



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**CEVİZ BAKTERİYEL YANIKLIĞI VE UÇ
NEKROZU (BAN) ETMENLERİNİN TANISI VE
KARAKTERİZASYONU ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

Doktora Tezi

Damla ERTİMURTAŞ

Bitki Koruma Anabilim Dalı

**İzmir
2023**

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**CEVİZ BAKTERİYEL YANIKLIĞI VE UÇ
NEKROZU (BAN) ETMENLERİNİN TANISI VE
KARAKTERİZASYONU ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Damla ERTİMURTAŞ

Danışman: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Fitopatoloji Doktora Programı

İzmir

2023

Damla ERTİMURTAŞ tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Ceviz Bakteriyel Yanıklığı ve Uç Nekrozu (BAN) Etmenlerinin Tanısı ve Karakterizasyonu Üzerine Araştırmalar**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 23/06/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ	
Üye	: Prof. Dr. Fatih ŞEN	
Üye	: Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ	
Üye	: Doç. Dr. Didem CANİK OREL	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum **“Ceviz Bakteriyel Yanıklığı ve Uç Nekrozu (BAN) Etmenlerinin Tanısı ve Karakterizasyonu Üzerine Çalışmalar”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

23/06/2023

İmzası

Damla ERTİMURTAŞ

ÖNSÖZ

Ceviz (*Juglans regia* L.), kültür tarihinin eskiliği, adaptasyon kabiliyetinin yüksek oluşu, insan sağlığı açısından önemli besin kaynağı olması, ilaç ve sanayide çeşitli kullanım alanlarının olması nedeni ile önemli kültür bitkilerindendir. Ülkemizin de hem çok eski ve köklü meyvecilik tarihine sahip olması hem de coğrafi konumundan dolayı birçok meyve türünün olduğu gibi cevizin de anavatanı olarak bilinmektedir. Ülkemizde ceviz yetiştiriciliğinin yapıldığı illerin başında gelen Balıkesir, Çanakkale ve Manisa illerinde cevizin ihracat ve ithalat değerinin yüksek olması sebebi ile her geçen gün kapama ceviz bahçelerinde artış gözlenmektedir.

Bakteriyel ve fungal etmenlerin neden olduğu hastalıklar ceviz üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. Cevizde görülen en önemli bakteriyel hastalıklar ceviz bakteriyel yanıklığı ve son yıllarda yaygınlaşan uç nekrozu (BAN)'dır. Söz konusu hastalıklar ceviz üretiminde %70'e varan verim kayıplarına neden olmaktadır. Ceviz yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok ülkede de bu hastalıkların yaygın olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, Balıkesir, Çanakkale ve Manisa illerinde ceviz plantasyonlarında ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN'da esas sorumlu *Xaj*'nin ve sekonder etkili fungal etmenlerin klasik ve moleküler yöntemlerle tanılanması, her iki hastalığın yaygınlık oranlarının belirlenmesi, *rep*-PCR ve MLSA gibi moleküler karakterizasyon çalışmaları ile *Xaj*'nin genetik çeşitliliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışması, Türkiye'de ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalıkları ile ilgili detaylı verilerin elde edildiği ilk çalışma niteliğindedir. Yürütülen bu çalışmada elde edilen veriler, söz konusu hastalıkların neden olduğu verim kayıplarını en aza indirilmesini ve sağlıklı ürünlerin elde edilmesine katkıda bulunacaktır. Bu çalışma, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı TAGEM tarafından TAGEM/BSAD/E/19/A2/P1/1343 no'lu proje olarak desteklenmiş ve Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde yürütülmüştür.

İZMİR

Damla ERTİMURTAŞ

23/06/2023



ÖZET**CEVİZ BAKTERİYEL YANIKLIĞI VE UÇ NEKROZU (BAN)
ETMENLERİNİN TANISI VE KARAKTERİZASYONU ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

ERTİMURTAŞ, Damla

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

23.06.2023, 129 Sayfa

Ceviz (*Juglans regia*), dünyada en çok yetiştiriciliği yapılan sert kabuklu meyveler arasında yer almaktadır. Türkiye’de de ceviz üretimi artarak devam etmektedir. Ceviz plantasyonlarında önemli bakteriyel hastalıklardan biri *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, (*Xaj*)’in neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklığıdır. Son yıllarda uç nekrozu (Brown Apical Necrosis, BAN)’da ülkemizde ceviz üretimini tehdit etmektedir. Ceviz bakteriyel yanıklığı etmeni (*Xaj*) BAN’ dan esas sorumlu etmen olup fungal etmenler (*Fusarium* spp. ve *Alternaria* spp vd.) de belirti tablosuna eşlik etmektedir. Bu çalışmada, 2018-2019 yıllarında Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde ceviz plantasyonlarında survey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ceviz bakteriyel yanıklığı için en yüksek yaygınlık oranı Balıkesir ili Sındırgı ilçesinde, BAN için en yüksek yaygınlık oranı ise Manisa ili Akhisar ilçesinde bulunmuştur. Patojenisite çalışmaları sonucunda 31 *Xaj* izolatının 20’si, 8 *Alternaria* spp. izolatının hepsi patojen olarak belirlenmiştir. Bakteriyel ve fungal izolatlar hem klasik hem moleküler yöntemlerle tanılanmıştır. PCR ürünlerinin sekans sonuçları NCBI veri tabanında kayıtlı türler ile karşılaştırılmış ve *Xaj* için %99,83-100, *Alternaria* spp. için %100 benzer bulunmuştur. Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen 31 adet *Xaj* straininin moleküler karakterizasyonu, ilk olarak DNA parmak izi profillemeye yöntemi olan *rep*-PCR (BOX, ERIC, REP) ile yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre farklı lokasyonlardaki *Xaj* strainleri arasında genetik farklılığın olduğu ve bu nedenle farklı gruplarda yer aldıkları görülmüştür. Her il ve ilçeden, virülensliği yüksek ve *rep*-PCR’daki grupları da

temsil edecek şekilde 8 *Xaj* straini seçilmiştir. Bu strainlerin moleküler karakterizasyon çalışmasına 7 housekeeping geni kullanılarak MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) ile devam edilmiştir MLSA’da birleştirilmiş gen sekansları ile oluşturulan dendrogram sonucunda 8 *Xaj* straini 3 farklı gruba ayrılmıştır. Balıkesir ilinde ceviz bakteriyel yanıklığından elde edilen *Xaj* strainleri aynı grupta yer alırken Manisa ve Çanakkale’de BAN’dan elde edilen *Xaj* strainleri ise kendi içlerinde bir grup oluşturmuştur. *rep*-PCR ve MLSA ile yapılan moleküler karakterizasyon sonucunda farklı lokasyonlardan ve farklı hastalıklardan elde edilen *Xaj* strainleri arasında genetik çeşitliliğin olduğu saptanmıştır. Bu tez çalışması, Türkiye’de ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN’dan elde edilen *Xaj* strainlerinin hem moleküler tanısının hem de *rep*-PCR ve MLSA yöntemleri ile moleküler karakterizasyonunun yapıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, ceviz bakteriyel yanıklığı, BAN, *rep*-PCR, MLSA.

ABSTRACT**INVESTIGATIONS ON IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION
OF THE CAUSAL AGENTS OF WALNUT BLIGHT AND BROWN
APICAL NECROSIS (BAN)**

ERTİMURTAŞ, Damla

Ph.D thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

23.06.2023, 129 pages

Walnut (*Juglans regia*) is one of the most cultivated nut fruits in the world. Walnut production is continue to increase in Türkiye. Walnut production continues to increase in Türkiye. One of the most important bacterial diseases in walnut plantation is Walnut Bacterial Blight (WBB). In recent years, Brown Apical Necrosis (BAN) has also threatened walnut production in the Mediterranean region. *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*) is the causal agent of WB, primary responsible pathogen of BAN and secondary pathogens are *Fusarium* and *Alternaria*. In this study, survey studies were conducted in walnut plantations in Manisa, Balıkesir and Çanakkale provinces in 2018-2019. The highest prevalence rate of WBB was found in Balıkesir province Sındırgı district, and the highest prevalence rate for BAN was found in Akhisar district of Manisa province. As a result of pathogenicity test, 20 of 31 *Xaj* isolates and all 8 *Alternaria* spp. isolates were determined as pathogen. Bacterial and fungal isolates were identified by classical and molecular methods. All isolates showed the highest homology to *Xaj* (99.83-100%) and *Alternaria* (100%). Molecular characterization of 31 *Xaj* strains obtained from different geographical regions was performed with *rep*-PCR (BOX, ERIC, REP) which is the DNA fingerprint profile method and as a result there was a genetic diversity between *Xaj* strains in different locations and therefore they were divided into different groups. 8 of *Xaj* strains were selected from each province and district to represent the groups with high virulence and in the *rep*-PCR groups. The molecular characterization of these strains was continued with MLSA (Multi Locus Sequence Analysis). As a result of the dendrogram with the concatenated sequences in MLSA, 8 *Xaj* strains were clustered in 3 different groups. While the *Xaj* strains obtained from WBB in Balıkesir province were in the same group, the *Xaj* strains

obtained from BAN in Manisa and Çanakkale were clustered in a different group from WBB. As a result of molecular characterization studies with *rep*-PCR and MLSA, it was determined that there is genetic diversity among *Xaj* strains obtained from different locations and diseases. This thesis is the first study of molecular diagnosis and molecular characterization of *Xaj* strains obtained from WBB and BAN were performed by *rep*-PCR and MLSA.

Key Words: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, walnut bacterial blight, BAN, *rep*-PCR, MLSA.



İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	i
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖNSÖZ.....	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Konusunda Yapılan Çalışmalar	6
2.1.1. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının belirtileri ve yaygınlığı	6
2.1.2. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalık etmeninin tanısı konusunda yapılan çalışmalar	7
2.1.3. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalık etmeninin mücadelesi konusunda yapılan çalışmalar	8

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2. Uç Nekrozu (BAN) Hastalığı Konusunda Yapılan Çalışmalar	13
2.2.1. Uç nekrozu hastalığının (BAN) belirtileri ve yaygınlığı	13
2.2.2. Uç nekrozu (BAN) hastalık etmeninin tanısı konusunda yapılan çalışmalar	16
2.2.3. Uç nekrozu (BAN) hastalık etmeninin mücadelesi konusunda yapılan çalışmalar	21
2.3. Ceviz Bakteriyel Yanıklığı ve Uç Nekrozu (BAN) Etmenlerinin Karakterizasyonu Konusunda Yapılan Çalışmalar	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	33
3.1. Gereç	33
3.1.1. Bakteriyel ve fungal materyal	33
3.1.2. Bitki materyali.....	33
3.1.3. Çalışmada kullanılan besi yerleri	33
3.1.4. Moleküler çalışmalarda kullanılan materyaller	34
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Survey çalışmaları	34
3.2.2. Bakteriyel etmenlerin izolasyon çalışmaları	36
3.2.3. Fungal etmenlerin izolasyon çalışmaları	37
3.2.4. Bakteriyel etmenlerin klasik tanı çalışmaları	38
3.2.5. Fungal etmenlerin klasik tanı çalışmaları	43

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.6. Patojenisite testi	43
3.2.7. Bakteriyel etmenlerin moleküler tanı çalışmaları	46
3.2.8. Fungal etmenlerin moleküler tanı çalışmaları	48
3.2.9. Bakteriyel etmenlerin <i>rep</i> -PCR ile moleküler karakterizasyon çalışmaları... ..	49
3.2.10. Bakteriyel etmenlerin Multi Locus Sequence Analyse (MLSA) ile moleküler karakterizasyon çalışmaları	51
4. BULGULAR	54
4.1. Survey Çalışmaları Sonuçları	54
4.2. Bakteriyel Etmenlerin İzolasyon Çalışmaları Sonuçları.....	56
4.3. Fungal Etmenlerin İzolasyon Çalışmaları Sonuçları	57
4.4. Bakteriel Etmenlerin Klasik Tanı Çalışmaları Sonuçları	61
4.5. Fungal Etmenlerin Klasik Tanı Çalışmaları Sonuçları.....	70
4.6. Patojenisite Testi Sonuçları	71
4.6.1. Bakteriyel etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları	71
4.6.2. Fungal etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları	73
4.6.3. Bakteriyel x fungal etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları.....	75

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.7. Moleküler Tanı ve Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları	76
4.7.1. Bakteriyel etmenlerin moleküler tanı çalışmaları sonuçları	76
4.7.2. Fungal etmenlerin moleküler tanı çalışmaları sonuçları	80
4.7.3. Bakteriyel etmenlerin <i>rep</i> -PCR ile moleküler karakterizasyon çalışmaları sonuçları	81
4.7.4. Bakteriyel etmenlerin Multi Locus Sequence Analyse (MLSA) ile moleküler karakterizasyon çalışmaları sonuçları	90
5. TARTIŞMA	101
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	117
KAYNAKLAR DİZİNİ	119
TEŞEKKÜR	128
ÖZGEÇMİŞ	129

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 2021 yılı verilerine göre dünya genelinde önemli ceviz üreticisi ülkelerin toplam üretimdeki payı.....	2
2.1 Ceviz bakteriyel yanıklığının yaprak ve meyvede oluşturduğu belirtiler.....	7
2.2 Ceviz meyvelerinin BAN' dan sorumlu etmenler tarafından enfeksiyonu	14
2.3 Survey çalışmalarında rastlanan erken meyve dökümleri	14
3.1 Bakteriyel ve fungal etmenlerin izolasyon çalışmaları.....	38
3.2 Bakteriyel etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi uygulaması	44
3.3 Fungal etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite test uygulaması.....	45
3.4 <i>Xaj</i> izolatlarına uygulanan <i>rep</i> -PCR işlemi	49
4.1 2018-2019 yılında gerçekleştirilen survey çalışmaları	54
4.2 Ceviz meyvelerinden bakteriyel etmen izolasyonu.	56
4.3 YDC besi yerinde sarı-mukoid koloni gelişimi ve TMM besi yerinde presipitasyon zon oluşumu	56
4.4 İklim odasında domates fidelerinde aşırı duyarlılık test çalışmaları	57
4.5 BAN belirtili ceviz meyvelerden fungal etmenlerin izolasyonu	58
4.6 Balıkesir ili survey çalışmasından ceviz bakteriyel yanıklığı belirtisi görülen ceviz meyvelerinden <i>Xaj</i> izolasyon çalışmaları	59
4.7 Çanakkale ili survey çalışmasından BAN belirtisi görülen ceviz meyvelerinden <i>Xaj</i> izolasyon çalışmaları	59

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.8 SNA besi yerinde levan oluşumu testi sonucu.....	61
4.9 Oksidaz testi sonucu.....	62
4.10 Patates çürüklük testi sonucu	62
4.11 Arginin dehidrolaz testi sonucu	63
4.12 Domates fidelerinde aşırı duyarlılık reaksiyonu testi sonucu	63
4.13 Jelatin hidrolizi test sonucu.....	64
4.14 Aesculin test sonucu.....	64
4.15 Karbon kaynaklarından asit üretimi testi sonucu	67
4.16 Nişasta hidroliz testi sonucu	68
4.17 Anaerobik gelişim testi sonucu	68
4.18 BAN belirtili meyvelerden izole edilen fungal izolatların PDA besi yerindeki koloni ve mikroskoptaki spor görüntüleri.....	70
4.19 <i>Xaj</i> izolatlarının ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları	72
4.20 <i>A. alternata</i> izolatlarının ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları.....	74
4.21 Bakteri x fungus izolatlarının ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları	75
4.22 <i>Xaj</i> izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	77
4.23 <i>Xaj</i> izolatlarının 16S rRNA geni dendrogramı	79

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.24 <i>A. alternata</i> izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	80
4.25 <i>Xaj</i> izolatlarının ERIC-PCR parmakizi profili agaroz jel görüntüsü.....	82
4.26 <i>Xaj</i> izolatlarının ERIC-PCR dendrogramı ve benzerlik tablosu.....	83
4.27 <i>Xaj</i> izolatlarının BOX-PCR parmakizi profili agaroz jel görüntüsü	85
4.28 <i>Xaj</i> izolatlarının BOX-PCR dendrogramı ve benzerlik tablosu.....	86
4.29 <i>Xaj</i> izolatlarının REP-PCR parmakizi profili agaroz jel görüntüsü.....	88
4.30 <i>Xaj</i> izolatlarının REP-PCR dendrogramı ve benzerlik tablosu.....	89
4.31 <i>Xaj</i> izolatlarının MLSA housekeeping genlerinin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	91
4.32 <i>Xaj</i> izolatlarının <i>dnaK</i> geni temelli MLSA dendrogramı	93
4.33 <i>Xaj</i> izolatlarının <i>atpD</i> geni temelli MLSA dendrogramı	94
4.34 <i>Xaj</i> izolatlarının <i>efp</i> geni temelli MLSA dendrogramı	95
4.35 <i>Xaj</i> izolatlarının <i>fyuA</i> geni temelli MLSA dendrogramı.....	96
4.36 <i>Xaj</i> izolatlarının <i>glnA</i> geni temelli MLSA dendrogramı	97
4.37 <i>Xaj</i> izolatlarının <i>gyrB</i> geni temelli MLSA dendrogramı	98
4.38 <i>Xaj</i> izolatlarının <i>rpoD</i> geni temelli MLSA dendrogramı	99
4.39 <i>Xaj</i> izolatlarının MLSA' da 7 housekeeping geni birleştirilmiş dendrogramı	100



TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Önemli ceviz üreten ülkelerin 2018-2021 yılları ceviz üretim miktarları (ton).....	1
1.2 Türkiye’ de en fazla ceviz üretimi yapılan iller ve ceviz üretim miktarı (ton).....	2
3.1 Bakteriyel ve fungal etmenlerin izolasyonunda kullanılan besi yerleri ve içerikleri.....	33
3.2 Balıkesir, Çanakkale ve Manisa illerinde ceviz survey alanlarına ait genel bilgiler	35
3.3 Bahçedeki toplam ağaç sayısına göre incelenen ağaç sayısı	35
3.4 BAN hastalığı patojenisite testi değerlendirme skalası	44
3.5 Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığı patojenisite testi değerlendirme skalası ..	44
3.6 <i>Xaj</i> tanısında kullanılan 16S rRNA geni universal primer bilgileri	47
3.7 16S rRNA geni master mix ve PCR koşulları	47
3.8 Fungal izolatların tanısında kullanılan ITS primer bilgileri	48
3.9 ITS geni master mix ve PCR koşulları	48
3.10 <i>Xaj</i> izolatlarının moleküler karakterizasyonunda kullanılan BOX, ERIC ve REP-PCR primerleri ve baz dizilimleri	50

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.11 <i>Xaj</i> izolatlarının moleküler karakterizasyonunda kullanılan BOX, ERIC ve REP-PCR prokolleri	50
3.12 <i>Xaj</i> izolatlarının MLSA ile moleküler karakterizasyonunda kullanılan housekeeping genlerine spesifik primerleri ve baz dizilimleri	52
3.13 <i>Xaj</i> izolatlarının MLSA ile moleküler karakterizasyonunda kullanılan mastermix ve PCR protokolleri.....	52
4.1 Balıkesir, Çanakkale ve Manisa il ve ilçelerinde ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN yaygınlık oranları (%).....	55
4.2 Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde 2018-2019 yılları ceviz yaprak ve meyvelerinden izolasyonda elde edilen bakteriyel ve fungal etmenler	59
4.3 <i>Xaj</i> izolatlarının LOPAT ve GATTa testleri sonuçları	65
4.4 <i>Xaj</i> izolatlarının biyokimyasal testler ve karbon kaynakları kullanımı test sonuçları	69
4.5 Balıkesir, Çanakkale ve Manisa illeri 2018-2019 yılları surveylerinden elde edilen bakteriyel ve fungal izolat sayıları.....	71
4.6 <i>Xaj</i> izolatlarının patojenisite test sonuçlarına göre ceviz bakteriyel yanıklığı hastalık şiddeti değerleri (%)	72
4.7 <i>A. alternata</i> izolatlarının patojenisite test sonuçlarına göre BAN hastalık şiddeti değerleri (%).....	74

TABLÖLAR DİZİNİ (devam)TabloSayfa

4.8 Bakteri x fungus izolatlarının patojenisite test sonuçlarına göre BAN

hastalık şiddeti değerleri (%) 76

4.9 *Xaj* izolatlarının 16S rRNA geni sekans sonuçları 77

4.10 *A. alternata* izolatlarının ITS geni sekans sonuçları..... 80





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
cm	Santimetre
da	Dekar
dk	Dakika
bp	Baz pair
°C	Santigrad derece
cfu/ml	Mililitredeki bakteri hücresi
g	Gram
L	Ladder
pH	Potansiyel hidrojen
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
V	Volt
rpm	Dakikada devir sayısı
sn	Saniye
%	Yüzde

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BAN	Brown Apical Necrosis
DNA	Deoksiribonükleik asit
Gf	Gemale flowering
HR	Aşırı duyarlılık reaksiyonu
ITS	Internal Transcribed Spacer
MLSA	Multi Locus Sequence Analyse
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	Patates dekstroza agar
RNA	Ribonükleik asit
YDC	Yeast dekstroza agar
TAE	Tris-acetate-EDTA
TMM	Tween modified medium
UV	Ultraviole
<i>Xaj</i>	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>

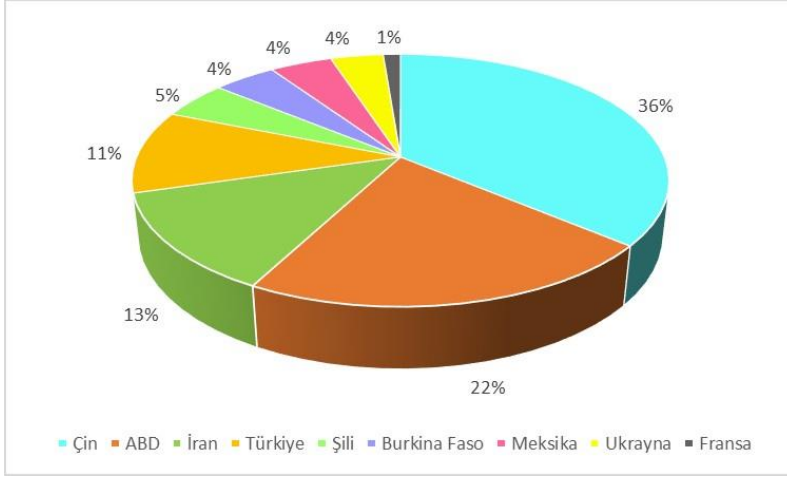
1. GİRİŞ

Ceviz (*Juglans regia*), soğuk ve kurak iklim koşullarına dayanıklı sert kabuklu meyvedir. Bu tür Anadolu veya İran cevizi olarak da bilinmektedir. Ceviz eski çağlardan beri meyvesinden yararlanmak amacı ile yetiştirildiği bilinmektedir. İ.Ö. 750-500 yılları arasında İran'dan Yunanistan'a ve daha sonra da Roma'ya götürülen cevizin Jovis Glans (Jüpiterin meyvesi) olarak isimlendirilmiştir. Günümüzde cevizin bilimsel adı olarak kullanılan *Juglans* da Jovis Glans'dan türetilmiştir (Şen, 2005). Günümüzde Türkiye, İran, Irak, Afganistan, Güney Rusya, Hindistan ve Kore'ye kadar tüm dünyada ceviz yetiştiriciliği yapılmaktadır (Kadakoğlu ve ark., 2022). Cevizin yaprağı, meyve ve kerestesinin sanayide kullanım alanları oldukça geniştir. Yeşil meyveler gıda ve ilaç sanayinde; yaprak, kabuk ve kökleri ise boya sanayinde kullanılmaktadır. Ceviz yağı hem teknolojide hem de resim sanatında önemli kullanım alanına sahiptir (Bayazit ve ark., 2016). Ayrıca dünyada cevizin yetiştiriciliğinin en önemli nedenlerinden bir diğeri ise ceviz meyvesinin K, Fe, Mg, Ca gibi mineraller ve A, B1, B2, B6, C vitaminleri açısından zengin olduğundan insan sağlığında önemli bir besin kaynağı olmasıdır.

Dünyada sert kabuklu meyve üretimi ile ilgili istatistiksel veriler üzerine yapılan değerlendirmelere göre 2021 yılı dünyada sert kabuklu meyve üretimi toplam 3,500,172 tondur (FAO, 2021). 2021 yılı verilerine göre toplam ceviz üretim ele alındığında Çin 1.1000.000 ton ile ilk sırada yer almaktadır. ABD 657,710 ton ile 2. sırada, İran 386,976 ton ile 3. ve Türkiye 325,000 ton üretim ile 4. sırada yer almaktadır (Tablo 1.1). Türkiye' nin Dünya genelinde ceviz üretimindeki payı ise %11'dir (Şekil 1.1).

Tablo 1.1. Önemli ceviz üreten ülkelerin 2018-2021 yılları ceviz üretim miktarları (ton) (FAO, 2021).

Ülkeler	2018	2019	2020	2021
Çin	850.000	1.000.000	1.100.000	1.100.000
ABD	615.980	594.206	716.680	657.710
İran	304.039	321.073	356.953	386.976
Türkiye	215.000	225.000	286.706	325.000
Meksika	159.535	171.367	164.651	135.946
Şili	152.000	125.000	140.400	148.000
Burkina Faso	127.000	128.000	128.000	137.267
Ukrayna	127.190	125.850	113.320	115.420
Fransa	31.860	34.950	35.700	37.740



Şekil 1.1 2021 yılı verilerine göre Dünya genelinde önemli ceviz üreticisi ülkelerin toplam üretimdeki payı (FAO, 2021).

Türkiye, ılıman iklim meyve yetiştiriciliğine uygun bir coğrafi konuma sahiptir. Bu meyveler içerisinde ceviz, fındık, Antep fıstığı, badem, kestane, elma, şeftali kayısı gibi sert çekirdekli ve sert kabuklu ürünler yer almaktadır (Gül ve Akpınar, 2006). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2022 yılı verilerine göre üretim miktarlarına bakıldığında Türkiye’de sert kabuklu meyve üretimi toplam 1,38 milyon ton olup %49,4 üretim payı ile fındık ilk sırada, %23,5 üretim payı ile ceviz 2. sırada yer almaktadır. 3. ve 4. sırada ise sırası ile %12,9 badem ve %8,6 Antep fıstığı takip etmektedir (TÜİK, 2022).

Ülkemizde en fazla ceviz üretimi TÜİK 2022 yılı verilerine göre 19,056 ton ile Kahramanmaraş ilinde gerçekleşmiştir. Bursa ili 16.111 ton üretim ile 2. sırada yer alırken sırası ile 15.245 ton üretim ile Mersin ve 14.910 ton ile Denizli ili takip etmektedir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Türkiye’de en fazla ceviz üretimi yapılan iller ve ceviz üretim miktarı (ton) (TÜİK, 2022).

İl	2019	2020	2021	2022
Kahramanmaraş	11.436	13.036	19.237	19.056
Bursa	10.837	19.319	18.991	16.111
Mersin	10.838	16.495	22.598	15.245
Denizli	8.941	12.054	13.595	14.910
Balıkesir	4.923	5.621	6.537	13.586
Çanakkale	4.606	6.879	10.149	13.584
Antalya	5.825	7.567	10.255	9.905
Manisa	5.394	8.143	8.838	8.691

Ceviz hem ihracat hem de ithalat değeri yüksek olan ürünler arasındadır. Türkiye’de kaliteli ceviz çeşitleri üretimi, pazarlarda uygun fiyat oluşumu ve rekabeti artırmada önemli bir faktördür. Ancak, ülkemizde ceviz yetiştiriciliğine uygun yeterli kapama bahçelerin olmaması, verimin düşük olması ve üreticiye yeterli desteğin sağlanmaması nedeniyle hem üretim hem de pazarlama açısından büyük sorun oluşmaktadır. Ayrıca üreticinin hangi ceviz çeşidinin bölgesine uygun olduğu konusunda yeterli bilgiye sahip olmaması da önemli sorunlar arasındadır.

Ülkemizde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan Şebın, Bilecik ve Yalova çeşitlerinin verimi yüksek değildir. Bu çeşitlerin dışında ABD çeşitlerinden “Payne, Hartley, Chandler, Pedro” ve Fransız çeşitlerinden “Fernor, Fernette, Franquette” üretici tarafından daha çok tercih edilmektedir.

Bakteriyel ve fungal patojelerin neden olduğu hastalıklar ceviz üretiminde ciddi sorunlar meydana getirmektedir. Cevizde görülen en önemli hastalıklar ise Ceviz Bakteriyel Yanıklığı (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*), Uç Nekrozu (Brown Apical Necrosis, BAN), Sert Çekirdeklielerde Meyve Ağaçlarında Bakteriyel Kanseri ve Zamklanma (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*), Kök Uru (*Agrobacterium tumefaciens*), Ceviz Antraknozu (*Gnomonia leptostyla*) ve *Phytophthora* Kök ve Kökboğazı Çürüklüğü (*Phytophthora* spp.)’dür.

Ceviz bakteriyel yanıklığı, Avustralya, Yeni Zelanda, Kuzey ve Güney Amerika, Çin, Rusya, İran, Irak, Güney Afrika, Arjantin (Bradbury, 1986) ve cevizin yetiştirildiği İspanya, Fransa ve İtalya başta olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde yaklaşık %50 oranında verim kayıplarına yol açan en önemli bakteriyel patojendir (Loreti et al., 2001; Scortichini et al., 2001; Moragrega et.al., 2009).

Dünyada ceviz yetiştiriciliğinde önemli paya sahip olmamıza rağmen verim kayıplarına neden olan ceviz bakteriyel yanıklığı etmeni (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, Xaj) ile ilgili geniş çapta araştırmalar yapılmamıştır (Akat et al., 2016). Karaca, (1974) Karadeniz Bölgesi’nde bu hastalığa rastladığını bildirmiş, Özaktan et al. (2007)’nin hastalık etmeni bakteriyi izole etmesi ve tanılması ülkemizde yapılmış olan önemli ve sayılı çalışmalardandır. Türkiye’nin de katıldığı

Avrupa Birliği COST 873 programı çerçevesinde gerçekleştirilen alışma Grubu toplantılarında özellikle İtalya ve İspanya gibi Akdeniz lkelerinde ceviz yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen hastalık olan BAN’a dikkat çekildiği belirtilmiştir (zaktan et al., 2010). Ülkemizde Marmara Bölgesinde yapılan çalışmalarda bu hastalığın varlığı ve erken meyve dökümü nedeni ile ürün kayıplarına yol açtığı vurgulanmıştır (zaktan et al., 2007).

Xaj, ceviz meyvelerinde ceviz bakteriyel yanıklığının yanı sıra BAN’a da neden olmaktadır. Ceviz meyvelerinde BAN Akdeniz bölgesinde yer alan ülkelerde ceviz üretim alanlarını tehdit eden yeni bir hastalıktır. Hastalık ilk olarak İspanya, sonraki yıllarda Fransa ve İtalya’da ceviz üretim alanlarında saptanmıştır. Son yıllarda Türkiye’de yapılan çalışmalarla birlikte özellikle Marmara Bölgesi’nde (zaktan et al., 2009) ve Balıkesir çevresinde (stn et al., 2016) ceviz üretiminin yapıldığı plantasyonlarda erken meyve dökümü nedeni ile önemli verim kayıpları kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalara göre; ceviz meyvelerinde BAN oluşumundan esas sorumlu etmenin *Xaj* olduğu kabul edilmektedir (Moragrega and zaktan, 2010). BAN’dan sorumlu diğer hastalık etmenleri olarak *Fusarium* ve *Alternaria* türlerinin de önemli oldukları belirtilmiştir (Belisario et al., 2002). Bu hastalığın ceviz meyvelerinde zarara neden olmasında biyotik faktörlerin dışında bitki besin elementlerinin de etkisinin olabileceği savunulmuştur (Garcin and Duchesne, 2001).

Son yıllarda yapılan “EuroXanth COST ACTION 16107” projesi sonucunda ceviz bakteriyel yanıklığına neden olan ve *Xanthomonas euroxanthea* olarak isimlendirilen yeni bir etmen keşfedilmiştir (Martins et al., 2020). Böylece yapılan çalışmaların artması ve yeni verilerin elde edilmesi ile birlikte cevizde bakteriyel hastalıklara neden olan *Xanthomonas* etmenlerine dikkat çekilmektedir.

Bu alışmada, Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN’da esas sorumlu olan bakteriyel ve fungal etmenlerin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle tanılanması, her iki hastalığın yaygınlık oranlarının belirlenmesi, *rep*-PCR ve MLSA ile bakteriyel izolatların moleküler karakterizasyon çalışmaları ve *Xaj*’nin genetik çeşitliliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, Manisa, Balıkesir ve Çanakkale il ve ilçelerinde ceviz

plantasyonlarında surveyler gerçekleştirilmiş, *Xaj* ve *A. alternata* belirlenmiş ve yaygınlık oranları saptanmıştır. Her iki etmen için ham ceviz meyvelerinde patojenisite testleri yapılmış olup daha sonra klasik ve moleküler yöntemler ile etmenler tanımlanmıştır. *Xaj*'nin moleküler karakterizasyon çalışmaları öncelikle *rep*-PCR ile yapılmış ve farklı lokasyonlardaki genetik çeşitlilikleri değerlendirilmiştir. Daha sonra 7 housekeeping geni (*atpD*, *rpoD*, *gyrB*, *dnaK*, *glnA*, *fyuA*, *efp*) kullanılarak yapılan MLSA yöntemi ile *Xaj* strainleri arasında coğrafik bölgelere ve hastalığa göre genetik farklılık olup olmadığı ortaya konulmuştur.

Ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığı, ceviz yetiştiriciliğinde önemli verim kayıplarına neden olmasına rağmen ülkemizde yapılan fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yaptığımız çalışma Türkiye’de bu kapsamda ilk olma niteliği taşımaktadır. Elde edilen veriler söz konusu hastalıkların epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına, böylece hastalıklar ile mücadelede yeni yaklaşımlar ile verim kayıplarının en aza indirilmesine ve sağlıklı ürünlerin elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Konusunda Yapılan Çalışmalar

2.1.1. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığının belirtileri ve yaygınlığı

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis*'in (*Xaj*) neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklığı ceviz yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok ülkede önemli miktarda verim kaybına neden olmaktadır (Parveaud et al., 2010). Bu hastalık Avustralya başta olmak üzere Yeni Zelanda, Kuzey ve Güney Amerika, Çin, Rusya, İran, Güney Afrika, Arjantin ve cevizin yetiştirildiği birçok Avrupa ülkesinde görülmektedir (Bradbury, 1986). Ülkemizde de ceviz üretiminde yüksek oranda verim kayıplarına yol açan *Xaj* ile ilgili geniş çapta araştırmalar yapılmamıştır. Hastalık etmeni bakteri sadece *Juglans* cinsi bitki türlerinde enfeksiyona neden olmaktadır. Ticari ceviz çeşitlerinin birçoğu *Xaj*'nin neden olduğu enfeksiyona karşı duyarlıdır. Erkek ve dişi çiçekte, yaprak, sürgün ve meyvede ceviz bakteriyel yanıklık belirtileri gözlenmektedir. Karaca, 1966 yılında Karadeniz Bölgesinde bu hastalığın belirtilerine rastladığını bildirmiştir (Karaca, 1974). 2007 yılında ise hastalık etmeni bakteri izole edilmiş ve klasik tanı yöntemleri ile tanısı yapılmıştır (Özaktan et al., 2007).

Hastalığın ilk belirtileri yapraklarda görülmektedir. Parankima dokusunda birkaç milimetrelik kahverengi-siyah lekeler daha sonra köşeli lekelere dönüşür (Şekil 2.1). Bu lekeler zamanla yaprak yüzeyinde yayılarak yaprakta şekil bozukluklarına ve deformasyona neden olmaktadır. Meyveler de çiçek döneminde bu hastalığa karşı duyarlıdır. Meyvenin dış yüzeyinde yağ yeşili renkte küçük lezyonlar gözlenir. Meyve kabuğu henüz yeşil iken dış kabuk üzerinde görülen siyah lekeler yaygınlaşarak çürüklüğe neden olur. Meyvedeki bu lekeler çoğu zaman meyve içine de ilerler (Şekil 2.1) (Saygılı ve ark., 2019).



Şekil 2.1. Ceviz bakteriyel yanıklığının yaprak ve meyvede oluşturduğu belirtiler

2.1.2. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalık etmeninin tanısı konusunda yapılan çalışmalar

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* ceviz bakteriyel yanıklığının esas etmeni olmakla birlikte ceviz (*Juglans regia*) yaprak, sürgün ve meyvesinde simptomlar oluşturmaktadır. Birçok ticari çeşit de laboratuvar ve tarla koşullarında *Xaj*'ye karşı duyarlıdır. Yağmurların genellikle erken ilkbaharda yoğunlaştığı Akdeniz Bölgesi'nde 'Franquette' gibi geç vegetatif çeşitler hastalığa karşı daha az hassastır. Etmenin tanısında EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) protokollerinde önerildiği gibi YDC (yeast extract dextrose calcium carbonate), YPGA (yeast peptone glucose agar) ve mTween besi ortamları kullanılmaktadır. Enfekteli yaprak, çiçek, sürgün ve meyveden etmen izolasyonu yapılabilmektedir. *Xanthomonas* benzeri koloniler biyokimyasal testlerle, meyvenin ve tüm bitkinin inokule edilerek yapılan patojenisite testleri ve DNA temelli moleküler tanılama testleri sonucunda *Xaj*'nin kesin tanısı yapılmaktadır (Moragrega, 2012).

Romanya ve Macaristan'da tüm ceviz yetiştirme alanlarında ceviz bakteriyel yanıklığı en önemli hastalık olarak kabul edilmektedir. Ceviz çeşitlerinin bu hastalığa karşı duyarlılık/dayanıklılığını belirlemek için bakteriyel yanıklık belirtilerinden izole edilmiş 61 *Xaj* izolatu ile çalışılmıştır. Karakteristik *Xaj* kolonilerinin enfekteli bitki dokularında saprofitik olarak bulunan diğer bakterilerden ayırımında sarı renkli mukoid koloniler seçilmiş ve nişastanın hidrolizi ve glukozun oksidasyonu testleri yapılmıştır. Tüm izolatların tütünde aşırı

duyarlılık testi (*Nicotina tabacum* L.), fasulye kabuğu (*Phaseolus vulgaris* L) ve ham ceviz meyvelerinin (*Juglans regia*) kullanıldığı patojenisite testleri yapılmıştır. Seçilen izolatların taksonomisinin belirlenmesinde *Xaj*'nin farklı coğrafik bölgelerde ortaya çıkabilecek ırk/biyotip işaretlemesi için API 20NE ve API CH50 kitleri kullanılmıştır. Macaristan ve Romanya izolatları karbonhidrat kaynaklarının kullanımında yüksek oranda benzerlik gösterse de type strain düzeyinde farklı bulunmuştur. Ayrıca tüm *Xaj* izolatlarının bakıra karşı duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (Bandi et al., 2014).

