı olarak, bitkide büyümeyi yavaşlatıp, meyve verimini ve kalitesini düşürerek az ya da çok zarar meydana getirir [74]. Hastalığın yoğun olarak ortaya çıktığı durumlarda, meyve ağırlığında %52'ye varan ürün kayıplarına neden olduğu bulunmuştur [69,75,76].

1.1.10. Bakteriyel Leke Hastalığının Belirtileri

Bakteriyel hastalık etmeni domates ve biber bitkilerinin yaprak, gövde ve meyvelerinde dairesel küçük çaplı (1-5 mm) lekelerin oluşmasına neden olur. Genç yaprak ve meyvelerin, olgun yaprak ve meyvelere göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu bitkilerde bakteriyel leke hastalığının ilk belirtileri yaprak kenarlarında ortaya çıkar. Yaprakta önce küçük sarı yeşil, etrafı sarımsı bir hale ile çevrili olan lekelerin, nemli koşullarda su emmiş alanlar şeklini aldığı, daha sonra lekelerin birleşerek merkezi kahverengi-siyah olan genel bir sarı görünüm oluşturduğu gözlenmiştir. Bazı durumlarda nekrotik alanlar kuruyarak dökülmekte ve yapraklar sanki saçma ile delinmiş gibi bir görünüm almaktadır. Yapraklar erken dönemde enfekte olduğunda deforme olur ve etkilenmiş yaprakların kenarları ince bir nekrotik doku bandı ile çevrilir [Şekil1.8]. Bitki yaprağındaki düzensiz ve şekilsiz nekrotik alanlara karşın gövde ve meyve lekeleri dairesel ve düzenli şekildedir. Hastalık gövdede önce hafif sulu ve sarımsı, zamanla koyu kahverengi ve üzerinde derin çatlaklar oluşmuş nekrotik alanlar şeklinde ortaya çıkar. Meyvedeki bakteriyel lekeler başlangıçta küçük, kabarcık benzeri ve düzenlidir, daha sonra kahverengileşir ve siğilli bir görünüm alarak meyvede şekil bozukluklarına neden

olurlar [Şekil 1.9]. Hastalık etmeni genç meyvelerde belirti oluşturmadan meyve dökümüne neden olabilir. Yaprak ve meyve sapı ile taç yaprakların hastalığa en duyarlı yerler olduğu belirlenmiştir [77-78].



Şekil 1.8. Hastalık etmeninin domates ve biber yapraklarında oluşturduğu nekrotik ve yanıklık lekeleri [74].



Sekil 1.9. Hastalık etmeninin meyvelerde olduğu belirtiler [74].

1.1.11. Hastalığın Dünya ve Türkiye'deki Dağılımı

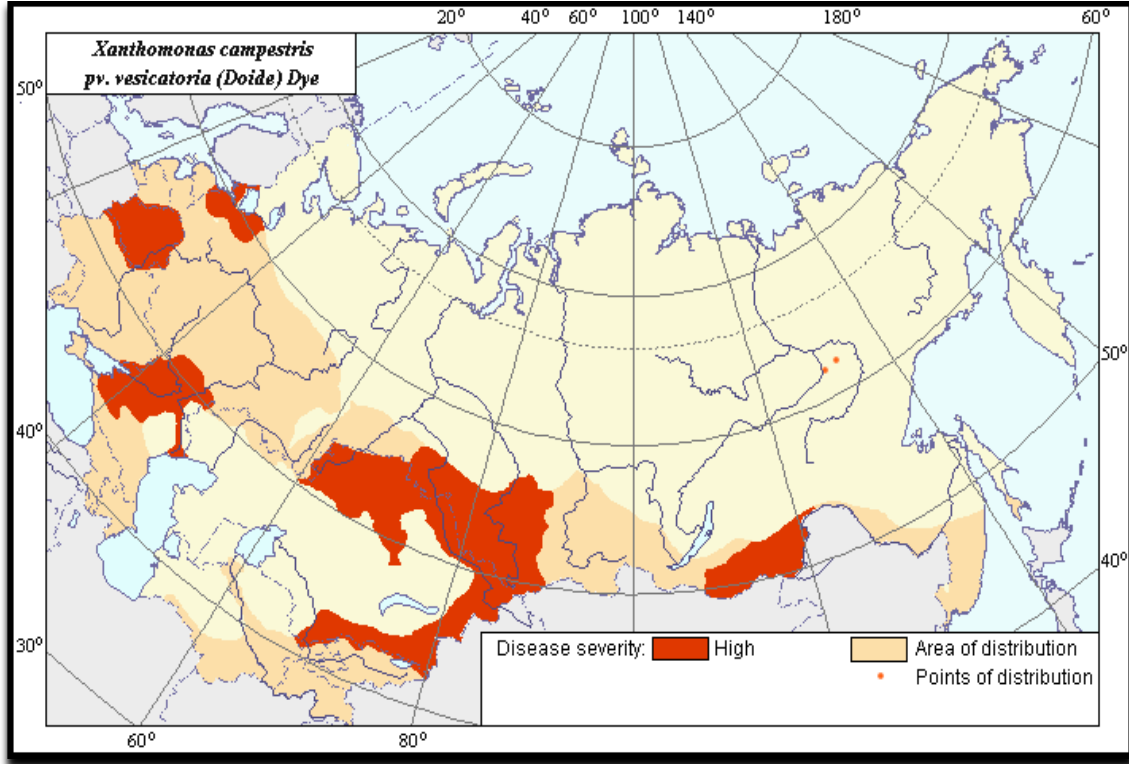
Bakteriyel leke hastalığının varlığı biber ve domates üretimi yapılan birçok ülkede rapor edilmiştir. Sürekli yağış ve yüksek sıcaklık hastalık şiddetini artırır. Çok yağmur alan ve aynı zamanda yüksek sıcaklığa sahip bölgelerde bu hastalık daha çok görülebilir [5,79,80].

Tablo 1.2. *Xanthomonas vesicatoria* ve bakteriyel leke hastalığı görülen ülkeler [81-117]

Kıtalar	Ülkeler
Asya	İsrail [81], Çin [82,83], Kore [84], Tayvan [85-87], Hint Okyanusu bölgesinde (Hindistan, Tayland, Pakistan) [88,89], Filipin [90], Japonya [91], Suudi Arabistan[92].
Avrupa	İtalya [93,94], Bulgaristan [95,96], Türkiye [97], Makedonya [98], Sırbistan [99,100], Rusya [101,102], Yugoslavya [103], Macaristan, Avustralya, Yunanistan, Romanya, İspanya, Çek Cumhuriyeti [104,105]
Amerika	Meksika [106], Brezilya, Arjantin, Kolombiya, Şili, Venezuela, Kanada [107], Pensilvaniya [108], Michigan [109], Barbados [110,111], Florida [112].
Afrika	Sudan, Etiyopya, Kenya, Malavi, Mozambik, Mısır, Tanzanya [113-117]

Xanthomonas vesicatoria domateslerde Çanakkale ilinde, biberlerde ise, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde (Adana ve Osmaniye) sofralık ve salçalık biber üretimi yapılan alanlarda rapor edilmiştir. Batı Akdeniz'de (Antalya) ve Doğu Anadolu (Erzurum, Erzincan ve Yusufeli) Bölgesi'nde domates ve biber üretim alanlarında bu hastalığın varlığı saptanmıştır [118,119].

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), *X. vesicatoria* 'nın yayıldığı alanları gösteren bir harita ortaya koymuştur [Şekil 1.10]. Bu hastalık dünyada domates üretiminin yapıldığı hemen hemen her alanda görülmektedir [120].



Şekil 1.10. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) tarafından yayınlanan *X. vesicatoria*'nın dünyadaki yaygınlığı [120].

1.1.12. Epidemiyolojisi

X. vesicatoria'nın konukçuları arasında domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum* spp.) gibi bitkilerinin yanı sıra *Solanaceae* familyasından *Nicotiana rustica*, *Physalis minima*, *Physalis pubescens*, *Solanum nigrum*, *Solanum dulcamara*, *Solanum rostratum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum melongene*, *Hyoscyamus niger*, *Lycium chinense*, *Lycium halimifolium*, *Datura stramonium*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Eclipta alba*, *Trifolium repens* ve *Eupatorium capillifolium* türleri de yer alır [5,69,121].

X. vesicatoria domates ve biber bitkilerinin tohumlarında, iletim demetlerinde, sekonder köklerinde, gövdesinde, toprak yüzeyinde kalan enfekte bitki artıklarında bulunur. Sağlıklı görülen bitkilerden elde edilen tohumların bu patojenle bulaşık olabileceği rapor edilmiştir. Etmenin kurutulmuş domates tohumlarında 20 yıl, biber tohumlarında ise 10 yıl canlılığını sürdürdüğü saptanmıştır [122]. Patojen bulaşık bitki artıklarında ve toprakta ise canlılığını bir sonraki mevsime kadar sürdürebilmektedir. *X. vesicatoria* tohum ve toprak kökenli olduğu için, pek çok ülkeye tohumla bulaşmıştır. Bakteriyel leke etmeninin optimum gelişme sıcaklığı

25-30°C arasındadır. Hastalık gelişimi için 25-30°C sıcaklık ve % 80-100 nem uygun koşullardır. Hastalık yağışlı dönemde ortaya çıkar [123,124].

1.1.13. Hastalık Kontrolünde Bakırın Kullanımı

Bakteriyel leke hastalığı ile mücadele etmede bakır-temelli bakterisidler tüm Dünya'da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar dahil hemen hemen tüm canlı formları için bakır belirli düzeylerde gerekli olan bir metaldir. Solunum ve elektron taşınmasında görev alan çeşitli enzimler kofaktör olarak bakır kullanılır. Bununla birlikte, belirli konsantrasyonların üstünde bakır hücreler için toksiktir. Bu toksisitenin nedeni, bakırın nükleik asitler ve enzim aktif bölgeleri ile etkileşime girmesi, enerji transport sisteminde karışıklığa yol açarak sonuçta hücre zarlarının bütünlüğünü bozmasıdır.

Bitki patojenlerine karşı oldukça toksik olan bakırlı bileşikler aynı zamanda kimyasal olarak kararlı olduklarından, bitki üzerinden kolayca yıkanıp gitmezler ve ucuz maliyetlidir. Bütün bu özellikleri nedeniyle bakteriyel bitki hastalıklarının kontrolünde geniş ölçekli kullanıma sahiptirler [3,4,95,125].

1.1.14. *Xanthomonas vesicatoria*'nın Tanısı

Enfekte bitki tohumları hastalık etmeninin en önemli inokulum kaynağıdır. Bu nedenle bakteri ile kontaminasyonun önlenmesi hastalık ile mücadelede önemi bir stratejidir. Çeşitli moleküler ve immünolojik yöntemler, bu patojenlerin tohum içindeki varlığını test etmek için geliştirilmiştir. *Xanthomonas* türlerinin tanısında kullanılan yöntemler, spesifik besi ortamlarında gelişen kolonilerin morfolojik karakterizasyonu, biyokimyasal testler, enzim bağlı immün analiz (ELISA), immünofloresan yöntemler ve yağ asidi analizleridir. Ancak, düşük hassasiyette ve pahalı olan bu testler zaman kaybı ve sık sık yanlış pozitif sonuçlar verdikleri için kabul görmemiştir [29,126-129]. Son yıllarda diğer organizmalarda olduğu gibi mikrobiyal organizmaların tanımlama ve genetik tiplendirme çalışmalarında da en çok tercih edilen yöntem Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'a dayalı yöntemlerdir. Bu yöntem, çift zincirli kalıp DNA üzerinde özel bir bölgenin enzimatik reaksiyon ile çoğaltımına dayanır. *Xanthomonas* ve pek çok bitki patojeni bakterinin saptanmasında ve tanımlanmasında polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) kullanılabileceği gösterilmiştir. [95,130-133].

X. vesicatoria'nın tanımlanması için *rhs* geni kullanılmıştır. Bu gen ilk kez 1980 yılında *E.coli*'de tanımlanmıştır. Daha sonra *Salmonella*, *Yersinia*, *Erwinia*, *Pseudomonadaceae*, *Myxococcaceae* dahil olmak üzere bir çok Gram negatif bakteride bulunmuştur. *E.coli*'de *rhs* genlerinde gözlenen yeniden düzenlemelerden dolayı bu gen "Rearrangment Hot Spot" olarak adlandırılmıştır. *rhs* geninin keşfedilmesinin üzerinden uzun yıllar geçmesine rağmen, kesin bir fonksiyonu belirlenememiştir. *rhs* genlerinin büyüklüğü 2-12 kb arasındadır. Bu genler, uzun diziler (core dizi olarak adlandırılır) ve kısa diziler olarak bilinen iki farklı diziyi kapsar. *rhs* geninde bulunan core dizileri G/C açısından zengindir ve türler arası korunmuş özelliktedir. Kısa diziler ise G/C açısından fakir ve oldukça değişkendir [134].