2.1.3. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalık etmeninin mücadelesi konusunda yapılan çalışmalar

Ceviz bakteriyel yanıklığına karşı Avustralya'ya da yapılan bir çalışmada, duyarlı meyveleri hastalık etmenine karşı korumak için bakırlı biosidler (150 g/kg mancozeb ile formüle edilmiş 300 g/kg bakır hidroksit) ile tomurcuk patlamasından itibaren 4-5 hafta süresince 7-14 günlük periyotlarla 10 uygulama yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre çok yönlü bakır kullanımının hastalığı kontrol etmede her zaman başarılı olmadığı belirlenmiştir (Lang and Evans, 2010). Bakıra karşı dayanıklılık gösteren *Xaj* strainleri ilk olarak Fransa ve Kuzey Kaliforniya' da yapılan çalışmalar sonucunda saptanmış (Gardan et al., 1993; Lee et al., 1993). Bakırlı biositlerin uzun süre kullanılması sonucunda topraktaki mikrobiyal aktivitede ve ceviz bahçelerindeki verimde azalma görüldüğü belirlenmiştir (Radix et al., 1994).

Ceviz bakteriyel yanıklığına karşı konukçu duyarlılığında çeşitler arasında farklılıkla birlikte aynı çeşidin farklı organlarının da *Xaj*'ye karşı farklı duyarlılık gösterebildiği bilinmektedir (Mulrean and Schroth, 1982; Aleta et al., 2001). Günümüzde ticari ceviz çeşitlerinin çoğu söz konusu hastalığa karşı duyarlıdır. (Woeste et al., 1992; Aleta and Ninot, 1993). İspanya'da yapılan çalışmalarda yabani *Juglans regia* çeşitlerinin *Xaj*'ye karşı ticari çeşitlere göre daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Germain et al., 1997).

Adaskaveg et al. (2008) ceviz bakteriyel yanıklığının mücadelesi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında, *Xaj*'ye karşı farklı bakırlı kimyasalları denemişlerdir.

Bordeaux mixture, Bordeaux mixture+Kasumin, Bordeaux mixture+demir sülfat, Kocide kombinasyonlarını mart ayından itibaren iki haftada bir olmak üzere ceviz ağaçlarına uygulamış olup, temmuz ve eylül aylarında da hasat edilmiş kuruyan meyvelerdeki hastalık şiddeti değerleri kaydedilmiştir. Söz konusu uygulamalar arasında herhangi bir korelasyon bulunmamasına rağmen Kocide ile yapılan uygulamaların etkilerinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Uygulamalar arasındaki bu farklılığın, kimyasalların enfeksiyon sırasındaki aktivitelerinden ve patojenin inokule edildikten sonraki hastalık gelişiminin kontrol edilemediğinden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Cevizde bakteriyel yanıklık etmeni olan *Xaj*'nin kontrolünde antagonistik bakterilerin kullanılıp kullanılamayacağını belirlemek amacı ile yaptığı çalışmada, 29'u hastalık belirtisi görülmeyen ceviz ağaçlarından izole edilen toplam 35 bakteriyel antagonist *Xaj*'ye karşı *in vitro* da biyolojik kontrol aktivitesi açısından taranmıştır. *Pantoea vagans* strain C9/1 referans biyolojik kontrol olarak kullanılmıştır. TSA besi yerinde *Xaj*'nin gelişimini 3 mm-13mm arasında engelleyen 18 strain, koparılmış ceviz meyvelerinde bakteriyel yanıklığın biyolojik kontrolünde kullanılmak üzere seçilmiştir. Antagonist strainlerin yaklaşık %60'ı pozitif kontrole göre hastalığın gelişimini %41-77 oranında azaltmıştır. Olgunlaşmamış ceviz meyvelerinde *Xaj* gelişimini önemli ölçüde engelleyen bakteriyel antagonist strainler daha sonra ceviz fidanlarında testlenmek üzere seçilmiştir. Ceviz fidanlarında *in vivo* biyolojik kontrol testlerine göre WH77/1, WH68, WH48/1A strainleri %55, %42 ve %82 oranında hastalığı azaltan en etkili strainler olup biyokimyasal ve fizyolojik testler sonucunda *Pseudomonas fluorescens* olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı ceviz bitkilerinden izole edilen antagonist bakterilerin diğer bitkilerden izole edilenlere göre bakteriyel yanıklığın kontrolünde daha umutvar sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Bu araştırma, bağımsız ceviz analizinin *Xaj* biyokontrol ajanlarında tarama için hızlı ve güvenilir sonuçların elde edilebileceği bir yöntem olduğunu göstermektedir (Özaktan ve ark., 2012).

Xaj enfeksiyonunun şiddetini azaltabilme özelliğini ve ceviz meyvelerinde fenolik bileşikler içeriği üzerindeki etkisini araştırılması için cv. Franquette erişkin ceviz bahçesinde Prohexadione calcium (ProCa) uygulanmıştır. ProCa stigmaların ortaya çıkmasından önce 8-10 günlük aralarla 0.125 mg/L konsantrasyonda (R1

tedavisi) ve kahverengi stigmaların ortaya çıktığı aşamada 0.250 mg/L konsantrasyonda (R2 tedavisi) üç kez kullanılmıştır. Simptomatik meyvelerin kabuk dokularındaki yanıklığın şiddeti PDA ve MS tespiti ile HPLC kullanılarak yürütülen fenolik analizler sonucunda değerlendirilmiştir. ProCa, konsantrasyonu ve ilk uygulama tarihi ne olursa olsun *Xaj* şiddetinde anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur. İndüklenen savunma reaksiyonu mevsim boyunca devam etmiştir. Ceviz kabukları ProCa tedavilerinden sonra 15-günlük aralıklarda farklı fenolik bileşiklerin daha önceki meyve olgunlaşmasından 14 kat daha yüksek konsantrasyonunu sergilemiştir. Tedavi uygulanan meyvelerde daha yüksek bir total fenolik içerik (TPC), daha fazla hidroksisinnamik asit (HC ve flavanol varken ProCa flavonollerin ve gallik asidin içeriğini azaltmıştır. ProCa'nın fenol sentezi düzenlenmesi aracılığıyla ceviz savunma mekanizmalarını tetikleme potansiyeli, bu ürünü *Xaj*'a karşı uygun bir kontrole dahil etme amacını taşıyan ek denemelerde teyit edilmelidir (Solar et al., 2012).

Transilvanya ve çevresinden seçilmiş çeşitlerle *in vitro* koşullarda yapay inokulasyon ile bakteriyel yanıklığa karşı duyarlılık çalışmaları yapılmıştır. 11 ceviz çeşidi ve 10 seleksiyonu temsil eden 30 ham ceviz meyvelerinde virülensliği kontrol edilmiş *Xaj* izolatlarının karışımı süspansiyon şeklinde uygulanmıştır. Kontrol olarak orta dayanıklı 'Pedro' ve oldukça duyarlı 'Milotai intenzív' çeşitleri kullanılmıştır. 10 gün sonra inokulasyon noktaları etrafındaki nekrotik alan çapları ölçülmüş ve hastalık oranları hesaplanmıştır. 21 çeşidin hiçbirisi hastalığa karşı dirençli bulunmamış ancak hepsi duyarlı kontrol olarak kullanılan 'Milotai intenzív' çeşidinden daha yüksek derecede dayanıklılık göstermiştir. Analiz edilen çeşitlerin çoğu orta duyarlı ve orta derecede dayanıklıdır. 'Milotai kései' ve 'SZEN-10' çeşitleri kontrol olarak kullanılan 'Pedro' çeşidi ile birlikte orta düzeyde dayanıklı olarak kabul edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda söz konusu çeşitlerin *Xaj*' ye karşı dayanıklılıkları temel alınarak Karpat Havzası çevre koşullarında üretim amaçlı olduğu kadar dayanıklı gen kaynakları olarak önerilebilecekleri sonucuna varılmıştır (Bandi et al., 2015).

Bakteriyel yanıklık, İran'ın batısı, merkezi ve kuzeyinde olduğu kadar dünya genelinde de ceviz üretimini her yıl azaltan en önemli ceviz hastalıklarındandır. İran'ın kuzeybatısında hastalığın önemi nedeniyle, 2014-2016 yılları ilkbahar ve

yaz aylarında çeşitli ceviz bahçelerinden sarı halka semptomları olan yanıklık, koyu kahverengi lekeli yaprak ve meyvelerden şüpheli örnekler toplanmıştır. Bakteriyel etmen izolasyonundan sonra fizyolojik ve biyokimyasal testler, patojenisite testleri ve moleküler tanılama çalışmaları sonucunda etmen *Xaj* olarak tanılanmıştır. *Xaj* izolatların patojenisitesini ve farklı yerel ceviz çeşitlerinin dayanıklılığını araştırmak amacıyla seçilmiş dört adet ceviz çeşidi (Khoshei, Peckan, Chandler, Kagazi) ile *in vitro* koşullarda patojenisite testleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda ‘Peckan’ çeşidi *Xaj*’ye karşı en hassas bulunurken ‘Khoshei’ ise en dayanıklı çeşit olarak değerlendirilmiştir. Bu çeşitlerdeki dayanıklılık genlerinin tanılanması üzerine yapılacak olan çalışmaların ceviz fidanı üretimini olumlu yönde etkileyeceği savunulmaktadır (Eskandari et al., 2018).

Dünya genelinde *Xaj*’in neden olduğu bakteriyel yanıklık ceviz üretimini olumsuz etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı; *Osmanthus fragrans* yapraklarından elde edilen OFE17 isimli endofitik bakterinin karakterizasyonu ve ceviz bakteriyel yanıklığına karşı biyokontrol etkinliğinin değerlendirilmesi ve etki mekanizmasının belirlenmesidir. Xiaogan (Çin) şehrindeki sağlıklı *O. fragrans* yapraklarından izole edilen endofitik antagonist aday bakteriler Çin’nin Hubei bölgesindeki farklı şehirlerden izole edilen 42 adet *Xaj* izolatına karşı *in vitro* koşullarda potansiyel antagonistik etkileri test edilmiştir. *Xaj* DW3F3 izolatına karşı en etkili bulunan bir strain seçilmiş ve OFE17 olarak isimlendirilmiştir. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri, 16S rDNA ve *gyrB* sekans analizi ve antibiyotik üreten genler dikkate alındığında endofit OFE17 bakterisi *Bacillus* sp. olarak tanılanmıştır. Ham ceviz meyvelerinde yapılan patojenisite testleri sonucunda %68.69 oranında hastalığı kontrol altına aldığı gözlenmiştir. OFE17 protease, selüloz, amylase, siderofor üretebilirken ekstraselüler lipaz, IAA (indol acetic acid) üretememektedir. OFE 17’nin aktif bileşikleri öncelikle protein olmayan bileşikler ve optimum organik ekstraksiyon çözücüsü kloroformdur. PCR ile yapılan moleküler tanılamada iturin A sentetazın sentezinden sorumlu *ituA* ve *ituD* genlerini taşıdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, OFE17’nin aday antagonist olarak en yüksek etkinliği %68.89 olurken en düşük etkinliği %20,3’tür. Patojen uygulandıktan 1-2 gün sonra OFE17’nin uygulanması biyokontrol etkinliğini artırdığını vurgulamaktadır (Benzhong et al., 2021). Cevizde bakteriyel yanıklık etmeni *Xaj*’ye karşı etkili biyolojik mücadele ajanı taraması için 2017 yılında Çin’de Xiogan şehrindeki 94

farklı sağlıklı bitkiden 152 aday antagonist bakteri izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan *Xaj* izolatu 2015 yılında izole edilmiştir. Besi yerinde karşılıklı ekim yöntemi sonucunda *Amaranthus tricolor*, *Bambusa multiplex*, *Canna indica* ve *Osmanthus fragrans* bitkilerinden izole edilen ATE17, BME17, CIE18 ve OFE17 antagonist bakterileri *Xaj*'ye karşı etkili bulunmuştur. Karşılıklı ekim yöntemi sonuçlarına göre antagonist bakterilerin *Xaj*'yi engelleme oranları sırasıyla 1.5, 1.6, 1.3 ve 1.6'dır. Bu sonuçlar ATE17, BME17, CIE18 ve OFE17 antagonist bakterilerinin ceviz bakteriyel yanıklığına karşı biyokontrol potansiyelin olduğunu göstermektedir. Daha sonra *Xaj*'ye karşı en etkili bulunan 4 endofitik bakterinin morfolojik, gram boyama, yağ asidi analizleri yapılmıştır. Ayrıca 16S rDNA ve *gyrB* gen sekans analizleri sonucunda ATE17 %91.70, BME17 %94.4, CIE17 %93.52 VE OFE17 %93.31 *Bacillus subtilis* ile benzerlik göstermiştir. Ayrıca BME17 ve OFE17 besi yerinde birçok fungal ve bakteriyel patojenleri baskılayabilmektedir. Ayrıca *Xaj*'ye karşı antagonistik etkisi en yüksek olan BME17 ve OFE17 bakterileri 10 farklı fungal patojene ve çeltikte 2 farklı bakteriyel patojene karşı da antagonistik etkileri denenmiş olup hepsinde antagonistik etki göstermiştir (Fu et al., 2021).

Xaj'in bakırlı bileşiklere karşı genetik dayanıklılığı kanıtlanmış olsa da günümüzde hastalığın mücadelesinde bakır sülfat (CuSO_4) gibi bakırlı bileşikler kullanılmaktadır. Bakteriyel yanıklığın simtopatolojisini ve *X. juglandis* yükünü azaltmaya karşı biyolojik mücadelede alternatif olarak bakteriyofaj kullanımı etkin ve sürdürülebilir olabilir. *f20-Xaj*, *f29-Xaj* ve *f30-Xaj*'nin karakterizasyonu yapılmış ve ceviz plantasyonlarında bakteriyel yanıklığa karşı etkisi saptanmıştır. Şili ve Fransa'dan izole edilen *Xaj* strainlerinde spesifik litik enfeksiyonlar göstermiştir. *f20-Xaj* ve *f30-Xaj*'nin filogenetik analizleri sonucunda fajların *Pradovirus* genusuna ait oldukları belirlenmiştir. Bahçe denemelerinde ise bu fajların kokteyllerinin CuSO_4 ile benzer etkiler gösterdiği ve ceviz dokularında hastalık şiddeti ve yaygınlığının azaldığını göstermiştir. Ayrıca CuSO_4 uygulamasının tam tersine bakteriyofajların varlığı *X. juglandis*'in bakteriyel yükünü azaltmıştır. Bu sonuçlara göre *Xaj*'nin neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklığına karşı bakteriyofajların kullanımı alternatif bir mücadele yöntemi olabilir (Remateles et al., 2022).

2.2. Uç Nekrozu (Brown Apical Necrosis, BAN) Hastalığı Konusunda Yapılan Çalışmalar

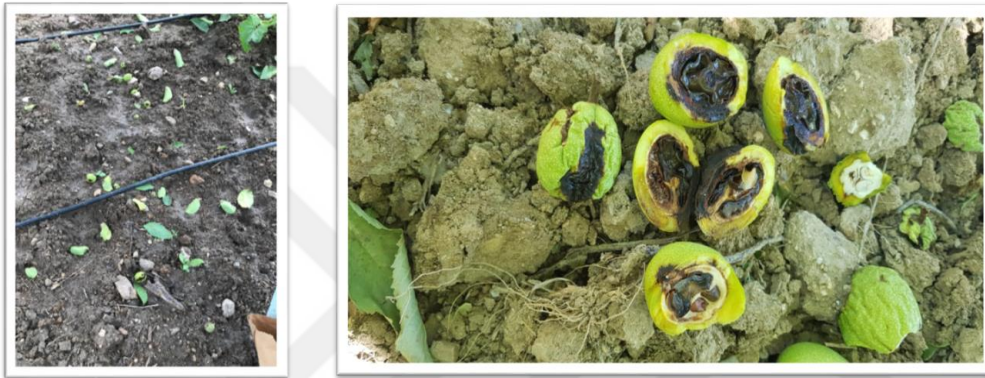
2.2.1. Uç nekrozu (BAN) hastalığının belirtileri ve yaygınlığı

Türkiye’de olduğu gibi Dünyada ve Avrupa’da da bakteriyel ve fungal patojenler ceviz üretiminde ciddi sorunlar meydana getirmektedir. Son yıllarda Türkiye’ nin de katıldığı Avrupa Birliği COST 873 toplantılarında dünyada ceviz üretiminde önemli ülkeler arasında olan İtalya ve İspanya’da da ceviz yetiştiriciliğini önemli derecede tehdit eden Uç Nekrozu (Brown Apical Necrosis, BAN) konusuna dikkat çekilmiştir (Özaktan et al., 2010). Ülkemizde Marmara Bölgesinde yapılan çalışmalarda bu hastalığın varlığı ve erken meyve dökümü nedeni ile ürün kayıplarına yol açtığı bildirilmiştir (Özaktan et al., 2007).

BAN hastalığının ilk belirtileri meyvenin apikal ucunda küçük boyutta koyu kahverengi suda haşlanmış lekelerdir. Meyve büyüdükçe lekeler de büyür-genişler ve 2-15 mm çapındaki kuru-kahverengi yuvarlak lezyonlar daha sonra ilerleyerek tüm meyveyi kaplayabilir. Meyvenin apikal ucundaki siyah suda haşlanmış lekeler *Xaj*’nin neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklık belirtisinden farklıdır. BAN’da meyvenin apikal ucundan başlayan enfeksiyon meyve içine doğru ilerler ve epikarp, mezokarp dokularını enfekte ederek tohumda kadar ulaşabilir (Şekil 2.2). Epikarp ve mezokarpta kuru sert lezyonlar görülürken tohumda lezyonlar çürüklük şeklindedir. Meyve ve kabuğu sertleşmeye başladıktan sonra yeni lezyonlar epikarp ve mezokarpla sınırlı kalır, meyve içine ilerleyemez. Olgunlaşmamış enfekteli meyveler düşer ve böylece erken meyve dökümleri ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır (Akat et al., 2016). Yere düşen meyvelerde meydana gelen lezyonlar ağaçta kalan meyvelere göre daha şiddetlidir ve meyve iç dokusuna kadar ilerler (Moragrega and Özaktan, 2010).



Şekil 2.2. Ceviz meyvelerinin apikal ucunda ve meyve iç dokularında BAN' dan sorumlu etmenler tarafından enfeksiyonu.



Şekil 2.3. Survey çalışmalarında rastlanan erken meyve dökümleri.

İtalya'daki cevizlerde (*Juglans regia*) yaygın olarak erken meyve dökümü gözlenmiştir. Düşen meyvelerde çiçek burnu ucunda kahverengi lekeler ve meyve iç dokusunda yumuşuma-çürüme belirtilerine rastlanılmıştır. Fransa ve İtalya'dan toplanan örneklerden yapılan izolasyon ve tanılama sonucunda hastalığın Brown apical necrosis (BAN) olduğuna karar verilmiştir. Fransa ve İtalya'da seçilen üç ceviz plantasyonunda BAN'ın etiyolojisini doğrulamak için çalışmalar yürütülmüştür. Meyve içine ilerlemiş olan yumuşama-çürüme belirtisi görülen dokulardan yapılan izolasyon sonucunda azalan izolasyon sıklığıyla sırası ile *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum* ve *Phomopsis* fungus türleri elde edilmiştir. Buna rağmen BAN ile enfekteli meyvelerin stigmasından sadece *Fusarium* spp. elde edilmiştir. BAN ile ilişkili fungus türlerinin bölgeye ve zamana göre de değişiklik göstermesi daha önceki çalışmaların sonuçlarını da desteklemektedir. Koparılmış ham ceviz meyveleri ile yapılan patojenisite testlerinde *Fusarium* türleri daha tipik belirtiler oluştururken *Alternaria alternata*

daha kısıtlı nekrozlar oluşturmıştır. İzole edilmiş diğer fungus türlerinin BAN hastalığındaki rolü henüz açıklığa kavuşmamıştır. Ceviz bakteriyel yanıklık etmeni olan *Xaj* aynı zamanda BAN belirtisinden de izole edilmiştir. Meyve dışındaki kahverengi lekeler ile meyve içindeki çürüklük belirtileri arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre meyveden tekrarlanan izolasyonlar ve yapay inokulasyonlar sonucunda BAN'ın kompleks bir hastalık olarak kabul edilebileceğini ve meyve içi enfeksiyonların çiçek sapından kaynaklanabileceği anlaşılmıştır (Belisario et al., 2002).

Güney İspanya'da 'Chico' ve 'Chandler' ceviz çeşitlerinin meyvelerinde nekrotik lezyonların olduğu ve erken meyve dökümü gözlenmiştir. 2000-2003 yıllarında nisan-eylül ayları arasında periyodik olarak her 15 günlük gözlemlerde hastalık belirtileri değerlendirilmiş ve enfekteli meyvelerden bakteri ve fungal etmenler izole edilmiştir. 3 yıl boyunca gözlemlenen diğer önemli hastalık ise *Xaj*'nin neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklıktır. Meyvedeki büyük lekeler erken meyve dökümü ve meyve içindeki çürüklük ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca her mevsim sonunda meyve içindeki çürük dokulardan *Fusarium* spp. elde edildiği bildirilmiştir (Arquero et al., 2005).

Son yıllarda Akdeniz'de ceviz yetiştiriciliği yapılan alanlarda cevizlerde (*Juglans regia*) olgunlaşmamış meyve dökümlerine ve verim kayıplarına neden olan yeni bir hastalığın gözlemlendiğini bildirilmiştir. Hastalığın karakteristik belirtileri meyve kabuğunda ve çiçek ucunda uç yanıklığı şeklindedir. Meyve gelişiminin erken dönemindeki uç nekrozunu, cevizde önemli diğer bakteriyel hastalık olan ceviz bakteriyel yanıklığından ayırt etmenin yolu iç ve dış enfekteli dokulardaki belirtilerin ayrıntılı gözlenmesidir. Ceviz yetiştiriciliği yapılan alanlarda enfekteli cevizlerde hastalık etmeni tanısı ve çevresel faktörlerin etkisi üzerine yapılan araştırmalar sonucunda *Xaj*, uç nekrozu ile ilgili en yaygın mikroorganizmadır. *Fusarium* spp. ve *Alternaria* spp. ise uç nekrozunda ikincil enfeksiyon kaynağı yada bakteriyel enfeksiyonlu dökülmüş meyveler üzerinde saprofitik gelişerek hastalığa neden olmaktadır. Bu da hastalık belirtileri ve yayılmasını artırmaktadır. Bitki besin elementleri ve toprak özellikleri de uç nekrozunda etkisi olduğu düşünülmektedir (Moragrega and Özaktan, 2010).

2.2.2. Uç nekrozu (BAN) hastalık etmeninin tanısı konusunda yapılan çalışmalar

2009 yılında ülkemizde yapılan çalışmada, hastalıklı ceviz meyvelerinin endokarp ve tohum dokularından %30 oranında *Xaj* izole edilmiştir. Ayrıca, herhangi bir semptom gözlenmeyen ceviz meyvelerinden de %5 oranında *Xaj*'ye rastlanmıştır. Aynı çalışmada BAN'dan sekonder sorumlu etmen olarak *Fusarium* spp.'nin meyvenin perikarp ve tohum kısmından %3, *A. alternata*'nın ise perikarp dokusundan %7 oranında elde edildiği bildirilmiştir (Özaktan et al., 2009).

Yapılan bir çalışmada BAN ile enfekteli meyvelerin perikarp ve tohumundan %80 oranında *Xaj*, %20 oranında *Fusarium* ve ceviz meyvesinin perikarp dokusundan sadece *Alternaria* türleri izole edildiği bildirilmiştir (Moragrega et al., 2007). Diğer bir çalışmada ise, söz konusu hastalıktan esas sorumlu bakteriyel etmenin *Xaj* olduğu ve hastalık ilerledikçe *F. semitectum*, *F. solani*, *F. poe*, *F. lateritium*, *Alternaria* sp. ve *Chlamydosporium* türlerinin de meyvenin iç ve dış dokularında olduğu saptanmıştır (Moragrega et al., 2009).

Ceviz meyvesinin stigma ucunda meydana gelen nekrozlar *Juglans regia*'da oldukça yaygındır. Ceviz meyvesinin çiçek ucunda ve meyve kabuğundaki siyah noktalar *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ve *Gnomonia leptostyla*'nın birlikte neden olduğu hastalık belirtileridir. Uç nekrozunda (BAN) meyvenin apikal ucundaki kahverengi lekelere polifag funguslar neden olmaktadır. Söz konusu hastalıkta olgunlaşmamış meyve dökümüne bağlı verim kaybı ekonomik açıdan fazladır. Daha önceki yapılan çalışmalarda BAN'a neden olan fungus türlerinde *Fusarium* ve *Alternaria* türleri ön plana çıkmıştır. 10 yıllık araştırma sonucunda çiçek, meyve ve yapay inokulasyonlardan yapılan izolasyon sonucunda fungus türleri saptanabilmiştir. Çiçek ve meyveye uygulanan yapay inokulasyonlarda fungusun doğal açıklıklardan giriş yapmasının doğrulanmış olması BAN' nın oluşumunu bilmek açısından önemlidir. Çekirdek ve endokarptaki nekrozlara birçok *Fusarium* türleri neden olsa da *F. semitectum* ve *F. graminearum* en agresif türler olduğu görülmüştür. Ayrıca *Alternaria alternata* ve daha agresif olan *A. arborescens* BAN' da ikincil önemli fungal etmenlerdendir (Belisario et al., 2010).

Moragrega et al. (2011), İspanya’da 2007-2008 yıllarında Chandler, Franquette ve Hartley ceviz çeşitlerinin bulunduğu ceviz plantasyonunda BAN’nın etiyolojik ve epidemiyolojik yönlerini çalışmışlardır. Hastalıktan etkilenen ceviz meyvelerinde çiçek ucundan başlayan kahverengi nekroz belirtilerini gözlemlenmiş ve bu belirtilerin bakteriyel yanıklık belirtilerinden farklı olduğunu belirtmişlerdir. *Xaj* apikal lezyonlardan büyüme sezonu boyunca izole edilmiştir. Elde edilen izolatlar koparılmış ham ceviz meyvelerinde yapılan testler sonucunda da aynı belirtileri oluşturmuştur. *Fusarium* spp. ve *Alternaria* spp.’nin düşen ceviz meyvelerinde sporadik oluşumu başlangıçta *Xaj*’in neden olduğu apikal lezyonlarda ikincil etmenler olduğu anlaşılmıştır. Apikal nekrozu ve ceviz bakteriyel yanıklığı epidemiyoloji ve ceviz türlerinin duyarlılığı açısından benzerlik gösterirken ilk meyve gelişimi zamanı epideminin artmasında ana faktörlerdendir. Chandler ve Hartley ceviz çeşitleri Franquette çeşidine göre hastalığa karşı daha duyarlıdır. Çalışma sonuçlarına göre apikal nekrozun belirgin belirtiler ve şiddetli erken meyve dökümlerine neden olan yeni ve önemli bir hastalık olduğu bildirilmiştir (Moragrega et al., 2011).

Po ovasının yakınlarındaki ceviz plantasyonlarında BAN enfekteli meyvelerden izole edilen fungal etmenlerin hastalıktaki rolünü araştırmak için yapılan bu çalışmada *F. semitectum* ISPaVe 1946, *F. graminearum* ISPaVe 1945, *A. alternata* ISPaVe 1779, *A. arborescens* ISPaVe 1779, *A. tenuissima* ISPaVe 1770 izolatları mix şeklinde uygulanmıştır. Önceki yıllardan BAN belirtisi görülen bahçede, hazırlanan fungal süspansiyonlar stigmadan ya da çiçek/meyvenin stigma ucundan yapay inokulasyonla verilmiştir. 2007-2008 yıllarında tüm sezon boyunca yapılan gözlemler sonucunda *F. graminearum* sadece 2007 yılında, *Alternaria* türleri sadece 2008 yılında izole edilirken *F. semitectum* tüm yıl boyunca izole edilmiştir. Coğrafik dağılım, çevresel faktörler ve erken meyve dökümünün yıllara göre yoğunluğunun istatistiksel analizleri yapılmıştır. BAN etiyolojisi ile ilgili coğrafik dağılım, meyve dökümü, belirtilerin ilerlemesi, fungusların çeşitliliği hakkında önemli bilgiler vermiştir. *Fusarium* graminearum ve *Alternaria* türlerinin *F. semitectum*’a göre daha agresif oldukları ve erken zamandaki yapay inokulasyonun meyve dökümünü artırdığı bildirilmiştir. *F. semitectum* mayıs ortasında yapılan ilk inokulasyondan sonra çiçek/meyve üzerinde nekrotik lezyonlara neden olurken 20 gün içinde meyve dökümleri gözlenmiştir. Çalışmanın

sonucunda BAN'ın kompleks bir hastalık olduğu ve *Fusarium* türlerinin esas etmenler olduğu kanısına varılmıştır (Scotton et al., 2015).

Şandong (Çin) çevresindeki ceviz alanlarında %50-60 oranında BAN belirtilerini gözlemlemişlerdir. Dökülmüş prematüre ceviz meyvelerinden *Alternaria* spp., *Xaj* ve *Pantoea agglomerans* izole etmişlerdir. HXJ izolatının genomik DNA'sı elde edildikten sonra 16S rRNA gen bölgesine spesifik 27F/1492R universal primerler kullanılarak PCR yapılmış ve sekans sonuçları GenBank veri tabanında %99 oranında *P. agglomerans* ile eşleşmiştir. HXJ izolatının patojenisitesini doğrulamak için ham ceviz meyvelerinde ve 9 yaşındaki cv. Xiangling ceviz çeşidinde patojenisite testi yapılmıştır. Inokulasyondan 10 gün sonra BAN'ın tipik belirtileri olan meyve çiçek ucunda nekroz ve meyve içindeki yumuşak nekrotik alanlar gözlenmiştir. Fizyolojik, biyokimyasal, patojenisite ve 16S rRNA gen sekans sonuçlarına göre *P. agglomerans* olarak kesin tanısı yapılmıştır. Bu çalışma Çin'de ve dünyada *P. agglomerans*'ın BAN'dan sorumlu esas etmen olduğunu kanıtlayan ilk çalışmadır (Yang et al., 2011).

Balıkesir (Sındırgı) çevresinde 2013-2014 yıllarında yapılan bir çalışmada 'Pedro' cinsi ceviz meyvelerinde yaygın olarak Brown apical necrosis (BAN) belirtileri gözlenmiştir. Bu hastalığın en tipik belirtilerinden olan olgunlaşmamış meyve dökümü ile yaklaşık %50 verim kaybına neden olmaktadır. BAN belirtileri ile birlikte ayrıca *Gonomonia leptostyla*'nın neden olduğu antraknoz ve *Xaj*'in neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklık hastalık belirtileri de gözlenmiştir. BAN hastalık belirtisi görülen yaprak saplarından, meyvelerin stigmatik ucundan ve enfekteli meyvelerdeki kahverengileşmiş-çürümüş dokulardan yapılan izolasyonda YDC besi yerinde sarı-mukoid gelişen bakteri kolonileri ve PDA besi yerinde gelişen funguslar izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler morfolojik, biyokimyasal testler ve 'Pedro' cinsi ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonucunda *Xaj* olarak tanısı yapılmıştır. Meyve içine ilerlemiş olan çürümüş dokulardan izole edilen funguslar morfolojik tanılama sonucunda *Alternaria* spp. ve *Fusarium* spp. olarak tanılanmıştır. Sadece *Fusarium* türleri ham ceviz meyve testinde pozitif sonuç vermiştir. Bu çalışma ile birlikte BAN'dan esas sorumlu etmenin *Xaj* olduğu; *Fusarium* ve *Alternaria* türlerinin ise ikincil sorumlu etmenler olduğu kanıtlanmıştır (Üstün et al., 2016).

Kuzey Patagonya’da Temperini et al. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ceviz bakteriyel yanıklığı ve erken meyve dökümüne neden olan uç nekrozu dünyada oldukça yaygın olduğu vurgulanmıştır. Önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre *Xaj* ile birlikte *Fusarium* spp. ve *Alternaria* spp.’nin uç nekrozuna neden oldukları kesinleşmiştir. Arjantin’de ceviz bakteriyel yanıklığının varlığı bilinirken uç nekrozu ile ilgili daha önce yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. 2013-2014 yılları arasında Rio Negro Middle Valley bölgesinde cevizlerde ciddi zararların olduğu ve hastalıklı ceviz meyvelerindeki belirtilerin bakteriyel yanıklık ve uç nekrozu belirtilerine benzediği görülmüştür. Her iki hastalığın yaygınlığını belirlemek ve bu hastalıklara neden olan patojenlerin etiyolojisini ortaya koymak için bu çalışma yapılmıştır. Hastalık belirtisi görülen meyvelerden bakteriyel etmen izole edilmiş ve morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testler sonucunda %66.7’si bakteriyel yanıklık ve %53.3’ü BAN’ dan izole edilen *Xanthomonas arboricola* olarak tanılanmıştır. Fungal etmenler ise %93.3’ü bakteriyel yanıklık ve %100’ü BAN belirtilerinden izole edilmiş ve %83.21’i *Alternaria*, %13,74 *Epicoccum* ve %3,05’i *Fusarium* olarak tanısı yapılmıştır. *X. arboricola*’nın genus düzeyinde 16S rDNA için X1/X2 primerleri ve tür düzeyinde XarbQF/XarbQR primerleri kullanılarak moleküler çalışmalar sonucunda *X. arboricola* pv. *juglandis* olarak tanılanmıştır. Ayrıca, *A. tenuissima* hem sağlıklı hem de hastalıklı meyvelerden yaygın olarak izole edilmişken *Fusarium* türlerine daha düşük oranda rastlanılmıştır. Patojenisite testleri sonucunda *Xaj* ve *A. tenuissima* ham ceviz meyvelerinde patojenisite testinde tipik belirtiler oluşturmuştur. *A. tenuissima* sadece meyvenin dış yüzeyinde nekrotik lekeler oluştururken meyvenin iç yüzeyinde *Xaj*’nin aksine herhangi bir belirtiyeye neden olmadığı görülmüştür. Her iki etmenin birlikte olmasının hastalığın yaygınlığını ve şiddetini artırabileceği kanıtlanmıştır. Her iki hastalığın bu bölgede son birkaç yılda meydana geldiği düşünülmektedir. Bu çalışma BAN ile ilgili Arjantin’de yapılan ilk çalışma niteliğini taşımaktadır.

Çin’de yapılan diğer bir çalışmada ise Hubei bölgesinde 2014 yılından itibaren 40.000ha ‘lık ceviz alanında % 50-70 oranında BAN hastalığına rastlanılmıştır. “Quingxiang” ceviz çeşidine ait BAN belirtisi gösteren 165 meyve, 2016-2018 tarihlerinde periyodik olarak toplanmış ve 165 fungal ve 101 bakteriyel izolat elde edilmiştir. Bakteriyel izolatlar arasında %45.2 oranla *Pantoea*

agglomerans, fungal izolatlar arasında ise *Fusarium avenaceum* %28.7 oranla en baskın tür olmuştur. Ayrıca *Alternaria* spp. (%25.5) ve *Colletotrichum* (%24.1) da elde edilmiştir. Fungal izolatların translation elongation factor 1 α (TEF-1 α) ve β -Tubulin (TUB2) genleri ile moleküler tanı sonucunda %99.8 oranında *F. avenaceum* ile benzer bulunmuştur. Bakteriyel ve fungal izolatların koparılmış ceviz meyvelerinde patojenisite test sonuçlarına göre de *F. avenaceum* en yüksek virülensliği göstermiştir. Bu çalışma Hubei bölgesinde (Çin) *P. agglomerans*'ın BAN'a neden olduğu ile ilgili yapılan ilk çalışma olduğu bildirilmiştir (Wang et al., 2019).

BAN hastalığı ile yapılan ilk çalışmalardan biri de 2015 yılında Şili'de yapılmıştır. Ceviz (*J. regia*) Şili'de 40,800 ha'lık üretim alanı ile sofralık üzüm üretiminden sonra 2. sırada yer almaktadır. 2015 yılından beri Biobio ve Nuble bölgelerindeki ceviz plantasyonlarında erken meyve dökümleri ile birlikte %75 oranında verim kaybı olduğu belirtilmiştir. Dökülmüş meyvelerde apikal uçtan meyvenin iç dokularına ilerlemiş nekrozların olduğu görülmüştür. Diğer çalışmaların (Moragrega et al., 2011; Moya-Elizondo et al., 2018) aksine bu çalışmada fungal patojenlerin bu belirtilere neden olup olmadığı üzerinde durulmuştur. Her ceviz bahçesinden 10 adet BAN belirtisi görülen meyveler toplanmış ve yapılan izolasyon sonucunda *Fusarium* ve *Alternaria* türleri tanımlanmıştır. Ayrıca *Fusarium* izolatları için translational elongation factor 1-alpha gen bölgesine (*tef1- α*) spesifik primerler (EF-1/EF-2) ve *Alternaria* izolatları için ise beta tubulin 1 gen bölgesine (*btub1*) spesifik primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Sekans sonuçları NCBI gen bankasında *Alternaria alternata*, *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum* ve *F. oxysporum* ile %97-100 oranında benzerlik göstermiştir. Koparılmış ceviz meyvelerindeki patojenisite testlerinde her fungal izolat için 30 meyve (Gf 30 aşamasında) kullanılmıştır. 18 günlük inkübasyon sonrasında değerlendirilen meyvelerde *A. alternata* %40-50, *F. avenaceum* %40, *F. culmorum* %10 ve *F. oxysporum* %50 oranında BAN belirtisi oluşturmuştur. Çalışmanın sonucunda BAN hastalığının epidemiyolojisini daha iyi anlamak ve uygun ve etkili mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma Şili'de yapılan ilk çalışma olduğu bildirilmiştir (Moya-Elizondo et al., 2021).

2.2.3. Uç nekrozu (BAN) hastalık etmeninin mücadelesi konusunda yapılan çalışmalar

Ceviz meyveleri üzerinde *Xaj*'in bazı funguslarla birlikte oluşturduğu uç nekrozu (Brown Apical Necrosis, BAN) erken meyve dökülmelerine neden olmaktadır.

Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde 2010-2011 yıllarında farklı ceviz çeşitlerindeki hastalık gelişimi, bu hastalıktan sorumlu olan bakteriyel ve fungal etmenler ve farklı ceviz çeşitlerinin uç nekrozuna karşı reaksiyonu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca hastalıktan sorumlu etmenlerin populasyon değişimleri izlenmiş olup bu hastalığın etiyolojisi ortaya konulmuştur. Çalışma sonuçlarına göre BAN'dan sorumlu ana etmenin *Xaj* olduğu ve *F. equiseti*, *F. verticilioides* ile *A. alternata* gibi fungal etmenlerin ise; saprofit olarak ikincil enfeksiyona neden olup hastalık şiddetini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca 'Hartley' ve 'Howard' çeşitlerinin BAN'a karşı en hassas çeşitler olduğu ve yerli çeşitlerden Bilecik'in daha az hassas olduğu belirtilmiştir. Bakırlı preparatlar ile yapılan uygulamaların da hastalık etmeni fungal ve bakteriyel etmene karşı etkili olduğu saptanmıştır (Akat et al., 2016).

2.3. Ceviz Bakteriyel Yanıklığı ve Uç Nekrozu (BAN) Etmenlerinin Karakterizasyonu Konusunda Yapılan Çalışmalar

Bitki patojeni bakterilerin genetik farklılıklarının incelenmesi üzerine yapılan araştırmalarda patojen virulensliğindeki değişimler ve buna bağlı olarak direncin ortaya çıkması hakkında önemli veriler sağlamaktadır. *rep*-PCR (Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction) ise prokaryotları hedef alan ve kısa tekrarlayan bölgelerin çoğaltılıp genomlar arasındaki farklılıkları ortaya koyan DNA parmak izi haritalama yöntemidir. Çoğu Gram-negatif bakterinin ve birkaç Gram-pozitif bakterinin genomlarında, üç ana tipte ortaya çıkan yüksek oranda korunmuş ve tekrarlayan DNA dizilerinin çok sayıda kopyası vardır. 35-40bp Repetitive Extragenic Palindromic (REP) sekansı, 124-127bp Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sekansı ve 154bp BOX alt birimlerin çeşitli kombinasyonlarını içermektedir (Rademaker and De Bruijn, 1997).

Xanthomonas genusuna ait özellikle de bakteriyel yanıklığa neden olan strainler arasındaki genetik farklılıkları pathovar düzeyinde değerlendirebilmek için *rep*-PCR oldukça güvenilir bir yöntemdir.

Cevizden (*Juglans regia* L.) izole edilmiş, uluslararası kültür koleksiyonlarından ve bitki bakteri hastalıkları laboratuvarlarından elde edilmiş 61 *Xaj* izolatının *rep*-PCR (ERIC, BOX, REP) yöntemi ile genomik farklılıkları ortaya konulmuştur. Ayrıca *Xaj* izolatların bakır dayanıklılığı, nişasta hidrolizi ve quinate metabolizması da değerlendirilmiştir. Ham ceviz meyveleri ve ceviz fidanlarında patojenisite testleri de yapılmıştır. *rep*-PCR moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda 61 adet *Xaj* izolatı Grup A1 (Yeni Zelanda, Romanya ve İtalya), Grup2 (Hollanda ve Macaristan), Grup B1 (Portekiz, İspanya, Fransa, USA, İtalya-merkez, Birleşik Krallık), Grup B2 (Yunanistan), Grup C1 (Sicilya) ve Grup C2 (İran) olarak farklı gruplara ayrılmıştır. Kümeleme analizleri sonucunda A, B ve C olmak üzere 3 farklı ana grup oluşturulmuştur. A ve B grupları arasında %85 oranında benzerlik görülürken C grubu diğer 2 grup ile %78 oranında benzerlik göstermektedir. Ayrıca, İtalya, Yeni Zelanda, Yunanistan ve Hollanda kendi içinde de farklı gruplara ayrılmaktadır. İtalya'nın Rieti çevresinden ve Yunanistan'ın Arkadia ve Attiki yakınlarından elde edilen *Xaj* strainleri de kendi arasında farklılık göstermiştir. *Xaj* strainleri arasındaki genetik farklılık ülkeler arasında sınırlı kalmayıp aynı ülke içinde de farklılıkların olduğu bu çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu çalışma ile ceviz yetiştiriciliğinin olduğu her alanının farklı bir *Xaj* popülasyonuna sahip olduğunu göstermektedir (Scortchini et al., 2001).

Xaj'in neden olduğu bakteriyel yanıklık orta, batı ve kuzey İran'da ceviz üretimini olumsuz etkileyen en önemli hastalıklardandır. Bu çalışma Quazvin ve Mazandaran çevresinde yapılan ilk çalışma niteliğini taşımaktadır. 2011 ilkbahar-yaz sezonu boyunca Alborze, Lorestan çevresinden enfekteli yapraklar toplanmış ve izolasyon yapılmıştır. Klasik tanılama yöntemleri ve patojenisite test sonuçlarına göre sarı renkli koloniler *Xaj* olarak tanımlanmıştır. Genomik DNA elde edildikten sonra *rpoB* (*beta subunit*) genine spesifik CM81b-F/CM32b-R primerleri kullanılmış ve 637 bp' de bant gözlenmiştir. NCBI veri tabanında sekans sonuçları değerlendirilmiş ve MEGA5 ile filogenetik analizleri yapılmıştır. *rep*-PCR ile yapılan moleküler karakterizasyon sonuçlarına göre *Xaj* strainleri %56 benzerlikle

3 farklı grup oluşturmuştur. Lorestan ve Mazandaran izolatları aynı grupta yer alırken Alborz izolatları diğerlerinden ayrı bir grupta yer almıştır. Lorestan izolatları da kendi için 3 farklı grup oluşturmuştur. Bu çalışma sonuçlarına göre İran' nın farklı bölgelerinden izole edilen *Xaj* izolatlarının farklı genotipik profile sahip olduğunu kanıtlamıştır (Shami et al., 2013).

Zheng et al. (2022) adaşları tarafından yapılan bir çalışmada Hubei (Çin) bölgesindeki Danjiangkou, Baokang, Suihou ve Beijing çevresindeki bakteriyel yanıklık belirtilerinin görüldüğü farklı ceviz plantasyonlarından elde edilen bakteriler arasında genetik varyasyonun olup olmadığını araştırmışlardır. Şüpheli yaprak, sürgün ve meyvelerden 60 *Xaj* izolatı elde edilmiştir. *rep*-PCR (ERIC, BOX, REP) ile moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen polimorfik bantlar UPGMA analiz yöntemi ile değerlendirilmiştir. İzolatlar arasında yüksek benzerlik olmasına rağmen benzerlik katsayı 0.89 hesaplandığında 60 *Xaj* izolatı 8 farklı gruba ayrılmıştır. Bu izolatlar arasındaki genetik farklılığın izole edildiği bitki dokusu ya da coğrafik köken ile net ilişkili olmadığını savunmaktadır. Sonuç olarak ceviz bakteriyel yanıklığı etmeninin genetik çeşitliliğini anlamak hastalıkla mücadele stratejilerini geliştirmek açısından önemlidir. *rep*-PCR yöntemi bitki patojenlerinin karakterizasyon çalışmalarında güvenilir bir yöntemdir.

Sırbistan'da 2010-2012 yılları arasında ceviz bahçelerinde yapılan bir çalışmanın amacı *Xaj* strainleri arasında genetik farklılığın olup olmadığını *rep*-PCR ve *gyrB* gen sekansı kullanılarak araştırmaktır. Bu bakteri hem bakteriyel yanıklık hem de erken meyve dökümüne neden olan uç yanıklığı hastalığının esas etmenidir. Bakteriyel yanıklığın varlığı ve yaygınlığı Sırbistan'da uzun yıllardır bilinse de farklı bölgelerdeki *Xaj* strainleri arasındaki farklılıklar üzerine çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada farklı ceviz alanlarındaki semptomlu meyvelerden izole edilen 59 *Xaj* izolatı kullanılmıştır. Morfolojik, biyokimyasal ve patojenisite testlerinden sonra moleküler çalışmalar için genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha sonra ERIC, BOX ve REP PCR primerleri kullanılarak PCR yapılmış ve oluşan DNA bant profilleri Unweighted Pair-Group Method (UPGMA) ile değerlendirilmiştir. *rep*-PCR sonucunda 15 *Xaj* straini 3 gruba ayrılmıştır. Sadece IZB 327 (Kladovo) straini hiçbir grupta yer almamışlardır. REP primerleri,

250 bp-10kb arasında bant oluşturmuş ve strainler arasındaki ayrımı genetik olarak ortaya koymada yetersiz olduğu görülmüştür. ERIC primerleri ise 200bp-10kb arasında bant oluşturmuş ve strainler 6 farklı grupta yer almıştır. *rep*-PCR sonuçlarına göre genetik farklılık coğrafik kökene bağlı değildir. Ayrıca genetik farklılığı daha fazla belirlemek için *rep*-PCR' da farklı gruplarda yer alan 15 *Xaj* straininin *gyrB* genine spesifik XgyrB1F/XgyrB1R primerleri ile PCR yapılmıştır. Sekans sonuçları NCBI veri tabanındaki *Xaj* strainlerinin hiçbirisi ile %100 benzerlik göstermemiştir. Tüm strainler %98'lik bootstrap değeri ile tek bir monofiletik grupta toplanmıştır (Ivanović et al., 2015).

Bu çalışmada, 5 ceviz çeşidi, *Juglans cinerea* L., *J. mandshurica* Maxim., *J. regia* L., *J. nigra* L., *J. ailantifolia* Carr. ve 2 hibrid çeşit olan *J. x bixbyi* Rehd (*J. cinerea* X *J. regia*) ve *J. x quadrangulata* (Carr.) incelenmiştir. Tipik bakteriyel yanıklık belirtileri gösteren 30 bitkiden örnekler alınmış ve 59 *Xanthomonas* benzeri izolat elde edilmiştir. 8 izolat *Xanthomonas* genusuna spesifik X1/X2 primerleri (Maes, 1993) ile PCR yapılmış ve 480 bp'de bant oluşturduğu gözlenmiştir. 8 izolatın 5'inde *XajF*-*XajR* pathovar spesifik primerleri kullanılmış ve 216 bp' de bant oluşturmuş ve bu 5 izolat *X.a. pv. juglandis* olarak tanımlanmıştır. Genetik farklılıkları belirlemek için total DNA üzerinden Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) ve *rep*-PCR yapılmıştır. MLSA için *gyrB* (DNA gyrase subunit B), *fyuA* (tonB-dependent receptor) ve *rpoD* (RNA polymerase sigma factor) housekeeping genleri kullanılmıştır. Tüm *Xaj* strainleri tek monofiletik grupta birleştirilmiş sekanslarının %98.2-100 benzerlik oranına göre gruplandırılmıştır. *rep*-PCR için REP-ERIC-BOX primerleri kullanılmış (Louws et al., 1994; Versalovic et al., 1991, 1994) ve bu yöntemin *Xaj* moleküler karakterizasyonu için uygun olduğu bildirilmiştir. *rep*-PCR sonucunda Litvanya ve Polonya *Xaj* strainleri arasında genetik çeşitlilik bulunduğundan dolayı 2 gruba ayrılmıştır. Ayrıca Litvanya'dan elde edilen 5 strain arasında hiçbir farklılık bulunmamıştır. Bu çalışma ile REP-PCR primerleri *Xaj* strain ayrımında en iyi primerler olduğu ve coğrafik farklılıkların *Xaj*'yi genetik olarak etkilediğini de kanıtlamıştır (Burokiene and Pulawska, 2012).

Polonya'da 6 bölgeden, ceviz bakteriyel yanıklığı belirtileri görülen yaprak ve ceviz meyveleri toplanmıştır. 23 bakteriyel izolat klasik yöntemlerle

yapılan tanılama testleri sonucunda *Xanthomonas arboricola* olarak tanılanmıştır. Ham ceviz meyvelerinde yapılan patojenisite testlerinde 23 izolatın 18'i bütün perikarpı kaplayan tipik siyah nekrotik lezyonlar oluşturmuş ve *Xaj* olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca, *Xanthomonas* genusuna spesifik olan X1/X2 primerleri ile yapılan PCR sonucunda 18 *Xaj* straininin *Xanthomonas* genusuna ait olduğu moleküler olarak da doğrulanmıştır. Strainler arasındaki genetik farklılığı belirlemek için genomik DNA elde edildikten sonra ERIC ve BOX PCR yapılmıştır. Sonuçlar UPGMA algoritması ile değerlendirilmiştir. I-391 referans izolatu diğer Polonya izolatlarından büyük oranda farklılık göstermiştir. Konkowola ve Motycz izolatları diğer Polonya izolatlarından farklı bir grup oluşturmuştur. Ayrıca ERIC ve BOX PCR sonucunda hem bölgesel hem de virülenslik düzeyi farklı olan izolatların farklı gruplarda yer almıştır. Özellikle ERIC-PCR'nin strainler arasındaki genetik farklılıkları ayrıntılı olarak gösteren en iyi yöntem olduğuna karar verilmiştir. Ek olarak 3 housekeeping gen (*fyuA*, *gyrB* ve *rpoD*) kullanılarak MLSA ile moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. I-391 izolatu rep-PCR'nin aksine çalışmadaki diğer izolatlarla gruplandırılmıştır. *Xaj* strainleri ERIC-BOX PCR sonucunda farklı gruplarda iken MLSA sonuçlarına göre aynı kümede yer aldığı vurgulanmıştır. Böylece Polonya izolatları arasında genetik farklılıktan dolayı heterojenlik olduğu vurgulanmıştır (Kaluzna et al., 2014).

Populasyon çeşitliliğini çalışmak amacıyla 4 yıl boyunca Romagna (İtalya) bölgesinden 77 *Xaj* izolatu toplanmıştır. Fenotipik değerlendirmeden sonra ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi ve 500 ppm bakır sülfat içeren Mannitol glutamat yeast agar besisi yerindeki koloni gelişimlerine göre sonuçlar değerlendirilmiş ve 3 farklı gruba ayrılmıştır. 7 izolat *in vitro* koşullarda 500 ppm'e kadar bakır dayanıklılığı göstermiştir. Fenotipik özellik ve bitki materyalinin orijini/yaşı dikkate alınarak seçilen 41 izolat için BOXA1R primerleri kullanılarak rep-PCR yapılmıştır. Bu strainler, 8 farklı haplotipe sahip olduğu için pathovar içi varyasyon göstermiştir. Farklı BOX profillerini temsil eden 20 izolatın ayrıca TR5b lokusu temel alınarak VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) analizi yapılmış ve 5 farklı sekans tipinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* ve *rpoD* housekeeping genleri kullanılarak Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) yapılmıştır. İtalyan izolatlarındaki çeşitlilik düzeyi, dünya genelindeki referans strainlerle aynı aralıkta olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışma

sonuçlarına göre üretim materyallerinin orjinlerinin farklı olmasından dolayı *Xaj* içindeki fenotipik ve genotipik çeşitliliğin fazla olduğu görülmüştür (Giovanardi et al., 2015).

2014 yılından bu yana, Nagano'da (Japonya) ticari ceviz yetiştiriciliği yapılan bölgelerin çoğunda cevizin (*Juglans regia*) yaprak, sürgün ve meyvelerinde kahverengimsi siyah noktalar gözlemlenmiştir. Ceviz meyvelerine yapılan inokulasyon ve re-izolasyon sonucunda elde edilen bakterini gram negatif, tek kamçılı çubuk şeklinde, aerobik, sarı-mukoid koloni, fizyolojik ve API 20NE ile yapılan biyokimyasal testler sonucunda *Xanthomonas* türüne ait olduğu belirlenmiştir. *Xanthomonas* izolatlarının ayrıca 16S rRNA ve *qumA* genlerini temel alan PCR testi, *atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD* housekeeping genlerinin birleştirilmiş sekanslarının kullanıldığı MLSA sonuçlarına göre *Xaj* olarak tanısı yapılmıştır. Ek olarak, *Xaj* straini ceviz bakteriyel yanıklığında (WB) *xopAH* geni ve yatay sıızan kanser (VOC) ise *xopB* geni olmak üzere 2 farklı kökene sahiptir. Hangi T3E genine sahip olduğunu belirlemek için yapılan PCR testi sonucunda patojenin *xopAH* genine sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca MLSA filogenetik ağacında da söz konusu izolatların WB strainleri ile aynı kümede yer aldığı ve Nagano bahçelerinde gözlemlenen simptomların WB simptomları ile benzer olduğunu doğrulamaktadır. Sonuç olarak, klasik ve moleküler tanılama ve karakterizasyon çalışmaları sonucunda etmen bakteriyel yanıklığa neden olan *Xaj* olarak kesin tanısı yapılmıştır. Bu çalışma Japonya'da *Xaj*'nin neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklığının varlığını kanıtlayan ilk çalışma olduğu bildirilmiştir. Dünyada yapılan çalışmaların çoğunda *Xaj*'nin heterojen bir dağılıma sahip olduğu kanıtlansa da bu çalışmadaki tüm *Xaj* izolatları arasında homojen dağılım görülmüştür (Sawada et al., 2017).

Kim et al. (2021), Gyeongbuk'da (Kore) *Xaj*'in neden olduğu ceviz bakteriyel yanıklığı ile ilgili 2016-2018 yıllarında ceviz plantasyonlarında yaptıkları bir çalışmada cevizlerde hastalık simptomlarının antraknoz ile çok benzer olduğunu gözlemlemiştir. Enfekteli çiçek, yaprak, sürgün, dal ve meyvelerden örnekler alınmış ve YDC besi yerinde gelişen tipik *Xanthomonas* benzeri kolonilerin konvansiyonel tanı yöntemleri sonucunda *Xaj* olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca *Xaj* izolatlarının moleküler tanısında 27F/1492R primerleri ile 16S rDNA ve X.

arboricola'ya spesifik *XajF/XajR* primerleri ile PCR yapılmış ve sekans sonuçlarına göre *Xaj* olduğu moleküler olarak tanımlanmıştır. *atpD*, *dnaK*, *efp* ve *rpoD* housekeeping genleri ile yapılan MLSA sonuçlarına göre Andong, İtalya ve Yeni Zelanda'daki genç ağaçlardan izole edilen *Xaj* strainleri aynı grupta yer alırken, Yeongyang ve Çin izolatları kendi aralarında yüksek oranda benzerlik göstermektedir. 4 housekeeping geninin birleştirilmiş sekans sonuçlarına bakıldığında farklı lokasyonlardan elde edilen *Xaj* strainleri arasında genetik farklılıkların olduğu açıkça görülmektedir. *Xaj* strainlerinin patojenisitesini belirlemek için 3 yaşındaki ceviz fidanlarına bakteri süspansiyoları yapraklara spreyleme şeklinde inokule edilmiştir. 1 hafta sonra yapraklarda sarı haleli açık kahverengi lekeler, meyvelerde ise kahverengi lekeler görülmüştür. Simptom görülen tüm dokulardan *Xaj*'nin Koch postulatlarına göre re-izolasyonu yapılmıştır. Diğer yandan hastalık belirtileri *Colletotrichum gloeosporioides*'in neden olduğu antraknoza çok benzediği belirtilmiştir. Ceviz fidanları *Xaj* ve *C. gloeosporioides* ile birlikte inokule edildiğinde hastalık belirtilerinin teksele uygulamaya göre daha şiddetli olduğu gözlenmiştir. *Xaj* popülasyonu mart ayındaki dormansiden dolayı nisan ayında artış gösterdiği görülmüştür (Kim et al., 2021).

Hubei (Çin) çevresinde 2015-2027 yılları arasında ceviz bakteriyel yanıklık belirtisi görülen cevizlerden örnekler toplanmıştır. Elde edilen 206 izolattan 59 tanesi morfolojik ve moleküler tanı yöntemleri sonucunda *Xaj* olarak kesin tanısı yapılmıştır. 60 *Xaj* izolatının (Hubei'den 59 ve Beijing'ten 1 izolat) MLSA ile genetik farklılıkları değerlendirilmiş ve bakıra karşı dayanıklılıklarına bakılmıştır. *atpD-dnaK-glnA-gyrB* housekeeping genleri yapılan MLSA yapılmış olup neighbour-joining dendrogramı oluşturulmuştur. 60 izolat 2 ana gruba ayrılmıştır. Grup I'de 45 izolat (Danjiangkou, Baokang ve Suizhou), Grup II'de geri kalan 15 izolat yer almıştır. *glnA* gen sekansında en fazla polimorfizme rastlanmıştır. *atpD* bölgesinde ise sadece bir nükleotitde polimorfizm görülmüştür. MLSA sonuçlarına göre *gyrB* gen bölgesi fazla korunmuş olduğu için 60 *Xaj* izolatında da nükleotitler arasındaki değişim görülememiştir. *Xaj* izolatlarının genetik farklılıkları yönünden Ivanovic ve arkadaşlarının (2015) Sırbistan'da yaptıkları çalışma sonuçları ile benzer sonuçlar elde ettiklerini bildirmiştir. Bu sebeple genetik çeşitlilik çalışmalarında sadece *gyrB* geninin dikkate alınmaması gerektiğini savunmaktadır. *Xaj* izolatların bakır dayanıklılığı çalışmalarında ise referans *Xaj* DW3F3 izolatının

en düşük engelleme Cu^{+2} konsantrasyonu 115 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bakıra dayanıklılık eşik değeri 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ belirlenmiş olup izolatlardan 47'si duyarlı ve 13'ü dayanıklı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca 5 izolatın bakıra dayanıklılık eş değeri 270 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'dir. Duyarlı ve dayanıklı izolatların bakıra dayanıklılık geni (*copB*) ile de moleküler olarak karşılaştırılması yapılmıştır (Fu et al., 2021).

Ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığının esas etmeni olan *Xaj* ile ilgili yapılan çalışmalarda hastalık belirtisi görülen bitki dokularından elde edilen bazı izolatların patojenisite testleri sonucunda belirti oluşturmadağı görülmüştür. Bilindiğı gibi *X. arboricola* türü hem patojen hem de patojen olmayan strainlere sahiptir. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda söz konusu izolatların *X. arboricola* pv. *juglandis* ile aynı grupta yer almadığı ve farklı bir grup oluşturdukları belirtilmiştir. Bu yeni tür *Xanthomonas euroxanthae* olarak isimlendirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda *Xaj* olduğu düşünülen bazı izolatların da bu çalışmalar sonucunda *X. euroxanthae* olduğuna karar verilmiştir (Fernandes et al., 2021; Martins et al., 2020).

Xanthomonas arboricola birçok sert çekirdekli ve sert kabuklu meyvelerde önemli hastalıklara neden olmaktadır (Lamichhane, 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, simptomatik ve asimptomatik bitki dokularından çoğunlukla patojen olmayan *X. arboricola* elde edilmektedir. Patojen olmayan *Xanthomonas* pathovarları ve konukçuları arasındaki ilişkilerin hala tam olarak bilinmediğini ortaya koymaktadır. İlginçtir ki, *Xanthomonas* genusu içinde *X. arboricola* türü birçok patojen olmayan straine de sahiptir (Merda et al., 2016). Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda patojen olmayan *X. arboricola* strainlerinin patojen olanlardan filogenetik olarak oldukça farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca, MLSA ile yapılan çalışmalarda cevizden izole edilen patojen ve patojen olmayan *X. arboricola* strainlerinin pv. *juglandis* ile aynı grupta yer almadığı görülmüştür (Essakhi et al., 2015; Fernandes et al., 2018).

Portekiz'de tek bir ceviz ağacından bakteriyel yanıklık belirtileri görülen yaprak ve meyvelerden ve hastalık belirtisi görülmeyen sürgünlerden örnekler alınmıştır. Klasik tanı testleri sonucunda *Xanthomonas* olduğuna karar verilen izolatların ham ceviz meyvelerinde (cv. Hartley) patojenisite testleri yapılmış ve

CPBF 424 ve CPBF 1480 no'lu izolatlar ve pozitif kontrol yapraklarda tipik nekrotik lekeler oluşturunca, CPBF 367 no' u izolat ve negatif kontrol herhangi bir semptom oluşturmamıştır. . Biolog GEN III metabolik profillemeye sonuçları CPBF 367 ve CPBF 424 strainleri ve diğer *Xanthomonas*lar arasında bazı farklılıkların olduğunu ortaya koymuştur. 7 housekeeping gen (*fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*) ile yapılan MLSA analizinde söz konusu izolatlar *Xaj* ile farklı gruplarda yer alırken *Xanthomonas prunicola* ve *Xanthomonas arboricola* pv. *populi* ile aynı grupta yer almışlardır. “Average nucleotide identity (ANI)” analiz sonuçlarına göre her iki izolatın *X. arboricola* strainleri ile benzerlik oranı %93'ten düşüktür. ANI ve dijital DNA-DNA hibridizasyon benzerlik değerleri 89'dan düşük ve %50 oranında *Xanthomonas arboricola* olmayan strainler ile eşleşmiştir. Daha önce tanımlanan *Xanthomonas* türüne ait olmadığını ortaya koymaktadır. Buna ek olarak, bu iki strain birbirleri ile %98 oranında benzerlik göstermektedir. Genomik analiz sonuçlarına göre CPBF 424 tüm Type III secretion system ve bazı type III effector proteinlerine sahipken tam tersi olan CPBF 367 straininin ise patojenik olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar dikkate alındığında CPBF 367 ve CPBF 424 izolatları yeni bir tür olan *Xanthomonas euroxanthea* sp. nov., olarak isimlendirilmiştir (Martins et al., 2020).

Loures bölgesinde (Portekiz) bulunan aynı ceviz ağacından izole edilen, *Xaj* ve *Xanthomonas euroxanthea* ile yapılan *Xanthomonas* soy ağacı çalışmalarına göre cevizle ilgili *Xanthomonas* grubu patojen ve patojen olmayan strainleri içermektedir. *Xanthomonas euroxanthea* CPBF 367 dışındaki diğer izolatlar cevizde patojendir. *acnB*, *fyuA*, *gyrB* ve *rpoD* genleri kullanılarak yapılan MLSA analizi sonuçlarına göre CPBF 427 izolatı diğer *Xaj* izolatları ile gruplandırılırken CPBF 367, CPBF 424 ve CPBF 426 izolatları yeni tür olan *X. euroxanthea* olarak gruplandırılmıştır. Bu ortak kolonizasyonun sonuçları henüz tam olarak bilinmese de türe özgü adaptasyonların araştırılması için *X. euroxanthea* (CPBF 367, CPBF 424 ve CPBF 426) ve *Xaj* (CPBF 427) strainlerinin kromozom dizi analizleri arasındaki tutarlılığı sağlamak için Illumina ve Nanopore yöntemleri ile sekansları yapılmıştır. 4 strainin (CPBF 427, CPBF 367, CPBF 424 ve CPBF 426) Illumina ve Nanopore okumalarına göre CPBF 367 ve CPBF 426 strainlerinde tek bir plasmid olduğu ve tek bir kromozomal yapının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Genom içerikleri karşılaştırıldığında G+C oranı hepsine %65'e yakın bulunurken

rRNA operonları ve 5S tRNA gibi diğer içeriklerde oldukça önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. 4 izolatın genom büyüklüğü karşılaştırıldığında *Xaj* (CPBF 427) (5.23 Mb) izolatı ilk sırada yer almaktadır. Ayrıca genel genomik özelliklere göre CPBF 427 izolatı genom büyüklüğü, sayı ve CDSs içeriği yönünden *Xaj* ile benzer genoma sahipken *X. euroxanthea* strainlerinin *Xaj* ile benzerliği düşüktür. Tüm genom karşılaştırmaları yapıldığında *Xaj* ve *Xanthomonas euroxanthea* arasında Tip 3 salgı sistemi (T3SS) ve tip 3 efektörleri (T3E), diğer salgı sistemleri, kemotaksis ile ilgili proteinler ve ekstraselüler enzimler gibi önemli genomik farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirilecek olursa *X. euroxanthea*'nin genomundaki farklılıklar ceviz ile ilgili *Xanthomonas*ların patojenisitelerinin ortaya çıkışını ve evrimsel sürecini değerlendirmede önemli olabilir (Fernandes et al., 2021).

Xanthomonas arboricola türü 9 pathovarı kapsamaktadır. *pv. juglandis* (*Xaj*) cevizde bakteriyel yanıklık ve uç nekrozu (BAN) hastalığa neden olurken, *pv. corylina* (*Xac*) fındık bakteriyel yanıklığına neden olmaktadır. Son yıllarda söz konusu hastalıkların yaygınlaşması ve verim kayıplarındaki artışlar nedeniyle *X. arboricola*'nın bu iki pathovarı dikkat çekmektedir. Konukçu dağılımına bakıldığında filogenetik olarak birbirine yüksek oranda benzeyen strainler 3 farklı kümede yer almaktadır. *pv. juglans* farklı sınıflarda yer alsa da homojen strain grubuna sahip değilken *pv. corylina* 2 ana gruba ayrılmaktadır.

Son yıllarda ise MLSA yöntemi kullanılarak seçilen housekeeping genlerinin sekansına dayalı tanılama ve taksonomik konumunun belirlenmesinde önemli olmuştur (Young et al., 2008; Webber et al., 2020). *X. arboricola* pathovarları arasındanki ayırım ve *Xac* strainlerinin belirlenmesinde *rep*-PCR (BOX, ERIC, REP) spesifik primerleri kullanışlı bulunmuştur (Pulawska et al., 2010, Scortichini et al., 2001).

pv. juglandis ve *pv. corylina* neden olduğu hastalıkların epidemiyolojisini daha iyi anlayabilmek, pathovarlar ile ilgili genetik veriler elde etmek ve hastalıklarla etkili mücadele stratejilerini geliştirebilmek için akrabalık ilişkileri araştırılmıştır. Tür içindeki farklılığı belirlemek için 7 housekeeping gen ile yapılan MLSA'da 2 farklı monofilogenetik grupta yer almaktadır. Daha az gen ya da sadece

gyrB geni ile yapılan analizlerde *Xaj* ve *Xac* strainleri birbirinden ayırt edilemez çünkü bu gruptaki *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) gibi diğer pathovarlar da aynı *gyrB* genini bulundurmaktadır. MLSA analizleri sonucunda *Xaj*, *Xac* ve *Xap* konukçuya özelleşmiş strainler üç klonal kompleks oluşturmuşlardır. Sık haplotiplerin sınırlı sayıda oluşturduğu epidemik klonların ayırt edildiği A Grubu (*Xaj*, *Xac* ve *Xap* pathovarları); yüksek rekombinasyona sahip farklı strainlerin oluşturduğu B Grubu (başarısız pathovarlar ve düşük ya da hiç olmayan patojenisite); *X. arboricola*'nın B grubu ve farklı soyları içeren C grubu aynı konukçudan izole edilen *Xaj* ve *Xap* benzeri izolatları kapsamaktadır. Ayrıca, Portekiz'de *J. regia* 'dan izole edilmiş patojen ve patojen olmayan strainler yeni bir tür olan "*Xanthomonas euroxanthea*" olarak sınıflandırılmıştır. Bu yeni tür C grubunda farklı bir soy ağacı grubu oluştururken *J. regia* (Fransa) ve *Phaseolus vulgaris*' en (USA) izole edilen ve patojen olmayan bu strainler de C grubunda yer almaktadır. Bu çalışmada; farklı bölgelerdeki strainlerin aynı genetik profile sahip olduğu görülürken tam tersine İtalya'da Emilia Romagna bölgesinden elde edilen *Xaj* strainleri arasında genetik farklılık olduğu görülmüştür. Ayrıca tek bir yaprak farklı *Xaj* strainlerinin konukçusu olabilmektedir. Bu da dünyadaki farklı çoğaltma materyallerinin değiş tokuşu sebebiyle farklı sekans türlerinin yayılmasına sebep olmaktadır (Kaluzna et al., 2021).

Portekiz'de yapılan bir çalışmada ise, cevizdeki *Xanthomonas* popülasyonu hakkında yeni veriler edinmek için cevizde kolonize olan *Xaj* çeşitliliğini etkileyebilecek faktörleri temel alan kapsamlı bir örnekleme çalışması yapılmıştır. 64 ceviz ağacından elde edilen 131 *Xanthomonas* izolatlarının genetik çeşitliliği MLSA ve dot blot hibridizasyon yöntemi ile ortaya konulmuştur. İzolasyon yılı, biyoklimatik bölgeler, yetiştiricilik yöntemleri ve konukçu ilişkisi temelli epidemiyolojik veriler dikkate alınmıştır. İzolatların çoğu *Xaj* ile ilişkili 17 gruba ayrılırken diğer izolatlar *Xaj* ile ilişkili olmayan 4 gruba ayrılmıştır. Söz konusu olan 4 grup, *X. arboricola*'nın 3 kökeni ve yeni tür olarak kabul edilen *X. euroxanthea* olmak üzere *Xanthomonas* spp.'nin 11 kökeni ile eşleşmiştir. Ayrıca *Xaj*, *X. arboricola* ve *Xanthomonas* spp. aynı ceviz ağacından izole edilmiş olup aynı konukçada genetik çeşitliliğin olabileceğini göstermektedir. Filogenetik analizler de *Xanthomonas* spp. popülasyonunda yüksek oranda farklılıkların olduğunu kanıtlamıştır. Tip 3 salgı genlerinin değerlendirilmesi sonucunda *X.*

euroxanthea CPBF 424 hariç bazı *Xanthomonas* spp. strainlerinin cevizde patojen olmadığı görülmüştür. Yapılan bu çalışma ile cevizle ilişkili *Xanthomonas*'ların karakterizasyonu çalışmaları yapılmış olup hem risk analizlerine katkıda bulunulmuş hem de bitki sağlığı çalışmalarını iyileştirmek için yeni adımların atılmasını sağlayacaktır (Fernandes et al., 2021).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Bakteriyel ve fungal materyal

Çalışmanın bakteriyel ve fungal materyalini; Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illeri ceviz plantasyonlarından toplanan bitki örnekleri ile ceviz yaprak ve meyvelerinden izole edilen bakteriyel ve fungal izolatlar oluşturmuştur.

3.1.2. Bitki materyali

Ham ceviz meyvelerinde patojenisite çalışmalarında; ‘Chandler’ ceviz çeşidi ile çalışmalar yürütülmüştür.

3.1.3. Çalışmada kullanılan besi yerleri

Bakteriyel etmenlerin izolasyon çalışmalarında YDC (Yeast Dextrose Calcium Agar) besi yeri ve selektif besi yeri TMM (Tween Modified Medium) kullanılmıştır. Fungal etmenlerin izolasyonu ve çoğaltılmasında streptomycin içeren (100 mg/l PDA (Potato Dextrose Agar) kullanılmıştır (Schaad et al., 2001) (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Bakteriyel ve fungal etmenlerin izolasyonunda kullanılan besi yerleri ve içerikleri.

Besiyeri adı	Kullanım amacı	İçeriği (1 lt)
YDC (Yeast Dextrose Calcium Agar)	Bakteriyel etmenlerin izolasyonu, sarı pigment oluşumu	10 g Yeast-extract 20 g Glucose 20 g CaCO ₃ 12g Agar
TMM (Tween Modified Medium)	Bakteriyel etmenlerin izolasyonu, prespirasyon zonu oluşumu	10 g Peptone 10 g Potassium bromide 0,25 g CaCl ₂ 15g Agar Otoklavlandıktan sonra, 10 ml Tween 80 75 mg Cycloheximide 25mg Cephalixin 6 mg 5-fluorouracil 0,4 mg Tobramycin
PDA (Potato Dextrose Agar)	Fungal etmenlerin izolasyonu	39 g Potato Dextrose Agar otoklavlandıktan sonra; 100 mg/lt oranında streptomycin ilave edilmiştir.

3.1.4. Moleküler çalışmalarda kullanılan materyaller

DNA izolasyonunda; Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (Norgen, Biotek Corp.), mikropipetler, santrifüj, ısı bloğu, eppendorf tüpler ve vorteks cihazı kullanılmıştır.

PCR işleminde; PCR Master Mix (Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye, grisp), double steril saf su, PCR tüpleri (Thermo), mikropipetler, thermocycler (Eppendorf), primerler, jel elektroforez cihazı (Hoefer Scientific), farklı konsantrasyonda bufferlar, vorteks cihazı, DNA ladder kullanılmıştır. Agaroz jel fotoğrafları jel görüntüleme cihazında (ETX-20.M) görüntülenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Survey çalışmaları

Surveyde incelenen ceviz plantasyonları survey bölgesindeki ceviz yetiştiriciliği yapılan alanları temsil edecek şekilde örnekleme yapılmıştır (Lazarov and Grigorov, 1961). Survey çalışmaları, 2018 ve 2019 yılları, Mayıs-Ağustos aylarında üretim sezonu boyunca aylık ziyaretler şeklinde gerçekleştirilmiştir. Survey yapılan il ve ilçelerin seçiminde ceviz plantasyonları büyüklüğünün yanı sıra daha önce bu illerde her iki hastalıkla ilgili tespit veya şikayet bulunması kriterleri de dikkate alınmıştır.

Surveylerde hastalık oranı ve yaygınlığının belirlenmesi amacıyla ceviz yetiştiriciliğinin en çok yapıldığı Balıkesir, Çanakkale ve Manisa ili ve ilçelerinde hastalık belirtisi görülen bitki örnekleri toplanmıştır.

Tablo 3.2’de görüldüğü gibi Balıkesir, Çanakkale ve Manisa illerinde örnekleme yapılan bahçelerin seçiminde ilçeler bazında toplam ağaç sayısı en yüksek olan 4’er ilçe seçilmiştir. Bu nedenle Manisa için toplam ağaç sayısı 70.000’den fazla olan ilçeler, Balıkesir ili için toplam ağaç sayısı 20.000’den fazla olan ilçeler, Çanakkale için toplam ağaç sayısı 60.000’den fazla olan ilçelerde survey yapılmıştır.

Tablo 3.2. Balıkesir, Çanakkale ve Manisa illerinde ceviz survey alanlarına ait genel bilgiler.