1.1.15. Moleküler Tanı

Bakteri suşlarının moleküler karakterizasyonu ve aynı tür bakteriler arasındaki genetik farklılığın ortaya çıkarılması için değişik moleküler markırlar kullanılmaktadır. Moleküler markırlar DNA seviyesindeki değişiklikleri içerir ve genelde bireyler arasında DNA seviyesindeki farklılığın ortaya çıkarılmasına yardımcı olur. Moleküler DNA markırları hibridizasyon ve PZR tekniğine dayanan markırlar olmak üzere iki kategoride sınıflandırılmaktadır. İlk moleküler markır kuşağı olan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi) DNA-DNA hibridizasyonu temeline dayanan, yavaş ve yüksek maliyetli bir tekniktir. DNA parçalarını çoğaltmaya yarayan polimeraz zincir reaksiyonunun keşfi ile daha hızlı ve daha düşük maliyetli olan, PZR yöntemine dayalı ikinci kuşak moleküler markırların oluşturması sağlanmıştır.

Genetik farklılığı belirlemede RFLP, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA/rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), ISSR (Inter Simple Sequences Repeats/basit dizi tekrarlar arası), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi) ve SSR (Simple Sequence Repeats/basit dizi tekrarları) gibi markırlardan yararlanılmaktadır. Kullanılacak DNA markırları, yapılacak çalışmanın amacına göre seçilmelidir. Çalışılacak populasyonun yapısı, genetik düzeyi, çalışma için gerekli zaman, maliyet ve sistemin kullanılabilirliği göz önünde bulundurulması gereken kriterlerdir [135,136].

RAPD ve ISSR yöntemleri düşük maliyetli ve tekrarlanabilir olması ve radyoaktif madde kullanımı gerektirmemesi nedeniyle avantajlıdır. Ayrıca bu iki teknik de dizi bilgisini gerektirmez. Bu nedenle ISSR ve RAPD gibi yöntemler tür içindeki genetik çeşitliliği belirlemek için çok sık kullanılmaktadır [137].

1.1.15.1. ISSR Tekniği

ISSR tekniği birbirine ters yönde ve yakın konumda olan mikrosatellit bölgelerin (100–3000 bç) amplifikasyonu esasına dayanır. Mikrosatellitler genomda bol miktarda ve orantılı olarak dağılmış halde bulunurlar. Bu tekniğin en önemli avantajı, DNA dizisi hakkında ön bilgi gerektirmemesidir. ISSR tekniğinde kullanılan primerler 5' veya 3' ucunda genellikle 1–4 bazdan oluşan tekrar dizilerine sahiptir. Ancak seçici baz içermeyen primerler de kullanılabilir. Bu teknikte basit tekrar dizileri içeren (15–24 bç) primerler SSR'lar arasında kalan bölgeler amplifiye edilir. ISSR tekniği filogenetik çalışmalarda, genetik kaynakların karakterizasyonu, genetik varyasyonun belirlenmesi, genotipler arasında genetik ilişkilerin saptanması ve çeşit tanımlamaları gibi alanlarda kullanılabilir [135].

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini domates ve biber üretim alanlarından izole edilen *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, besiyerleri, çeşitli kimyasallar ve PZR malzemeleri oluşturmuştur.

2.1.1. *Xanthomonas vesicatoria* İzolatları

Çalışmada kullanılan örnekler Muğla Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ömür Baysal tarafından toplanmıştır. Araştırma kapsamında, Antalya ilinin Kumluca, Demre ve Göynük ilçelerinden toplanmış 12 adet *Xanthomonas* izolatı ve 17 adet Amerikan izolatı kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan örnekler, Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan *Xanthomonas vesicatoria* izolatlarının kod numaraları.

Sıra No	İzolat Kodu	Alındığı yer	Konukçu
1	TR-38	Göynük	Biber
2	TR-4	Demre	Biber
3	ABD-1220	ABD	Domates
4	ABD-2010	ABD	Domates
5	ABD-330	ABD	Domates
6	ABD-141	ABD	Domates
7	ABD-938	ABD	Domates
8	ABD-444	ABD	Biber
9	TR-36	Göynük	Biber
10	ABD-1605	ABD	Domates
11	ABD-GA2	ABD	Domates
12	ABD-144	ABD	Domates
13	ABD-14B4	ABD	Domates
14	ABD-451	ABD	Biber
15	TR-37	Göynük	Biber
16	ABD-153	ABD	Domates
17	TR-50	Kumluca	Domates
18	ABD-1111	ABD	Domates
19	ABD-338	ABD	Domates
20	TR-39	Göynük	Biber
21	TR-55	Demre	Biber
22	ABD-56	ABD	Domates
23	ABD-155	ABD	Domates
24	TR-49	Kumluca	Domates
25	TR-XC kum.2010	Kumluca	Domates
26	ABD-157	ABD	Domates
27	TR-63	Demre	Biber
28	TR-56	Demre	Biber
29	TR-44	Göynük	Biber

2.2. Metot

2.2.1. Bakteri İzolatlarının Besiyerinde Çoğaltılması

2.2.1.1. Nutrient Agar Besiyerinde Üretim

300 µl bakteri süspansiyonu mikropipetle alınıp Nutrient agar besiyeri içeren petrilere bir baget yardımı ile yayıldı ve 37°C'deki inkübatörde geceboyu (18saat) üretildi. İnkübasyon sonunda gelişen koloniler incelendi ve beyaz açık sarı renkli koloni morfolojisine sahip olan koloniler *Xanthomonas vesicatoria* olarak değerlendirildi. İzolatlar gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere gliserol içeren tüplerde -80 °C'de saklandı.

2.2.1.2. Nutrient Broth Besiyerinde Üretim

Moleküler tanı için, Nutrient agar besiyerinde üretilen bir öze dolusu bakteri 5 ml Nutrient broth besiyerine inoküle edilerek, 70 dev./dak.'lık dönen çalkalayıcı inkübatör gece boyu 37±1°C'de üretildi. Nutrient agar ve Nutrient broth'ın hazırlanması Tablo 2.2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 2.2. Nutrient agar ve Nutrient broth'ın hazırlanması

Nutrient Agar	Nutrient Broth
Nutrient Agar 20.0 g Distile Su 1000.0 ml 120°C'de 15 dakika steril edildi.	Nutrient broth 8.0 g Distile Su 1000.0 ml 120°C'de 15 dakika steril edildi.

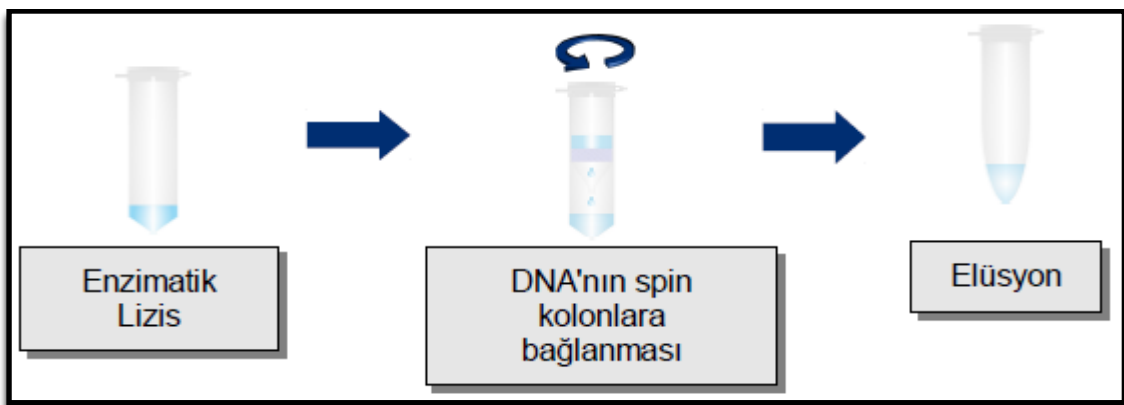
2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan *Xanthomonas vesicatoria* grubuna ait toplam 29 izolattan QIAGEN Genomik DNA İzolasyon Kiti ile genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bu prosedür aşağıdaki basamakları içermektedir:

1. Gece boyu geliştiren bakteri süspansiyonundan 1 ml steril ependorf tübüne alındı ve 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Üst sıvı atıldı.
2. Pelet üzerine 180 µl solüsyon ATL eklendi. Pelet iyice vortekslenerek çözüldü.

3. 20 µl Proteinaz K çözeltisi eklendi. Vortekslenerek karıştırıldı ve 56°C'de 1 saat bekletildi.
4. 15 saniye santrifüje edildi. 200 µl Solüsyon AL eklendi ve 20 saniye boyunca vorteks yapılarak karıştırıldı. Hızlıca 200 µl etanol (%96-100) eklendi, 20 saniye vorteks yapıldı.
5. Kısa bir süre santrifüje edildikten sonra karışım, 2 ml'lik toplama tübünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı ve 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi. Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tübüne yerleştirildi.
6. 500 µl Solüsyon AW1 eklendi. 8,000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi. Toplama tübündeki sıvı atıldı ve kolon yeni bir toplama tübüne yerleştirildi.
7. 500 µl Solüsyon AW2 eklendi. 10,000 rpm'de 3 dakika santrifüje edildi. Toplama tübündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tübe yerleştirildi.
8. 14,000 rpm'de 30 saniye santrifüje edildi.
9. Spin kolon, steril 2 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.
10. 200 µl Solüsyon AE eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 14,000 rpm'de 1 dakika santrifüje edildi.
11. Spin kolon atıldı, genomik DNA mikrosantrifüj tübünün içindeki elüsyon tamponunda toplandı.

İzole edilen DNA'lar PZR çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.



Şekil 2.1. Genomik DNA izolasyon kiti (QIAGEN) ile çalışma aşamaları.

2. 2. 3. İzole Edilen Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen DNA örneklerinin varlığını kontrol etmek için %1'lik (w/v) agaroz jel kullanıldı. Bu amaçla 50 ml hacmindeki jel kabı için 0,5 g agaroz tartılıp, erlenmayer içindeki 50 ml elektroforez tamponuna (1 X TBE) eklendi. Mikrodalga fırında agaroz iyice eriyene kadar ısıtıldı. Jel kaynarken şeffaf bir hale geldi, ardından 50-60°C arası sıcaklığa kadar soğutuldu, daha sonra jelin içine 10 µl stok EtBr (Etidiyum bromür) solüsyonundan ilave edildi ve jel kalıbına döküldü. Jel polimerize olduktan sonra taraklar özenli bir şekilde çıkarıldı ve üzerini örtecek kadar 1X TBE tamponu ilave edildi. 10X TBE, 1X TBE tamponu ve DNA yükleme tamponu hazırlanması Tablo 2.3.'de gösterilmiştir. Mikropipet ile 2 µl DNA örneği ile 2 µl yükleme tamponu karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. 100 voltta 20 dakika elektrik akımına maruz bırakılarak yürütüldü. Jel üzerindeki bantlar Syngene Gene Genius Bio Imaging cihazında ultraviyole ışık altında görüntülendi ve fotoğraflandı. Molekül ağırlığı belirteci olarak, Fermentas SM 0623 kullanıldı.

Tablo 2.3. 10X TBE tamponu ve DNA yükleme tamponu hazırlanması

10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu	1 X TBE (1 litre için)	DNA Yükleme Tamponu (Loading dye) (6X)
108 gr Tris baz (Sigma®) 55 gr borik asit (Sigma®) 40 ml 0,5 M EDTA, (Sigma®) Bir miktar distile su içinde çözündükten sonra pH 8.0 olarak ayarlanıp, hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.	100 ml 10 X TBE stok solüsyonuna, 900 ml distile su ilave edilerek hazırlandı.	40 gr sükröz 0,25 gr bromfenol mavisi 100 ml olacak şekilde distile su içinde çözündü. Ependorf tüplerine paylaştırılarak buzdolabında muhafaza edildi.

2. 2. 4. *Xanthomonas vesicatoria* İzolatlarının PZR Testi İle Tanısı

PZR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı *in vitro* DNA sentez yöntemidir. Günümüzde PZR yöntemi, mutasyonların ve dizi değişimlerinin saptanması, gen ifadesinin belirlenmesi, filogenetik araştırmalar, dizi analizi çalışmaları ve fungal, bakteriyel ve viral enfeksiyon etmenlerinin özgüllükle tanımlanmasında çok kullanılan bir yöntem haline gelmiştir.

PZR tekniği üç temel basamaktan oluşmaktadır. Bunlar:

1. Denatürasyon: Bu basamakta çoğaltılacak DNA tek zincirli hale getirilene kadar belirli bir süre 90°-95°C'de ısıtılır.

2. Bağlanma (Annealing): İkinci basamakta, sıcaklık derecesi kullanılan primerlere özgül olmak koşuluyla 50°-70°C'lere düşürülür ve primerlerin kalıp DNA'da komplementer dizilere hidrojen bağları ile bağlanması sağlanır.

3. Uzama (Extension): Uzamanın gerçekleştirildiği bu basamakta, ısıya dayanıklı *Taq DNA polimeraz* enzimi ile yaklaşık 72°C sıcaklıkta dNTP'lerin DNA'ya 5' → 3' yönünde bağlanması ve çift zincirli DNA sentezlenmesi sağlanır.

Çalışma, 0.5 ml'lik ependorf tüplerde toplam hacmi 25 µl olan reaksiyon karışımının kullanılmasıyla gerçekleştirildi. PZR koşulları ve reaksiyon karışımları ile kullanılan primerler Tablo 2.4., Tablo 2.5. ve Tablo 2.6.'da verilmiştir.

Tablo 2.4. Optimize edilen PZR reaksiyon karışımı

DNA	2 µl
10x PZR tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
2,5 mM dNTP karışımı	1 µl
İleri primer-F (10 pmol/µl)	1 µl
Geri primer-R (10 pmol/µl)	1 µl
Distile Su	17,9 µl
<i>Taq DNA polimeraz</i> (5 U/µl)*	0,1 µl
Toplam Hacim	25 µl

* **Taq DNA Polimeraz:** 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, stabilizatörler, 50% gliserol

Tablo 2.5. *Rhs* geni içindeki bölgenin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin dizisi

Patojen	Primer	PZR ürün boyutu (bp)	Literatür
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	XCVF (Z1) 5'-agaagcagtcctgaaggca-3' XCVR (Z2) 5'- aatgacctcgccagttgagt-3'	517	[133]

Rhs ileri(F)	TAGAAGAACCGATATCGAATCATGGTCAAAGGTCGTAACGTTCTGGTTTTTTGTGCGGGATCAGAATAAC GTTTGCAATATGCGACTGATTTCTCAGGACGCTGCCATATCGGGTATGCGTATCAAGTATTGCCCTCAG AGGTCCAGTTTTTTTTGGGTGAAGGCTGCGGTTATCCCGGCTGGGGAACGATTACCGGGGACATAGAAA CATGTCATACATCTGATTGCCGAGAGATGGTAGGAAATCCTATTCACGTCTTTAGCGGCGAAAAGTTTTAC GCGCAAAAAGAAGCAGTCCTTGAAGGCA
Rhs geri(R)	TTGAATTC AAGCGCACGTTTAGTTCCAATTCCAAGAATCCTC ATAAGTTTGCAACACAAAATTGGATGGATAATTTTTTCATCGCGGCTATATGGATGGGCAGCGTATCTTTC ACCTGAAGCGAAGCTCTGCCAAGTCGTTTTCAAGGTGAAAATGCTGTTTGCGCAACAACGAGTCGATA CGTTTTGTGACTGTTGGGGGAAAAAAGCAGGTTAGAACATCTGACAAATTTGTCGAGACGTTTCGACCAGG ACGGATATCTGATAAAAGTCGAGTATCTATCAGGTCAAGTTGTTGAAGTCGAGCGCGGCGCTGATAAGAA GATAGAGAAACTCCGATTTGGTTCGGGCGCGTTATTAACCTCAATTACACAAACCCTTCTGCCAATGCA GCACCATTAGTAAGTTCCATCGTTTTTCCGGATTTACAATTACCTACGTACACGACGAAAGACTACGTC TGCGCCAGATTCGATACTCAACTGGCGAGGTCATTAGTTATCAGTATGAGGATCCTCGCTTCCCAACTCT ACTGACAACTGTCGTTGGCGAGGATGGAAAAACCAGTGCTCAGTATGTCTATGATAACAATGGGCGTGCA GTGACCTCCGTTTTCTGAAGGGCGTGCCTACCAAGTTAGCTATGACGATGCCGCATCTGTCTCGACAGTG ACAGACCCAAATGGAGCAATATCCAAATACTACGGATCAATTCAAACATTTGGCCGTGTTGTACCCCGAT CTCAGGGTGTGTCAGAGGAAGCTTGGTCGTACGGAACAATGGCCCTTCGTCTTTTTCTAAGGGGCAAT GGAAAGTAGATTATAAACCGGACTTTATGTCGGGCGTCATTACGGAGTTATCAGAATCGCTCAAAGGGAC TTTATATCGTCAAGGGTGGTCACGTGGAATGCATTTCTCCAGTCCAAGACTCGTATTCAATCTTGAATG CTTCTGGTGTACGCTTCAAAGAATGAGTTTACACGCAACGAGCTAGGGCAGGTGCAAACAGCCACAA CAACATCGACGCAAGGCAATCTGACGCGACAAGTTGTTTCCAGCTACTGCTTGCCAAGTGACGTTAGCG CAGGCACATGTACACGTGCGTGGGCTTTGAGAAGTAAAAACGGTCCCCGAACAGACGTGAACGACCAAT GCTCTATGCGTACATGACGATGCGGCAGGATGTGCCTCAGCAGCAAGTGGATGCATTTATCGCAA GGGCGATTTGTTGAAAACAATAATCCTGCCGGCCAAACCACCGAATACCTCGCTACGACGGCGCTGG CCGCCGCTGTCCATTAAGGACGCCAATGGCATCGTACCGACTACAGCTATACCCGCGCGGTTGGCT GACG

Şekil 2.2. Rhs geni içindeki PZR ile çoğaltılan bölge(Primerler sarı renk ile gösterilmiştir)

Tablo 2. 6. Rhs genlerin optimize edilen PZR reaksiyon koşulları

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	2 dakika	1
Denatürasyon	94°C	45 saniye	32
Bağlanma	52°C	45 saniye	
Uzama	72°C	90 saniye	
Son Uzama	72°C	5 dakika	1

PZR ürünlerinin tanımlanması için %1'lik agaroz jel kullanıldı. Elde edilen ürünleri tanımlayabilmek için 100 bç markır kullanıldı. PZR için hazırlanan jelin her bir kuyusuna 2 µl yükleme tamponu ve 8 µl örnek olmak üzere toplam 10 µl karışım yüklendi ve 90 V'ta 30 dakika yürütüldükten sonra bantlar Syngene Gene Genius Bio Imaging Jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

2.2.5. ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) PZR

X. vesicatoria izolatlarının genetik tiplendirmesinde kullanılacak ISSR primerlerinin üç tanesi (D3, A31, I811) literatür taraması ile bulunmuş olup, diğerleri (p880, p881, p887, p888, p889) Prof. Dr. Ömür Baysal tarafından gönderilmiştir. Bu primerlerin özelliklerini Tablo 2.7 'de, reaksiyon karışımları ve koşulları ise Tablo 2.8 ve Tablo 2.9 'da verilmiştir.

Tablo 2.7. ISSR primerleri ile baz dizilimleri ve DNA'ya bağlanma sıcaklıkları

Primer	Baz dizilimi (5'– 3')	Baz sayısı	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Literatür
P880	GGAGAGGAGAGGAGA	15	48	Ö. Baysal
P881	GGGTGGGGTGGGGTG	15	54	Ö. Baysal
P887	TCTCTCTCTCTCTC	14	42	Ö. Baysal
P888	CACACACACACACA	14	42	Ö. Baysal
P890	GTGTGTGTGTGTGT	14	42	Ö. Baysal
D3	GACAGACAGACAGACA	16	48	[89]
I811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	17	52	[141]
A31	AGCAGCAGCAGC	12	40	[89]

Bu aşamada PZR ile elde edilen bantların incelenebilmesi için agaroz jel elektroforezi uygulandı. PZR için hazırlanan %1'lik jelin her bir kuyusuna 2 µl yükleme tamponu ve 8 µl örnek olmak üzere toplam 10 µl karışım yüklendi ve 110

V'ta 40 dakika yürütüldükten sonra elde edilen bantlar Syngene Gene Genius Bio Imaging Jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

Tablo 2.8. Optimize edilen ISSR-PZR reaksiyon karışımı

DNA	2 µl
10x PZR tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTP karışımı(10 mM)	0.1 µl
ISSR Primer (10 pmol/µl)	1 µl
DMSO	1,25 µl
Distile Su	18,55 µl
<i>Taq DNA polimeraz</i> (5 U/µl)	0,1 µl
Toplam Hacim	25 µl

Tablo 2. 9. Optimize edilen ISSR-PZR koşulları

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	5 dakika	1
Denatürasyon	94°C	45 saniye	35
Bağlanma*	40°C-54°C	45 saniye	
Uzama	72°C	90 saniye	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1

* bağlanma sıcaklıkları primerlere göre değişmektedir.

2.2.6. İstatistiksel Analizler

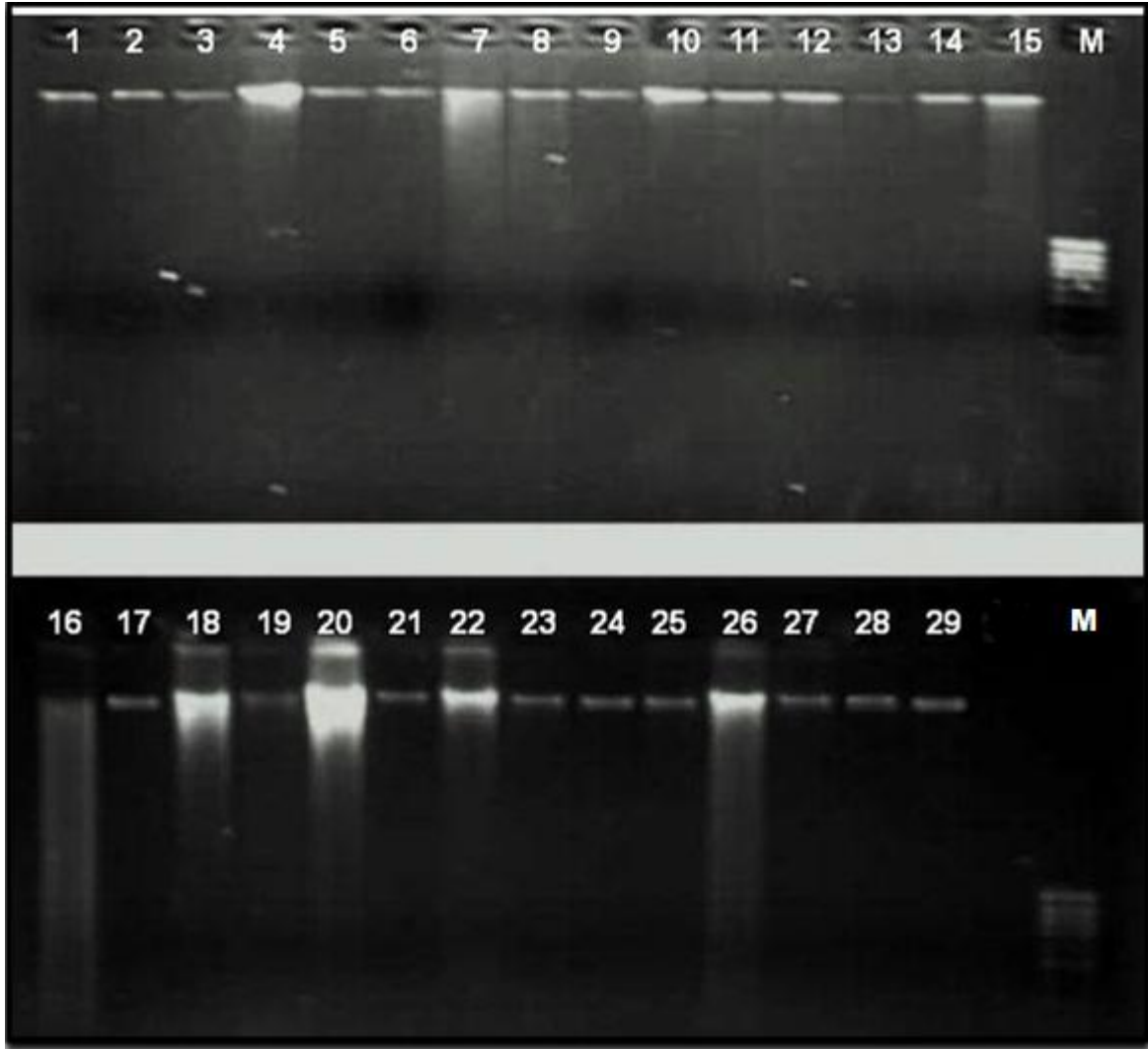
Kullanılan *X. vesicatoria* izolatlarının genetik benzerlik ve farklılıklarının saptanması amacıyla her bir primer için ayrı ayrı elde edilen jel fotoğrafları incelenerek, polimorfik bantlar belirlendi.

Bu kapsamda analiz için NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) version 2.1 (Rohlf, 2000) bilgisayar programında öncelikle NT-Edit versiyon 1.2 alt programı kullanıldı. Jelde görüntülenen bantlar polimorfik olup olmamasına göre 1 (var) veya 0 (yok) olarak sınıflandırılıp matris oluşturuldu. Bu matrisler kullanılarak primerlerin verdikleri polimorfik bantların polimorfizm oranları hesaplandı. Bant matrisleri oluşturulduktan sonra SIMQUAL (Similarity for Qualitative Data) alt programı kullanıldı. Son aşamada benzerlik matrisini temel alan UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages/aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu) algoritması kullanılarak izolatlara ait dendogramlar çizildi.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Kromozomal DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi

Çalışmada kullanılan 29 izolatin DNA izolasyonları QIAGEN DNA izolasyon kit kullanımı ile gerçekleştirildi ve elde edilen bantlar agaroz jelde görülerek* fotoğraflandı [Şekil 3.1].