İl	İlçe	Ceviz Alanı* (da)	İncelenen Alan (da)	Toplam Ağaç Sayısı (adet)	İnceleme Yapılan Bahçe Sayısı (adet)
Balıkesir	Bandırma	1.630	16	19.358	3
	Dursunbey	1.000	10	25.000	2
	Kepsut	3.000	30	47.100	6
	Sındırgı	6.550	65	65.100	12
Çanakkale	Biga	3.300	33	62.100	6
	Bayramiç	3.550	35	69.600	7
	Ayvacık	3.960	39	77.510	8
	Ezine	4.300	43	74.950	8
Manisa	Akhisar	5.000	50	70.900	10
	Gördes	5.600	56	78.300	11
	Salihli	5.750	57	197.350	11
	Kula	7.811	78	82.705	16
TOPLAM		51.451	512	869.973	100

Ceviz ağaçlarında üretim sezonu boyunca Manisa, Balıkesir ve Çanakkale il ve ilçelerinde toplamda 100 bahçe incelenmiştir (Tablo 3.2).

Bahçelerde, il ve ilçeleri temsil edecek şekilde üretim alanının %1'lik bölümünde çiçeklenme döneminden başlayarak meyve dönemi dahil aylık gözlemler tesadüfi örnekleme yöntemine göre yapılmıştır. Ayrıca, GPS cihazı ile survey yapılan bahçelerin koordinatları kaydedilmiştir.

Bahçe içinde incelenen ağaç sayısı bahçedeki toplam ağaç sayısı dikkate alınarak (Tablo 3.3) Lazarov and Grigorov (1961)'a göre belirlenmiştir.

Tablo 3.3. Bahçedeki toplam ağaç sayısına göre incelenen ağaç sayısı.

Bahçedeki ağaç sayısı	İncelenecek ağaç sayısı
20	20
21-70	10-30
71-150	31-40
151-500	41-80
501-1000	76-150 (%15)
>1000	>150 (%5)

Ceviz plantasyonlarından hastalık belirtisi görülen yaprak, sürgün ve meyve örnekleri alınarak öncelikle makroskobik olarak değerlendirilmiş ve daha sonra kese kağıdına konulup buz kutusu içerisinde üzerinde üretici adı, örnek numarası, bahçe büyüklüğü ve yeri, ceviz ağacı çeşidi gibi bilgiler bulunan örneğe ait survey bilgi formuyla birlikte izolasyon çalışmaları için laboratuvara getirilmiştir.

Survey çalışmalarının yürütüldüğü köy, ilçe ve illerdeki hastalık yaygınlık oranlarının hesaplanmasında tartılı ortalama kullanılmıştır. Bu amaçla her ceviz bahçesinde hastalık belirtisi gösteren ağaçlar toplam ağaç sayısına oranlanarak o ceviz bahçesindeki hastalıklı bitki ve yüzdeleri tespit edilmiştir. Daha sonra tartılı ortalama ile o bölgeye ait yaygınlık oranları bulunmuştur (Bora ve Karaca, 1970).

$$\Sigma (\text{Hastalıklı meyve sayısı} \times \text{Gözlem yapılan meyve sayısı})$$

$$\text{*Hastalık Bulunma Oranı (\%)} = \frac{\text{-----}}{\text{Toplam meyve sayısı}} \times 100$$

Toplam meyve sayısı

Survey alanındaki her bir bahçede gözlem yapılan ağaçlarda bakteriyel yanıklık ve BAN'ın varlığı yüzde (%) olarak kaydedilmiş ve bahçedeki hastalık bulunma oranları (%) elde edilmiştir (Bora ve Karaca, 1970).

$$\text{Yaygınlık oranı} = \frac{\Sigma (\%) \text{ Bahçedeki hastalık oranı} \times \text{Bahçe alanı (dekar)}}{\text{Maksimum Hastalık Oranı}} \times 100$$

Yukarıdaki formül yardımıyla söz konusu hastalıkların il ve ilçe düzeyindeki yaygınlık oranları yüzde (%) olarak elde edilmiştir (Özgönen ve Kılıç, 2009).

3.2.2. Bakteriyel etmenlerin izolasyon çalışmaları

Bakteriyel yanıklık

Hastalık etmeni bakteri (*Xaj*) izolasyonu yaprak, sürgün ve meyvelerde hastalık belirtisi görülen bitki dokularından yapılmıştır. Laboratuvara getirilen bitki örneklerinden steril bistüri ile kesilen örnekler %1'lik sodyum hipoklorit (NaClO) ile 2-3 dakika yüzeysel dezenfeksiyon yapılmıştır. İki kez steril saf suda yıkanıp ve steril kurutma kağıdında kurutulduktan sonra steril havanda ezilmiştir. Daha sonra az miktarda steril saf su eklenerek hazırlanan süspansiyondan 100 µL YDC besi yerine ekim yapılmış ve 2-3 gün 24-25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sarı pigment oluşumu gözlemlenmiştir. Ayrıca bakteriyel etmen izolasyonu ve presipitasyon zonu oluşumunu gözlemek amacıyla TMM selektif besi yeri

kullanılmıştır (Shcaad et al., 2001). Besi yerinde gelişen bakteriyel etmen koloni morfolojisine göre değerlendirilmiştir. YDC besisi ortamında parlak sarı renkte koloni ve levan oluşturan bakteri kolonileri ise TMM besisi yerine ekilmiş ve presipitasyon zon oluşumu gözlenmiştir (Shcaad et al., 2001). Bakteriyel izolatlar daha sonraki çalışmalarda kullanmak üzere +4°C’de ve %15 gliserol solüsyonu içerisinde – 80°C’de saklanmıştır (Martini and Bertolini, 2012).

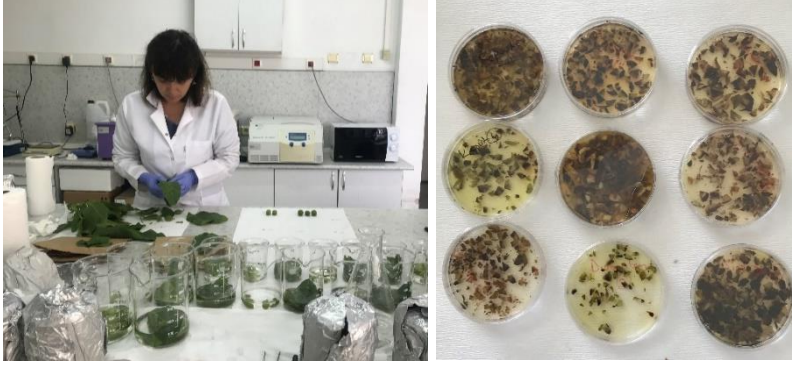
Uç nekrozu (BAN)

Hastalık etmenlerinin izolasyonu, hastalık belirtisi görülen ceviz meyvesinden fungal ve bakteriyel etmenler için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Alınan meyve örneklerinden *Xaj* izolasyonunda ceviz meyveleri %5’lik NaClO ile 3-4 dakika yüzeysel dezenfeksiyon yapılmıştır. İki kez steril saf suda yıkanıp ve steril kurutma kağıdında kurutulduktan sonra meyvelerin apikal ucundaki infekteli meyve dokusu, steril bistüri ile atılıp belirti görülen kısımdan örnek alınmış ve iki bistürü yardımıyla steril saf su ile parçalanmıştır. Bu işlem sonrasında YDC besisi yerine ekim yapıp 48-72 saat 24°C’de inkubasyona bırakılmış ve gelişen bakterilerin koloni morfolojisi değerlendirilmiştir. YDC besisi yerinde palak-sarı renkte ve levan oluşturan *Xanthomonas* benzeri bakteri kolonileri saflaştırılarak prespiritasyon zonu oluşumunu gözlemlemek için TMM selektif besisi yerine ekilmiştir (Shcaad et al., 2001).

3.2.3. Fungal etmenlerin izolasyon çalışmaları

Laboratuvara getirilen BAN belirtisi görülen meyvelerden mezokarp, endokarp ve tohum kısmından örnekler alınmış ve steril bistüri ile kesilen meyve dokuları %1’lik NaClO ile 2-3 dakika yüzeysel dezenfeksiyon yapılmıştır. Steril destile sudan iki defa geçirilen ve steril olarak kurutulan parçalar streptomycin içeren (100 mg/lt) PDA besisi yerinde her petriye dört parça ile ekim yapılmış ve 24°C’de 7 gün inkubasyona bırakılmıştır (Akat et al., 2016). Besi yerinde gelişim gösteren funguslar saflaştırılmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’de ve %15 gliserol solüsyonu içerisinde – 80°C’de saklanmıştır (Martini and Bertolini, 2012).



Şekil 3.1. Bakteriyel (sol) ve fungal (sağ) etmenlerin izolasyon çalışmaları.

3.2.4. Bakteriyel etmenlerin klasik tanı çalışmaları

YDC besi yerinde gelişen *Xanthomonas* benzeri bakteri kolonileri saflaştırılarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler ile klasik tanısı yapılmıştır (Lelliott and Stead, 1987; Schaad et al., 2001). İzolasyon sonucunda koloni morfolojisine göre elde edilen bakteriyel izolatlar, YDC besi yerinde sarı mukoid gelişimi ve TMM besi yerinde presipitasyon zonu oluşumuna göre morfolojik değerlendirme yapılmıştır. YDC besi yerinde sarı mukoid gelişen ve TMM besi yerinde engelleme zonu oluşturan bakteri kolonileri ile klasik tanılama çalışmalarına devam edilmiştir. 24-48 saatlik bakteri kültürlerinden, inokulum yoğunluğu (UV visible spektrofotometre, OD_{600nm} : 0.45, 10^9 CFU/ml) ayarlanarak bakteri süspansiyonları hazırlanmış ve domates/tütün fideleri yapraklarına steril şırınga ile enjekte edilmiştir. 24-48 saat sonra domates/tütün yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyon belirtisi gösterenler (HR+) pozitif olarak değerlendirilmiştir (Obradovic, 2010; Schaad et al., 2001). Domates yapraklarında HR belirtilerinin gözlenmesi *Xanthomonas arboricola* tanısında tütünde HR testinden daha duyarlı sonuç vermesi nedeniyle tercih edilmektedir. HR (+) değerlendirilen bakteriyel izolatların tanısı, King B'de floresen pigment oluşumu, LOPAT testleri (Levan oluşumu, Oksidaz testi, Pektolitik aktivite, Arginin dehidrolaz, Tütünde aşırı duyarlılık testi) (Klement et al., 1966), GATTa testleri (jelatin hidrolizi, aesculin hidrolizi, tyrosin aktivitesi, tartaric acid kullanımı), nişastanın hidrolizi, anaerobik gelişim, karbon kaynaklarının kullanımı (arabinose, mannose, glukoz, fruktoz, trehalose, ve cellobiose) (Ayers et al., 1919) ve ham ceviz meyvelerinde patojenisite testleri ile devam etmiştir.

Levan oluşumu

Nutrient Agar + %5 sukroz ile hazırlanan besi ortamında 48 saat sonunda gelişen bakteri kolonilerinde kubbemsi yapı oluşturanlar değerlendirmeye alınmıştır (Obradovic, 2010; Schaad et al., 2001).

Oksidaz testi

Nutrient Agar + %1 glikoz ile hazırlanan besi ortamına 24–48 saat önceden ekilen bakteri kültürleri, kurutma kağıdına bir damla %1’lik tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride’ den damlatılıp bakteri kültürü bu bölgeye sürülmüş ve kurutma kağıdında 60 sn’den sonra mavi renge dönüşmeyen izolatlar negatif (-) olarak değerlendirmeye alınmıştır (Obradovic, 2010; Schaad et al., 2001).

Patateste çürüklük testi

Testte kullanılacak patatesler yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra enine halkalar şeklinde kesilmiş ve steril petride kurutma kağıdının üzerine yerleştirilmiştir. Patates halkasının ortasına steril bistüri yardımı ile küçük oyuklar açılmış ve King B’ de gelişen bakteri kolonilerinden alınarak bu oyuklara konulmuştur. Daha sonra kurutma kağıdı steril su ile nemlendirilerek oransal nem sağlanmıştır. 27°C’de ve 3–4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Patates yüzeyinde çürüme oluşturmeyen bakteri izolatları dikkate alınmıştır (Obradovic, 2010; Schaad et al., 2001).

Arginin dehidrolaz testi

Bu test için besi yeri aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

	<u>11</u>
Peptone	1 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Agar	3 g
Phenol red	1 mg
Arginine HCl	10 g

Besi yerinden cam tüplere 3 ml konulduktan sonra otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonra besi yerine ekilen bakterilerin üzerine 2 ml steril parafin eklenmiş ve 27°C’de 7–15 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda negatif olanlar yani pembe-kırmızı olanlar değerlendirmeye alınmıştır (Schaad et al., 2001; Thornley 1960).

Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu

Bakteriyel izolatların 10⁸ cfu/ml’ lik süspansiyonları hazırlanmış ve tütün fidelerinin yapraklarına steril şırınga ile inokule edildikten sonra tütün bitkileri iklim odasında 27°C’de 48 saat bekletilmiştir (Obradovic, 2010; Schaad et al., 2001). 48 saat sonunda tütün yapraklarında nekrotik alanlar oluşturan bakteriyel izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Jelatin hidrolizi

Bu test için kullanılan besi yerinin formülü aşağıda belirtilmiştir.

	<u>11</u>
Peptone	5 g
Beef extract	3 g
Jelatin	120 g

Hazırlanan besi yerine 50°C’de eritilmiş jelatin eklendikten sonra pH 7–7,2’ye ayarlanmıştır. Tüplere 5 ml konmuş ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilmiştir. Tüplere bakteri ekildikten sonra 24-25°C’de 7–14 gün inkübasyona bırakılmıştır. *Xaj* benzeri bakteriler için tüpteki jelatin akıcı ve test sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir. (Obradovic, 2010; Schaad et al., 2001).

Aesculin hidroliz testi

Bakteriyel izolatların aesculin hidroliz testi için kullanılan bazal ortam aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmış ve pH değeri 7,0’ye ayarlanmıştır.

	<u>11</u>
Peptone	10 g
Aesculin	1 g
Sodium citrate	1 g
Ferric citrate	0.05 g

Besi yeri cam tüplere 5'er ml konduktan sonra otoklavda 121°C'de 20 dk sterilize edilmiştir. Daha sonra tüplere bakteri ekimi yapılmış ve 27-28°C'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besi yerinde kahverengi-siyah renk değişimi gözlenen bakteriyel izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sneath, 1956).

Karbon kaynaklarının kullanımı testi

Bakterilerin karbon kaynaklarından yararlandıklarını belirlemek için kullanılan bazal ortam aşağıda belirtilen formüle göre hazırlanmıştır.

	<u>11</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
KCl	0.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
Bromthymol blue	0.08 g
Damıtık su	900 g
Agar	14 g

Bromthymol blue 5 ml %95'lik alkode çözündürülüp 1 ml eklendikten sonra pH değeri 7.1'e ayarlanmış ve üzerine agar ilave edilmiştir. 100°C'de eritilip ve cam tüplere 4.5 ml konulmuştur. Testte kullanılan karbohidratlardan (arabinose, mannose, glukoz, fruktoz, trehalose, cellobiose, tyrosin, tartaric asit) %10'luk stoklar hazırlanmıştır. Eritilip pH değeri 7.0' a ayarlandıktan sonra steril bakteri filtresinden geçirilmiştir. Kullanılan karbohidratlardan her tüpe 0.5' er ml eklenmiştir. Bakteriler ekildikten sonra 24°C'de 7-15 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerde maviden sarıya dönen renk değişimi karbohidrat kaynaklarının kullanıldığını ve asit oluşumunu göstermektedir. Renk değişimi gösteren izolatlar (+) değerlendirilmiştir (Schaad et al, 2001).

Nişastanın hidrolizi

Bakteriyel izolatların nişastanın hidrolizi testinde kullanılan besi yeri aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmış ve pH değeri 6.5 olarak ayarlanmıştır.

	<u>11</u>
Pepton	5 g
Beef extract	5 g
Yeast extract	5 g
Eriyebilir nişasta	2 g
Agar	15 g

Nişasta ayrıca 10 ml suda eritildikten sonra bu karışıma agar ilave edilmiştir (28 g/lt nutrient agar). Bakteriler petrilere çizgi ekim yöntemi ile ekildikten sonra 2-7 gün 24°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol için hazırlanan lugol solüsyonundan (1 g Iyod, 2 g KI ve 300 ml saf su) ekim yapılan petrilere damlatılmıştır. Mavi renk oluşturan bakteriler negatif, mavi renk oluşturmeyen ancak çizgi ekim yapılan bakteri çevresinde açık renk hale oluşturanlar ise pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schaad et al, 2001).

Anaerobik gelişme testi

Besi yeri aşağıda belirtildiği gibi hazırlandıktan sonra pH 7,1 olarak ayarlanmıştır.

	<u>11</u>
Pepton	2 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
Agar	2 g
Bromthymol blue (%1’lik solüsyon)	15 g

Cam tüplere 5 ml bazal ortam konulduktan sonra otoklavda 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir. Ayrıca hazırlanan %10’luk glukoz solüsyonu steril bakteri filtresinden geçirilerek sterilize edilmiş besinin bulunduğu her bir tüpe 0,5 ml eklenmiştir. Bakteriler tüplere ekildikten sonra üzerini kapatacak miktarda

steril sıvı parafin döküldükten sonra 24°C'de inkubasyona bırakılmıştır. Başlangıçta mavi-yeşilimsi olan renk eğer sarı renge dönmüş ise bakterinin anaerobik gelişim gösterdiğine karar verilmiştir (Hugh and Leifson, 1953).

3.2.5. Fungal etmenlerin klasik tanı çalışmaları

Çalışmada elde edilen fungal izolatlar makroskobik (koloni yapısı ve rengi) ve mikroskobik (sporların biçim ve boyutları) özellikler kullanılarak gruplandırılmış ve ön tanısı Domsch et al., (1981) ve Leslie and Summerell (2006)' e göre ön tanılaması yapılmıştır.

Makroskobik ve mikroskobik incelemeler

Fungal izolatlar, PDA besi yerine ekildikten sonra 22°C'de 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüde 10-15 gün inkübasyona bırakılmıştır. Fungal izolatların kolonilerinin renkleri, konidi şekilleri ve konidi büyüklükleri dikkate alınarak morfolojik ve mikroskobik özellikleri kaydedilmiştir.

3.2.6. Patojenisite testi

Bakteriyel izolatların ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi

Fizyolojik ve biyokimyasal testlerle kesin tanısı yapılmış, domates fidesinde HR (+) bulunmuş ve *Xaj* olduğu saptanan bakteriyel etmenlerin patojenisitesi, ham ceviz meyvelerinin kullanıldığı test ile değerlendirilmiştir. Patojenisite testi için her iki hastalığa duyarlı olduğu bilinen Chandler çeşidinin sağlıklı meyveleri kullanılmıştır. 2-3 cm çapında sağlıklı ceviz meyveleri Gf 30 aşamasında (gemale flowering 30) toplanmıştır. Hastalık belirtisi görülmeyen ceviz meyveleri steril saf su ile yıkanmıştır. Bakteriyel süspansiyonların inokulum yoğunluğu (UV visible, OD_{600nm}: 0.45, 10⁹ cfu/ml), ayarlandıktan sonra BAN için ceviz meyvelerinin apikal uç bölgesine, bakteriyel yanıklık için ise ceviz meyvelerinin lateral yüzüne 30 µL şırınga ile infiltre edilmiştir (Şekil 3.2). Daha sonra bu meyveler %90 oransal nem, 24±2°C'de 5-10 gün inkubasyona bırakılmıştır. Deneme her bakteriyel izolat için 6 tekerrür olarak yapılmıştır. Meyve testi sonuçlarının değerlendirilmesinde, apikal uçtaki nekrozun ceviz meyvesinin dış yüzeyinde kapladığı alan ve meyvenin

içindeki derinliği dikkate alınarak 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir (Tablo 3.4). Ayrıca, meyve apikal bölgeden ikiye kesilerek hastalığı meyve içine ne kadar ilerlediği değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Bakteriyel etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi uygulaması.

Tablo 3.4 BAN hastalığı patojenisite testi değerlendirme skalası.

Skala Değeri	Tanım
0	Hastalık belirtisi yok
1	Meyvenin apikal kısmında 2 -5 mm çapında oluşan yüzeysel lezyonlar
2	Meyvenin apikal kısmında 5 -10 mm çapında oluşan lezyonlar pericarpdan endokarpa doğru ilerleme
3	Meyvenin apikal kısmında 10 mm çapından büyük lezyonlar tohuma doğru ilerleme
4	Meyve yüzeyi ve içinde tamamen kararma

Bakteriyel yanıklık için ise; inkubasyon süresi sonunda meyve yüzeyinde gelişen bakteriyel yanıklık belirtileri 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığı patojenisite testi değerlendirme skalası.

Skala Değeri	Tanım
0	Hastalık belirtisi yok
1	İnokulasyon kısmında yüzeysel küçük lekeler
2	İnokulasyon kısmında 2mm'den küçük yüzeysel geniş lekeler
3	İnokulasyon kısmında 2-5mm çapında, iç dokulara ilerleyen 1mm'lik siyahlaşma,
4	İnokulasyon kısmında 5mm çapından fazla, iç dokulara ilerleyen 2-4 mm'lik siyahlaşma

Elde edilen skala değerleri Thowsend Heuberger* formülü ile hastalık şiddeti (%) değerlerine dönüştürülmüştür.

$$\% \text{Hastalık şiddeti} = \frac{\sum (\text{Skala değeri} \times \text{Skalada değerlendirilen bitki sayısı})}{\text{Toplam bitki sayısı} \times \text{En yüksek skala değeri}} \times 100$$

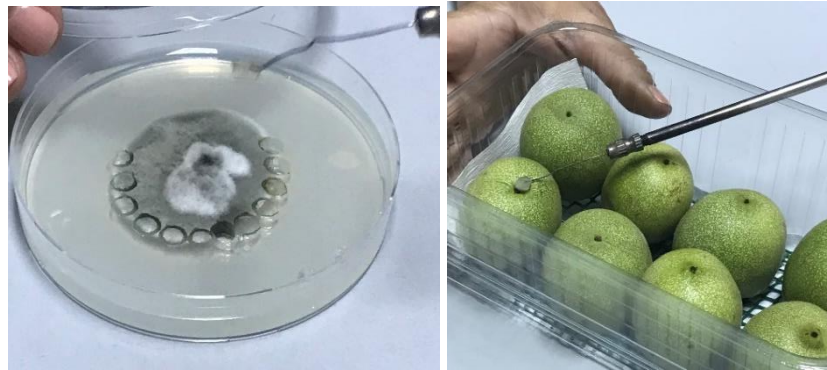
*Towsend-Heuberger formülü:

Hastalık şiddeti (%) = $[S(n.V)/Z.N]$

(S: toplam, n: skalada farklı hastalık derecelerine isabet eden örnek adedi, V: skala değeri, Z: en yüksek skala değeri, N: gözlem yapılan toplam örnek adedi)

Fungal izolatların ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi

PDA besi yerinde (streptomycin, 100 mg/l) 7 gün süreyle gelişen fungal kolonilerden mantar delicisi ile yaklaşık 5 mm çapında fungus kültürleri alınmıştır. Fungus diskleri, sağlıklı meyvelerinin apikal uç kısmına temas edecek şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Ceviz meyveleri $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de ve %90 oransal nemde 10-15 gün inkubasyona bırakılmıştır. Her fungal izolat için 8 tekerrür olacak şekilde yapılmıştır. Testin değerlendirmesinde apikal uçtaki fungusun yüzeydeki gelişimi ve meyve içinde ilerleme seviyesi dikkate alınmış ve Tablo 3.4'te belirtilen 0-4 skalasına göre (Akat et al., 2016) değerlendirilmiştir. Test sonucundaki skala değerleri (%) hastalık şiddeti değerlerine dönüştürülmüştür.



Şekil 3.3. Fungal etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite test uygulaması.

Bakteriyel x fungal izolatların birlikte ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi

Bakteri ve fungus izolatları ham ceviz meyvelerinde teksele olarak testlendikten sonra, sağlıklı ceviz meyvelerinde aynı inokulasyon noktasına birlikte uygulanmıştır. Bu test için daha önce yapılan teksele patojenisite test sonuçlarına göre seçilen virulensi en yüksek olan bakteri ve fungus izolatları kullanılmıştır. Sağlıklı ceviz meyvelerinin apikal ucuna, inokulum yoğunluğu (UV visible, OD_{600nm}: 0.45, 10⁹ CFU/mL) ayarlanan bakteri süspansiyonları steril şırınga ile 30 µl miktarında infiltre edilmiştir. Bakteri süspansiyonu inokulasyonundan 1-2 saat sonra PDA besi ortamında gelişmiş 7 günlük fungus izolatı daha önceki teksele uygulamada yapıldığı gibi meyvenin apikal ucuna yerleştirilmiştir. Bakteri ve fungus izolatlarının birlikte uygulandığı sağlıklı ham ceviz meyveleri 24±2°C’de ve %90 oransal nemde 10 gün inkubasyona bırakılmıştır. Test sonuçları Tablo 3.4’te belirtilen BAN için hastalık şiddeti 0–4 skalasına göre (Akat et al., 2016) değerlendirilmiştir. Testler her patojen grubu için 4 tekerrür olacak şekilde yapılmış ve test sonucunda elde edilen skala değerleri (%) hastalık şiddeti değerlerine dönüştürülmüştür. Bakteriyel ve fungal izolatların tek ve birlikte ham ceviz meyvelerine inokulasyonu sonucunda elde edilen hastalık şiddeti (%) değerleri karşılaştırıldığında hastalığın gelişiminde ve şiddetinde bakteriyel ve fungal etmenler arasında birlikte etkilerinin olup olmadığı da araştırılmıştır.

3.2.7. Bakteriyel etmenlerin moleküler tanı çalışmaları

BAN ve ceviz bakteriyel yanıklığı belirtilerinden elde edilen bakteriyel izolatlardan ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları ve coğrafik dağılım dikkate alınarak seçilen 8 *Xaj* izolatının moleküler tanısı gerçekleştirilmiştir.

Bakteriyel etmenlerin DNA izolasyonu

İnkübatörde 25±2°C’de KB besi yerinde geliştirilen 2-3 günlük *Xaj* kolonileri kullanılmıştır. DNA izolasyonu, Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (Norgen, Biotek Corp.) protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Tüm bakteriyel izolatlar için süspansiyon yoğunluğu 2x10⁹ CFU/mL olarak nanodrop cihazında ayarlanmıştır.

Elde edilen DNA örnekleri moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

8 *Xaj* izolatının moleküler tanısı, 16S rRNA gen bölgesine spesifik 27F/1491R universal primerleri kullanılarak yapılmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. *Xaj* tanısında kullanılan 16S rRNA geni universal primer bilgileri.

	Primerler	Baz dizilimleri (5'-3')	Baz uzunluğu (bp)	Referans
16S rRNA	27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	~1490bp	Weisburg et al.,1991; Wu et al., 2010
	1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T		

Seçilmiş *Xaj* izolatlarının DNA izolasyonu yapıldıktan sonra 16S rRNA geni için Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye protokolüne göre hazırlanan PCR master mix ve PCR koşulları Tablo 3.7 ‘de açıklandığı gibi uygulanmıştır.

Tablo 3.7. 16S rRNA geni master mix ve PCR koşulları.

PCR MasterMix	Miktar (µl) (1X)	PCR Döngü Koşulları		
		Sıcaklık	Zaman	Döngü
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye	12.5	95°C	8 dk	1
Su	5.5	95°C	30 sn	35
27F primer (10µM)	1	55°C	30 sn	
1492R primer (10µM)	1	72°C	1.5 dk	
DNA	5	72°C	10 dk	1
Toplam	25µl			

PCR ürünleri %1.5 agaroz jele 1µl RedSafe (Nucleic acid staining solution 20.000X, Intron Biotechnology) eklendikten sonra 1X TAE buffer da 100V-1 saat yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir. HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp) kullanılmıştır. Agaroz jelde 1300-1490 bp aralığında bant oluşumu beklenmiştir. PCR ürünleri SANGER sekans analizine gönderilmiştir. Elde edilen sonuçların NCBI gen bankası veri tabanındaki (www.ncbi.nlm.nih.gov) mevcut türlerle benzerlikleri karşılaştırılmıştır. Blast sonuçlarına göre tüm izolatlar NCBI’ a accession number ile kayıt edilmiştir.

3.2.8. Fungal etmenlerin moleküler tanı çalışmaları

BAN hastalığının görüldüğü il ve ilçeleri temsil edecek şekilde fungal izolatlar gruplandırılmıştır. Moleküler tanı çalışmalarına seçilen fungus izolatları ile devam edilmiştir

Fungus izolatlarının DNA izolasyonu

Fungus izolatlarının DNA izolasyonu, Promega Genomic Purification Kit protokolüne göre yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’ de saklanmıştır.

Fungus izolatların moleküler tanısı, fungusların korunmuş ITS (Internal Transcribed Spacer) gen bölgesine spesifik ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Fungal izolatlarının tanısında kullanılan ITS primer bilgileri.

	Primerler	Baz dizilimleri (5'-3')	Baz uzunluğu (bp)	Referans
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500-600 bp	Mitchell et al., 1994
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

DNA izolasyonu yapılan fungus izolatlarının PCR işleminde Thermo Fischer Scientific PCR Master Mix (2X) protokolüne göre mastermix hazırlanmış ve PCR koşulları Tablo 3.9’ da belirtildiği gibi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.9. ITS geni master mix ve PCR koşulları.

Mix	Miktar (µl) (1X)	PCR Döngü Koşulları		
		Sıcaklık	Zaman	Döngü
PCR Master Mix (2X)	12.5	95°C	10 dk	1
Su	8.5	95°C	20 sn	35
ITS1 primer (10µM)	1	55°C	20 sn	
ITS4 primer (10µM)	1	72°C	1 dk	
DNA	2	72°C	10 dk	1
Toplam	25µl			

PCR ürünleri %1.5 agaroz jele 1µl RedSafe (Nucleic acid staining solution 20.000X, Intron Biotechnology) eklendikten sonra 1X TAE buffer da 100V-1 saat

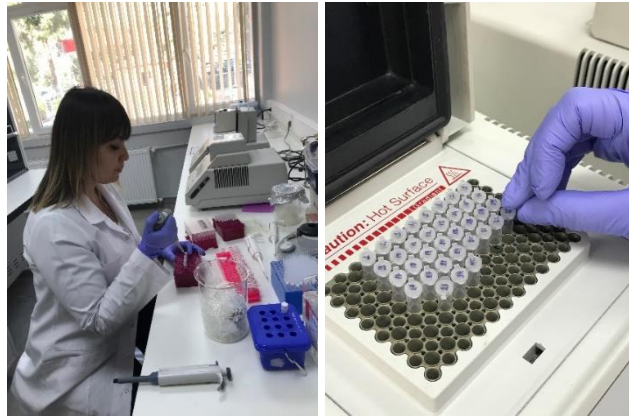
yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir. HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp) kullanılmıştır. 500-600 bp aralığında bant oluşumu beklenmiştir (Mitchell et al., 1994). PCR ürünlerinin SANGER sekans analizi sonuçları, NCBI gen bankası veri tabanındaki (www.ncbi.nlm.nih.gov) mevcut türlerle benzerlikleri karşılaştırılmıştır. Blast sonuçlarına göre tüm isolatlar NCBI'a accession number ile kayıt edilmiştir.

3.2.9. Bakteriyel etmenlerin *rep*-PCR ile moleküler karakterizasyon çalışmaları

Bakteriyel yanıklık ve BAN semptomları görülen ceviz yaprak ve meyvelerinden izole edilmiş, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve patojenisite testleri sonucunda *Xaj* olduğuna karar verilen bakteri ve fungus isolatlarının moleküler tanısı Polimerase Chain Reaction (PCR) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

rep-PCR (BOX, ERIC, REP)

DNA izolasyonu ile elde edilen *Xaj* isolatlarının DNA'larının amplifikasyonu amacıyla BOX, ERIC ve REP-PCR için spesifik primerleri (Tablo 3.10) ve PCR protokolleri (Tablo3.11) Termal cyclers (Eppendorf Master Cycler Personal)' da programlanarak uygulanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 *Xaj* isolatlarına uygulanan *rep*-PCR işlemi.

Tablo 3.10. *Xaj* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda kullanılan BOX, ERIC, REP-PCR primerleri ve baz dizilimleri.

Primerler	Baz dizilimleri (5'-3')	Baz uzunluğu (bp)	Referans
BOXAIR	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	-	Schaad et al., 2001; Prokic et al., 2012
Rep1R-1	III ICG ICG ICA TCI GGC		
Rep2-1	ICG ICTTATCIGGCCTAC		
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC		
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		

Tablo 3.11. *Xaj* izolatlarının moleküler karakterizasyonunda kullanılan BOX, ERIC, REP-PCR protokolleri.

BOX PCR Protokolü				
Mix	Miktar (µl) (1X)	PCR Döngü Koşulları		
		Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X)	16.25	95°C	7 dk	1
Su	2	94°C	1 dk	30
BOX primer (10µM)	3.75	53°C	1 dk	
DNA	3	65°C	8 dk	
		65°C	16 dk	1
Toplam	25µl			
ERIC PCR Protokolü				
Mix	Miktar (µl) (1X)	PCR Döngü Koşulları		
		Sıcaklık	Zaman	Döngü
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye	12.5	94°C	7 dk	1
Su	5.5	90°C	30 sn	33
ERIC-1R primer (10µM)	1	52°C	1dk	
ERIC-2 primer (10µM)	1	65°C	8 dk	
DNA	5	65°C	16 dk	1
Toplam	25µl			
REP PCR Protokolü				
Mix	Miktar (µl) (1X)	PCR Döngü Koşulları		
		Sıcaklık	Zaman	Döngü
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye	12.5	94°C	5 dk	1
Su	5.5	94°C	1 dk	33
REP1R-1 primer (10µM)	1	42°C	1 dk	
REP2-1 primer (10µM)	1	65°C	8 dk	
DNA	5	65°C	16 dk	1
Toplam	25µl			

PCR ürünleri, %2'lik agaroz jele 1µl RedSafe (Nucleic acid staining solution 20.000X, Intron Biotechnology) eklendikten sonra 1X TAE buffer da 6V-3 saat yürütülmüş ve UV ışıktaki görüntülenmiştir. HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp) kullanılmıştır.

rep-PCR ürünlerinin agaroz jeldeki bantlarının değerlendirilmesi sonucunda *Xaj* ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığının görüldüğü il ve ilçeleri temsil edecek şekilde *Xaj* izolatları gruplandırılmıştır. Daha sonraki moleküler çalışmalara gruplandırılmış *Xaj* izolatları ile devam edilmiştir.

3.2.10. Bakteriyel etmenlerin Multi Locus Sequence Analyse (MLSA) ile moleküler karakterizasyon çalışmaları

Klasik ve moleküler tanılama testleri sonucunda *Xaj* olduğu kesin tanısı yapılan ve *rep*-PCR sonuçlarına göre seçilen bakteriyel izolatların moleküler karakterizasyon çalışmalarına MLSA ile devam edilmiştir.

MLSA analizlerinde; *Xaj* izolatları arasındaki coğrafik farklılığı daha açık şekilde kanıtlayabilmek için *atpD* (ATP synthase β subunit), *dnaK* (chaperone protein *dnaK*, 70-kDa heat shock protein), *efp* (elongation factor P), *fyuA* (transmembran protein; Ton-B-dependent transporter), *gyrB* (DNA gyrase subunit β), *rpoD* (RNA polymerase sigma 70 factor), *glnA* (glutamin synthase I) olmak üzere 7 farklı housekeeping geni kullanılmıştır.

MLSA’ da kullanılan mastermix Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye (grisp) protokolüne uygun hazırlanmıştır. 7 housekeeping geni için Tablo 3.12’de belirtilen spesifik primerler kullanılarak uygulanan PCR protokolleri Tablo 3.12’de yer almaktadır. *atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *efp* housekeeping genleri için annealing sıcaklığı 63°C iken *rpoD* geni için 65°C derece kullanılmıştır (Giovanardi et al., 2015; Fischer-Le Saux et al., 2015; Kaluzna et al., 2014).

Tablo 3.12. *Xaj* izolatlarının MLSA ile moleküler karakterizasyonunda kullanılan housekeeping genlerine spesifik primerleri ve baz uzunlukları.

Housekeepin g gen	Primerler	Baz dizilimleri (5'-3')	Baz uzunluğu (bp)	Referans
<i>atpD</i>	P-X-ATPD-F	GGGCAAGATCGTTCAGAT	868	Fischer-Le Saux et al., 2015
	P-X-ATPD-R	GCTCTTGGTCGAGGTGAT		
<i>dnaK</i>	P-X-DNAK-F	GGTATTGACCTCGGCACCAC	1034	
	P-X-DNAK-R	ACCTTCGGCATAACGGGTCT		
<i>efp</i>	P-X-EFP-F	TCATCACCGAGACCGAATA	445	
	P-X-EFP-R	TCCTGGTTGACGAACAGC		
<i>fyuA</i>	emifyuA3F	ACCATCGACATGGACTGGACC	963	
	emifyuA4R	GTCGCCGAACAGGTTCACC		
<i>glnA</i>	P-X-GLNA-F	ATCAAGGACAACAAGGTCTG	1094	Boudon et al., 2005; Fischer-Le Saux et al., 2015
	P-X-GLNA-R	GCGGTGAAGGTCAGGTAG		
<i>gyrB</i>	X-gyrB1F	ACGAGTACAACCCGCACAA	904	Fischer-Le Saux et al., 2015
	X-gyrB1R	CCCATCARGGTGCTGAAGAT		
<i>rpoD</i>	emirpo11F	ATGGCCAACGAACGTCCTGC	1313	Fargier et al., 2011
	emirpo13R	AACTTGTAACCGCGACGGTATTCTG		

Tablo 3.13 *Xaj* izolatlarının MLSA ile moleküler karakterizasyonunda kullanılan master mix ve PCR protokolleri.

PCR Master Mix	Örnekteki Miktar (μ l) (1X)	PCR döngü koşulları		
PCR mix (2X)	12,5	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer F (10 μ M)	1	94°C	3 dk	1
Primer R (10 μ M)	1	95°C	30 sn	35
Su	5,5	63°C	30 sn	
Örnek DNA	5	72°C	30 sn	
Toplam	25 μl	72°C	7 dk	1
PCR Master Mix	Örnekteki Miktar (μ l) (1X)	PCR döngü koşulları		
PCR mix (2X)	12,5	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer F (10 μ M)	1	94°C	3 dk	1
Primer R (10 μ M)	1	94°C	30 sn	35
Su	5,5	65°C	30 sn	
Örnek DNA	5	72°C	30 sn	
Toplam	25 μl	72°C	7 dk	1

PCR ürünleri %1.5 agaroz jele 1 μ l RedSafe (Nucleic acid staining solution 20.000X, Intron Biotechnology) eklendikten sonra 1X TAE buffer da 100V-1 saat yürütülmüş ve UV' de görüntülenmiştir. HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp) kullanılmıştır. Tüm genler için Tablo3.13' de belirtilen bant

uzunlukları gözlenmiştir. PCR ürünlerinin SANGER sekans analizi sonuçları, NCBI gen bankası veri tabanında (www.ncbi.nlm.nih.gov) değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Survey Çalışmaları Sonuçları

Survey çalışmaları, 2018-2019 yıllarında Manisa, Balıkesir ve Çanakkale il ve ilçelerinde ceviz yetiştiriciliğinin yapıldığı plantasyonlarda Mayıs-ağustos ayları boyunca çiçeklenme döneminden hasada kadar gerçekleştirilmiştir. Manisa ilinde 48, Balıkesir ilinde 23 ve Çanakkale ilinde 29 olmak üzere toplamda 100 bahçede survey yapılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. 2018-2019 yılında gerçekleştirilen survey çalışmaları.

Bahçe düzeyinde ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalık oranları belirlendikten sonra her iki hastalığın il ve ilçe düzeyinde yaygınlık oranları tartılı ortalamaya göre hesaplanmıştır. Manisa, Balıkesir ve Çanakkale il ve ilçelerinde 2018-2019 yıllarında gerçekleştirilen survey kapsamında ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığının yaygınlık oranları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Balıkesir, Çanakkale, Manisa il ve ilçelerinde ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN yaygınlık oranları (%).

İl	İlçe	İlçe Düzeyinde Yaygınlık Oranı (%)		İl Düzeyinde Yaygınlık Oranı (%)	
		BAN	Yanıklık	BAN	Yanıklık
Balıkesir	Bandırma	-	38,44	-	42,77
	Dursunbey	-	43		
	Kepsut	-	37,5		
	Sındırgı	-	52,15		
Çanakkale	Biga	-	-	7,25	8,96
	Bayramiç	11,87	11,7		
	Ayvacık	-	17,18		
	Ezine	14,17	-		
Manisa	Akhisar	39,05	-	10,93	2,83
	Gördes	-	-		
	Salihli	-	-		
	Kula	-	7,09		

Tablo 4.1 incelendiğinde ceviz bakteriyel yanıklığının yaygınlığı en yüksek Balıkesir ili Sındırgı ilçesinde %52,15 oranında bulunmuştur. Bunu sırası ile Dursunbey %43, Bandırma %38,44 ve Kepsut ilçesi %37,5 yaygınlık oranı ile takip etmiştir. Çanakkale ilinde ceviz bakteriyel yanıklığı yaygınlığı Ayvacık ilçesinde %17,18 yaygınlık oranı ile il içinde ilk sırada yer alırken, Biga ve Ezine ilçelerinde bu hastalığa rastlanılmamıştır. Manisa ili Kula ilçesinde ise ceviz bakteriyel yanıklığı %7,09 yaygınlık oranı görülürken Akhisar, Gördes ve Salihli ilçelerinde bu hastalığa rastlanılmamıştır. İl düzeyinde ceviz bakteriyel yanıklığın en yaygın görüldüğü il %42,77 oranla Balıkesir'dir.

BAN hastalığının yaygınlığı en yüksek Manisa ili Akhisar ilçesinde %39,05 oranında bulunurken Gördes, Salihli ve Kula ilçelerinde bu hastalığa rastlanılmamıştır. Çanakkale ili Ezine ilçesi %14,17 yaygınlık oranıyla 2. sırada, Bayramiç ilçesi ise %11,87 yaygınlık oranı ile 3. sırada gelmektedir. İl düzeyinde BAN yaygınlık oranına bakıldığında Manisa'da %10,93, Çanakkale'de ise %7,25 oranında bulunmaktadır. Balıkesir ilinin 4 ilçesinde de BAN hastalığına rastlanılmamıştır (Tablo 4.1).

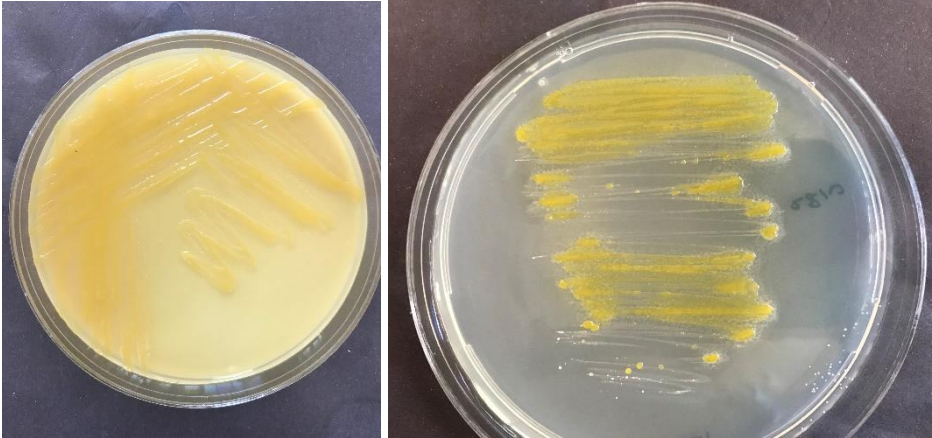
4.2. Bakteriyel Etmenlerin İzolasyon Çalışmaları Sonuçları

2018-2019 yıllarında vegetasyon dönemi boyunca kapama ceviz bahçelerinde yapılan surveyler sonucunda hastalık belirtisi görülen yaprak ve meyvelerden alınan örnekler laboratuvara getirilmiş ve izolasyonlar gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Ceviz meyvelerinden bakteriyel etmen izolasyonu.

Bakteriyel etmen için YDC besi yerinde *Xaj* benzeri sarı-mukoid gelişim gösteren koloniler ve TMM besi yerinde sarı kolonilerin etrafında presipitasyon zonu oluşturan izolatlar seçilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. YDC besi yerinde sarı-mukoid koloni gelişimi (soldaki) ve TMM besi yerinde presipitasyon zon oluşumu (sağdaki).

Domates fidelerinde aşırı duyarlılık testlerine, seçilen bu izolatlar ile devam edilmiştir. (Şekil 4.4)



Şekil 4.4. İklim odasında domates fidelerinde aşırı duyarlılık test çalışmaları.

Söz konusu ön tanılama testleri sonucunda bakteriyel yanıklık ve BAN belirtisinin görüldüğü yaprak ve meyvelerden izole edilen bakteri izolatlarının 31'i *Xaj* olarak değerlendirilmiştir.

Survey çalışmalarında ceviz yaprak ve meyvelerinden yapılan izolasyonların hepsinde YDC besi yerinde karakteristik *X. arboricola* benzeri koloniler gelişmiş, TMM besi yerinde ise bakteri kolonilerinin etrafında presipitasyon zon oluşumu gözlenmiştir. YDC ve TMM besi yerinde *X. arboricola* benzeri koloniler domates fidelerinde HR (+) sonuç vermiştir. Ceviz meyvelerinden izole edilen bakteriyel etmenin hepsi perikarp dokusundan elde edilmiştir.

4.3. Fungal Etmenlerin İzolasyon Çalışmaları Sonuçları

2018-2019 yılında yapılan surveylerde BAN belirtisi şüpheli meyvelerden alınan örnekler laboratuvara getirilmiş ve fungal etmenlerin izolasyon çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. BAN belirtili ceviz meyvelerden fungal etmenlerin izolasyonu.

Ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN belirtilerinin görüldüğü yaprak ve meyveden yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen bakteriyel ve fungal izolatlar Tablo 4.2’de özetlenmiştir. Balıkesir ilçelerinden sadece ceviz bakteriyel yanıklığı belirtisi görülen meyve örnekleri alınmış olup yapılan izolasyon ve ön tanı sonucunda *Xaj* etmeni elde edilmiştir. BAN belirtisi görülen meyve örneklerinden yapılan izolasyon ve morfolojik tanılama sonucunda fungal etmen olarak sadece *Alternaria alternata* elde edilmiştir. Çanakkale ilindeki Bayramiç-3 no’lu bahçeden bakteriyel yanıklık şüphesi ile alınan 29 ve 30 nolu örneklerden *Xaj* elde edilirken; Bayramiç-4 ve Bayramiç-5 no’lu bahçelerden BAN şüphesi ile alınan meyve örneklerinden ise *Xaj* ve *Alternaria alternata* elde edilmiştir. Ayrıca Bayramiç-3, Bayramiç-4, Bayramiç-5 ve Bayramiç-6 no’lu bahçelerde olduğu gibi aynı ilçenin farklı bahçelerinden alınan örneklerde farklı hastalıkların olabildiği de görülmektedir.

Tablo 4.2 Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde 2018-2019 yılları ceviz yaprak ve meyvelerinden izolasyonda elde edilen bakteriyel ve fungal etmenler.

İzolat no	Örnek bilgisi	İzole edildiği doku/Çeşit	Belirti	İzolasyon sonucu	
				Bakteri	Fungus
22	Dursunbey-1	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
26	Dursunbey-3	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
27	Bandırma-1	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
20	Bandırma-2	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
28	Bandırma-3	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
17	Kepsut-1	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
15	Kepsut-4	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
16	Kepsut-5	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
9	Sındırgı-5	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
10	Sındırgı-6	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
11	Sındırgı-7	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
12	Sındırgı-8	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
13	Sındırgı-10	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
14	Sındırgı-12	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
29	Bayramiç-3	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
30	Bayramiç-3	Yaprak/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
7	Bayramiç-4	Meyve/Chandler	BAN	<i>Xaj</i>	<i>A. alternata</i>
31	Bayramiç-5	Meyve/Chandler	BAN	<i>Xaj</i>	<i>A. alternata</i>
8	Bayramiç-6	Yaprak/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
21	Ayvacık-1	Yaprak/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
23	Ayvacık-1	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
19	Ayvacık-2	Meyve/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
24	Ayvacık-5	Yaprak/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
25	Ayvacık-6	Yaprak/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-
5	Ezine-2	Meyve/Chandler	BAN	<i>Xaj</i>	<i>A. alternata</i>
6	Ezine-5	Meyve/Chandler	BAN	<i>Xaj</i>	<i>A. alternata</i>
1	Akhisar-4	Meyve/Chandler	BAN	<i>Xaj</i>	<i>A. alternata</i>
2	Akhisar-5	Meyve/Chandler	BAN	<i>Xaj</i>	<i>A. alternata</i>
3	Akhisar-6	Meyve/Chandler	BAN	<i>Xaj</i>	<i>A. alternata</i>
4	Akhisar-9	Meyve/Chandler	BAN	<i>Xaj</i>	<i>A. alternata</i>
18	Kula-10	Yaprak/Chandler	Yanıklık	<i>Xaj</i>	-

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde her iki hastalık belirtisinin görüldüğü Chandler ceviz çeşidinin yaprak ve meyve örneklerinden yapılan izolasyon sonucunda domateste HR (+) sonuç veren bakteriyel etmen izole edilmiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Balıkesir ili survey çalışmasından ceviz bakteriyel yanıklığı belirtisi görülen ceviz meyvelerinden *Xaj* izolasyon çalışmaları.



Şekil 4.7. Çanakkale ili survey çalışmasından BAN belirtisi görülen ceviz meyvelerinden *Xaj* izolasyon çalışmaları.

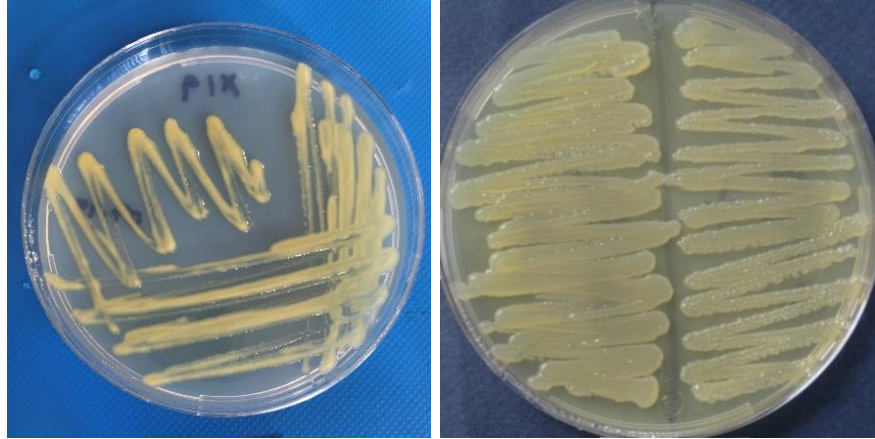
İzolasyon ve survey sonuçları birlikte değerlendirildiğinde sonuçlar arasında tutarlılık olduğu görülmektedir.

4.4. Bakteriyel Etmenlerin Klasik Tanı Çalışmaları Sonuçları

Survey çalışmaları sonucunda her iki hastalık belirtisinin görüldüğü yaprak ve meyvelerden izole edilen izolatlardan YDC ve TMM besi yerinde tipik *Xanthomonas arboricola* benzeri koloni gelişimi gösteren ve domates fidelerinde HR (+) sonuç veren şüpheli bakterilerler seçilmiştir. Söz konusu bakterilerin *Xaj* olup olmadığına LOPAT, GATTa, karbon kaynaklarının kullanımı gibi klasik tanı yöntemleri yapılarak karar verilmiştir.

Levan oluşumu

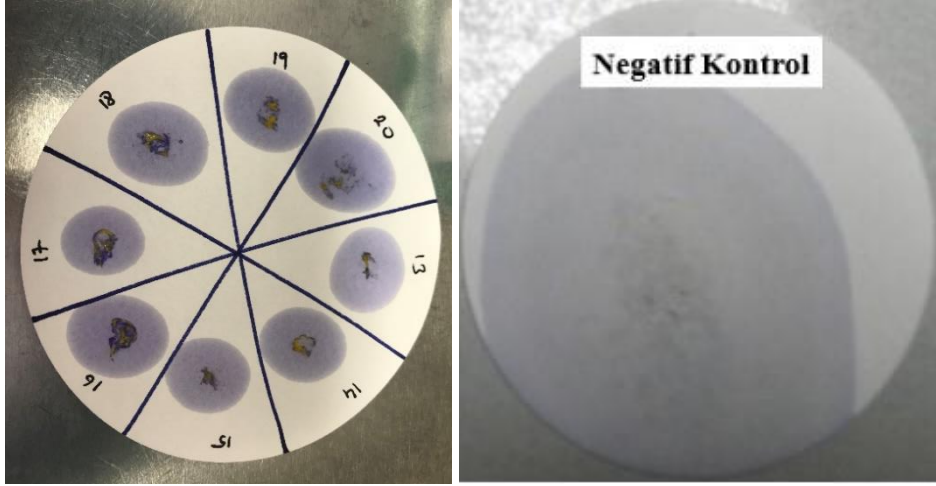
Ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalık belirtisi görülen ceviz yaprak ve meyvelerinden yapılan izolasyon sonucunda 31 *Xaj* ve referans *Xaj* izolatı ile levan oluşumu testi yapılmış olup tüm izolatlar SNA besi yerinde levan oluşturmuş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.8, Tablo 4.3).



Şekil 4.8. SNA besi yerinde levan oluşumu testi sonucu negatif (soldaki), pozitif (sağdaki).

Oksidaz testi

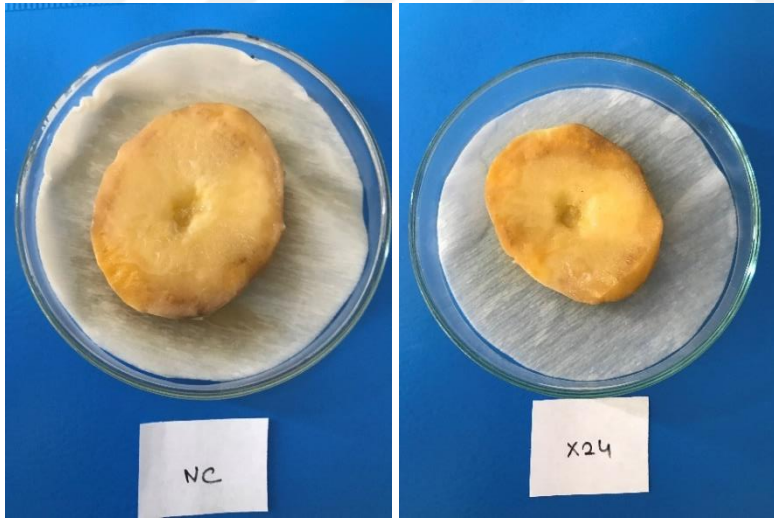
31 *Xaj* izolatı ve referans izolat mavi renk oluşturmamış ve negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.9, Tablo 4.3).



Şekil 4.9. Oksidaz testi sonuçları, pozitif *Xaj* izolatları (soldaki), negatif kontrol (sağdaki).

Patates çürüklük testi

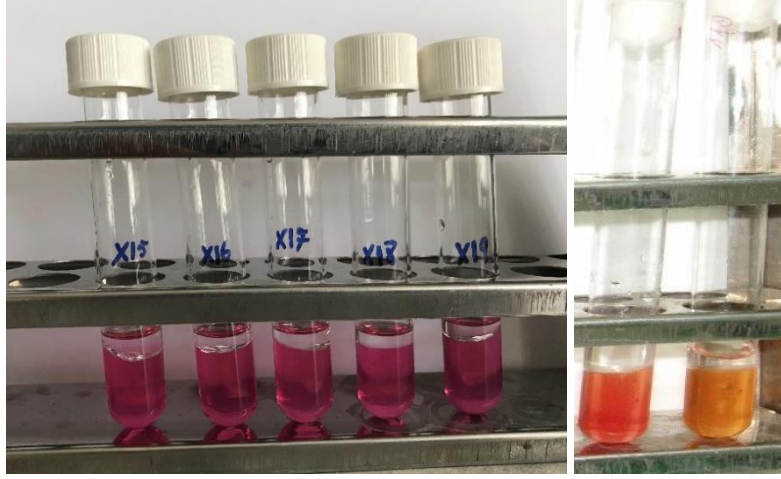
Bu test sonucunda 31 *Xaj* izolatu ve referans izolat patates yüzeyinde doku çökmesi-yumuşama oluşturmamış ve negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.10, Tablo 4.3).



Şekil 4.10. Patates çürüklük testi sonucu negatif kontrol (soldaki), *Xaj* izolatu (negatif) (sağdaki).

Arginin dehidrolaz testi

31 *Xaj* izolat ve referans izolat, 7-15 günlük inkübasyon sonucunda pembe-kırmızı (Şekil 4.11) yani negatif sonuç vermiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4.11. Arginin dehidrolaz testi sonucu, *Xaj* izolatları (negatif) (soldaki), pozitif kontrol (sağdaki).

Tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR) testi

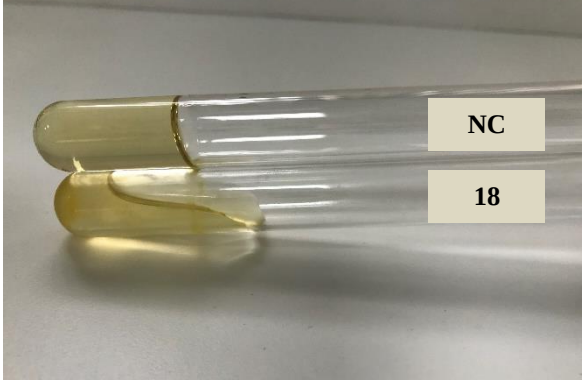
Domates fidelerinin yapraklarına 10^8 cfu/ml yoğunluğundaki bakteri süspansiyonları enjekte edilmesi sonucunda 31 *Xaj* izolatu da nekrotik alanlar oluşturmuş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.12, Tablo 4.3).



Şekil 4.12. Domates fidelerinde aşırı duyarlılık reaksiyonu testi sonucu, pozitif (soldaki), negatif (sağdaki).

Jelatin hidrolizi

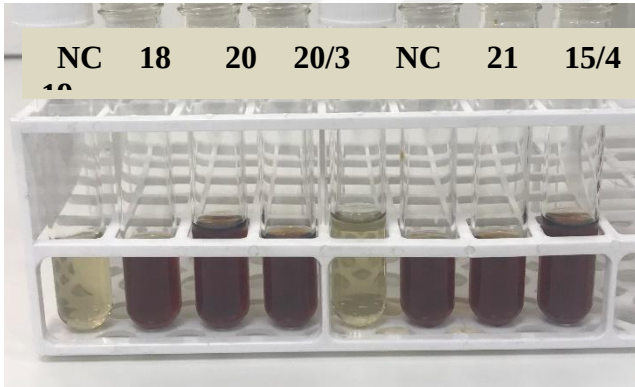
Jelatin içeren tüplere *Xaj* izolatları aşılanmış ve 14 günlük inkübasyon sonucunda yapılan değerlendirmelerde 31 *Xaj* izolatu ve referans izolat jelatini sıvılaştırmış ve pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.13, Tablo 4.3).



Şekil 4.13. Jelatin hidrolizi test sonucu, negatif kontrol ve 18 no'lu *Xaj* izolatı (pozitif).

Aesculin hidroliz testi

31 *Xaj* izolatı referans izolat ile aynı sonucu vererek aesculin hidrolize etmiş ve kahverengiye dönen renk değişimi gözlenmiş ve tüm izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.14, Tablo 4.3).



Şekil 4.14. Aesculin test sonucu, negatif kontrol ve pozitif sonuç veren *Xaj* izolatları.

Tablo 4.3. *Xaj* izolatlarının LOPAT ve GATTa testleri sonuçları.

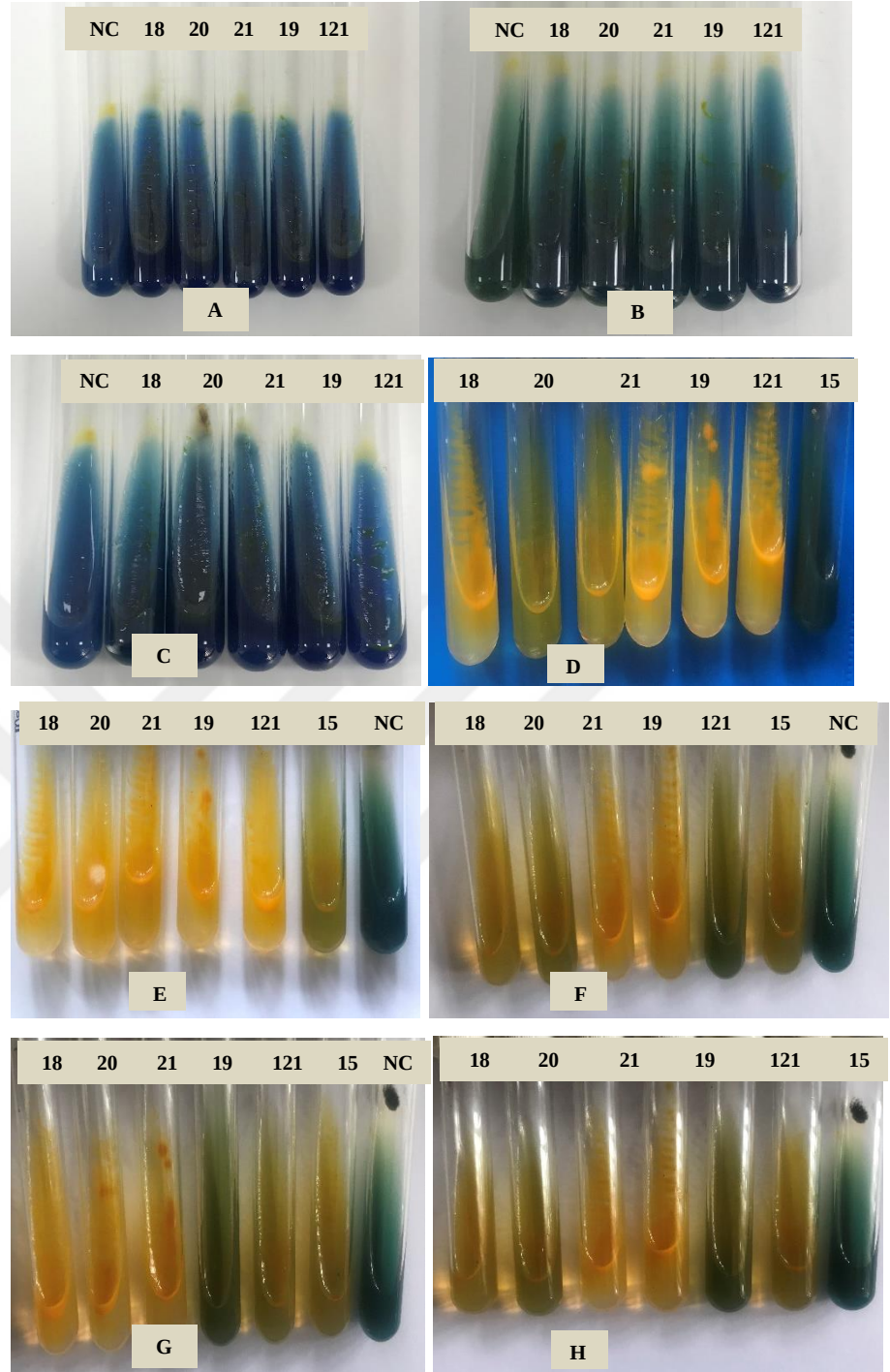
İzolat Adı	LOPAT TESTLERİ					GATTa TESTLERİ			
	Levan	Oksidaz	Patates	Arginin	Domates HR	Gelatin	Aesculin	Tyrosin	Tartaric asit
1	+	-	-	-	+	+	+	-	-
2	+	-	-	-	+	+	+	-	-
3	+	-	-	-	+	+	+	-	-
4	+	-	-	-	+	+	+	-	-
5	+	-	-	-	+	+	+	-	-
6	+	-	-	-	+	+	+	-	-
7	+	-	-	-	+	+	+	-	-
8	+	-	-	-	+	+	+	-	-
9	+	-	-	-	+	+	+	-	-
10	+	-	-	-	+	+	+	-	-
11	+	-	-	-	+	+	+	-	-
12	+	-	-	-	+	+	+	-	-
13	+	-	-	-	+	+	+	-	-
14	+	-	-	-	+	+	+	-	-
15	+	-	-	-	+	+	+	-	-
16	+	-	-	-	+	+	+	-	-
17	+	-	-	-	+	+	+	-	-
18	+	-	-	-	+	+	+	-	-
19	+	-	-	-	+	+	+	-	-
20	+	-	-	-	+	+	+	-	-
21	+	-	-	-	+	+	+	-	-
22	+	-	-	-	+	+	+	-	-
23	+	-	-	-	+	+	+	-	-
24	+	-	-	-	+	+	+	-	-
25	+	-	-	-	+	+	+	-	-
26	+	-	-	-	+	+	+	-	-
27	+	-	-	-	+	+	+	-	-
28	+	-	-	-	+	+	+	-	-

Tablo 4.3 devamı									
İzolat Adı	LOPAT TESTLERİ					GATTa TESTLERİ			
	Levan	Oksidaz	Patates	Arginin	Domates HR	Gelatin	Aesculin	Tyrosin	Tartaric asit
29	+	-	-	-	+	+	+	-	-
30	+	-	-	-	+	+	+	-	-
31	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Xaj Referans	+	-	-	-	+	+	+	-	-

Her iki hastalığın belirtisinin görüldüğü yaprak ve meyvelerden izole edilmiş 31 izolat ile yapılan LOPAT (+---+), GATTa (++--) testlerinde referanslara dayanılarak elde edilen test sonuçlarına göre tüm izolatların referans izolat ile aynı sonuçları vererek *Xaj* olduklarına karar verilmiştir.

Karbon kaynaklarının kullanımı

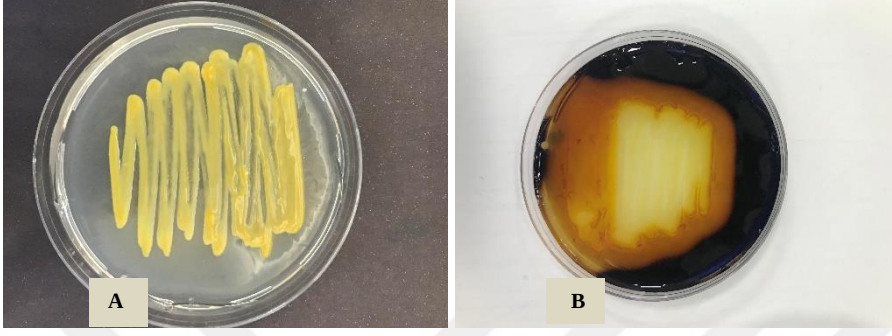
Testte kullanılan karbonhidratlardan tyrosin, tartaric asit ve arabinose içeren bazal ortamın rengi mavi-yeşilden sarı renge dönüşmemiş ve 31 *Xaj* izolatı negatif olarak değerlendirilmiştir. Diğer karbon kaynaklarını içeren tüplerde ortam rengi mavi-yeşil renkten sarı renge dönüşmüş ve tüm *Xaj* izolatları pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.15, Tablo 4.3, Tablo 4.4).



Şekil 4.15. Karbon kaynaklarından asit üretimi testi sonucu, a) Tyrosin, b) Tartaric asit, c) Arabinose, d) Mannose, e) Glukoz, f) Fruktoz, g) Trehaloz, h) Cellebiose.

Nişastanın hidrolizi

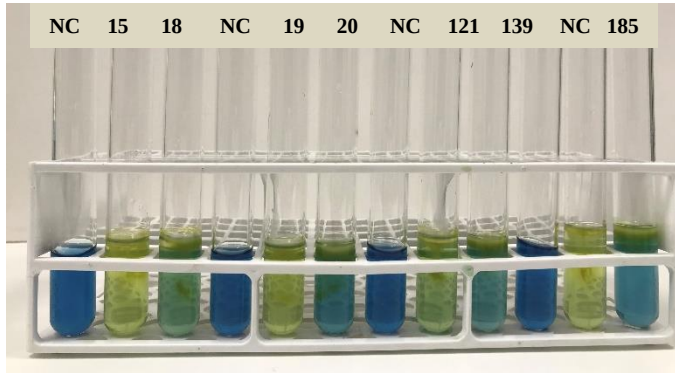
Ekim yapılan petrilere inkübasyon sonunda lugol solüsyonundan damlatılmış ve petrideki bakteri ekim çizgileri etrafında açık renk haleler oluşmuş ve tüm *Xaj* izolatları pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.16, Tablo 4.4).



Şekil 4.16. Nişasta hidroliz testi sonucu, a) lugol solüsyonu uygulama öncesi, b) lugol solüsyonu uygulama sonrası bakteri ekim çizgileri etrafında sarı hale oluşumu.

Anaerobik gelişim

Bazal ortama ekilen bakterilerde inkübasyon sonunda mavi renk olan ortamın rengi sarı-yeşil renge dönmüş ve tüm *Xaj* izolatları aerobik gelişim gösteriyor olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.17, Tablo 4.4).



Şekil 4.17. Anaerobik gelişim testi sonucu, negatif kontrol (mavi renk), pozitif izolatlar (sarı-yeşil renk).

Tablo 4.4. *Xaj* izolatlarının biyokimyasal testler ve karbon kaynakları kullanımı test sonuçları.

İzolat Adı	Biyokimyasal Testler		Karbon Kaynakları					
	Nişasta	Anaerobik	Arabinose	Mannose	D-Glukoz	D-Fruktoz	D-Trehalose	D-Cellobiose
1	+	-	-	+	+	+	+	+
2	+	-	-	+	+	+	+	+
3	+	-	-	+	+	+	+	+
4	+	-	-	+	+	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+	+	+
6	+	-	-	+	+	+	+	+
7	+	-	-	+	+	+	+	+
8	+	-	-	+	+	+	+	+
9	+	-	-	+	+	+	+	+
10	+	-	-	+	+	+	+	+
11	+	-	-	+	+	+	+	+
12	+	-	-	+	+	+	+	+
13	+	-	-	+	+	+	+	+
14	+	-	-	+	+	+	+	+
15	+	-	-	+	+	+	+	+
16	+	-	-	+	+	+	+	+
17	+	-	-	+	+	+	+	+
18	+	-	-	+	+	+	+	+
19	+	-	-	+	+	+	+	+
20	+	-	-	+	+	+	+	+
21	+	-	-	+	+	+	+	+
22	+	-	-	+	+	+	+	+
23	+	-	-	+	+	+	+	+
24	+	-	-	+	+	+	+	+
25	+	-	-	+	+	+	+	+
26	+	-	-	+	+	+	+	+
27	+	-	-	+	+	+	+	+
28	+	-	-	+	+	+	+	+
29	+	-	-	+	+	+	+	+
30	+	-	-	+	+	+	+	+
31	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Xaj</i> Referans	+	-	-	+	+	+	+	+

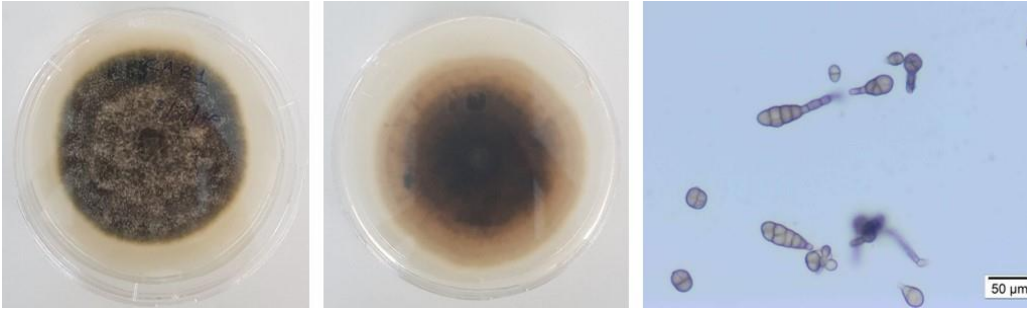
Her iki hastalığın belirtisinin görüldüğü yaprak ve meyvelerden izole edilmiş 31 izolat ile yapılan nişasta hidrolizi, anaerobik solunum ve karbon kaynakları kullanımı testlerinde referans izolat ile aynı sonuçları vermiştir.

31 bakteri izolatı ve referans *Xaj* izolatının klasik tanı testleri sonuçlarına göre tüm izolatların referans izolat ile aynı sonuçları vererek 31 izolatın *Xaj* olduğuna karar verilmiştir.

4.5. Fungal Etmenlerin Klasik Tanı Çalışmaları Sonuçları

Survey çalışmaları sonucundan BAN belirtisi görülen meyvelerden yapılan izolasyonlardan elde edilen fungal izolatlar koloni morfolojilerinin özelliklerine göre gruplandırıldıktan sonra mikroskopik özellikleri dikkate alınarak ön tanısı yapılmıştır.

Elde edilen izolatların rengi yeşilimsi koyu gri, spor ölçüleri 7-23 µm x 12-60 µm arasında değişmiş ve bölme sayısı ise 3-7 arasında enine ve boyuna değişiklik göstermiştir. Yapılan klasik tanılama sonucunda 8 adet izolatın *Alternaria alternata* olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. BAN belirtili meyvelerden izole edilen fungal izolatların PDA besi yerindeki koloni ve mikroskoptaki spor görüntüleri.

Bakteriyel ve fungal izolatlara uygulanan klasik tanılama testleri sonucunda elde edilen izolat sayıları Tablo 4.5’de belirtilmiştir. BAN belirtisinden 7 adet *Xaj* ve yanıklık belirtisinden 24 adet *Xaj* olmak üzere toplamda 31 adet *Xaj* ile çalışmaya devam edilmiştir. Ayrıca BAN belirtisinden 8 adet *A. alternata* edilmiştir. Makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre gruplandırma yapılmış

ve bundan sonraki çalışmalar seçilen farklı özellikteki 5 adet *A. alternata* izolatu ile yürütülmüştür.

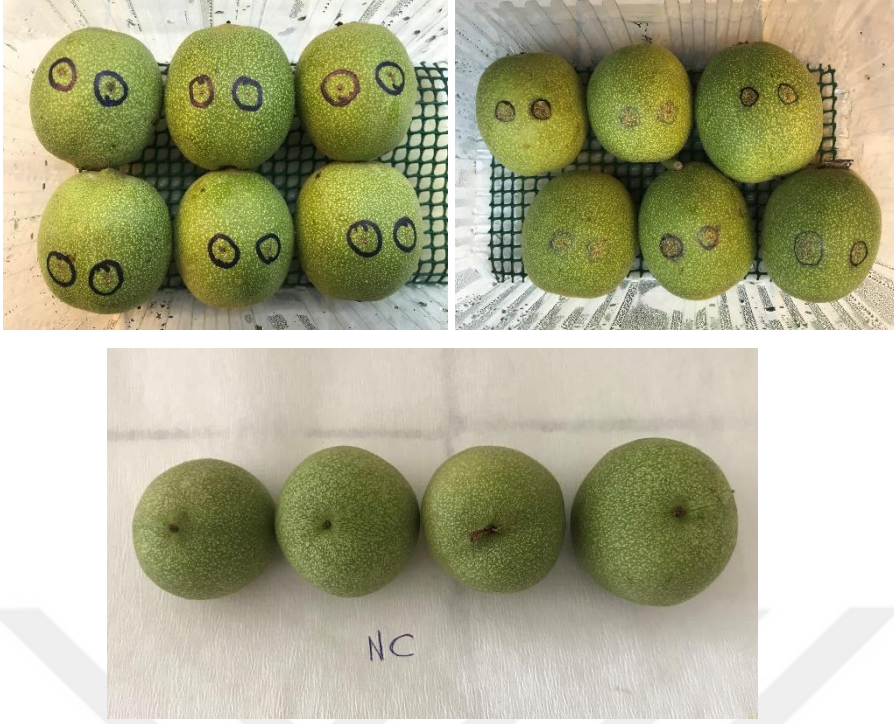
Tablo 4.5. Balıkesir, Çanakkale ve Manisa illerinde, 2018-2019 yılları surveylerinde elde edilen bakteriyel ve fungal izolat sayıları.