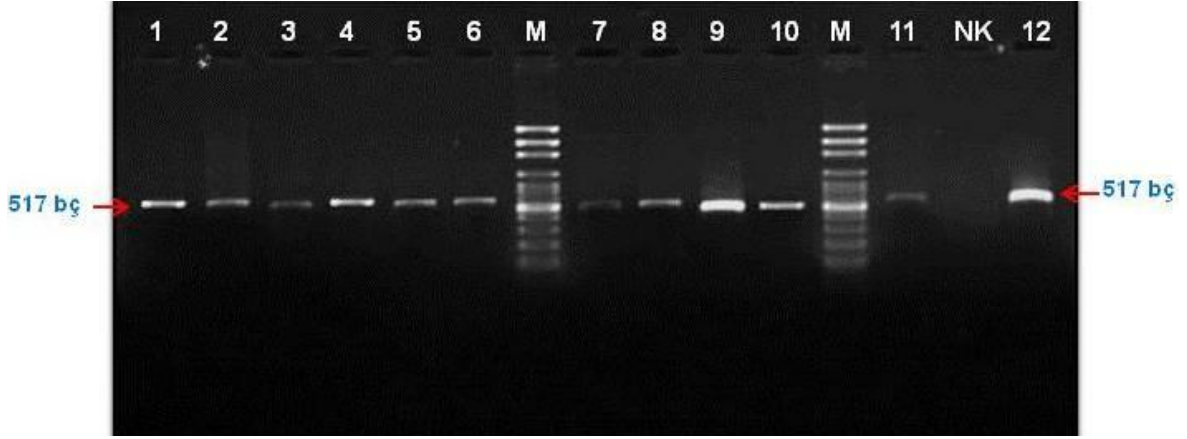


Şekil 3.1. *Xanthomonas vesicatoria* örneklerinden izole edilen DNAların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

*Tüm jel görüntülerinde verilmiş olan numaralar Tablo 2.1'deki sırayı izlemektedir.

3. 2. *Xanthomonas vesicatoria* İzolatlarının *rhs* Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

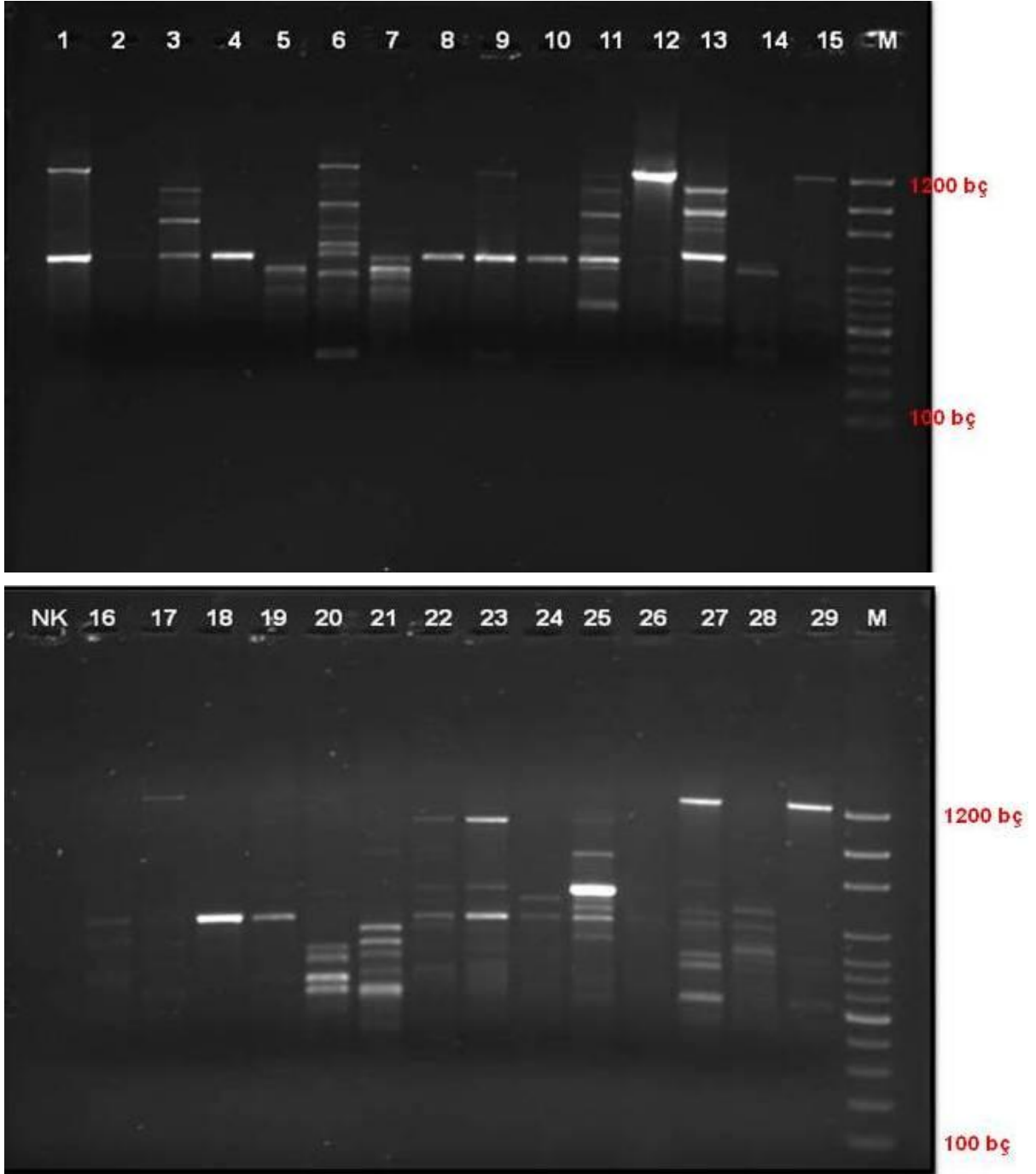
Tablo 2.1’de verilen *Xanthomonas vesicatoria* izolatından 1(TR38), 3(ABD1220), 4(ABD2010), 5(ABD330), 6(ABD141), 8(ABD444), 10(ABD1605), 13(ABD14B4), 18(ABD1111), 21(TR55), 25(TR-Xckum.2010), 29(TR44) kod numaralı olanlardan elde edilen genomik DNA’lar Tablo 2.5.’de verilen XCVF ve XCVR primerler ile *rhs* geni içindeki 517 bç’lik fragmentine ait bantlar oluşturdu. Kullanılan 29 adet izolattan sadece 12 tanesinde *rhs* gen bölgesi içindeki 517 bç’lik fragmentin varlığı görülebildi. Diğer izolatlarda bu bandın olmadığı saptandı [Şekil 3.2].



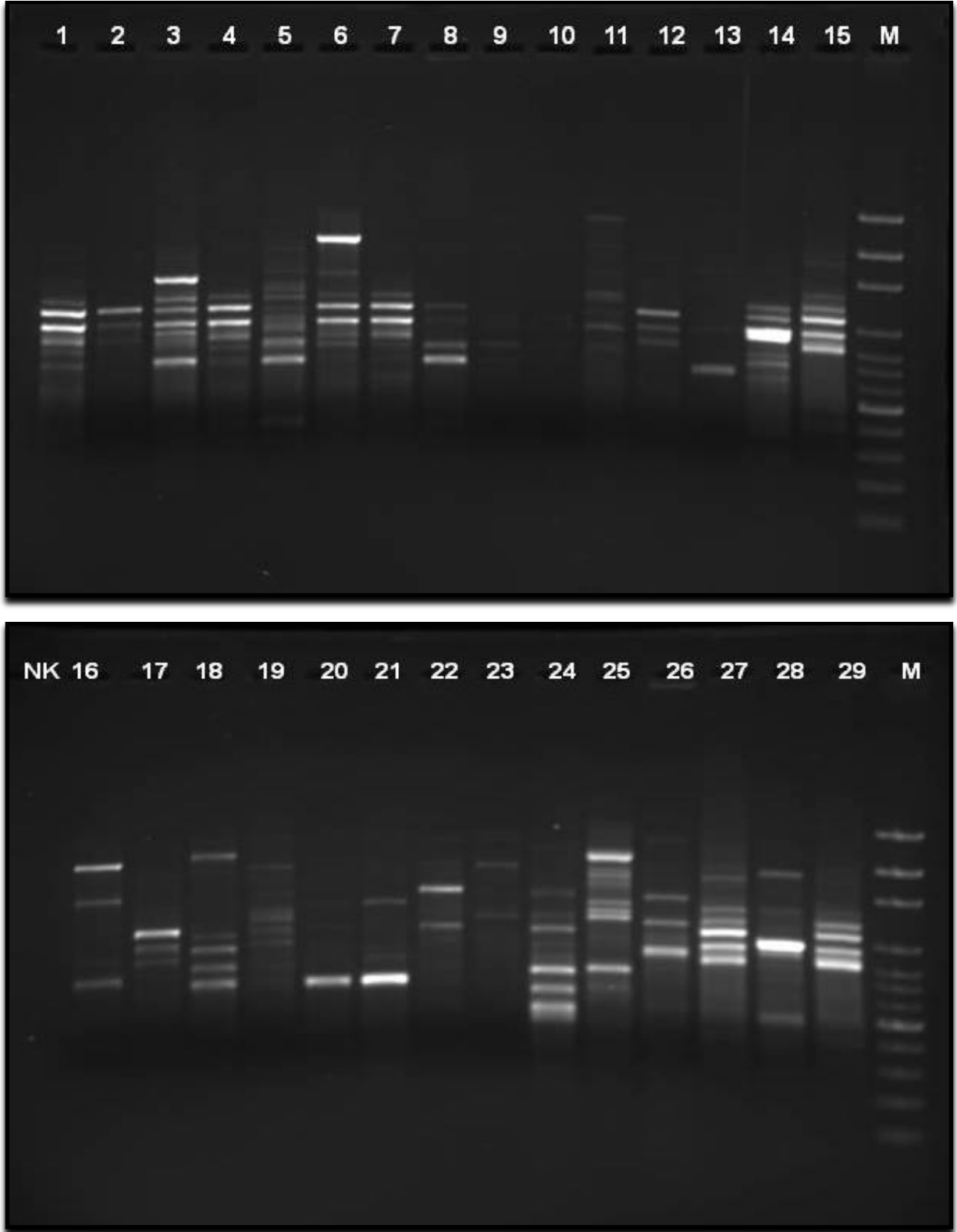
Sekil 3.2. *rhs* geni içindeki 517 bç’lik bölgenin XCVF ve XCVR primer ile amplifikasyon sonrası agaroz jeldeki görüntüsü. 1(TR38), 2(ABD1220), 3(ABD2010), 4(ABD330), 5(ABD141), 6(ABD444), 7(ABD1605), 8(ABD14B4), 9(ABD1111), 10(TR55), 11(TR-Xckum.2010), 12(TR44), M: 100 bç DNA moleküler ağırlık markırı, NK: Negatif Kontrol.

3.3. ISSR-PZR Sonuçları

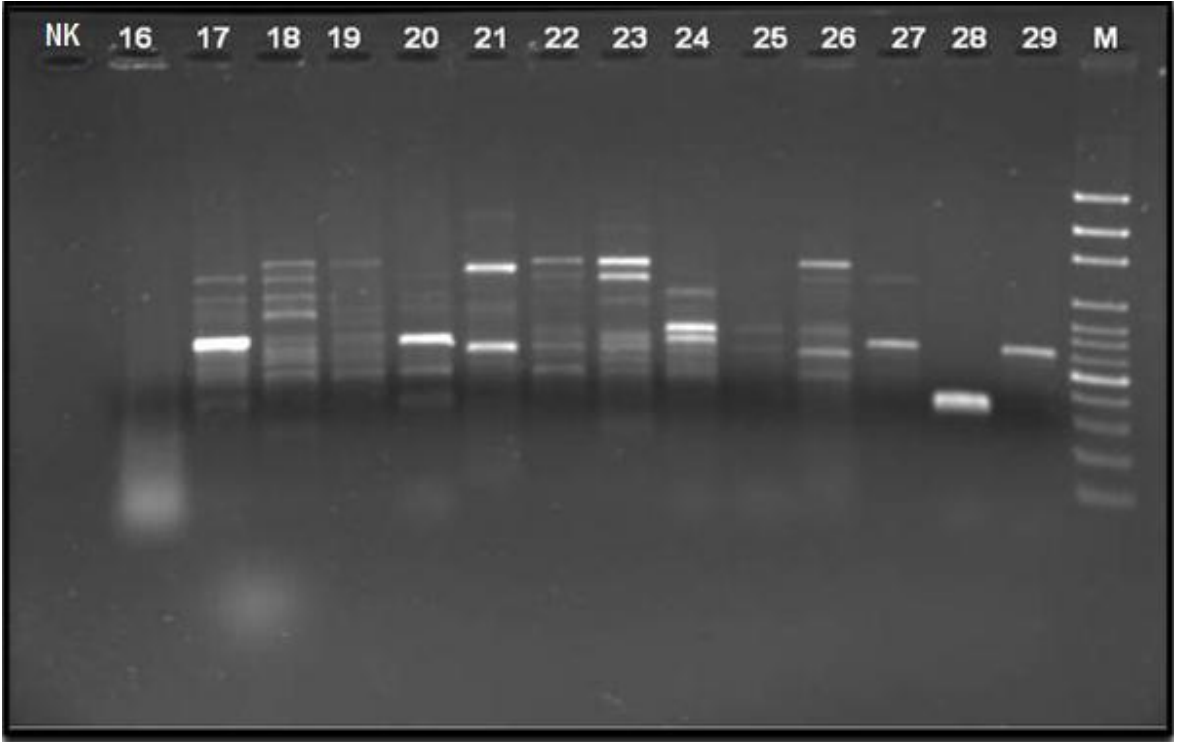
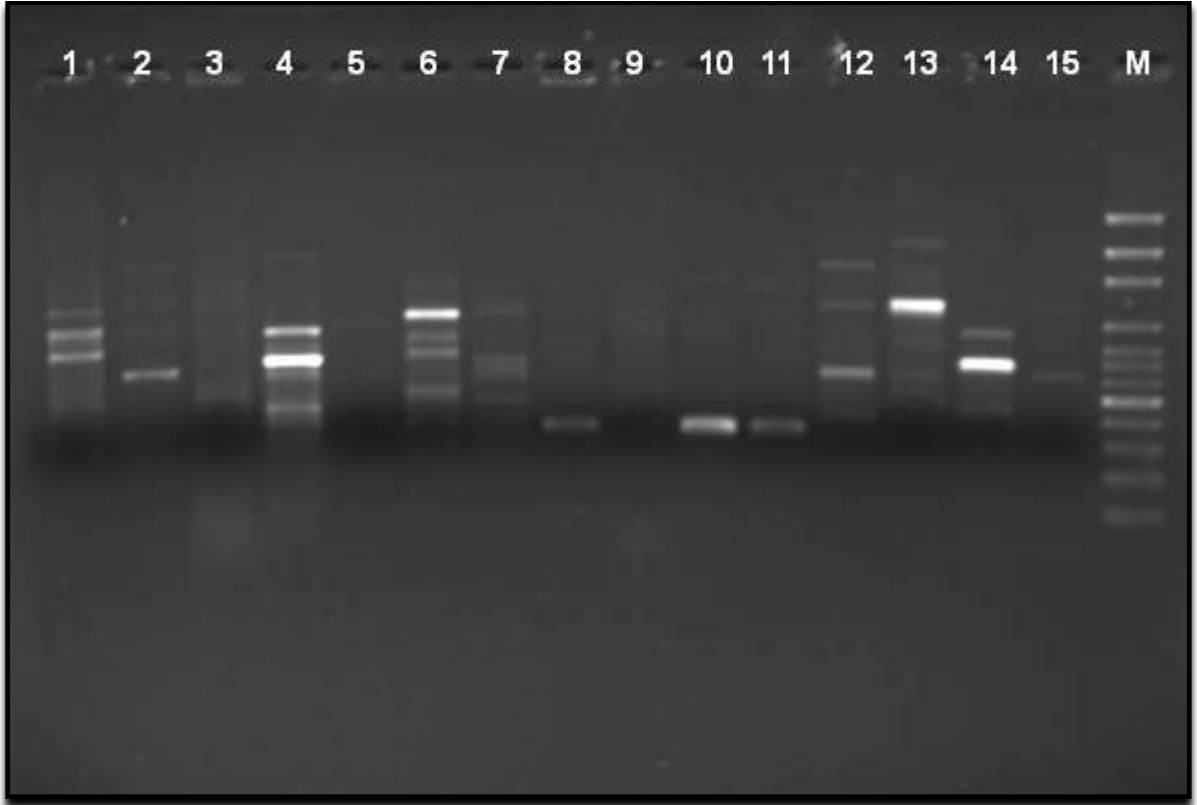
Çalışmada kullanılan *Xanthomonas vesicatoria* izolatları Tablo 2.7.’de belirtilen 5 farklı ISSR primerleri (p880, p881, D3, A31, I811) ile tarandı. ISSR-PZR analizlerinden elde edilen jel görüntüleri Şekil 3.3.-3.7.’de verilmiştir. Bu jel görüntülerinden saptanan polimorfizm yüzdeleri Tablo 3.1’de görülmektedir.



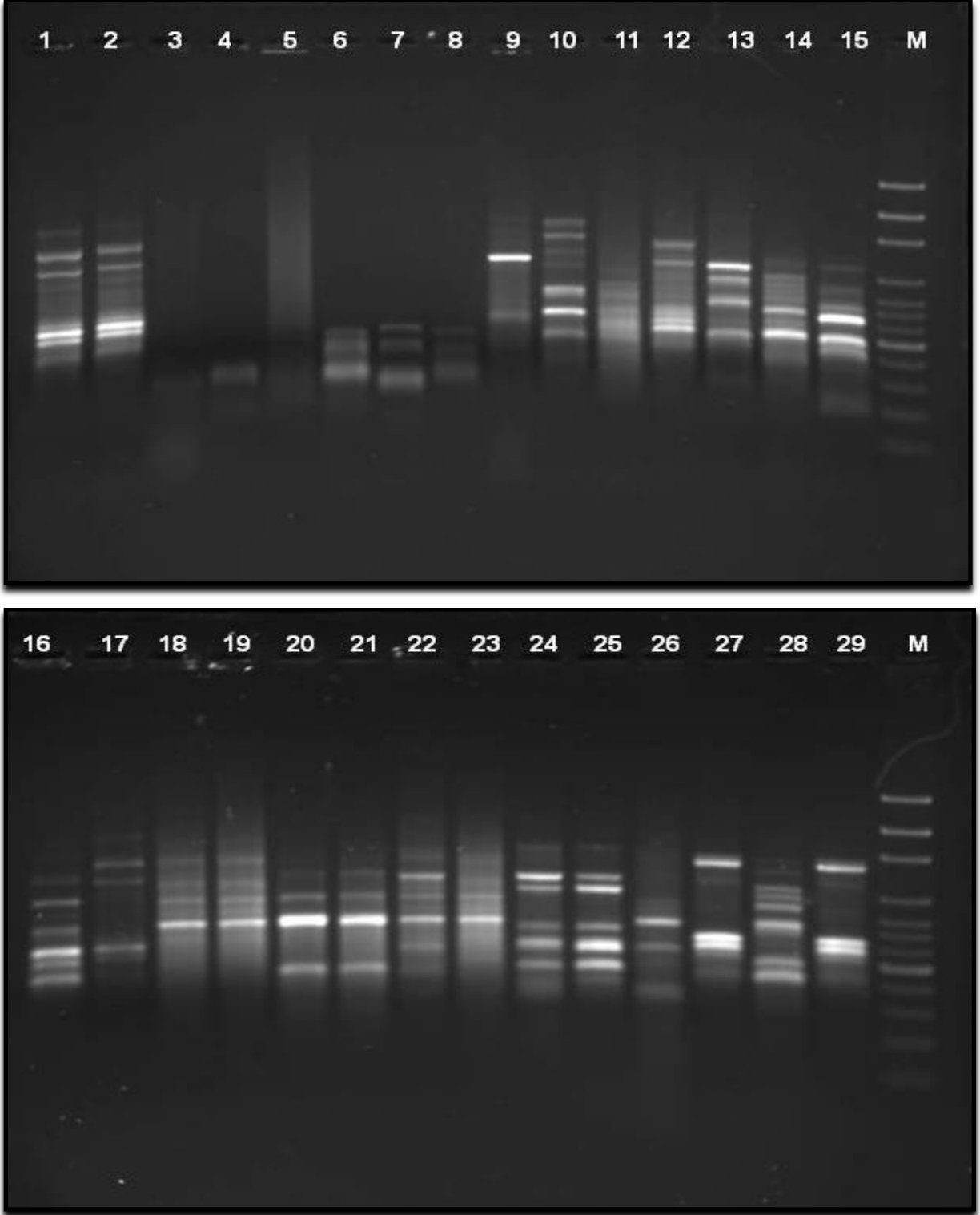
Şekil 3.3. p880 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. NK: Negatif Kontrol, 1-29: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bç DNA moleküler ağırlık markırı.



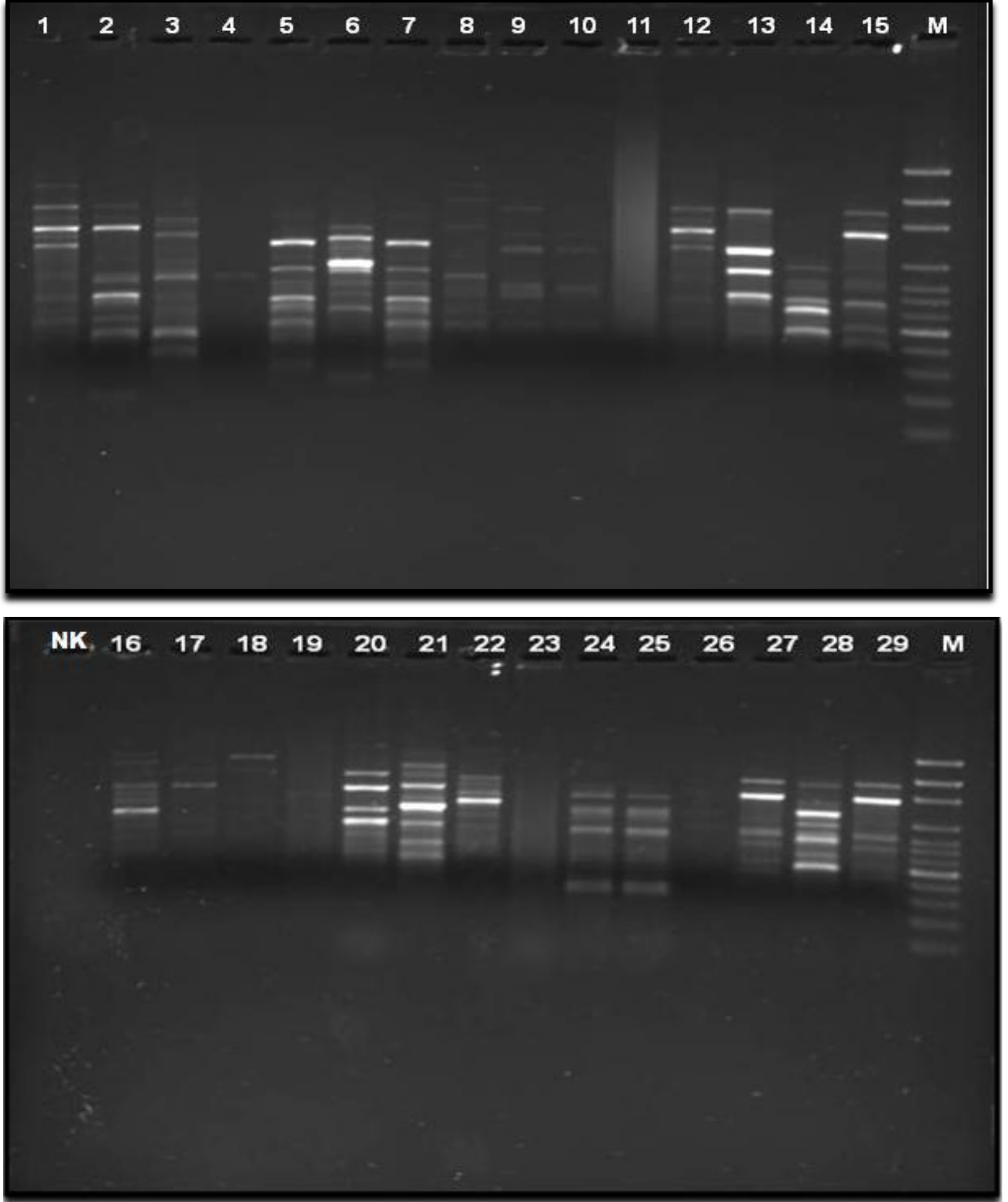
Şekil 3.4. p881 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. NK: Negatif Kontrol, 1-29: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bç DNA moleküler ağırlık markırı.



Şekil 3.5. I811 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. NK: Negatif Kontrol, 1-29: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı.



Şekil 3.6. A31 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. 1-29: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı.



Şekil 3.7. D3 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. NK: Negatif Kontrol, 1-29: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı.

Çalışmada kullanılan 5 adet ISSR primerinden toplam 57 adet bant elde edilmiş olup, bu bantların hepsinin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. En fazla polimorfik ISSR bandı oluşturan primer D3 olarak bulunmuştur.

Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin polimorfizm oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır :

$$\text{Polimorfizm Oranı (\%)} = \text{Polimorfik Bant Sayısı} / \text{Toplam Bant Sayısı} \times 100$$

Kullanılan 5 adet ISSR primerleri ile elde edilen polimorfizm oranları %100 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. ISSR primerlerinin oluşturduğu polimorfizm oranları

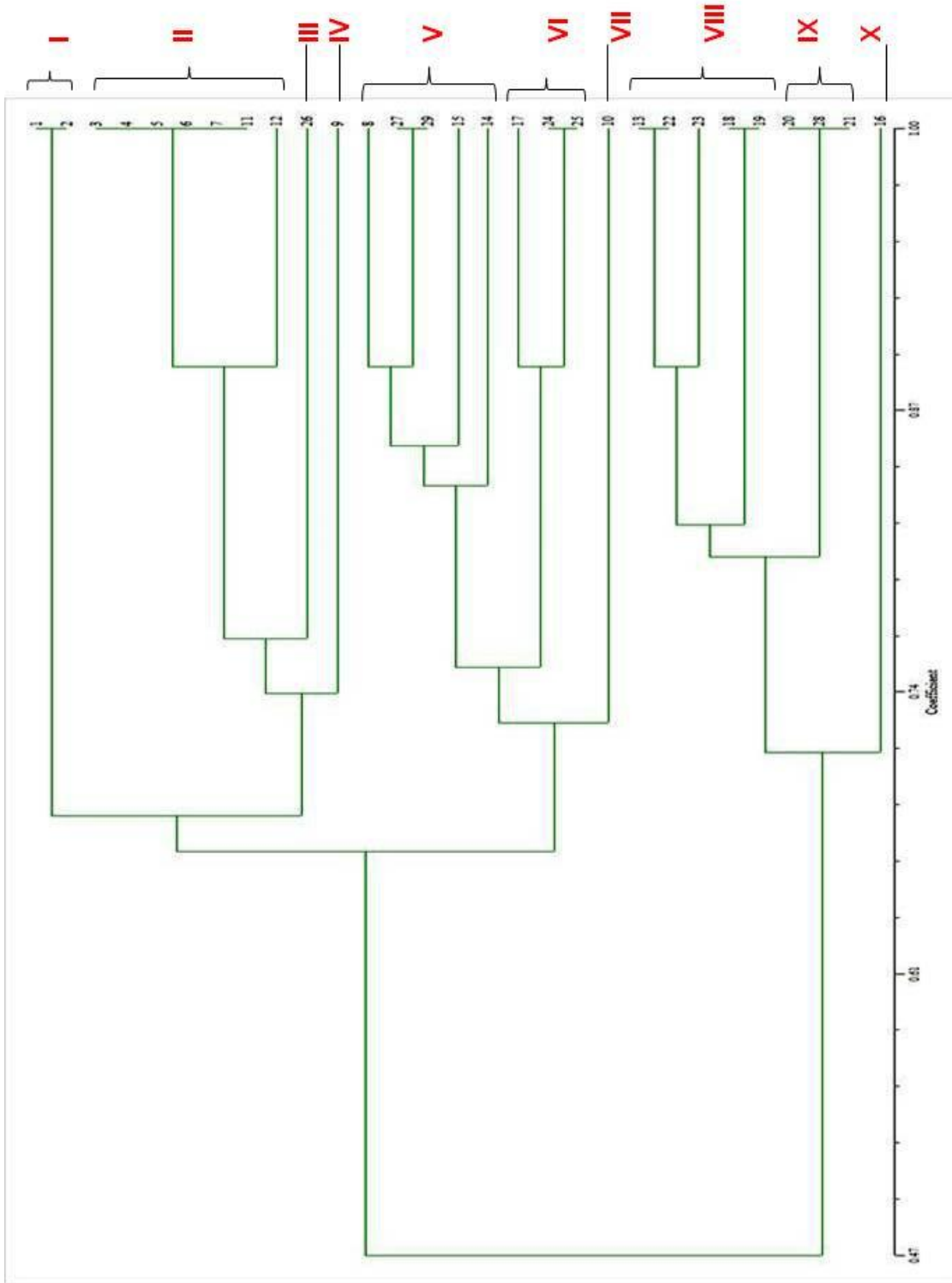
Primer	Dizi (5'–3')	Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	% Polimorfizm
P880	GGAGAGGAGAGGAGA	11	–	11	100
P881	GGGTGGGGTGGGGTG	13	–	13	100
P887	TCTCTCTCTCTC	–	–	–	–
P888	CACACACACACACA	–	–	–	–
P890	GTGTGTGTGTGTGT	–	–	–	–
D3	GACAGACAGACAGACA	14	–	14	100
I811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	10	–	10	100
A31	AGCAGCAGCAGC	9	–	9	100

3.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Yirmi dokuz adet *X. vesicatoria* izolatının tiplendirilebilmesi amacıyla kullanılan beş adet ISSR primeri (P880, P881, D3, A31, I811) ile elde edilen jel görüntüleri, her bir izolatta bulunan ve bulunmayan bantlar açısından değerlendirildi. Var olan bantlar için (1) olmayan bantlar için (0) sayısı kullanıldı ve NTSYS-pc 2.1 programı aracılığı ile dendogram çizildi.

Bu yolla elde edilen 5 adet dendogram birbirleriyle karşılaştırıldığında, en anlamlı sonucun A31 primerinden sağlandığı görüldü. A31 primeri kullanılarak elde edilen dendogram Şekil 3.8'de görülmektedir. Buna göre %80 benzerlik katsayısı temel

alınarak yapılan analiz sonucunda, 29 *X. vesicatoria* izolatı için 10 farklı grup bulunduğu saptandı.



Şekil 3.8. A31 primeri ile ISSR-PZR analizi sonucu UPGMA metoduyla oluşturulan *Xanthomonas vesicatoria* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram.

3.5. Tartışma

Genetik tiplendirme çalışmaları birçok organizmanın, özellikle de mikroorganizmaların tür ve alttür seviyesinde ayrılabilmesi ve aralarındaki çeşitliliğinin ortaya çıkarılmasına olanak tanımaktadır. Genetik tiplendirme çalışmalarının en büyük faydalarından biri, hastalık etmeni olan mikroorganizmaların tanısının yapılabilmesidir.

Türkiye'nin birçok bölgesinde, özellikle Doğu Akdeniz Bölgesi'nde *Xanthomonas vesicatoria* leke hastalığı domates ve biber ekim alanlarında ekonomik kayıplara neden olan en önemli bitki patojenlerinden biridir. Bu bitkilerde leke hastalığı etmenlerinin doğru saptanması alternatif mücadele yöntemlerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Bitkisel patojenlerin tanısı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere göre yapılabilmektedir. Ancak bu yöntemlerin ayırım gücü yeterli olmayabilir. Son yıllarda gelişen DNA temelli moleküler teknikler, özellikle PZR'a dayalı yöntemler hızlı, güvenilir ve kolay olması açısından mikroorganizmaların tanısında ve genetik tiplendirmede sıklıkla kullanılmaktadır. DNA temelli moleküler tekniklerden biri olan ISSR-PZR çeşitli bitkisel hastalıkların tanımlanmasında ilk sıralarda gelmektedir.

Bu çalışmada Muğla Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yürütülen bir proje kapsamında domates ve biber bitkilerinden elde edilen ve mikrobiyolojik tanıları yapılarak tarafımıza gönderilen *Xanthomonas vesicatoria* izolatları kullanılmıştır.

Öncelikle bu izolatların moleküler tanımlanması için, Gram negatif bakterilerde bulunduğu rapor edilen *rhs* genine özgü bir primer çifti kullanılarak [133], izolatlardan elde edilen DNA'lar PZR ile amplifiye edilmiştir. Bu PZR sonuçlarına göre *rhs* geni içindeki 517 bp'lik fragmentin 29 adet Amerika ve Türkiye izolatından 12 tanesinde bulunduğu saptanmıştır (Şekil 3.2.). Bunlar TR38, ABD1220, ABD2010, ABD330, ABD141, ABD444, ABD1605, ABD14B4, ABD1111, TR55, TR-Xckum.2010 ve TR44 kod numaralı izolatlardır (Tablo 2.1.). Bunun yanı sıra, 12 izolatta gözlenen bu bantların jel üzerinde aynı pozisyonunda yer aldıkları görülmektedir. Bu nedenle, *rhs* genine özgü XCVF ve XCVR primerleri ile yapılan PZR'nın *X. vesicatoria* türünü belirlemede uygun olmasına rağmen, tür içindeki çeşitliliği saptamada kullanışlı olmadığı sonucuna varılmıştır.

Park ve arkadaşları [133] domates ve biberde hastalık etmeni olan *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *rhs* genine özgü primer setini kullanarak, 517 bç'lik PZR ürününü saptanmışlar ve bu protokolün bu hastalık etmeninin özgül olarak tanısında güvenilir bir araç olduğunu rapor edilmişlerdir. Park ve arkadaşları *rhs* geni ile elde ettikleri bu sonuçlar bizim sonuçlarımız ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Bir diğer çalışmada Liu ve arkadaşları, *E.coli* suşlarının tiplendirilmesinde de *rhs* geninin iyi bir markır olabileceğini göstermişlerdir[138].

Bizim çalışmamızda test edilen 29 izolattan sadece 12 tanesinde 517 bç'lik fragmente ait bandın gözlenmiş olması, diğer izolatlarda bu primer setine ait bağlanma bölgelerinin değişikliğe uğramasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle, tüm örneklerde *rhs* geninin dizi analizi yapılarak, sonuçların karşılaştırılması daha doğru yorumlara olanak verecektir.

Çalışmanın ikinci kısmında Tablo 2.7.'de verilen toplam sekiz adet ISSR primeri amplifikasyon başarıları açısından denenmiş ve bunlardan 5 tanesi daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. P887, P888 ve P890 primerleri 29 izolatin hiçbirinde bant oluşturmamıştır.

P880, P881, D3, A31 ve I811 primerleri ile gerçekleştirilen PZR uygulamaları sonucunda, en iyi sonuç veren primerin A31 olduğunu saptanmıştır. Bu beş primer kullanılarak gerçekleştirilen amplifikasyonlar sonucunda 29 izolatta toplam 57 adet bant olduğu gözlenmiştir. Bu bantların en küçüğü yaklaşık 300 bç, en büyüğü ise 1200 bç kadardır.

Toplam 57 adet bandın tamamı polimorfik bulunmuş olup, hiç monomorfik bant saptanamamıştır.

NTSYS-pc 2.1 programı kullanılarak 5 ISSR primeri ile elde edilen bantlar değerlendirilmiş ve en iyi dendogram A31 primerinin verdiği sonuçlardan sağlanmıştır. A31 primeri ile elde edilen bant şemaları kullanılarak oluşturulan dendogram (Şekil 3.8.) incelendiğinde 10 ayrı grup ayırt edilmiştir:

- I. grupta (1, 2) Göynük ve Demre biber izolatları,
- II. grupta (3, 4, 5, 6, 7, 11, 12) ABD domates izolatları,
- III. grupta (26) ABD domates izolatu,
- IV. grupta (9) Göynük biber izolatu,

V. grupta (8, 27, 29, 15, 14) Göynük, Demre ve ABD biber izolatları,

VI. grupta (17, 24, 25) Kumluca domates izolatları,

VII. grupta (10) ABD domates izolatları,

VIII. grupta (13, 22, 23, 18, 19) ABD domates izolatları,

IX. grupta (20, 21, 28) Göynük ve Demre biber izolatları,

X. grupta (16) ABD domates izolatu yer almaktadır.

Şekil 3.8.'de görüldüğü gibi, ABD kaynaklı domates izolatları II, III, VII, VIII ve X arasında dağılmıştır. Bu dendogram grupları arasında konukçu özgülüğü (domates ve biber) tanımlanamamıştır. DNA amplifikasyon ürün şemaları ile hem Antalya ili içindeki hem de ABD kaynaklı orijin bölgeleri açısından biber izolatları arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. Dolayısıyla ISSR analizleri, ayrı gruplar altında toplanmış olan 29 izolatu birbirinden farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

Farklı *Xanthomonas* izolatları arasındaki genetik çeşitlilik değerlendirilmesi için yapılan bir çalışmada [89] 30 farklı RAPD ve üç farklı ISSR primeri kullanılmıştır. Bu üç ISSR primerinden ikisi (D3 ve A31) bizim çalışmamızda da kullanılmış ve en iyi oluşturulan dendogramda bu primer ile elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Söz konusu araştırmada [89] RAPD ve ISSR analizi sonuçları bir arada değerlendirilmiş ve iki ayrı *Xanthomonas* türünün (*Xanthomonas maltophilia* ve *Xanthomonas nematophilus*) sadece patojenik davranış açısından genomik benzerlik sergiledikleri gösterilmiştir.

Benzer bir çalışmada, Mondal ve Moni [139] ERIC-PZR ile elde ettikleri parmakizi analizi sonucunda, *Xanthomonas campestris pv. punicae* içinde patojenik değişkenliği rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise, Giri ve ark, [140] *Xanthomonas axonopodis pv. punicae* suşları arasında RAPD analizlerine dayalı yüksek oranda genetik değişkenlik saptanmışlardır [141].

Bizim çalışmamızda kullanılan *Xanthomonas vesicatoria* izolatlarının patojenitelerine ve ABD kaynaklı izolatların toplandıkları coğrafi bölgeye ilişkin tarafımıza herhangi bilgi verilmediği için, hem patojenik davranış, hem de coğrafi bölgeye bağlı farklılıklar açısından değerlendirme yapılması mümkün olmamıştır.

Sonuç olarak *rhs* geni, diğer Gram negatif bakteri turleri için olduğu gibi, *Xanthomonas vesicatoria* turu için de tanımlayıcı bir belirteç olarak unerilebilmektedir.