İl	İlçe	İzolat sayısı		
		Bakteri		Fungus
		BAN	Yanıklık	BAN
Balıkesir	Bandırma	-	3	-
	Dursunbey	-	2	-
	Kepsut	-	3	-
	Sındırgı	-	6	-
Çanakkale	Biga	-	-	-
	Bayramiç	2	3	2
	Ayvacık	-	5	-
	Ezine	1	-	2
Manisa	Akhisar	4	-	4
	Göğdes	-	-	-
	Salihli	-	-	-
	Kula	-	2	-
TOPLAM		7	24	
		31		8

4.6. Patojenisite Testi Sonuçları

4.6.1. Bakteriyel etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları

Manisa, Balıkesir ve Çanakkale il ve ilçelerindeki ceviz plantasyonlarından izole edilen, domates bitkisinde HR (+) bulunan ve klasik tanı yöntemleri ile *Xaj* olduğu saptanan 31 izolatın patojenisitesi, *in vivo* koşullarda ham ceviz meyve testiyle değerlendirilmiştir. Patojenisite testlerinde her iki hastalığa karşı duyarlı olduğu bilinen Chandler çeşidinin sağlıklı meyveleri (Gf 30 aşaması) kullanılmıştır. Ceviz bakteriyel yanıklığı için değerlendirilen ceviz meyvelerinde inkübasyon sonunda meyvenin lateral yüzeyinde gelişen lekeler, 3.2.4.1 bölümünde ceviz bakteriyel yanıklığı için belirtilen 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *Xaj* izolatlarının ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları, Kula-10 (solda), Bandırma-2 (sağda), negatif kontrol (altta).

Ham ceviz meyvelerinde yapılan test sonuçlarına göre 31 *Xaj* izolatının 11'i, 15. günde yapılan değerlendirme sonuçlarına göre ceviz meyvelerinin lateral yüzeyinde hiçbir belirti oluşturmamış ve 0-4 skalasına göre 0 olarak değerlendirilmiştir. Geriye kalan 20 *Xaj* izolatının hastalık şiddeti değerleri ise Tablo 4.6'da görüldüğü gibi % 2,08- 50 arasında değişiklik göstermektedir.

Tablo 4.6. *Xaj* izolatlarının patojenisite test sonuçlarına göre ceviz bakteriyel yanıklığı hastalık şiddeti değerleri (%).

İzolat No	Tekerrürde Saptanan Skala Değerleri						Hastalık şiddeti (%)
	1	2	3	4	5	6	
Bayramiç-4	2-1	2-2	2-2	2-2	1-1	1-1	50
Ezine-5	0-0	0-0	1-0	0-0	0-0	0-0	2,08
Bandırma-1	2-2	3-0	0-1	1-1	2-1	0-0	27,08
Bandırma-2	0-0	2-2	1-1	2-1	2-2	2-1	42
Sındırgı-6	2-2	1-1	0-0	0-0	1-1	1-1	43
Bayramiç-3	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	2-1	31,25
Kula-10	1-1	1-1	2-2	2-1	2-1	2-2	46
Kepsut-4	2-1	1-1	1-1	1-1	2-1	2-0	29,16

Tablo 4.6 devamı							
İzolat No	Tekerrürde Saptanan Skala Değerleri						Hastalık şiddeti (%)
Ayvacık-1	0-0	1-0	1-1	1-1	0-0	1-0	15
Kepsut-5	1-1	1-1	0-0	0-0	1-1	2-2	20,8
Akhisar-5	1-1	1-1	1-1	0-0	2-1	1-1	22,9
Dursunbey-1	0-1	1-1	1-0	2-2	1-1	3-0	27,08
Sındırgı-12	0-0	1-1	2-2	1-0	1-1	1-0	20,8
Bandırma-3	0-0	0-0	1-1	0-0	0-0	0-2	15
Ayvacık-6	0-0	0-0	1-0	0-0	2-2	1-0	15
Akhisar-4	1-1	1-1	1-1	2-1	2-2	2-2	41
	1	2	3	4	5	6	
Bayramiç-6	0-0	1-1	0-0	1-1	2-1	2-1	20,83
Ayvacık-2	2-1	1-1	0-0	0-0	1-0	0-0	27,08
Sındırgı-5	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	2-1	31,25
Akhisar-9	2-2	2-2	0-1	1-0	1-0	1-1	27,08

BAN belirtisinden izole edilen Bayramiç-4 izolatı en %50 hastalık şiddetine değeri ile en yüksek virülensliğe sahipken; BAN belirtisinden izole edilen Ezine-5 izolatı ise %2,08 hastalık şiddeti oranı ile en düşük virülenslik göstermiştir. Bakteriyel yanıklık belirtisinden izole edilen Kula-10 izolatı %46, Sındırgı-6 izolatı %43, Bandırma-2 izolatı %42, Akhisar-4 izolatı %41 hastalık şiddeti oranına en yüksek virülenslik gösteren diğer izolatlardır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda virülensliği en yüksek olarak saptanan 5 *Xaj* izolatı ile diğer patojenisite testlerine devam edilmiştir.

4.6.2. Fungal etmenlerin ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi

Klasik tanı yöntemleri ile *A. alternata* olduğu saptanan 5 fungus izolatının patojenisitesi, *in vivo* koşullarda ham ceviz meyve testiyle değerlendirilmiştir. Sağlıklı ceviz meyvelerinin apikal ucuna temas edecek şekilde yerleştirilen fungus diklerinin oluşturduğu belirtiler 15. gün sonunda BAN için belirtilen 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.20).

Ham ceviz meyvelerinde yapılan test sonuçlarına göre 8 *A. alternata* izolatının 4'ü, 15. günde yapılan değerlendirme sonuçlarına göre ceviz meyvelerinin apikal ucunda hiçbir belirti oluşturmamış ve 0-4 skalasına göre 0 olarak değerlendirilmiştir.

[illegible]

EK-3, ES-4 ve ES-5 izolatları hastalık şiddeti oranı %75 iken EK-1 izolatının %18'dir (Tablo 4.7). Yapılan değerlendirmeler sonucunda virülensliği en yüksek olan 3 *A. alternata* izolatı ile diğer patojenisite testine devam edilmiştir.

4.6.3. Bakteriyel x fungal etmenlerin birlikte ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi

Bakteriyel ve fungal izolatlar ham ceviz meyvelerinde teksele olarak testlendikten sonra, virülensliği en yüksek olan 5 *Xaj* izolatı ve 3 *A. alternata* izolatı seçilmiş ve sağlıklı ceviz meyvelerinde aynı inokulasyon noktasına birlikte uygulanmıştır. Patojenisite test sonuçları 3.2.4.1 bölümünde BAN için belirtilen 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Bakteri x fungus izolatlarının ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi sonuçları.

Test sonuçlarına göre sadece Akhisar-4/ES-4 kombinasyonu meyvenin apikal ucundan herhangi bir belirti oluşturmamış ve 0-4 skalasına göre sıfır olarak değerlendirilmiştir. Diğer bakteri x fungus izolatlarının hastalık şiddeti değerleri ise Tablo 4.8'de görüldüğü gibi %12,5-43,75 arasında değişiklik göstermektedir.

BAN belirtisinden izole edilen Bayramiç-4 izolatının EK-3 ve ES-5 no'lu izolatlar ile birlikte uygulandığında %43,75 oranında, Bandırma-2 izolatının EK-3 ve ES-5 no'lu izolatlar ile birlikte uygulama yapıldığında %43,75 oranla hastalık şiddeti ile en yüksek virülenslik gösteren izolatlardır.

Tablo 4.8. Bakteri x fungus izolatlarının patojenisite test sonuçlarına göre BAN hastalık şiddeti değerleri (%).

İzolat No (Bakteri/Fungus)	Tekerrürlerde Saptanan Skala Değerleri				Hastalık Şiddeti (%)
	1	2	3	4	
Sındırgı-6/ES-5	1	1	2	2	37,5
Bayramiç-4/ES-5	2	2	2	1	43,75
Akhisar-4/ES-5	2	2	1	1	37,5
Kula-10/ES-5	1	2	2	1	37,5
Bandırma-2/ES-5	1	2	2	2	43,75
Sındırgı-6/EK-3	0	1	1	1	18,75
Bayramiç-4/EK-3	1	2	2	2	43,75
Akhisar-4/EK-3	0	0	1	1	12,5
Kula-10/EK-3	1	2	1	1	31,25
Bandırma-2/EK-3	1	2	2	2	43,75
Sındırgı-6/ES-4	0	1	1	1	18,75
Bayramiç-3/ES-4	1	1	1	1	25
Akhisar-4/ES-4	0	0	0	0	0
Kula-10/ES-4	1	1	1	1	25
Bandırma-2/ES-4	0	0	1	1	12,5

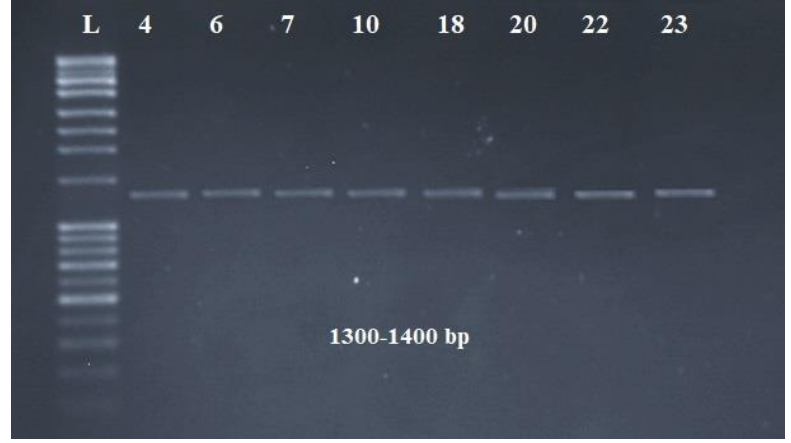
Patojenisite testi sonuçlarına göre; bakteri ve fungus izolatlarının teksele ve kombinasyon şeklinde uygulama sonucunda hastalık şiddeti oranları değerlendirildiğinde teksele uygulamalarda hem bakteri hem fungus izolatlarının hastalık şiddeti oranı daha yüksek iken kombinasyon şeklindeki uygulamada ise hastalık şiddeti oranının düştüğü görülmüştür.

4.7. Moleküler Tanı ve Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları

Morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve patojenisite testleri sonucunda *Xaj* olduğuna karar verilen izolatların DNA izolasyonu, Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (Norgen, Biotek Corp.) protokolü uygulanmıştır. Moleküler çalışmalarda Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) (gris) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

4.7.1. Bakteriyel etmenlerin moleküler tanı çalışmaları sonuçları

Genetik ve coğrafik olarak farklılıkları *rep*-PCR sonucunda ortaya konmuş, her il ve ilçeyi temsil edecek şekilde seçilen 8 *Xaj* izolatının moleküler tanısı 16S rRNA gen bölgesine spesifik 27F/1492R universal primerleri kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. *Xaj* izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 4: Akhisar-4, 6: Ezine-5, 7: Bayramiç-4, 10: Sındırgı-6, 18: Kula-10, 20: Bandırma-2, 22: Dursunbey-1, 23: Ayvacık-1 (meyve), L: HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp).

Şekil 4.22 incelendiğinde 16S rRNA bölgesine spesifik 27F/1492R universal primerleri ile yapılan PCR sonucunda Akhisar-4, Ezine-5, Bayramiç-4, Sındırgı-6, Kula-10, Bandırma-2, Dursunbey-1 ve Ayvacık-1 (meyve) izolatları 1300-1400 bp aralığında bant oluşturmuşlardır. PCR ürünleri SANGER sekansı sonuçları ile NCBI veri tabanındaki (www.ncbi.nlm.nih.gov) mevcut türlerin benzerlikleri karşılaştırılmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. *Xaj* izolatlarının 16S rRNA geni sekans sonuçları.

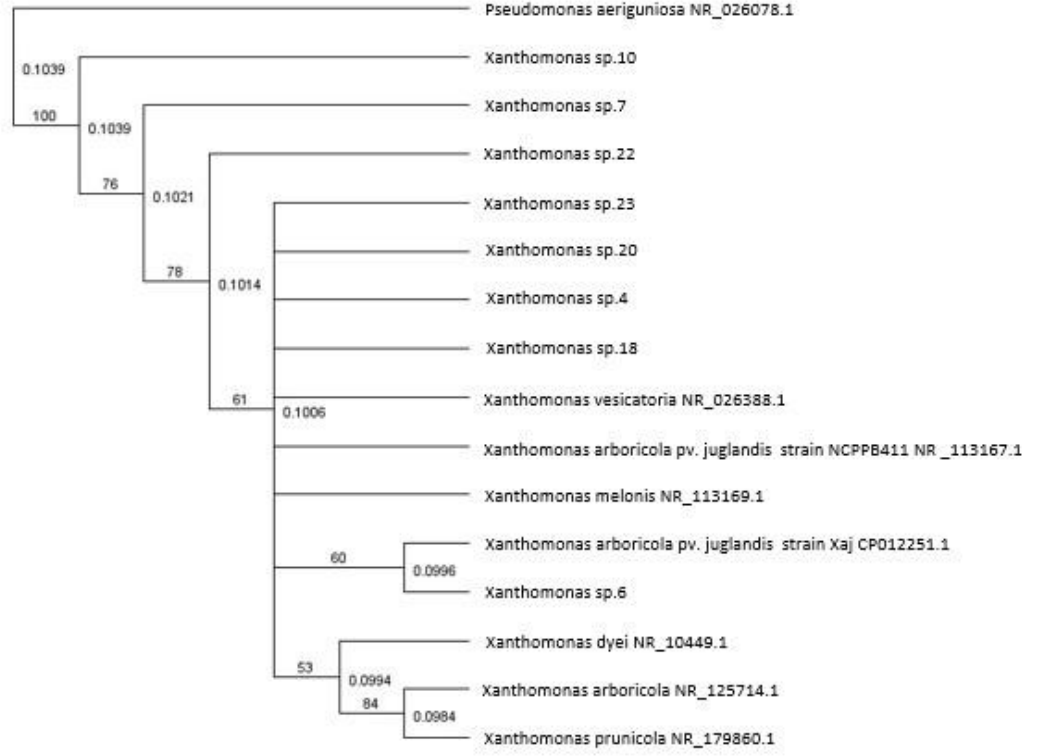
İzolat No	İzolat adı	Belirti	İzolat türü	Genbank'ta Eşleştiği Erişim No /Benzerlik Oranı (%)
4	Akhisar-4	BAN	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	MT040724.1/ %99.83
6	Ezine-5	BAN	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	HG999365.1/%100
7	Bayramiç-4	BAN	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	HG999365.1/%100
10	Sındırgı-6	Yanıklık	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	MT573402.1/%100
18	Kula-10	Yanıklık	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	MT573402.1/%100
20	Bandırma-2	Yanıklık	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	LR861807.1 %100
22	Dursunbey-1	Yanıklık	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	MT573402.1/%100
23	Ayvacık-1 (meyve)	Yanıklık	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	MT573402.1/%100

16S rRNA gen sekansı temelli yapılmış olan moleküler tanılamada, BLAST analizi sonucunda tanısı yapılan ve NCBI veri tabanındaki türler arasındaki benzerlik oranları özetlenmiştir. Tüm isolatlar %99.83-%100 oranında *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* ile benzerlik göstermektedir (Tablo 4.9).

BAN belirtisinden elde edilen Akhisar-4 izolatu, NCBI veri tabanındaki MT040724.1 no'lu *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* türü ile %99.83 benzerlik gösterirken Ezine-5 ve Bayramiç-4 isolatları ise HG999365.1 no'lu *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* türü ile %100 benzerlik göstermiştir.

Ceviz bakteriyel yanıklığından elde edilen Bandırma-2 izolatu ile LR861807.1 no'lu *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* türü %100 benzerlik gösterirken Sındırgı-6, Kula-10, Dursunbey-1 ve Ayvacık-1 (meyve) isolatlarının tümü MT573402.1 ile %100 benzerlik göstermiştir.

Söz konusu *Xaj* isolatları OQ719871 (Bayramiç-4), OQ719872 (Ezine-5), OQ719873 (Sındırgı-6), OQ719874 (Akhisar-4), OQ719875 (Bandırma-2), OQ719876 (Ayvacic-1 meyve), OQ719877 (Dursunbey-1) ve OR272030 (Kula-10) accession numarası ile NCBI veri tabanına kayıt edilmiştir.



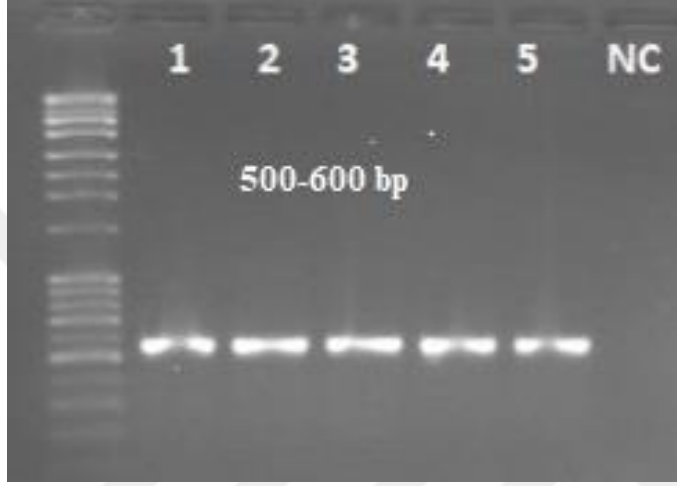
Şekil 4.23. *Xaj* izolatlarının 16S rRNA geni dendrogramı. *Xaj* izolatları arasındaki benzerlik Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak ortaya konulmuştur. Dal uzunluğunun toplamı 0.11880324 optimal olan dendrogram gösterilmektedir. Bootstrap testinde (1000 tekrar) ilişkili grupların kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar, Tamura-Nei yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analiz 16 nükleotit sekansını içermektedir. Final veri setinde 1594 pozisyon bulunmaktadır. Evrimsel analizler MEGA X' te yapılmıştır.

Balıkesir, Çanakkale ve Manisa' dan elde edilen 8 *Xaj* strain arasındaki filogenetik ilişkinin karşılaştırılabilmesi için diğer *Xanthomonas* strain dendrograma dahil edilmiştir. NCBI veri tabanındaki referans strainlerden *Pseudomonas aeruginosa* NR 026078.1 outgroup olarak kullanılmıştır. 16S rRNA sekans sonuçlarına göre oluşturulan dendrogramda tüm *Xaj* strainlerinin tek bir monofiletik grupta toplandığı görülmektedir (Şekil 4.23).

Her iki hastalık belirtisinden elde edilen izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, patojenisite ve moleküler tanılama test sonuçlarının birbirini desteklediği ve tüm izolatların *Xaj* olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca 16S rRNA sekans sonuçlarına göre BAN izolatları ile ceviz bakteriyel yanıklık izolatları NCBI veri tabanındaki farklı *Xaj* türleri ile eşlemiştir.

4.7.2. Fungal etmenlerin moleküler tanı çalışmaları sonuçları

Morfolojik ve makroskobik tanılama sonucunda *A. alternata* olduğuna karar verilen ve her grubu temsil edecek şekilde seçilmiş 5 fungus izolatının moleküler tanısı ITS gen bölgesine spesifik ITS1/ITS4 primerleri kullanılarak yapılmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.24’de verilmiştir.



Şekil 4.24. *A. alternata* izolatlarının PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü 1: Akhisar, 2: Bayramiç, 3-4: Ezine, 5: Akhisar, L: HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp).

Şekil 4.24 incelendiğinde *A. alternata* izolatları için ITS1/ITS4 primer çifti ile 500-600 bp aralığında bant elde edilmiştir. PCR ürünleri SANGER sekans sonuçları NCBI veri tabanındaki (www.ncbi.nlm.nih.gov) mevcut türlerle benzerlikleri karşılaştırılmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. *A. alternata* izolatlarının ITS geni sekans sonuçları.

İzolat No	İzolat adı	İzolat türü	Genbank'ta Eşleştiği Erişim No /Benzerlik Oranı (%)
1	Akhisar-4	<i>Alternaria alternata</i>	MT482506 %100
2	Bayramiç-4	<i>Alternaria alternata</i>	MT482505 %100
3	Ezine-2	<i>Alternaria alternata</i>	MT482505 %100
4	Ezine-5	<i>Alternaria alternata</i>	MT482505 %100
5	Akhisar-6	<i>Alternaria alternata</i>	MT482506 %100

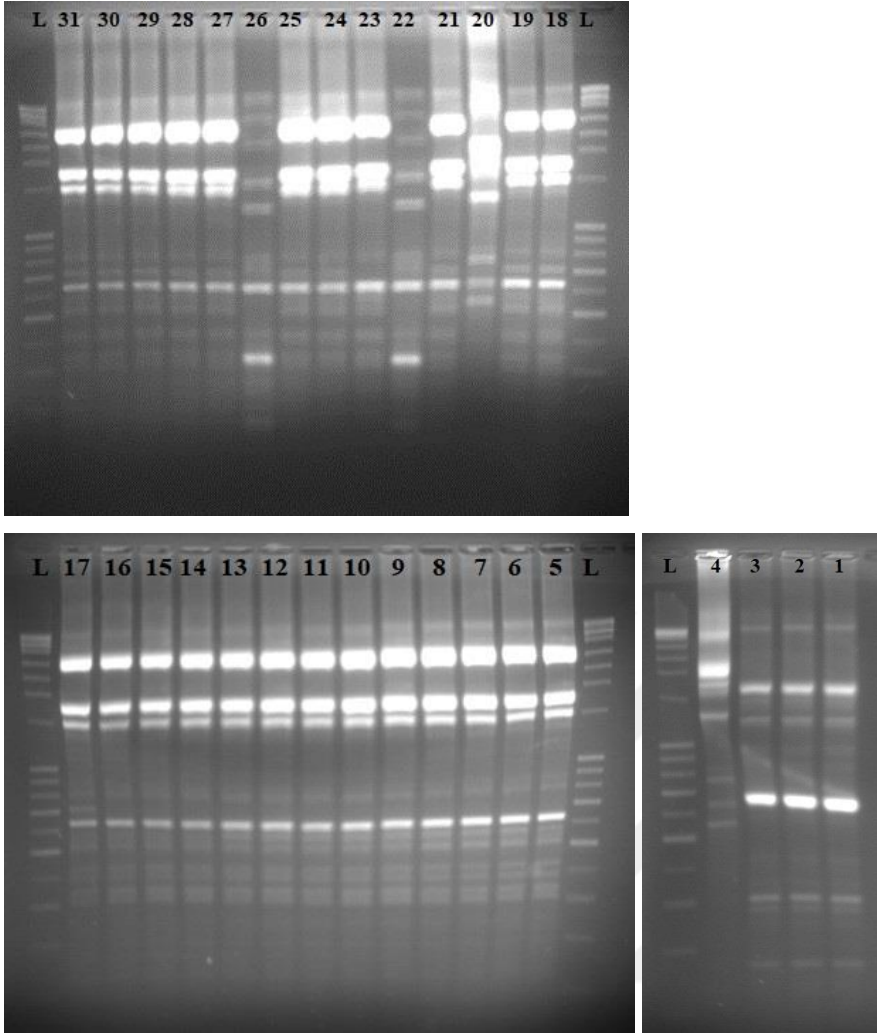
Tablo 4.10 incelendiğinde ITS gen sekansı temelli yapılmış olan moleküler tanılamada, BLAST analizi sonucunda tanısı yapılan ve NCBI veri tabanındaki türler arasındaki benzerlik oranları özetlenmiştir. Bayramiç-4 (2), Ezine-2 (3) ve Ezine-5 (4) izolatları NCBI veri tabanındaki MT482505 no'lu *A. alternata* no'lu *A. alternata* Akhisar-4 (1) ve Akhisar (6) izolatları ise MT482506 no'lu *A. alternata* türü ile %100 benzer bulunmuştur. Sonuç olarak, morfolojik ve makroskobik özelliklerine göre 5 adet *A. alternata* izolatının tanı sonuçları ile klasik PCR ile yapılan moleküler tanılama sonuçları birbirini desteklemektedir.

Söz konusu *A. alternata* izolatları OQ703095, OQ703096, OQ703097, OQ703098, OQ703099 accession numarası ile NCBI veri tabanına kayıt edilmiştir.

4.7.3. Bakteriyel etmenlerin rep-PCR ile moleküler karakterizasyon çalışmaları sonuçları

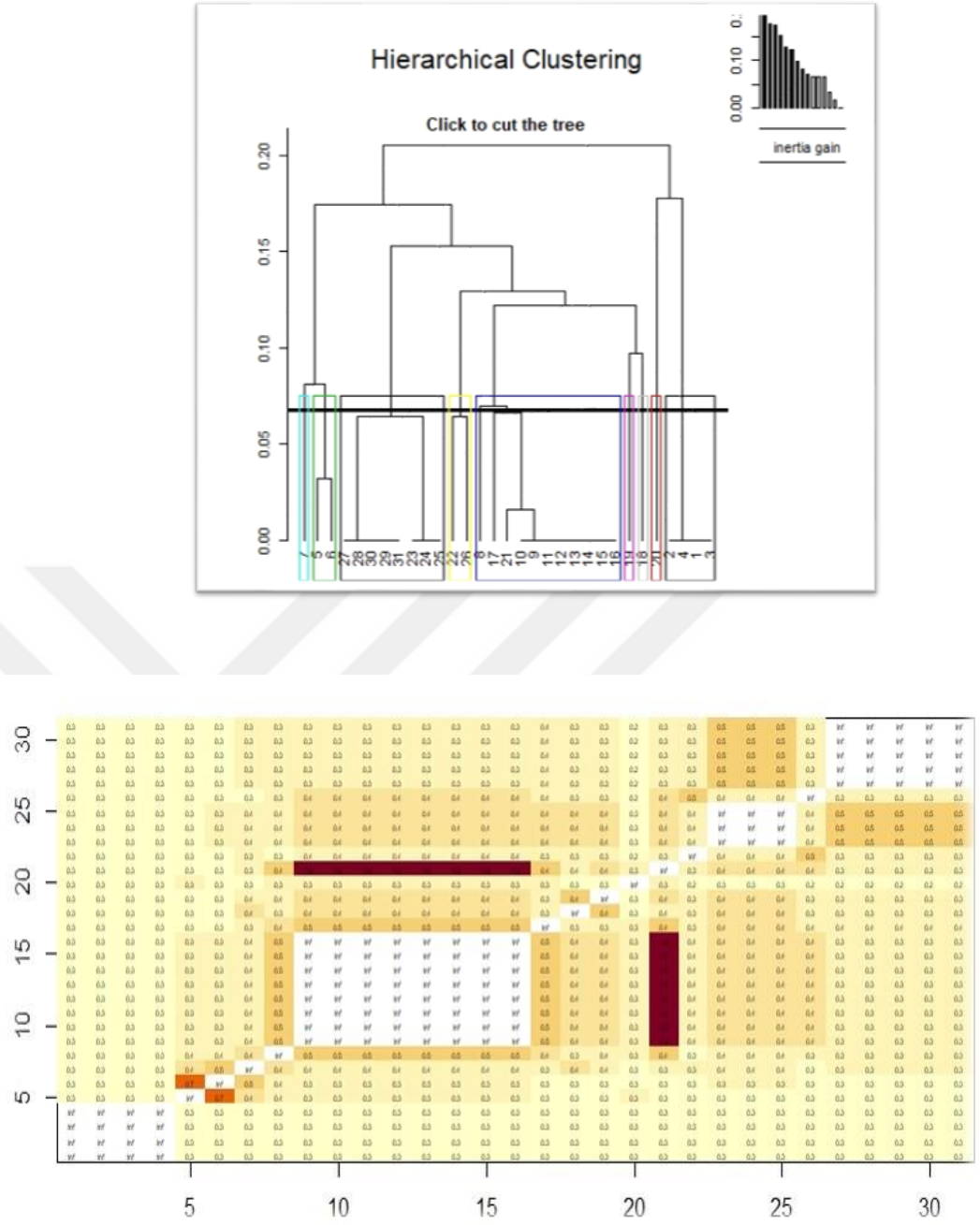
rep-PCR ile moleküler karakterizasyon çalışmalarında PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucu görüntülenen bantlar; genotiplerin sınıflandırılması için genetik boşluklar ya da izolatlar arasındaki benzerlikleri belirlemek amacıyla GelAnalyzer 2010a version yazılımı kullanılarak 1 ve 0 şeklinde skorlanmıştır. İstatistiksel analizler UPGMA (Unweighed Pair-Group Method Arithmetic Averages) kullanılarak yapılmıştır.

31 adet *Xaj* izolatının ERIC-PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucu 100-10.000bp aralığında bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *Xaj* izolatlarının ERIC-PCR parmakizi profili agaroz jel görüntüsü. 1-4:Akhisar, 5-6:Ezine, 7-8:Bayramiç, 9-14:Sındırgı, 15-17:Kepsut, 18:Kula, 19:Ayvacic-2, 20:Bandırma, 21:Ayvacic-1, 22: Dursunbey-1, 23-25:Ayvacic, 26:Dursunbey-3, 27-28:Bandırma, 29-31:Bayramiç, L: HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp).

31 *Xaj* izolatının ERIC-PCR parmak izi profili UPGMA kullanılarak gruplandırılmış ve dengedogram sonucunda 9 farklı gruba ayrılmıştır. (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. *Xaj* izolatlarının ERIC-PCR dendrogramı (üstte) ve benzerlik tablosu (altta).

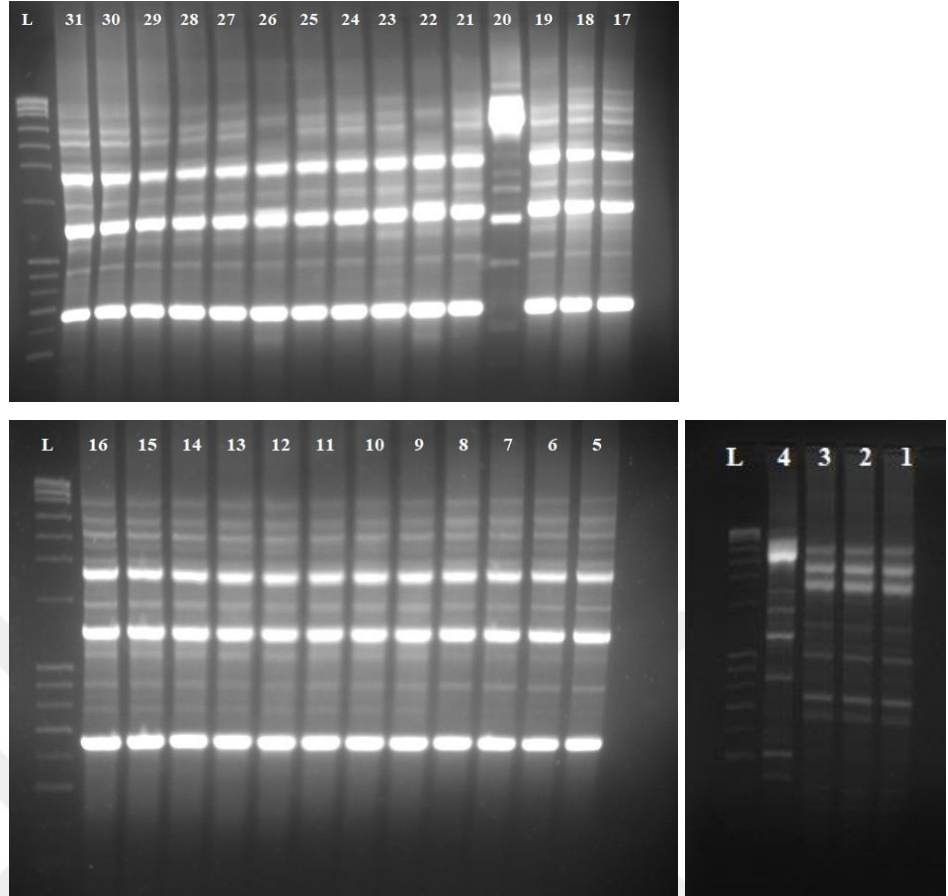
BAN belirtisinden izole edilen Bayramiç-4 (7), Ezine-2 (5) ve Ezine-5 (6) izolatlarının ERIC-PCR parmak izi profilinde birbirine benzer bantlar oluştururken Akhisar-4 (1), Akhisar-5 (3), Akhisar-6 (2) ve Akhisar-9 (4) izolatları ile aralarında farklılık görülmekte ve farklı gruplarda yer almaktadır. Yapılan UPGMA analizleri sonucunda Akhisar-4 (1), Akhisar-5 (3), Akhisar-6 (2) ve Akhisar-9 (4) izolatları kendi içinde %100 benzer bulunmuştur. Farklı ilçelerden elde edilen izolatların

benzerliği karşılaştırıldığında ise, Bayramiç-4 (7) izolatu Ezine-2 (5) ve Ezine-5 (6) ile %50 benzer bulunurken; Akhisar-4 (1), Akhisar-5 (3), Akhisar-6 (2) ve Akhisar-9 (4) ile %30 oranında benzerlik göstermiştir. Söz konusu izolatların patojenisite test sonuçlarına bakıldığında ise Bayramiç-4 izolatının hastalık şiddeti oranı %50 ile en yüksek virülensliğe sahipken Ezine-5 izolatu %2,08 olarak değerlendirilmiştir. Akhisar-4 (1) izolatu %41, Akhisar-9 (4) %27,08, Akhisar-5 (3) %22,09 ve Akhisar-6 (2) sıfır olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4. 26).

Ceviz bakteriyel yanıklık belirtisinden izole edilen ve patojenisite testi sonuçlarına göre virülensliği en yüksek izolatlardan olan Bandırma-2 (20) izolatu ile Sındırgı-6 (10), Kula-10 (18) ve Ayvacık-1 (23) izolatları %30 oranında benzer olduğu bulunmuştur. ERIC-PCR dengrogramına göre Sındırgı ve Kepsut izolatlarının tümü, Ayvacık-1 (yaprak) ve Ayvacık-5 birbirleri ile %100 benzer olduğu ve aynı grupta yer almaktadır. Balıkesir ve Çanakkale illerinden elde edilen Bandırma -1 (27), Bandırma-3 (28), Bayramiç-3 (yaprak) (30), Bayramiç-3 (meyve) (29), Bayramiç-5 (31), Bayramiç-6 (24), Ayvacık-1 (23) ve Ayvacık-6 (25) izolatları kendi içlerinde grup oluşturmuştur. Dursunbey-1 ve Dursunbey-3 izolatları kendi aralarında %100 benzer bulunmuş ve diğer ceviz bakteriyel yanıklık izolatlarından farklı bir grupta yer almışlardır. Birbirleri ile %30 oranında benzerlik gösteren Bandırma-2 (20), Sındırgı-6 (10), Kula-10 (18) ve Ayvacık-1 (23) izolatlarının patojenisite sonuçlarına bakıldığında ise sırası ile %42, %43, %46 ve %15' tir (Şekil 4. 26).

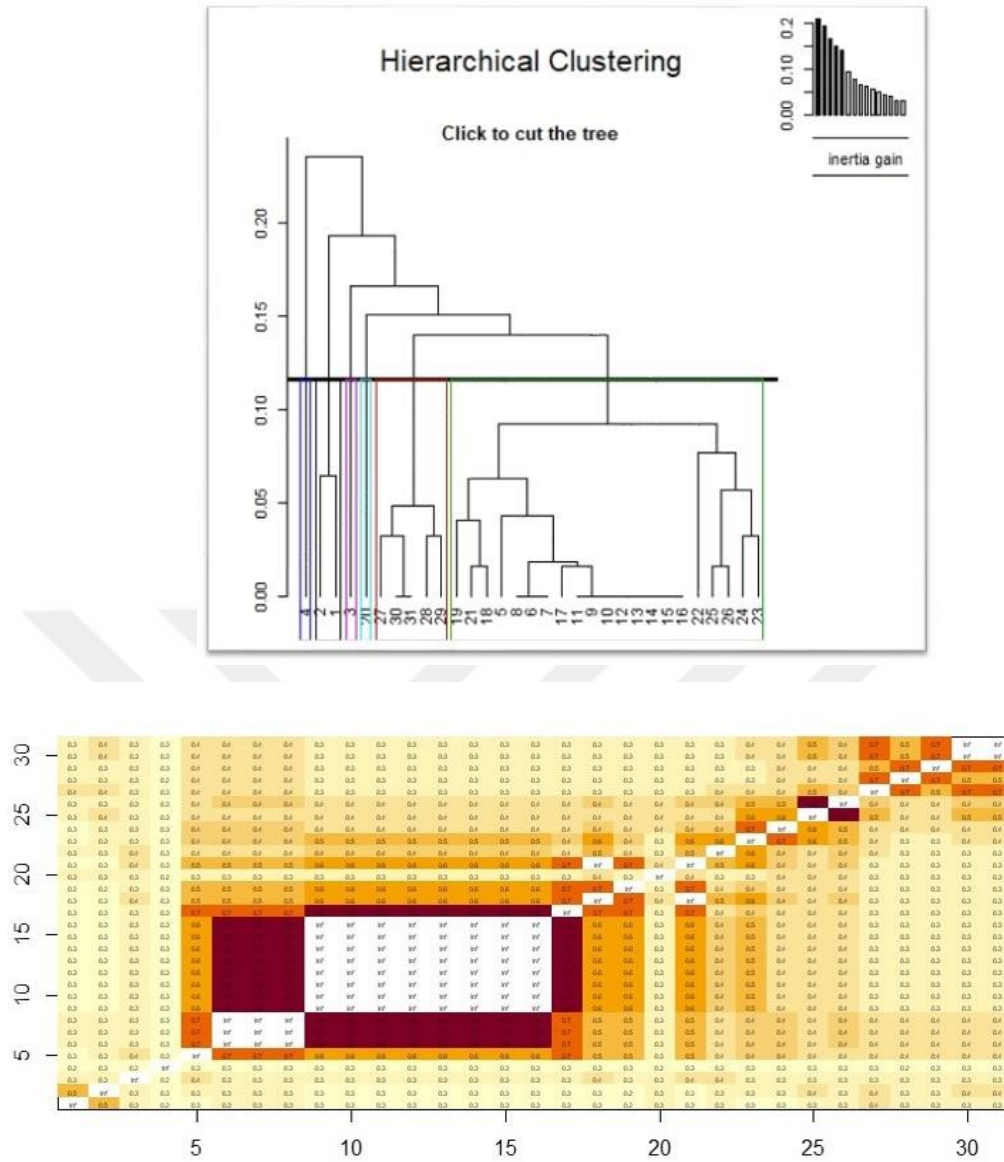
ERIC-PCR sonuçlarına göre aynı hastalık belirtisinden ve aynı il ve ilçeden elde edilen *Xaj* izolatları çoğunlukla aynı grupta yer aldığı görülmektedir. Fakat Çanakkale ilinin farklı ilçelerindeki BAN belirtilerinden elde edilen Bayramiç-4, Ezine-2, Ezine-5 ve Akhisar izolatlarında olduğu gibi hepsi farklı gruplarda yer alabildiği de görülmektedir. (Şekil 4. 26).