Araştırmamız kapsamında test edilen *Xanthomonas vesicatoria* izolatlarının genetik tiplendirilmesi amacıyla, çok daha farklı sayıda ISSR primerinin denemesi, bunun yanı sıra RAPD, ERIC-PZR, multilokus dizileme gibi daha ileri yontemlerin kullanılacağı çalışmaların planlanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Sinclair, J.B., Dhingra, D.O., Basic Plant Pathology Methods, 2.Baskı, CRC Basımevi, Florida, **1995**.
- [2] TÜİK, Haber Bültenleri, Bitkisel Üretim 1. Tahmini, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, **2014**.
- [3] Patikarnmonthon, N., Nawapan, S., Buranajitpakorn, S., Nisanart, C., Skorn, M., Copper ions potentiate organic hydroperoxide and hydrogen peroxide toxicity through different mechanisms in *Xanthomonas campestris pv.campestris*, *FEMS Microbiology Letter*, 313, 75-80, **2010**.
- [4] Bender, C.L., Malvik D.K., Conway, K.E., Characterization of pXV10A, a Copper Resistance Plasmid in *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 170, **1990**.
- [5] European and Mediterranean Plant Protection Organization(EPPO) plant quarantine, *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*, EPPO Bulletin18, 521-526, **2013**.
- [6] Kiran, F., Osmanoğlu, Ö., Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda ve Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27, 62-74, **2011**.
- [7] Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Veriler, Bitkisel Üretim Verileri, BÜGEM Faaliyetleri, Ankara, **2014**.
- [8] Türkiye İstatistik Kurumu(TÜİK), Haber Bültenleri, Bitkisel Üretim 1. Tahmini, Tablo-2: Sebze ürünleri üretim miktarı, **2014**.
- [9] Paylan, İ., Erkan, S., Detection of some viral agents in vegetable seeds and determination of their prevalence, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Derneği, 50, 231-240, **2003**.
- [10] Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Emerging infectious diseases of plants: Pathogen Pollution, Climate Change and Agrotechnology Drivers. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 19, **2004**.
- [11] Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology, *Molecular Plant Pathology*, 13, 614–629, **2012**.
- [12] Jackson, R. W., Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology, 3.Baskı, Caster Academic Basımı, Norfolk, **2009**.

- [13] Vauterin, L., Rademaker, J., Swings, J., Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 90, 677-682, **2000**.
- [14] Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K., Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *Journal of General Microbiology*, 137, 1677-1687, **1991**.
- [15] Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J., Kersters, K., Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic Applied Microbiology*, 16, 47-71, **1993**.
- [16] Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J., Reclassification of *Xanthomonas*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, **1995**.
- [17] Buell C.R., Interactions Between *Xanthomonas* Species and *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, e0031. doi:10.1199/tab, **2002**.
- [18] Norman D.J., Chase, A.R., Hodge, N.C., Stall, R.E., Differentiation of three species of *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas maltophilia* using cellular fatty acid analyses, *European Journal of Plant Pathology*, 103, 687–693, **1997**.
- [19] Chase, A. R., Stall, R. E., Hodge, N. C., Jones, J. B., *Characterization of Xanthomonas campestris Strains from Aroids Using Physiological, Pathological, and Fatty Acid Analyses*. *Phytopathology*, 82, 754-759, **1999**.
- [20] Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K., Gillis, M., Mew, T. W., Schroth, M.N., Palleroni, N.J., Hildebrand, D.C., Stead, D.E., Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 312-316, **1990**.
- [21] Yakoubou, S., Cote, J.C., Assessment of a short phylogenetic marker based on comparisons of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences on the genus *Xanthomonas*, *Natural Science*, 12, 1369-1374, **2010**.
- [22] Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417, 459-463, **2002**.
- [23] Simpson, R.B., Johnson, L.J., *Arabidopsis thaliana* as a Host for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3, 233-237, **1990**.
- [24] Ayub, M., Hill, J.P. 1997 Use of Cellular Fatty Acids in the Characterization and Differentiation of Bacterial Leaf Streak Pathogens on Millet, *Pakistan Journal Botanic*, 29, **1997**.

- [25] Rodriguez, L., Grajales, A., Ortiz, M., Genome Based Phylogeny of the Genus *Xanthomonas*, *Biomedical Central Microbiology*, 12, 43, **2012**.
- [26] Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W., Reclassification of the *Xanthomonads* Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. *Systematic Applied Microbiology*, 27, 755-762, **2004**.
- [27] Jones, J.B., Bouzar, H., Stall, R.E., Almira, E.C., Systematic Analysis of Xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) Associated with Pepper and Tomato Lesions, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1211-1219, **2000**.
- [28] Stall, R.E., Beaulieu, C., Egel, D.S., Hodge, N.C., Leite, R.P., Minsavage, G.V., Two Genetically Diverse Groups of Strains are Included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *International Journal Systematic Bacteriology*, 44, 47-53, **1994**.
- [29] Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Hodge, N.C., Minsavage, G.V., Physiological, Chemical, Serological, and Pathogenic Analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology* 84, 663-671, **1994**.
- [30] Bouzar, H., Jones, J.B., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Scott, J.W., Proteins Unique to Phenotypically Distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Revealed by Silver Staining, *Phytopathology*, 84, 39-44, **1994**.
- [31] Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Louws, F., Schneider, F.J., Multiphasic Analysis of Xanthomonads Causing Bacterial Spot Disease on Tomato and Pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries, *Phytopathology* 89, 328-335, **1999**.
- [32] Jones, J.B., Stall, R.E., Bouzar, H., Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review Phytopathology*, 36, 41-58, **1998**.
- [33] Hildebrand, D.C., Palleroni, N.J., Schroth, M.N., Deoxyribonucleic acid Relatedness of 24 xanthomonad strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*, *Journal Applied Bacteriology*, 68, 263-269, **1990**.
- [34] Palleroni, N.J., Hildebrand, D.C., Schroth, M.N., Hendson, M., Deoxyribonucleic acid relatedness of 21 strains of *Xanthomonas* species and pathovars, *Journal Applied Bacteriology*, 75, 441-446, **1993**.
- [35] Bashandy, S.R., Abdalla, M., Bacterial wilt and spot of tomato caused by *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum* in Egypt, *World Journal Microbial Biotechnol*, 24, 291-292, **2008**.

- [36] Gitaitis, R.D., Sasser, M.J., Beaver, R.W., McInnes, T.B., Pectolytic xanthomonads in mixed infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper transplants, *Phytopathology*, 77, 611-615, **1987**.
- [37] Poplawsky, A.R., Urban, S.C., Chun, W., Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5123–5127, **2000**.
- [38] Poplawsky, A.R., Kawalek, M.D., Schaad, N.W., A Xanthomonadin-Encoding Gene Cluster for the Identification of Pathovars of *Xanthomonas campestris*, 6, 545-552, **1993**.
- [39] Poplawsky, A.R., Chun, W., Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with atypical pigmentation isolated from commercial crucifer seeds, *Plant Pathology Division*, 79, 1021-1024, **1995**.
- [40] Jenkins, C.L., Starr, M.P., Formation of halogenated aryl-polyene (Xanthomonadin) pigments by the type and other yellow-pigmented strains of *Xanthomonas maltophilia*, *Annual Pasteur Microbiology*, 136, 257–264, **2006**.
- [41] Mirik, M., Demirici A.S., Gumus, T., Xanthan gum production under different operational conditions by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* isolated from pepper plant, *Food Science and Biotechnology*, 20, 1243-1247, **2011**.
- [42] Milosavljevic, V., Resistance of edible tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to the pathogen of *Xanthomonas vesicatoria*, Diploma thesis, Borno Mendel university, Department of Plant Medical, **2012**.
- [43] Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger C., Boch, J., Insights into Genome Plasticity and Pathogenicity of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Revealed by the Complete Genome Sequence, *Journal Of Bacteriology*, 187, 7254–7266, **2005**.
- [44] Lee, B.M., Park, Y.J., Kang, H.W., Kim, J.G., The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*, 33, 577-586. **2005**.
- [45] Cascales, E., Christie, P.J., The versatile bacterial type IV secretion systems, *Nature Review Microbiology*, 1, 137–149, **2003**.
- [46] Zamboni, D.S., McGrath, S., Rabinovitch, M., Roy, C.R., *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system, *Molecular Microbiology*, 49, 965–976, **2003**.

- [47] Tampakaki, A.P., Fadouloglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J., Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiology*, 6, 805–816, **2004**.
- [48] Cornelis, G.R., Gijsegem, F.V., Assembly and function of type III secretory systems, *Annual Review Microbiology*, 54, 735–774, **2000**.
- [49] Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G.V., Staskawicz, B.J., Stall, R.E., Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato, *Molecular Plant Microbe Interactation*, 4, 81–88, **1991**.
- [50] Szurek, B., Rossier, O., Hause G., Bonas, U., Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell *Molecular Microbiology*, 46, 13–23, **2002**.
- [51] Büttner, D., Yang, S.H., Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria, *Plant Physiology*, 150, 1656-1664, **2009**.
- [52] Büttner, D., Bonas, U., Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion, *Current Opinion Microbiology*, 9, 193-200, **2006**.
- [53] Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*, *New Phytologist*, 187, 983-1002, **2010**.
- [54] Ghosh, P., Process of protein transport by the type III secretion system, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 771–795, **2004**.
- [55] Gurlebeck, D., Thieme, F., Bonas, U., Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology*, 163, 233–255, **2006**.
- [56] Zhou, J.M., Chai, J., Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses, *Current Opinion in Microbiology*, 11, 179–185, **2008**.
- [57] Mudgett, M.B., New Insights to the Function of Phytopathogenic Bacterial Type III Effectors in Plants, *Annual Review Plant Biology*, 56, 509-531, **2005**.
- [58] Büttner, D., Lorenz, C., Weber, E., Bonas, U., Targeting of two effector protein classes to the type III secretion system by a HpaC- and HpaB dependent protein complex from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology*, 59, 513–527, **2006**.

- [59] Nennstiel, D., Klüsener, B., Bonas, U., Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Journal of Bacteriology*, 184, 2389–2398, **2002**.
- [60] Büttner, D., Noel, L., Stuttmann, J., Bonas, U., Characterization of the non-conserved hpaB-hrpF region in the hrp pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 20,1063–1074, **2007**.
- [61] Aksoy, H.M., Kara, C., Secretion Systems in Plant Pathogenic Bacteria, *Anadolu Journal Agricalature scientic*, 27, 48-54, **2012**.
- [62] Sonnewald, S., Priller, J.P.R., Schuster, J., Glickmann, E., Hajirezaei, M.R., Siebig, S., Mudgett, M.B., Regulation of Cell Wall-Bound Invertase in Pepper Leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Type Three Effectors. *PLoS ONE* **7(12)**, **2012**.
- [63] Lin, R.H., Peng, C.W., Lin, Y.C., The XopE2 Effector Protein of *Xanthomonas capmestris* pv. *vesicatoria* Is Involved in Virulence and in the Suppression of the Hypersensitive Response, *Botanical Studies*, 52, 55-72, **2011**.
- [64] Kay, S., Bonas, U., How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant, *Current Opinion in Microbiology*, 12, 1–7, **2009**.
- [65] Jones, J.B., Zitter, T.A., Momol, T.A., Compendium of Tomato Diseases and Pests, 2.Baskı, *The American Phytopathological Society*, USA, **2014**.
- [66] Tai, H.T., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato, 96, 14153–14158, **1999**.
- [67] Karaca, İ., Saygılı, H., Batı Anadolu'nun bazı illerinde domates ve biberlerde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri, belirtileri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar. III. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildiri Özeti*, Adana, 182-192, **1992**.
- [68] Aysan, Y., Çınar, Ö., Çukurova Bölgesinde biberlerde bakteriyel leke hastalığının (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) çıkışı ve kontrolü üzerine araştırmalar, *Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi*, Tekirdağ, 549-554, **2001**.
- [69] Jones, J.B., Pohronzny, K.L., Stall, R.E., Jones, J.P., Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathology* 76, 430-434, **1986**.
- [70] Bashan, Y., Diab, S., Okan, Y., Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil, *Plant and Soil*, 68:161-170, **1982**.

- [71] Volcani, Z., The Effect of Mode of irrigation and wind direction on disease severity caused by *Xanthomonas vesicatoria* on tomato in Israel. *Plant Disease Reporter*, 53, 459-461, **1969**.
- [72] Pohronezny, K., Hewitt, M., Infante, J., Datnoff, L., Wind and wind-generated sand injury as factors in infection of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 76, 1036-1039, **1992**.
- [73] Bonas, U., Ackerveken, G., Büttner, D., How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host, *Molecular Plant Pathology*, 1, 73–76. **2000**.
- [74] Ritchie, D.F., Bacterial spot of pepper and tomato. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094, **2000**.
- [75] Pohronezny, K., Volin, R.B., The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes, *HortScience*, 18, 69–70, **1983**.
- [76] Shenge, K.C., Mabagala, R., Mortensen, C., Evaluation of Locally Available Tomato Varieties and Introductions for Resistance to Bacterial Speck and Bacterial Spot Diseases in Tanzania, *Journal of Plant Protection Research*, 47, **2007**.
- [77] Saleh, M., Pathogenic variability among five bacterial isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causing spot disease on tomato and their response to salicylic acid, *Journal of the Saudi Society of Agricultural*, 10, 47-51, **2011**.
- [78] James, B., Ahowe, C., Godonou, I., Baimey, H., Goergen, H., Sikirou, R., Toko, M. Integrated pest management in vegetable production: a guide for extension workers in West Africa, ISBN 978-131-344-7, s 73, **2010**.
- [79] Peshin, R., Dhawan, A., Integrated Pest Management, *Springer*, DOI 10.1007/978-1-4020-8992-3, s 382, **2009**.
- [80] Swings, J., Civeta, L., *Xanthomonas*, *Chapman ve hall* Basımevi, s256, **1993**.
- [81] Ariel, T.D., Navon, N., Burdman, S., Identification of Genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Induced during Its Interaction with Tomato, *Journal Bacteriology*, 189, 6359-6371, **2007**.
- [82] Lamichhane, J.R. G.M. Balestra L. Varvaro, First report of bacterial spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race 2 on tomato in Nepal, *New Disease Reports*, [<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.025>], **2010**.