31 adet *Xaj* izolatının BOX-PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucu 100-10.000bp aralığında bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. *Xaj* izolatlarının BOX-PCR parmakizi profili agaroz jel görüntüsü. 1-4:Akhisar, 5-6:Ezine, 7-8:Bayramiç, 9-14:Sındırgı, 15-17:Kepsut, 18:Kula, 19:Ayvacic-2, 20:Bandırma, 21:Ayvacic-1, 22: Dursunbey-1, 23-25:Ayvacic, 26:Dursunbey-3, 27-28:Bandırma, 29-31:Bayramiç, L: HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp).

31 *Xaj* izolatının BOX-PCR parmak izi profili UPGMA kullanılarak gruplandırılmış ve dendrogram sonucunda 6 farklı gruba ayrılmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. *Xaj* izolatlarının BOX-PCR dendrogramı (üstte) ve benzerlik tablosu (altta).

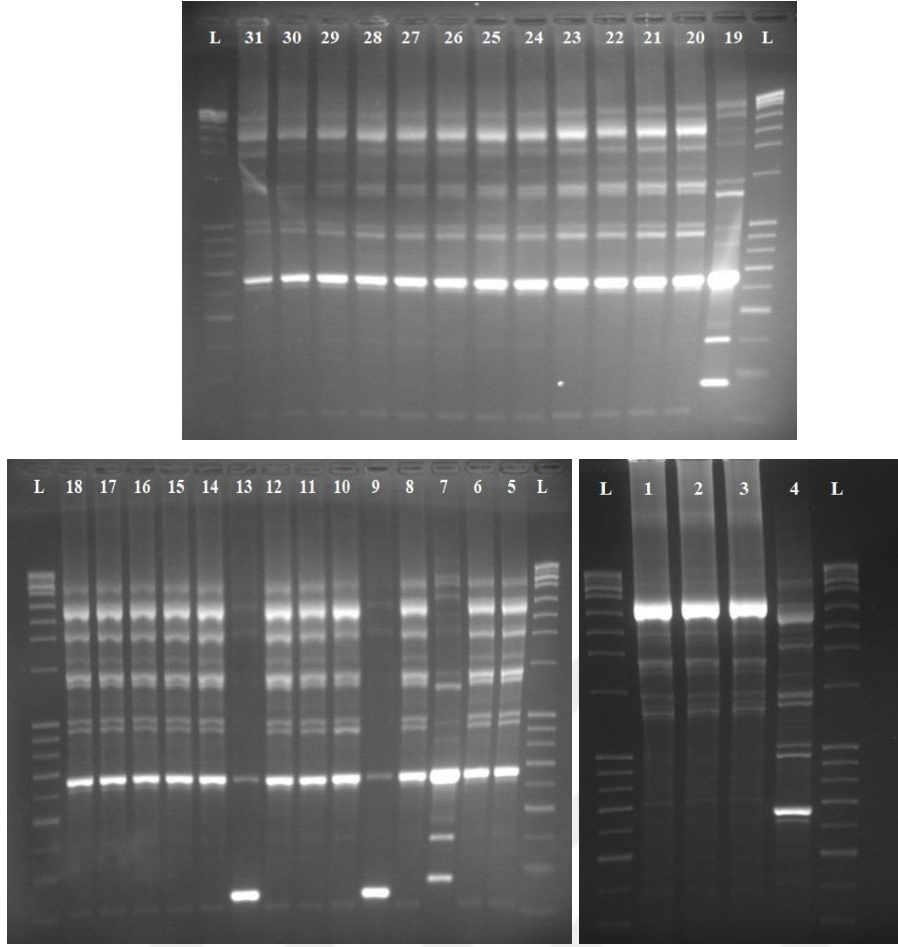
Bakteriyel yanıklık belirtisinden elde edilen Sındırgı, Kepsut, Ayvacık, Dursunbey ve Kula izolatlarının tümü, Bayramiç ve Bandırma izolatlarının bazıları ile BAN belirtisinden elde edilen Ezine izolatları aynı grupta yer almıştır. Balıkesir ve Çanakkale' nin farklı ilçelerinden elde edilen Bandırma-1 (27), Bandırma-3 (28), Bayramiç-3 (yaprak) (30), Bayramiç-3 (meyve) (29), Bayramiç-5 (31) izolatları ise aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.28).

Ayvacık, Sındırgı, Kepsut, Dursunbey, Kula izolatlarının tümü ve bazı Bayramiç izolatları ile BAN belirtisinden elde edilen Ezine-2 (5) ve Ezine-5 (6)

izolatları aynı grupta yer almıştır. Ayrıca Bandırma-1(27), Bandırma-3 (28), Bayramiç-3 (yaprak) (30), Bayramiç-3 (meyve) (29), Bayramiç-5 (31) izolatları da diğer bir grupta toplanmıştır. Bu gruptaki izolatlar arasındaki benzerlik oranlarına bakıldığında ise Bandırma-1(27) ve Bayramiç-3 (yaprak) (30) %50 benzerlik gösterirken; aynı gruptaki Bandırma-3 (28) ile %70 benzerlik göstermiştir. Bandırma-1(27) izolatu ile BAN izolatları olan Ezine-2 (5), Ezine-5 (6) ve Bayramiç-4 (7) izolatları %20 oranla birbirine en az benzeyen izolatlar olduğu görülmüştür (Şekil 4.28).

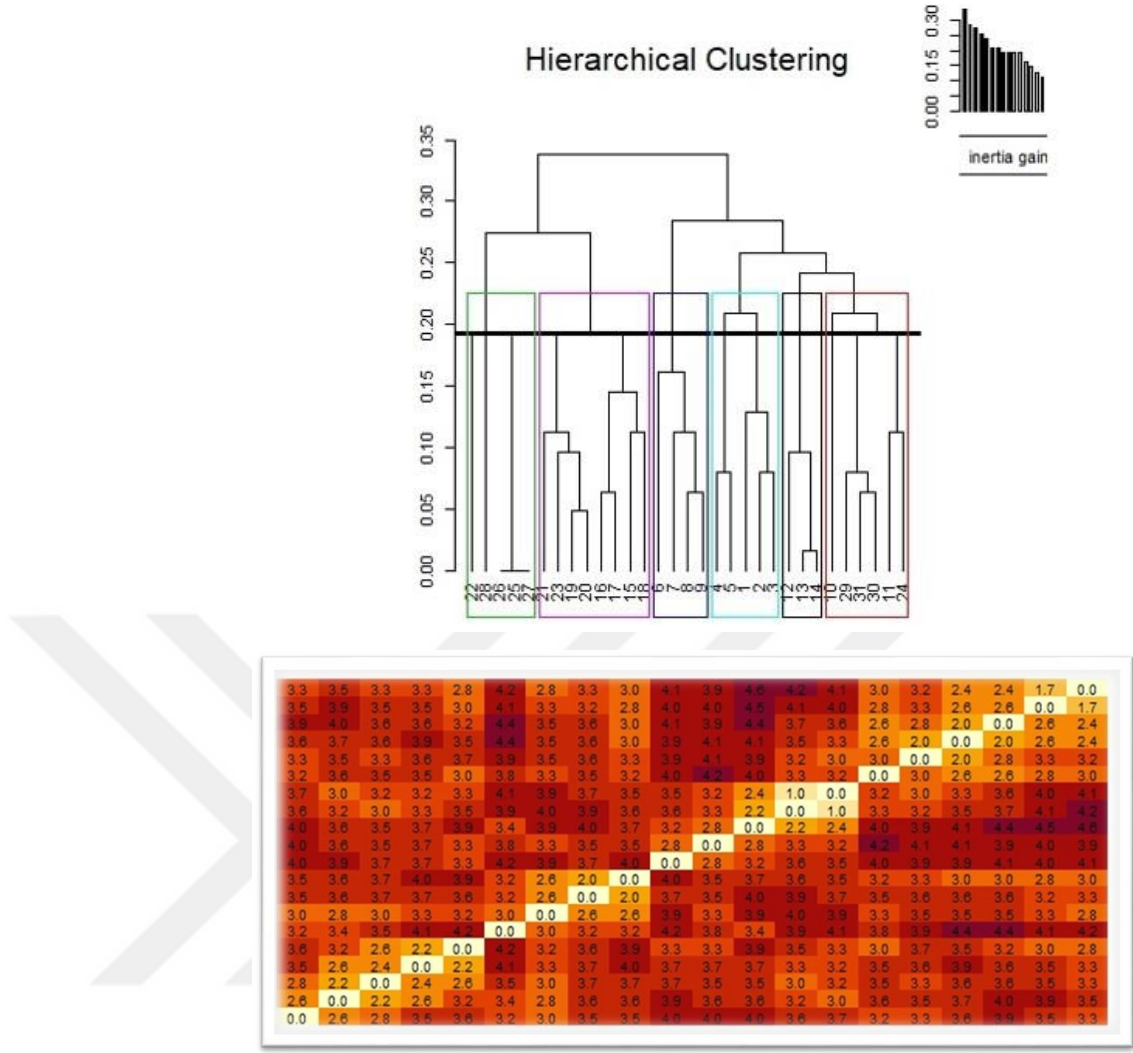
BAN belirtisinden elde edilen Akhisar izolatları BOX-PCR sonucunda 3 farklı gruba ayrılmıştır. Akhisar-6 (2) ve Akhisar-9 (1) izolatu aynı grupta fakat diğer Akhisar izolatları farklı gruplarda yer almışlardır. Akhisar-6 (2) ve Akhisar-9 (1) izolatlarının birbirleri ile benzerlik oranı %50 olup diğer Akhisar izolatları ile benzerlikleri ise %20'dir (Şekil 4.28).

31 adet *Xaj* izolatının REP-PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucu 100-8.000bp aralığında bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. *Xaj* izolatlarının REP-PCR parmakizi profili agaroz jel görüntüsü. 1-4:Akhisar, 5-6:Ezine, 7-8:Bayramiç, 9-14:Sındırgı, 15-17:Kepsut, 18:Kula, 19:Ayvacic-2, 20:Bandırma, 21:Ayvacic-1, 22: Dursunbey-1, 23-25:Ayvacic, 26:Dursunbey-3, 27-28:Bandırma, 29-31:Bayramiç, L: HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp).

31 *Xaj* izolatının REP-PCR parmak izi profili sonuçları UPGMA kullanılarak gruplandırılmış ve elde edilen dendrogram sonucunda 6 farklı gruba ayrılmıştır. (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Xqj izolatlarının REP-PCR dendrogramı (üstte) ve benzerlik tablosu (altta).

Yapılan analizler sonucunda BAN belirtisinden elde edilen Akhisar izolatlarının tümü ve Ezine-2 (5) izolatı aynı grupta yer almıştır. BAN belirtisinden elde edilen Ezine-5 (6) ve Bayramiç-4 (7) izolatları ise farklı bir grupta ve ceviz bakteriyel yanıklık belirtisinden elde edilen Ayvacık-5 (8) ve Sındırgı-5 (9) izolatları ile aynı grupta yer almıştır. Dursunbey- (22), Dursunbey-1 (26), Bandırma-1 (27), Bandırma-3 (28) ve Ayvacık-6 (25) izolatları aynı gruptadır. Kepsut izolatlarının tümü (15, 16, 17), Ayvacık-1 (yaprak) (21), Ayvacık-1 (meyve) (23), Ayvacık-2 (meyve) (19), Bandırma-2 (20) ve Kula-10 (18) izolatları da aynı grupta bulunmaktadır. Geriye kalan bakteriyel yanıklık izolatları da diğer grupta yer almaktadır.

rep-PCR ile yapılan analizler sonucunda Balıkesir, Çanakkale, Manisa il ve ilçelerindeki ceviz plantasyonlarından izole edilen 31 adet *Xaj* izolatu arasındaki genetik farklılıkların olduğu görülmüştür. BOX ve REP-PCR 6 farklı grup oluşurken ERIC-PCR sonucunda 9 farklı grup oluşmuştur. BOX ve REP-PCR sonuçlarına bakıldığında farklı il ve ilçelerdeki BAN ve ceviz bakteriyel yanıklığı belirtilerinden elde edilen *Xaj* izolatlarının aynı grupta yer aldığı görülmüştür. Fakat ERIC-PCR sonuçlarına göre her iki bakteriyel hastalıktan elde edilen izolatlar arasındaki coğrafik ve genetik farklılıkların olduğu daha açık şekilde ortaya konmuştur.

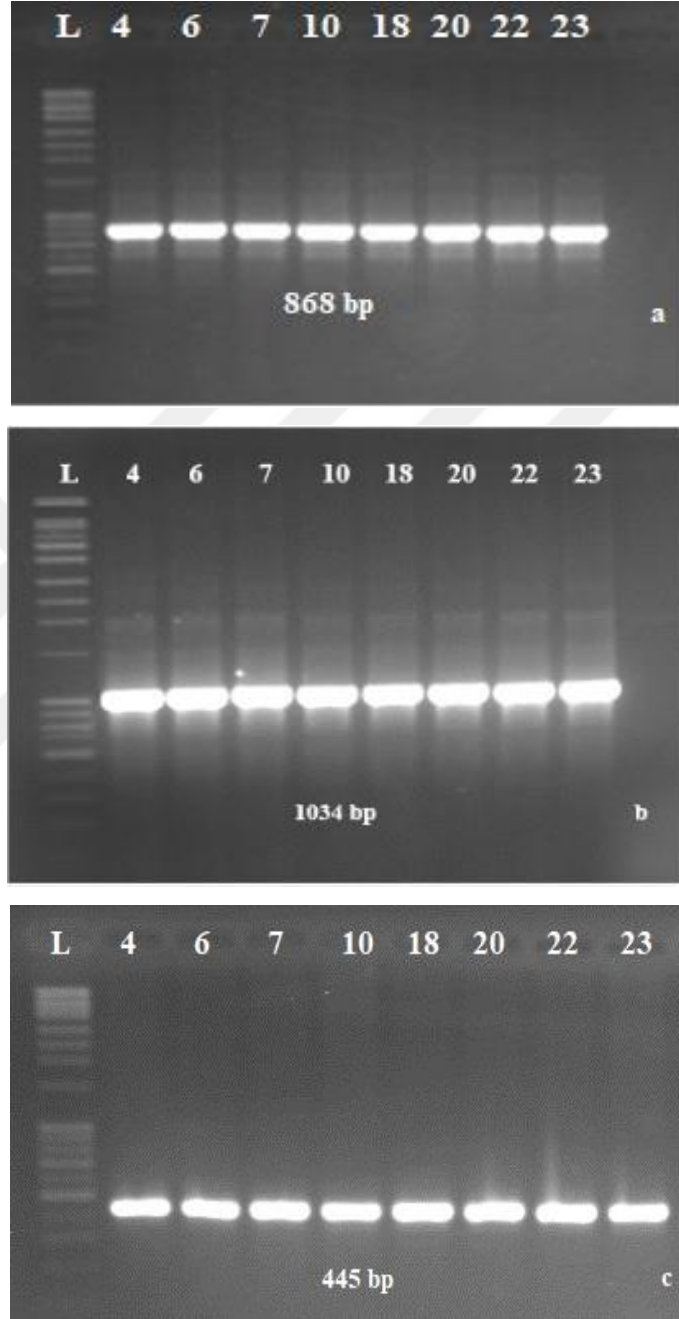
Sonuç olarak; *Xaj* izolatları arasındaki coğrafik ve genetik farklılıkların olduğu *rep*-PCR sonuçları ile desteklenmektedir. Ayrıca *rep*-PCR ve 16S rRNA sonuçları karşılaştırıldığında da söz konusu izolatlar arasında virülenslik düzeyi, genetik ve coğrafik farklılık olduğu sonucunu desteklemektedir. Sonuç olarak, *Xaj* izolatları arasında heterojenlik olduğunu kanıtlamaktadır.

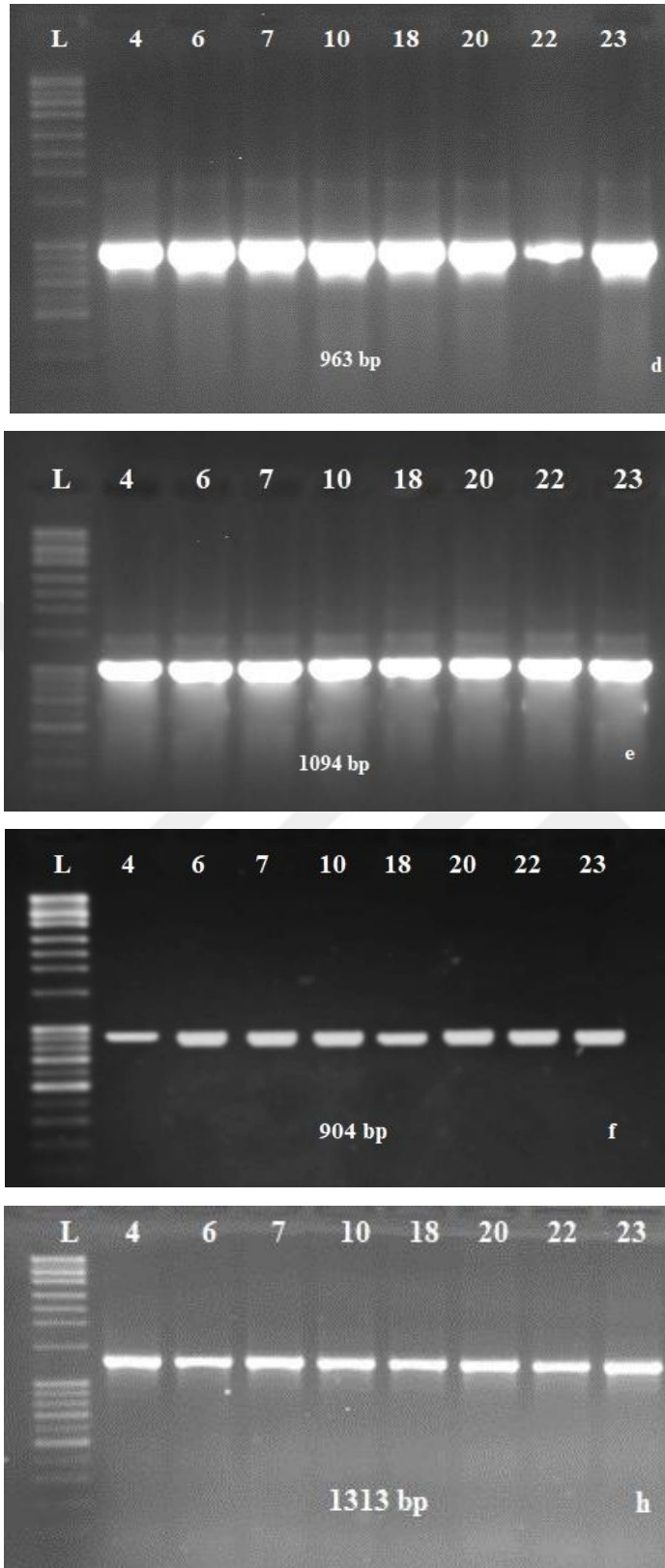
MLSA çalışmaları için 31 *Xaj* izolatından her iki hastalıktan elde edilen, genetik ve coğrafik olarak farklılıkların olduğu kanıtlanmış olan izolatlar seçilmiştir. MLSA çalışmalarına, BAN belirtilerinden elde edilen Akhisar-4 (4), Ezine-5 (6), Bayramiç-4 (7) ve ceviz bakteriyel yanıklık belirtilerinden elde edilen Dursunbey-1 (22), Ayvacık-1 (meyve) (23), Bandırma-2 (20), Sındırgı-6 (10) ve Kulan-10 (18) olmak üzere toplam 8 *Xaj* izolatu ile devam edilmiştir.

4.7.4. Bakteriyel etmenlerin Multi Locus Sequence Analyse (MLSA) çalışmaları sonuçları

Klasik ve moleküler tanı yöntemleri ile *Xaj* olduğunun kesin tanısı yapılmış 8 izolatın *rep*-PCR çalışmaları sonucunda da coğrafik ve genetik olarak birbirlerinden farklılık gösterdikleri kanıtlanmıştır. Söz konusu 8 *Xaj* arasındaki genetik akrabalık düzeyini daha ayrıntılı ortaya koymak için 7 housekeeping geni (*atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *fyuA*, *glnA*, *efp*, *rpoD*) sekans verileri teksele ve birleştirilmiş kullanılarak MLSA yapılmıştır.

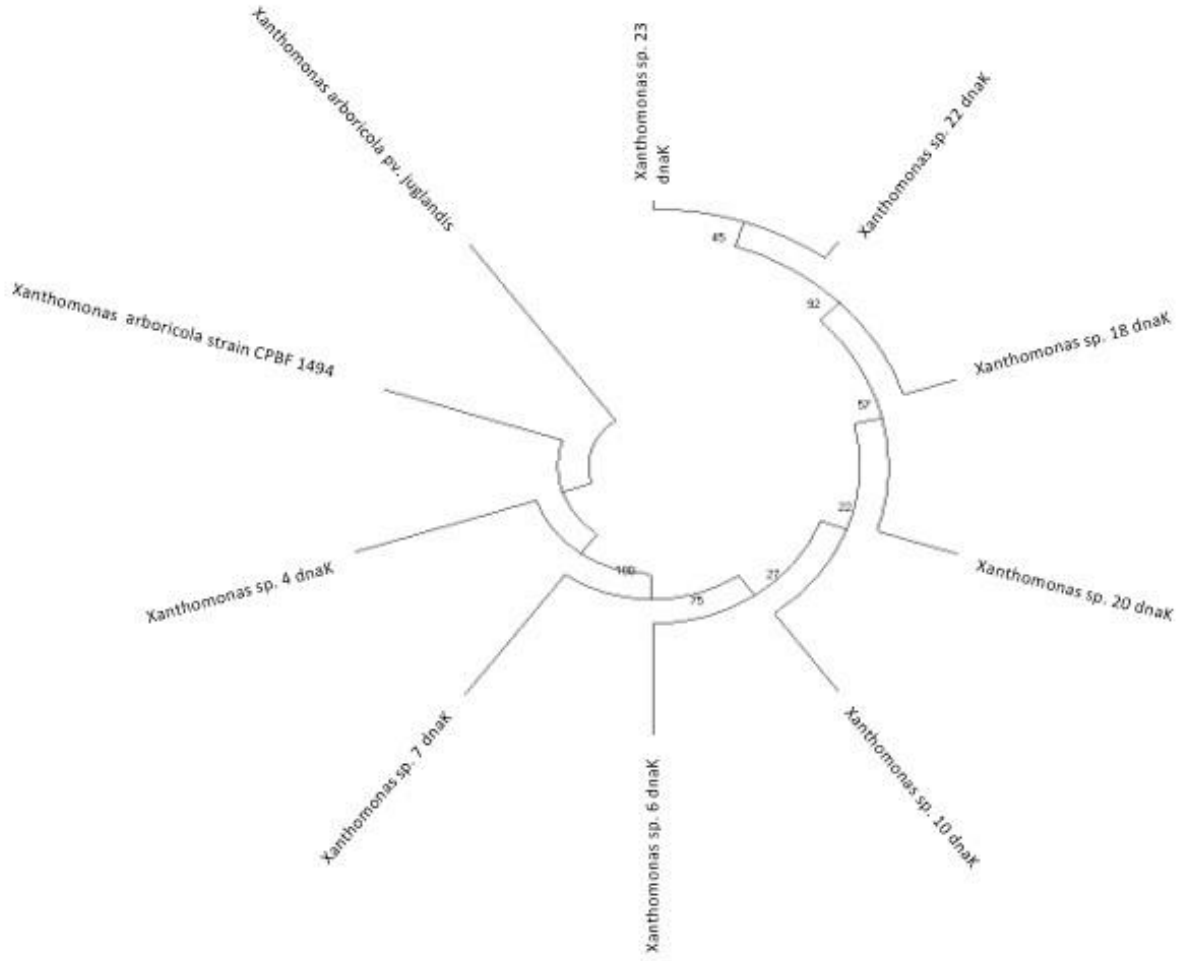
MLSA’ da kullanılan her housekeeping geni için Bölüm 3.2.5.4’de belirtilen primerler ile PCR yapılmıştır. PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.31’de verilmiştir.



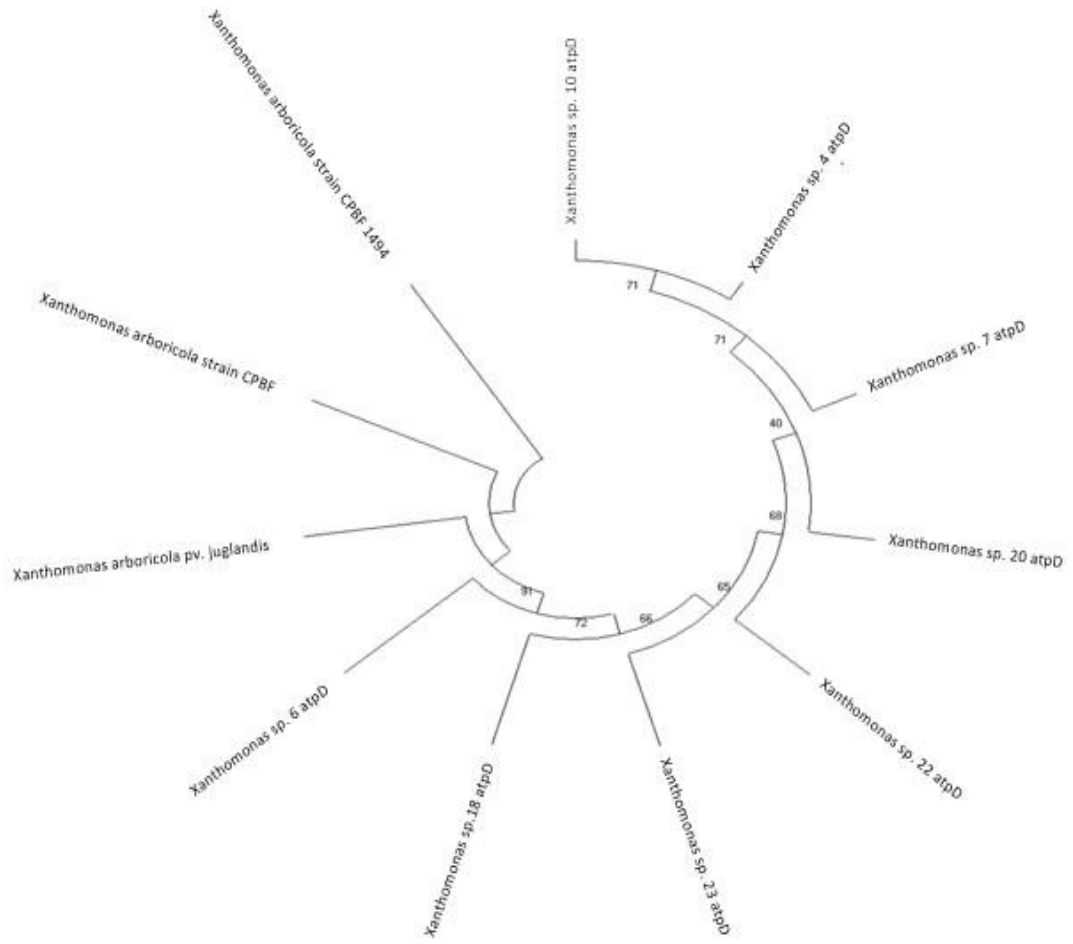


Şekil 4.31. *Xaj* izolatlarının MLSA housekeeping genlerinin PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. a) *atpD*, b) *dnaK*, c) *efp*, d) *fyuA*, e) *glnA*, f) *gyrB*, h) *rpoD*. 4: Akhisar-4, 6: Ezine-5, 7: Bayramiç-4, 10: Sındırgı-6, 18: Kula-10, 20: Bandırma-2, 22: Dursunbey-1, 23: Ayvacık-1 (meyve), L: HighRanger Plus 100 bp DNA ladder (100bp-10,000bp).

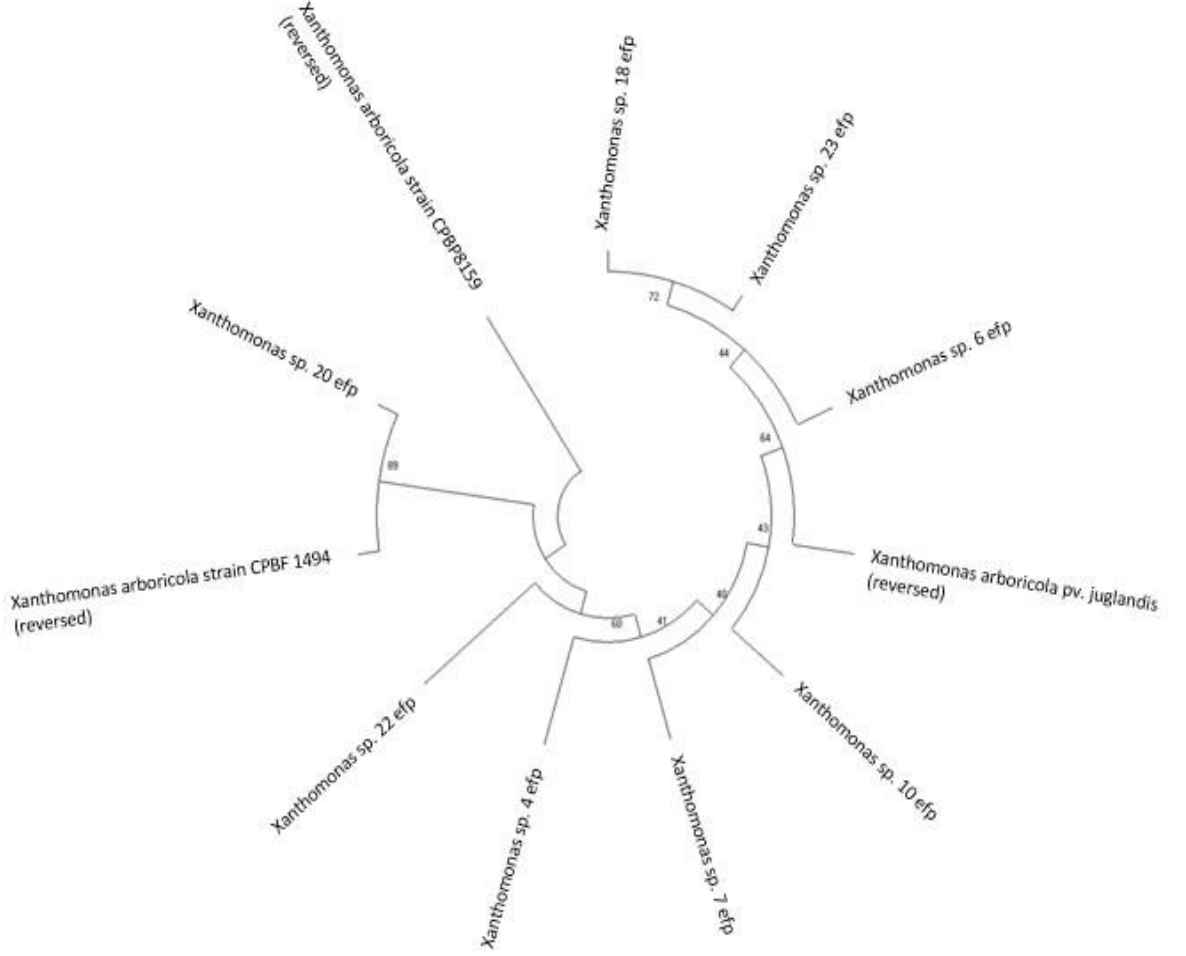
8 *Xaj* izolatı, MLSA’ da kullanılan *atpD* (868 bp), *dnaK* (1034 bp), *efp* (445 bp), *fyuA* (963 bp), *glnA* (1094 bp), *gyrB* (904 bp) ve *rpoD* (1313 bp) housekeeping genlerinde beklenen bp’de bant oluşturmuştur (Şekil 4.31). PCR ürünlerin SANGER sekans sonuçları NCBI gen bankası veri tabanındaki (www.ncbi.nlm.nih.gov) mevcut türlerle benzerlikleri karşılaştırılmıştır.



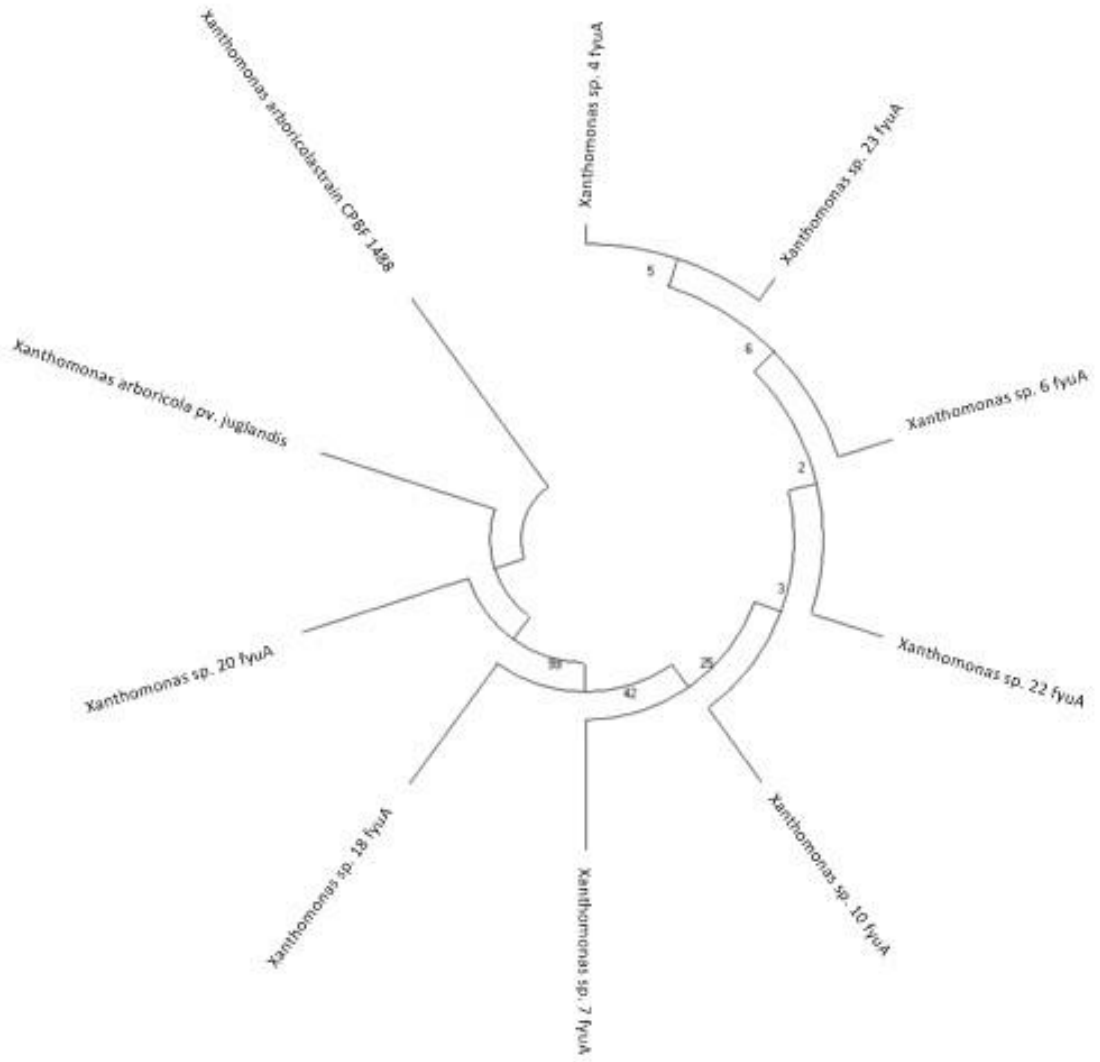
Şekil 4.32. *Xaj* izolatlarının *dnaK* geni temelli MLSA dendrogramı. *dnaK* geni dendrogramı Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Optimal dal uzunluğunun toplamı =0.28730590’dır. Bootstrap testinde (1000 tekrar) ilişkili grupların kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar, Tamura-Nei yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analiz 10 nükleotit sekansını içermektedir. Final veri setinde 1524 pozisyon bulunmaktadır. Evrimsel analizler MEGA X’te yapılmıştır.