- [83] Fuzai, S., Zhiqiang, D., Zhiliang, J., Tingchang, Z., Pathogen and race identification of bacterial spot of pepper and tomato. *Review of Plant Pathology*, 79(2), **2000**.
- [84] Myung, I.S., Moon, S.Y., Jeong, I., Lee, Y.K., Bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans*, a new disease in Korea. *Plant Disease* 93, **2009**.
- [85] Lue, Y.S., Deng, W.L., Wulle, Y.F., Cheng, A.S., Characterization of *Xanthomonas* Associated with Bacterial Spot of Tomato and Pepper in Taiwan, *Plant Pathology*, 19, 181-190, **2010**.
- [86] Hartman, G.L., Yang, C.H., Occurrence of three races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper and tomato in Taiwan. *Plant Disorders*, 74, 253, **1990**.
- [87] Leite, R.P., Jones J.B., Somodi G.C., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Associated with pepper and tomato seed by DNA Amplification, *Plant Disorders*, 79, 917-922, **1995**.
- [88] Hamza, A., Soustrade, I., Jouen, E., Pruvost, O., Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region, *Plant Disease*, 94, 993-999, **2010**.
- [89] Sabin, F., Bajwa, R., Anjum, T., Saleem, Z., Assessment of Genetic Diversity among Different Indigenous *Xanthomonas* Isolates via Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), *African Journal of Microbiology*, 6, 1947-1957, **2012**.
- [90] Şahin, F., Kotan, R., Gergon, E., Miller, S.A., First observation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Race T2P7 isolated pepper in the Philippines, *Plant Disease*, 83, **1999**.
- [91] Tsuchiya, K., Ussel, C., Horita, M., Nozu, Y., Relation of Japanese *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with worldwide strains revealed with three specific monoclonal antibodies, *Journal of General Plant Pathology*, 69, 310-315, **2003**.
- [92] First Report of Bacterial Spot Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on sweet pepper (*capsicum annum* L.) in Saudi Arabia, *The American Phytopathological Society* 96, 11, **2012**.
- [93] Buonauro, R., Stravato, V.M., Scortichini, M., Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annum* L. in Italy, *Plant Disease*, 78, 296–299, **1994**.

- [94] Aiello, D., Scuderi, G., Vitale, A., Firrao, G., Polizzi, G., A pith necrosis caused by *Xanthomonas perforans* on tomato plants, *Euro Journal Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10658-013-0214-7, **2013**.
- [95] Kizheva, Y., Vancheva, P., Hristova, M., Stoyanova, T., Identification of *Xanthomonas* strains from tomato and pepper and their sensitivity to antibiotics and copper, *Journal Agriculture Scientist*, 19, 80–82, **2013**.
- [96] Kizheva, Y., Vancheva, T., Hristova, P., Stoyanova, M., Bogatzevska, N., Diversity of *Xanthomonas* spp. Causal agents of bacterial spot on pepper and tomato plants in Bulgaria. *Medical Biotechnology*, 25, 1–7, **2011**.
- [97] Mirik, M., Aysan, Y., Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in naturally infected pepper seeds in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 91, 433-436, **2009**.
- [98] Mitrev, S., Pejcinovski, F., Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, in Macedonia causal agent of bacterial spot of pepper, *Yearbook for Plant Protection*, 151–163, **1999**.
- [99] Ignjatov, M., Gasic, K., Ivanovic, M., Sevic, M., Obradovic, A., Characterisation of *Xanthomonas euvesicatoria* strains pathogens of pepper in Serbia, *Pesticidi i Fitomedicina*, 25, 139–149, **2010**.
- [100] Gasic, K., Ivanovic, M.M., Ignjatov, M., Calic, A., Obradovic, A., Isolation and characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*, 93, 415–423, **2011**.
- [101] Kornev, K.P., Matveeva E.V., Pekhtereva, E.S., Polytko, V.A., *Xanthomonas* species causing bacterial spot of tomato in the Russian Federation. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 808, 243–246, **2009**.
- [102] Ignatov, A.N., Kornev K.P., Matveeva, E.V., Pekhtereva, E.S., Polytko, V.A., Occurrence of bacterial spot and bacterial canker in the Russian Federation. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 808, 247–249, **2009**.
- [103] Obradovic, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Bacterial spot of capsicum and tomato in Yugoslavia. *Review of plant pathology*, 80, 6419, **2001**.
- [104] European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on the pest categorisation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) *EFSA Journal*, www.efsa.europa.eu/efsajournal, Italy, 12, 3720, **2014**.
- [105] Moretti, C., Amatulli, M.T., Buonauro, R., PCR based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot, *Applied Microbiology*, 49, 466–471, **2009**.

- [106] Bouzar, H., Jones, J.B., Somodi G.C., Stall, R.E., Daouzli, N., Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper fields of Mexico. *Canadian Journal Plant Pathology*, 18, 75-77, **1996**.
- [107] Quezado-Duval A.M., Lopes, C.A., Leite, R.P., Lima, M.F., Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil, *Proceedings of the 1st International Symposium on Tomato Diseases*, Orlando, Florida, 101–108, **2005**.
- [108] Kim, S.H., Olson, T.N., Peffer, N.D., Nikolaeva, E.V., Park, S., First report of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas gardneri* in Pennsylvania. *Plant Disease Journal*, 94, s638, **2010**.
- [109] Ma, X., Lewis Ivey, M.L., Miller, S.A., 2011. First report of *Xanthomonas* causing bacterial spot of tomato in Ohio and Michigan, *Plant Disease Journal*, 95, 1584-1586, **2011**.
- [110] Ward, H.P., OGarro, L.W., Bacterial spot of pepper and tomato in Barbados. *Plant Disease Journal*, 76, 1046–1048, **1992**.
- [111] Gore, J.P., Garro, L.W., *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Bell Pepper and Tomato in Barbados Undergoes Changes in Race Structure, Virulence and Sensitivity to Chemical Control Agents, *Journal of Phytopathology*, 147, 397-342, **1999**.
- [112] Okey, E.N., Garro, L.W., Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and PCR analysis of hot pepper *Capsicum chinense* varieties, *Phytopathology* 89, s57, **1999**.
- [113] Black, R., Seal, S., Abubakar, Z., Womdin, R.N., Bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) of tomato and sweet pepper in Tanzania, *Plant Pathology*, 50, s810, **2001**.
- [114] Mbega E.R., Mabagala, R.B., Lund, O.S., Wulff, E.G., Mortensen, C.N., Five species of *Xanthomonads* associated with bacterial leaf spot symptoms in tomato from Tanzania, *Plant Disease*, 96, 760–761, **2012**.
- [115] Uys, M.D.R., Thompson, A.H., Holz, G., Diseases associated with tomato in the main tomato growing of South Africa. *Journal Scientific African Society Hort*, 6, 78–81, **1996**.
- [116] Bouzar, H., Ahmed, N.E., Somodi, G.C., Jones, J.B., Stall, R. E., Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains from tomato and pepper grown in Sudan, *Plant Disease*, 78:1219, **1994**.
- [117] Noha, M.S., Osman, M.E., Hendawy, H., Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*, *Microbiological Research*, 160, 343-352, **2005**.

- [118] Şahin, F., Pepper races 7,8 and 10 of *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* isolated From Diseased Pepper Plants in Turkey. *Plant Pathology*,50, 809, **2001**.
- [119] Şahin, F., Dursun, A., Aysan, Y., Mirik, M., Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* strains isolated from pepper during 1998-2002 in Turkey. *Plant Protection Towards the 21st Century Proceedings of the 15th International Plant Protection Congress*. Pekin, Çin, s530, **2004**.
- [120] A.M., Lazarev, M.I., Saulich, European and Mediterranean Plant Protection Organization(EPPO), Diseases, Area of distribution and severity of *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* (Doide) Dye, **2007**.
- [121] Janse, J.D., *Phytobacteriology Principles and Practice*, CABi, ebook, s267, **2006**.
- [122] Bashan, Y., Okan, Y., Heins, Y., Long-term survival of *Pseudomonas tomato* ve *Xanthomonas vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology*, 72, 1143-1144, **1982**.
- [123] Al-Dahmani, J.H., Abbasi, P.A., Miller, S.A., Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under green house conditions, *Plant Disease*, 87, 913-919, **2003**.
- [124] Ariel, D.T., Navon, N., Burdman, S., Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Genes Induced in its Interaction with Tomato, *Journal Bacteriology*, doi:10.1128/JB.00320-07, **2007**.
- [125] Bondarczuk, K., Seget, Z.P., Molecular basis of active copper resistance mechanisms in gram-negative bacteria, *Cell Biology Toxicolgy*, 29, 397-405, **2013**.
- [126] Doorn, J.V., Hollinger, T.C., Oudega, B., Analysis of the Type IV Fimbrial-Subunit Gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: Application in PCR-Mediated Detection of Yellow Disease in Hyacinths, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 67, 598–607, **2001**.
- [127] Alvarez, A.M., Benedict, A.A., Mizumoto, C.Y., Pollard, L., Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 81, 857–865, **1991**.
- [128] Lee, Y.A., Sung, A.N., Liu, T.F., Lee, Y.S. Combination of chromogenic differential medium and estA-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp, *Applied Environmental Microbiology*, 75, **2009**.

- [129] Ravikumar, M.R., Khan, A.N., Detection of *Xanthomonas vesicatoria* in tomato seeds by enzyme linked immuno sorbent assay, *Indian Journal Agricultural Research*, 36, **2002**.
- [130] Beran, P. , Mraz, I., Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*, *Crop Protection*, 43, 213-215, **2012**.
- [131] Park, D., Hyun, J.W., Park, Y.C., Kim, J.C., Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on hrpW gene sequences, *Microbiological Research*, 161, 145-149, **2006**.
- [132] Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., Specific Genomic Fingerprints of Phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and Strains Generated with Repetitive Sequences and PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295, **1994**.
- [133] Park, D., Shim, J.K., Kim, J.S., Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on rhs family gene sequences, *Microbiological Research*, 164, 36-42, **2009**.
- [134] Kung, V.L., Khare, S., Stehlik, C., Bacon, E.M., An *rhs* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome, *PNAS*, 109, 1275-1280, **2012**.
- [135] Caliskan, M., Genetic Diversity in Microorganisms, ISBN 978-953-51-0064-5, DOI: 10.5772/2641, 95-109, **2012**.
- [136] Kiran, F., Osmanoğlu, Ö., Molecular methods used for identification of lactic acid bacteria, *Erciyes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27, 62-74, **2011**.
- [137] Guo, H.B., Huang, K.Y., Zhou, T.S., Wu, Q.H., DNA isolation, optimization of ISSR-PCR system and primers screening of *Scutellaria baicalensis*, *Journal of Medical Plants Research*, 3, 898-901, **2009**.
- [138] Liu, K., Knabel, S.J., Dudley, E.G., *rhs* Genes Are Potential Markers for Multilocus Sequence Typing of *Escherichia coli* O157:H7 Strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5853-5862, **2009**.
- [139] Mondal, K., Mani, K., ERIC-PCR generated genomic fingerprints and their relationship with pathogenic variability of *Xanthomonas campestris* pv. *punicae*, the incitant of bacterial blight of pomegranate, *Current Microbiology*, 59, 616-620, **2009**.
- [140] Giri, M.S., Prasanthi, S., Kulkarni, S., Benagi, V., Biochemical and molecular variability among *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* strains, the pathogen of pomegranate bacterial blight, *Indian Phytopathology*, 64, 1-4, **2011**.

[141] Raghuwanshi, K.S., Hujare, B.A., Chimote, V.P., Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* isolates from western Maharashtra and their sensitivity to chemical treatments, *The Bioscan*, 8, 845-850, **2013**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: NAZİLA FARHANGZAD

Doğum Yeri: ZANJAN (İRAN)

Medeni Hali: BEKAR

E-posta: nfarhangzad@yahoo.com

Adresi: Çukurambar, 1489.Cd, Öncü Sitesi, C Blok, 42/NO, Çankaya/ANKARA

Eğitim

Lise: Özel Roshd Lisesi

Lisans: ZANJAN AZAD Üniversitesi Fen Fakültesi

Microbiyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- Advanced (ileri)

İş Deneyimi İRANA Tıbbi Labratuarı, Punak, Tehran.

Deneyim Alanları

Moleküler genetik, Mikrobiyoloji

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi (-)

Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar (-)