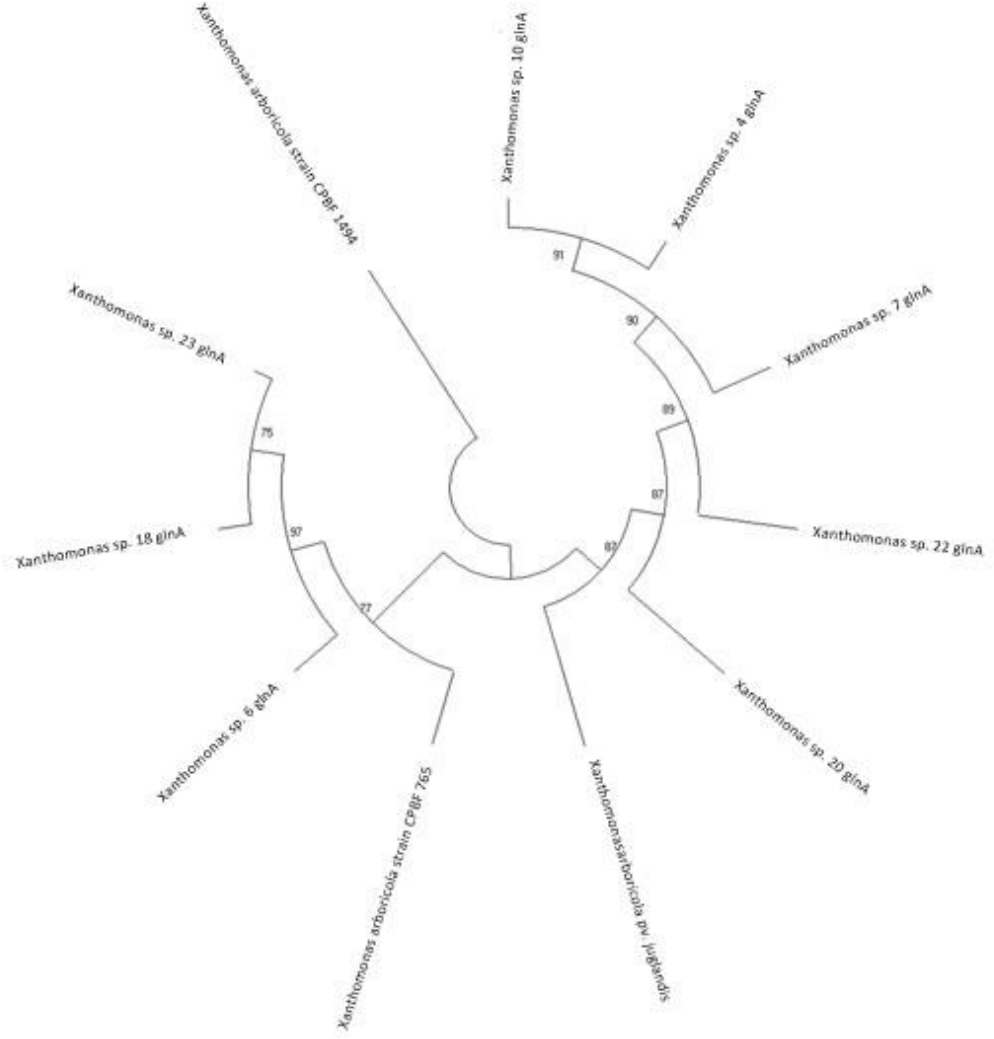
Şekil 4.33. *Xaj* izolatlarının *atpD* geni temelli MLSA dendrogramı. *atpD* geni dendrogramı Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Optimal dal uzunluğunun toplamı =0.02500059'dir. Bootstrap testinde (1000 tekrar) ilişkili grupların kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar, Tamura-Nei yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analiz 11 nükleotit sekansını içermektedir. Final veri setinde 828 pozisyon bulunmaktadır. Evrimsel analizler MEGA X'te yapılmıştır.



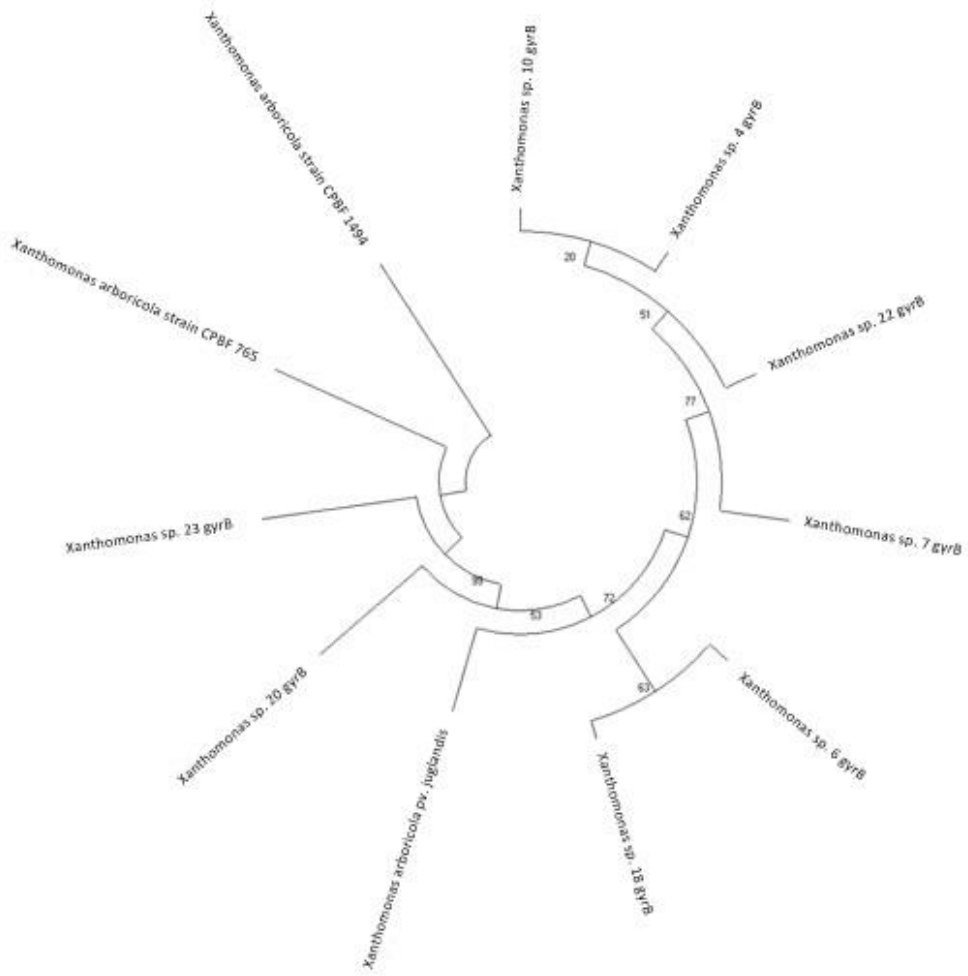
Şekil 4.34. *Xaj* izolatlarının *efp* geni temelli MLSA dendrogramı. *efp* geni dendrogramı Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Optimal dal uzunluğunun toplamı =0.01316463'dür. Bootstrap testinde (1000 tekrar) ilişkili grupların kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar, Tamura-Nei yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analiz 11 nükleotit sekansını içermektedir. Final veri setinde 420 pozisyon bulunmaktadır. Evrimsel analizler MEGA X'te yapılmıştır.



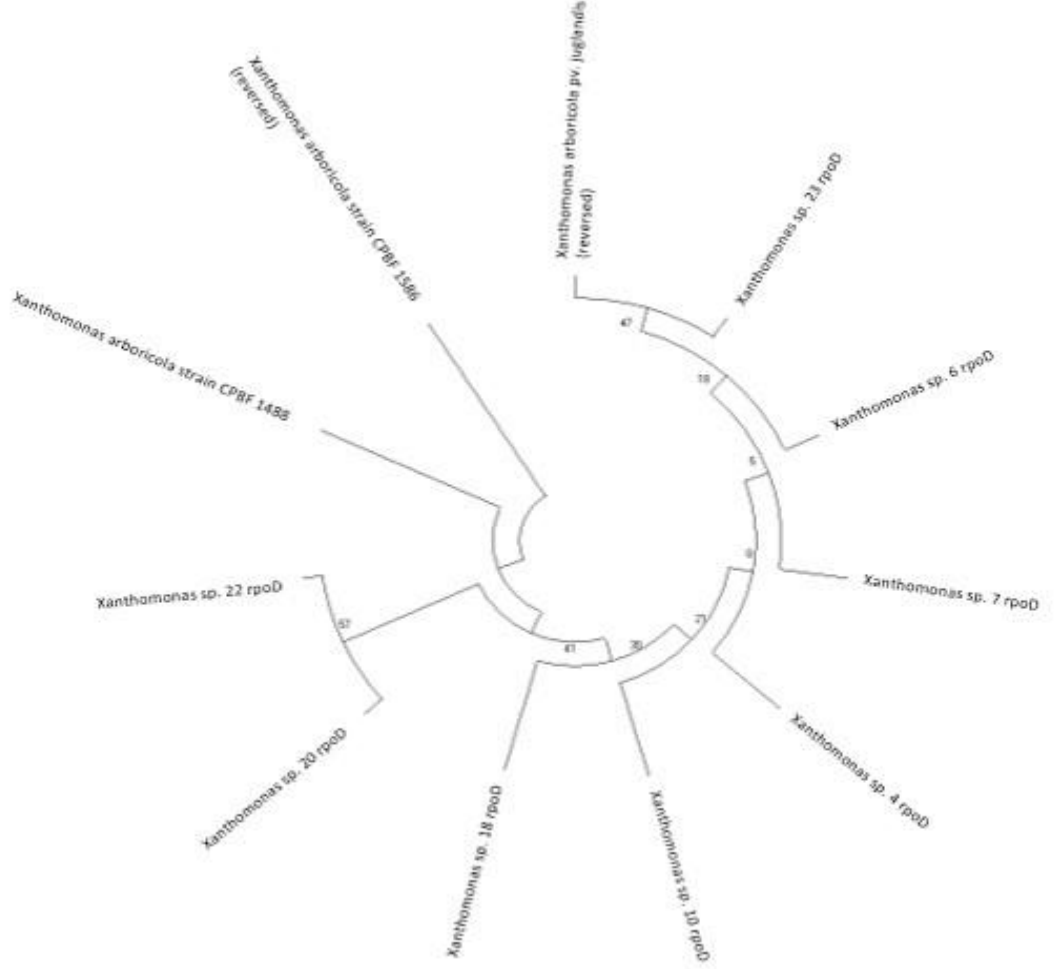
Şekil 4.35. *Xaj* izolatlarının *fyuA* geni temelli MLSA dendrogramı. *fyuA* geni dendrogramı Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Optimal dal uzunluğunun toplamı =0.02674058'dir. Bootstrap testinde (1000 tekrar) ilişkili grupların kümелendiği kopya ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar, Tamura-Nei yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analiz 10 nükleotit sekansını içermektedir. Final veri setinde 906 pozisyon bulunmaktadır. Evrimsel analizler MEGA X'te yapılmıştır.



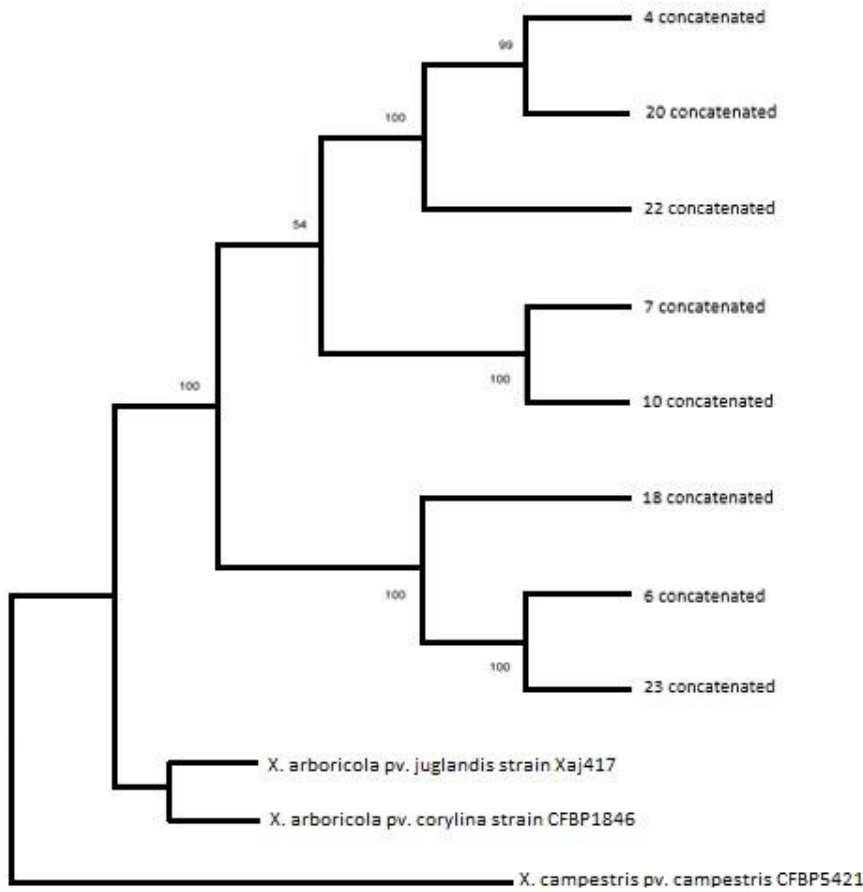
Şekil 4.36. *Xaj* izolatlarının *glnA* geni temelli MLSA dendrogramı. *glnA* geni dendrogramı Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Optimal dal uzunluğunun toplamı =0.01819801'dir. Bootstrap testinde (1000 tekrar) ilişkili grupların kümелendiği kopya ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar, Tamura-Nei yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analiz 11 nükleotit sekansını içermektedir. Final veri seti 1013 pozisyon içermektedir. Evrimsel analizler MEGA X'te yapılmıştır.



Şekil 4.37. *Xaj* izolatlarının *gyrB* geni temelli MLSA dendrogramı. *gyrB* geni dendrogramı Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Optimal dal uzunluğunun toplamı =0.01918701'dir. Bootstrap testinde (1000 tekrar) ilişkili grupların kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar, Tamura-Nei yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analiz 11 nükleotit sekansını içermektedir. Final veri seti 819 pozisyon içermektedir. Evrimsel analizler MEGA X'te yapılmıştır.



Şekil 4.38. *Xaj* izolatlarının *rpoD* geni temelli MLSA dendrogramı. *rpoD* geni dendrogramı Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Optimal dal uzunluğunun toplamı =0.3774095'dir. Bootstrap testinde (1000 tekrar) ilişkili grupların kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmiştir. Evrimsel uzaklıklar, Tamura-Nei yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu analiz 11 nükleotit sekansını içermektedir. Final veri seti 1178 pozisyon içermektedir. Evrimsel analizler MEGA X'te yapılmıştır.



Şekil 4.39. 8 *Xaj* izolatının MLSA’da 7 housekeeping geninin (*atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *fyuA*, *glnA*, *efp*, *rpoD*) birleştirilmiş dendrogramı.

8 *Xaj* straininin 7 housekeeping geninin (*rpoD*, *atpD*, *gyrB*, *efp*, *glnA*, *fyuA*, *dnaK*) birleştirilmiş sekanslarının dendrogramı Geneious Prime programında Neighbor Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. Referans strain olarak *X. arboricola* pv. *juglandis* strain Xaj417 kullanılmıştır. Karşılaştırma yapılabilmesi için *X. campestris* pv. *campestris* CFBP5421 out-grup olarak kullanılmıştır. BAN’dan elde edilen 4 (Akhisar-4) ve ceviz bakteriyel yanıklığından elde edilen 20 (Bandırma-2), 22 (Dursunbey-1) aynı grupta yer almıştır. BAN’ dan elde edilen ve 7 (Bayramiç-4) ve Ceviz bakteriyel yanıklığından elde edilen ve 10 (Sındırgı-6) izolatları da diğer bir grupta yer almaktadır. ceviz bakteriyel yanıklığından elde edilen 18 (Kula-10), 23 (Ayvacık-1) ve BAN’dan elde edilen 6 (Ezine-5) strainleri ise diğerlerinden farklı grupta yer aldığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Ceviz, dünyada ve Türkiye’de insan sağlığı açısından önemli bir besin kaynağıdır. Bunun yanı sıra kerestelik özelliğinin olması, iç ve dış pazarda kolay satılabilmesi nedeniyle ceviz yetiştiriciliği giderek önem kazanmaktadır. Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illeri ceviz yetiştiriciliğinde önemli paya sahiptir. Ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığı ile ilgili yapılan arazi gözlemleri, son yıllarda ceviz üreticilerinden gelen şikayetlerin artması ve ülkemizde kapsamlı çalışmaların henüz yapılmamış olması nedeni ile bu çalışmanın yapılmasına ihtiyaç duyulmuştur.

Bu tez çalışmasında, Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde ceviz plantasyonlarında ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığından esas sorumlu *Xaj*’nin ve BAN oluşumuna eşlik eden *Alternaria* türlerinin klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, her iki hastalığın yaygınlık oranlarının belirlenmesi, moleküler karakterizasyon çalışmaları ile *Xaj*’nin genetik ve coğrafik farklılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde ceviz plantasyonlarında üretim sezonu boyunca surveyler gerçekleştirilmiş, *Xaj* ve *Alternaria* türleri saptanmış, hastalıkların yaygınlık oranları belirlenmiştir. Farklı temellere dayanan moleküler karakterizasyon çalışmaları ile *Xaj*’nin genetik ve coğrafik dağılıma bağlı olarak farklılıklarının olup olmadığı ortaya konulmuştur.

2018-2019 yılları Mayıs-Ağustos aylarında Manisa, Balıkesir ve Çanakkale illerinde gerçekleştirilen survey çalışmalarında, üreticilerin de ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığı belirtilerini karıştırılabildiği görülmüştür. Özaktan et al. (2007), yaptıkları çalışmada ceviz bakteriyel yanıklığının ceviz meyvelerinde, başlangıçta, neden olduğu küçük yağ yeşili lezyonların zamanla siyahlaşıp meyve yüzeyine yayılarak çürüklüğe neden olduğunu bildirmiştir. Karaca (1974)’da Karadeniz Bölgesi’nde yaptığı çalışmalarda bu hastalık belirtilerini gözlemlediğini belirtmiştir. Moragrega and Özaktan (2010)’nın yaptıkları bir çalışmada ise BAN hastalığının en tipik belirtilerinin meyvenin apikal ucunda başlayan küçük kahverengi-suda haşlanmış lekelerin, bakteriyel yanıklıktan farklı olarak, zamanla meyve içine ilerleyip epikarp, mezokarp ve endokarp olmak üzere meyvenin iç

dokularına kadar ilerlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca BAN'da erken meyve dökümü de önemli belirtiler arasında yer aldığı belirtilmiştir (Akat et al., 2016). Survey çalışmalarında da her iki hastalığın tipik belirtilerine rastlanılmış ve özellikle de meyvedeki belirtiler arasında farklılıkların olduğu gözlenmiştir.

Survey çalışmaları sonucunda her iki hastalık için il ve ilçe düzeyinde hastalık oranları incelendiğinde; Balıkesir ilinde sadece ceviz bakteriyel yanıklığı görülürken (%42,77) Çanakkale ilinde ceviz bakteriyel yanıklık (%8,96) ve BAN (%7,25)'nin birbirine yakın oranlarda yaygınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Manisa ilinde ise BAN hastalığının (%10,93) ceviz bakteriyel yanıklığına (%2,83) göre daha yaygın görüldüğü ve önemli oranda ürün kaybına neden olduğu kanıtlanmıştır. Ceviz bakteriyel yanıklığı ile yapılan çalışmalarda da hastalığın ceviz üretiminde önemli oranda verimi düşürdüğü bildirilmiştir (Özaktan et al., 2007). Son yıllarda BAN hastalığı ile yapılan çalışmalar sonucunda bu hastalığa daha çok dikkat çekilmiş ve erken meyve dökümü nedeni ile ceviz üretimini olumsuz etkilediği vurgulanmıştır (Özaktan et al., 2010). Ülkemizde Marmara bölgesinde yapılan çalışmada da BAN'nın erken meyve dökümü nedeni ile ürün kaybına yol açtığı kanıtlanmıştır (Özaktan et al., 2007). Araştırmacılar her iki hastalığın farklı oranlarda yaygınlık göstermesinde bitki beslenme problemlerinde kaynaklanabileceğini ayrıca toprak yapısının ve ceviz meyvesinin fenolik içeriğinin de etkili olabileceğini savunmaktadır (Moragrega and Özaktan, 2015). Ayrıca, fidanların üretiminin ve yetiştiriciliğinin yapıldığı iklim koşullarının farklı olması nedeniyle ceviz çeşidinin biyolojik potansiyelinin düşmesi ve farklı biyotik-abiyotik stres koşullarının da bir sonucu olarak hastalıkların farklı bölgelerde farklı yaygınlıklarının olmasına neden olabilmektedir (Bandi et al., 2014). 2018-2019 yıllarında yürütülen survey çalışmalarında yapılan gözlemler ve toplanan örneklerden elde edilen çalışma sonuçları da daha önce yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Ceviz bakteriyel yanıklığı etmeni olan *Xaj* aynı zamanda BAN'dan da esas sorumlu etmendir. BAN'dan ikincil sorumlu etmenler ise *Fusarium* spp. ve *Alternaria* spp. türleridir (Belisario et al., 2010; Moragrega et al., 2011; Temperini et al., 2017). Fransa ve İtalya'da cevizlerde erken meyve dökümünün gözlemlendiği ve toplanan örneklerden yapılan izolasyon ve tanılama sonucunda *Fusarium*,

Alternaria, *Cladosporium*, *Colletotrichum* ve *Phomopsis* fungus türleri elde edilmiştir. BAN ile ilişkili fungus türlerinin bölgeye ve zamana göre farklılık gösterebileceği belirtilmiştir. Ayrıca ceviz bakteriyel yanıklık etmeni olan *Xaj* aynı zamanda BAN belirtisinden de izole edilmiş ve BAN'nın kompleks bir hastalık olduğu kabul edilmiştir (Belisario et al., 2002). Güney İspanya ve Akdeniz'de ceviz yetiştiriciliği yapılan alanlarda yürütülen benzer çalışmalar sonucunda da ceviz meyvelerindeki karakteristik uç yanıklığı ve meyve içine ilerleyen belirtilerden *Xaj* ve genel olarak *Fusarium* ve *Alternaria* fungus türlerinin elde edildiğini bildirmişlerdir (Arquero et al., 2005; Moragrega and Özaktan 2010). 2009 yılında ülkemizde BAN hastalığı ile ilgili yapılan çalışma sonuçlarına göre hastalıklı ceviz meyveleri dokularından %30 oranında *Xaj* izole edilirken BAN'dan sekonder sorumlu olan *Fusarium* spp. %3 ve *A. alternata*'nın ise %7 oranında izole edildiği kanıtlanmıştır (Özaktan et al., 2009). Moragrega et al., (2007) benzer bir çalışma sonucunda BAN ile enfekteli dokulardan %80 oranında *Xaj*, %20 oranında *Fusarium* ve *Alternaria* türlerini saptamışlardır. Yapılan diğer bir çalışmada ise *Xaj*'nin BAN'dan esas sorumlu etmen olduğunu fakat hastalığın farklı dönemlerinde *F. semitectum*, *F. solani*, *F. lateritium*, *F. poe*, *Alternaria* spp. ve *Chlamydosporium* gibi farklı fungus türlerinin de ceviz meyvesinin farklı dokularında saptandığını kanıtlamıştır (Moragrega et al., 2009). Belisario et al. (2010), BAN ile ilgili yaptığı çalışmada önceki çalışmalarla benzer sonuçlar bulmuş ve ek olarak *F. semitectum*, *F. graminearum*, *A. alternata* ve *A. arborescens*'sin en agresif türler olduğunu ve söz konusu fungusların BAN'da ikincil etkilerinin olduğu ortaya koymuştur. Scotton et al. (2015) ise önceki çalışmaların aksine, BAN'dan elde edilen fungusların yıllara göre farklılık gösterdiğini ayrıca *F. graminearum* ve *Alternaria* türlerinin *F. semitectum*'a göre daha agresif olduğunu, *Fusarium* türlerinin ise BAN'dan sorumlu esas etmen olduğunu savunmaktadır. Moya-Elizonda et al. (2018), Güney Şili'de yaptıkları çalışma sonucunda *Xaj*'nin BAN ile ilişkili olduğunu kanıtlamışlardır. 2021 de yaptıkları diğer bir çalışmada ise BAN'a neden olan funguslar üzerinde durup *A. alternata*'nın %50, *F. avenaceum*, *F. culmorum* ve *F. oxysporum*'un sırası ile %40, 10 ve 50 oranında BAN'da etkili olduklarını savunmuşlardır. Temperini et al., (2017)'nin *Xaj*'nin BAN ile ilişkili olduğunu ve *Fusarium* dışında ilk olarak *A. tenuissima* ve *Epicoccum* spp.'nin de bulunabileceğini belirlemiştir.

Xaj'nin BAN ile ilişkili olduğunu kanıtlayan çalışmaların aksine Şandong (Çin)'da yapılan çalışmada, BAN belirtisi görülen ve dökülmüş ceviz meyvelerinden *Xaj*, *Alternaria* spp. ve *Pantoea agglomerans* izole edildiği bildirilmiştir. Fizyolojik, biyokimyasal testler, patojenisite testleri sonucunda 16S rRNA gen sekansı sonuçlarına göre de *P. agglomerans*'ın BAN' dan sorumlu esas etmen olduğu bildirilmiştir (Yang et al., 2011). Çin'de yapılan diğer bir çalışma sonucuna göre BAN belirtili meyvelerden baskın tür olarak *P. agglomerans*'ın ve fungus türleri olarak da *Alternaria* spp., *F. avenaceum* ve *Colletotrichum* spp.'nin elde edildiği belirtilmiştir (Wang et al., 2019). *P. agglomerans*'ın BAN'dan sorumlu esas etmen olduğunu kanıtlayan bu iki çalışma dışında başka bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır. Böylece önceki çalışmaların çoğunda belirtildiği gibi bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre de *Xaj*'nin ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN'dan sorumlu esas etmen olduğu, *A. alternata*'nın ise BAN'da sekonder etkili olduğunu desteklemektedir. Fakat Scotton et al. (2015)'a göre *Fusarium* türleri BAN'dan sorumlu esas etmen iken bu tez çalışmasında *A. alternata* bulunmuş ve sekonder etkili olduğu kanıtlanarak iki çalışmanın sonuçları arasında benzerlik görülmemektedir. Ayrıca *P. agglomerans*'ın da BAN'ın esas etmeni olarak bulunduğu diğer çalışmalar ile bu tez çalışması sonuçları da birbirini desteklememektedir.

Günümüzde bitki patojenlerinin tanısında moleküler tanılama yöntemlerinin kullanımı hızlıca yaygınlaşsa da klasik tanı yöntemleri birçok patojenin tanısında hala geçerliliğini ve güncelliğini korumaktadır. Bunun nedeni ise tanısı yapılmak istenen patojen gruplarının belirlenmesi ve devamında kullanılan moleküler çalışmalara hız kazandırmasıdır. Bu tez çalışmasında da *Xaj* ve *A. alternata*'nın kesin tanısının yapılması amacı ile morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve patojenisite testlerinin yanı sıra klasik PCR ile moleküler tanı yöntemi kullanılmıştır.

Xaj'nin klasik yöntemlerle tanısında, YDC besi yerinde tipik sarı-mukoid koloni gelişimi, mTween besi yerinde koloni çevresinde presipitasyon zonu oluşumu (Stolp and Starr, 1964) ve sarı renkte suda çözünmeyen Xanthomonadine pigmenti karakteristiktir. *Xaj*'nin tanısında YDC ve mTween besi yerleri önemlidir (Lelliot and Stead, 1987). Ayrıca levan oluşumu pozitif, oksidaz, patates çürüklük

testi ve arginin dehidrolaz testinde negatif, domates bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu testinde pozitif sonuçların gözlenmesi (LOPAT), jelatin hidrolizi ve aesculin hidrolizi testlerinin pozitif, tyrosin ve tartaric asit kullanımının negatif sonuç vermesi (GATTa), karbon kaynaklarının kullanımı, nişasta hidrolizi, aerobik gelişim testleri ve patojenisite testi klasik tanılamada yaygın olarak kullanılan önemli testlerdendir (Schaad et al., 2001; Klement, 1990). LOPAT ve GATTa testleri, pratik olmakla birlikte, hem objektif hem de tutarlı sonuçlar sağlamaktadır. Ceviz bakteriyel yanıklık belirtisinden izole edilen ve YDC besisi yerinde *Xanthomonas* benzeri tipik sarı-mukoid koloni gelişimi gösteren izolatlar seçilerek LOPAT, nişastanın hidrolizi, glukoz oksidasyonu, tütünde aşırı duyarlılık testi, karbonhidrat kaynaklarının kullanımı ve ham ceviz meyvelerinde patojenisite testleri yapılmış ve elde edilen izolatlar klasik tanı yöntemleri sonucunda *Xaj* olarak tanımlanmıştır (Bandi et al., 2014). Balıkesir ilinde BAN belirtilerinin görüldüğü yaprak sapı, meyvelerdeki kahverengi-çürümüş dokulardan yapılan izolasyonda YDC besisi yerinde *Xanthomonas* benzeri gelişen şüpheli bakteri kolonileri, morfolojik, biyokimyasal testler ve ham ceviz meyvelerinde patojenisite testleri sonucunda *Xaj* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca belirtilerden elde edilen fungusların da morfolojik ve mikroskopik klasik tanı yöntemleri ile *Alternaria* spp. ve *Fusarium* spp. olduğu saptanmıştır (Üstün et al., 2016). Bu tez çalışmasında, ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN belirtilerinden elde edilen izolatların tanısında öncelikle klasik tanı yöntemleri kullanılmıştır. Söz konusu her iki hastalık belirtilerinden elde edilen toplam 31 bakteri izolatı, LOPAT (+---+) ve GATTa (++--) testlerinde verdikleri sonuçlar ile *Xaj* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlar daha önceki çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Klasik tanı yöntemlerinin *Xaj*'nin tanısında önemli olduğu, kesin ve güvenilir sonuç verdiği yapılan tüm çalışmalarla birlikte bir kez daha kanıtlanmıştır.

Xaj ve *Fusarium/Alternaria* türlerinin tanısında ham ceviz meyvelerinde patojenisite testi de önemli rol oynamaktadır. Moragrega et al. (2011), *Xaj*'nin neden olduğu BAN ve prematüre meyve dökümü arasındaki ilişkiyi incelediği çalışmasında elde ettiği *Xaj* ve *F. semitectum*, *F. chlamydosporum*, *F. lateritium* ve *Alternaria* türlerinin patojenisite testlerini Hartley çeşidi ham ceviz meyvelerinde yapmış ve izolatlar arasındaki belirti tiplerini karşılaştırmıştır. Bazı *Alternaria* izolatlarının patojenisite testinde ceviz meyvelerinde belirti oluşturmadığını ve

patojen olmadığını belirtmiştir. Belisario et al. (2002) da yapmış olduğu çalışmada *A. alternata*'nın ham ceviz meyvelerinde tipik BAN belirtileri oluşturmadığını ve böylece patojen olmadığı ile ilgili benzer sonuçlar elde etmiştir. Moragrega (2012), ceviz bakteriyel yanıklığından elde ettiği *Xaj* izolatlarını biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle tanılamış, ceviz meyve ve fidanlarında patojenisite testi sonuçları bakteriyel yanıklık skalasına göre değerlendirilmiştir. Polonya'da ceviz bakteriyel yanıklığı belirtilerinden elde edilen ve klasik tanı yöntemleri ile *Xaj* olduğuna karar verilen 23 izolatın 18'i patojenisite testi sonucunda ceviz meyvelerinde perikarpı kaplayan tipik nekrotik belirtiler oluşturduğu bildirilmiştir (Kaluzna et al., 2014). Bandi et al. (2015), patojenisite testine bağlı olarak bakteriyel yanıklığın toleransını belirleme çalışmasında yerel ceviz çeşitlerini kullanmış ve meyvelerde oluşan belirtiler hastalık skalasına göre değerlendirilmiş ve izolatların *Xaj* olduğu doğrulanmıştır. Temperini et al. (2017) de yapmış olduğu benzer bir çalışma ile *Xaj* ve *Fusarium/Alternaria* türlerini ham ceviz meyvelerinde tekse ve birlikte uygulayarak elde ettiği patojenisite testinden daha önceki çalışmalarla benzer sonuçlar elde etmiştir. Diğer bir çalışmada klasik tanı yöntemleri ile *Xaj* olduğu doğrulanan izolatların farklı yerel ceviz çeşitleri ile patojenisite testleri yapılmıştır. Yapraklardaki lekeler skalaya göre değerlendirilmiş ve izolatlar *Xaj* olarak tanılanmıştır (Eskandari et al., 2018). *F. avenaceum*'un BAN'dan sorumlu etmen olduğunu kanıtlayan çalışmada ise patojenisite testinde *P. agglomerans* ve *F. avenaceum* tekse ve birlikte ceviz meyvelerinin apikal ucuna uygulanmış ve uç nekrozu belirtilerinin olduğu bildirilmiştir (Wang et al., 2019). Moya-Elizondo et al. (2021), BAN'dan elde ettiği *Alternaria* ve *Fusarium* türlerinin patojenisite testlerini 7 yaşındaki Chandler çeşidinin meyvelerinin stigma ucuna fungus süpansiyonu uygulamış ve değerlendirme sonuçlarına göre birçok izolat meyvelerde tipik belirti oluştururken bazı *Fusarium* türlerinin düşük yoğunlukta olması dikkat çekmiş ve bu türlerin saprofit olabileceği öne sürülmüştür. Kim et al. (2021) de yapmış olduğu çalışmada patojenisite testinde *Xaj* ve *C. gloeosporioides*'i tekse ve birlikte uygulamış olup değerlendirme sonuçlarına göre bakteri ve fungus birlikte uygulandığında hastalık şiddetinin daha fazla olduğunu savunmuştur. Bu tez çalışmasında da klasik yöntemlerle kesin tanısı yapılmış 31 *Xaj* ve 5 *A. alternata* izolatının patojenisite testinde Chandler çeşidi ham ceviz meyveleri kullanılmış, *Xaj* ve *A. alternata* izolatları tekse ve birlikte uygulanmıştır. Patojenisite çalışmalarında değerlendirmeye alınan *Xaj* ve *A. alternata* izolatların

çoğu her iki hastalığın tipik belirtilerine neden olan patojenler olarak kabul edilmiştir. Belisario et al. (2002), Moragrega et al. (2011) ve Moya-Elizondo et al. (2021)'ın yapmış oldukları çalışmalarda ve bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş ve bazı *A. alternata*/Fusarium türlerinin herhangi bir belirti oluşturmayaabileceği ve patojen olarak değerlendirilemeyeceği, patojenisitenin çevresel koşullara bağlı olabileceği öngörülmüştür. Patojenisite testi ile ilgili yapılmış olan önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlar ve bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında birbiri ile paralellik göstermektedir. Ayrıca, patojenisite testinde, fungusların PDA diskleri şeklinde uygulanması daha yaygın olsa da süspansiyon olarak da meyvenin stigma ucuna uygulanması arasında fark olmadığı ve her iki uygulamadan benzer sonuçların elde edilebileceği görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, klasik yöntemlerle tanısı yapılan *Xaj* ve farklı fungus türlerinin patojen olup olmadığının ayrımının yapılabilmesinde patojenisite testinin önemi bir kez daha vurgulanmaktadır. Yapılmış olan tüm çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında patojenler arasındaki sinerji mekanizmasının hala tam olarak açıklanamadığı görülmektedir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarla birlikte yeni patojenlerin keşfedilmesi ve aynı genusa ait mikroorganizmalar arasında gen düzeyinde farklılıklarının ortaya çıkması nedeni ile klasik tanı yöntemlerinin yetersiz kaldığı görülmektedir. Ayrıca fizyolojik ve biyokimyasal testler, yoğun işgücü, zaman ve maliyet gerektirmektedir. Bu nedenle, günümüzde gelişen teknoloji ve yapılan çalışmalarla moleküler tanı yöntemleri daha da önem kazanmaktadır. Farklı temellere dayanan moleküler tanı yöntemleri daha güvenilir ve hızlı sonuç vermektedir.

16S rRNA geni tüm bakterilerde bulunan prokaryotik DNA'nın yaklaşık 1500 bp'lik bölümüdür. 16S rRNA geni bakterilerin moleküler tanısında oldukça yaygın olarak kullanılmakta ve güvenilir sonuç vermektedir. Yürütülen tez çalışmasında, *Xaj*'nin 16S rRNA gen bölgesi temelli moleküler tanısı gerçekleştirilmiştir. 8 *Xaj* izolatının 16S rRNA temelli yapılan klasik PCR sonucunda 600-660 bp'de bantlar elde edilmiştir. Blast analizi sonucunda NCBI veri tabanında kayıtlı MT040724.1, HG999365.1, MT573402.1, LR861807.1 no'lu *Xaj* türleri ile %99, 83 - 100 arasında benzerlik göstermiştir. *A. alternata*'nın moleküler tanısında ise ITS gen bölgesi kullanılmıştır. Klasik PCR sonucunda 5

izolat da 500-600 bp' de bant oluşturmıştır. ITS gen bölgesi sekans sonuçlarının Blast analizinde NCBI veri tabanında kayıtlı MT482505 ve MT482505 no'lu *A. alternata* türleri ile %100 benzer bulunmuştur. Burokiene and Pulawska (2012), 5 ceviz çeşidindeki ceviz bakteriyel yanıklığı simptomlarından elde ettiği 59 izolattan 8'ini *Xanthomonas* genusuna spesifik X1/X2 primerleri ve daha sonra 5'ni *XajF/XajR* primerleri ile moleküler tanı sonucunda *Xaj* olarak tanılamıştır. Kaluzna et al. (2014) ve Temperini et al. (2017), yapmış oldukları çalışmalarında önceki çalışmada olduğu gibi *Xanthomonas* genus ve türüne spesifik primerler kullanarak moleküler tanısını yapmış ve elde ettiği izolatların *Xaj* olduğunu doğrulamışlardır. Ayrıca *Alternaria* (*A. tenuissima* ve *A. alternata*) ve farklı *Fusarium* türlerinin de spesifik primerler ile moleküler tanısını yapmıştır. Ceviz bakteriyel yanıklığı belirtilerinden elde ettiği, fizyolojik ve biyokimyasal testler ile *Xaj* olarak tanıladığı izolatların moleküler tanısını da 16S rRNA ve *qumA* gen bölgesi ile yapmış ve izolatların *Xaj* olduklarını moleküler tanı yöntemleri ile de doğrulamıştır (Sawada et al., 2017; Eskandari et al., 2018). Wang et al. (2019) ve Moya-Elizondo et al. (2021) de önceki çalışmalara benzer şekilde BAN belirtilerinden elde edilen *A. alternata*'nın moleküler tanısında ITS gen bölgesine spesifik primerler ve *Fusarium* türlerinin (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*) tanısında ise TEF gen bölgesine spesifik primerler kullanarak klasik PCR ile moleküler tanılamışlardır. Kim ve arkadaşları (2021) da benzer bir çalışma yürütmüş ve infekteli bitki kısımlarından izolasyon sonucunda elde ettikleri izolatları önce morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal tanılama daha sonra da 27F/1492R primerleri ile 16S rRNA ve *Xaj*'ye spesifik *XajF/XajR* primeri ile moleküler tanı yapmış ve *Xaj* olduğunu doğrulamıştır. Cevizde bakteriyel yanıklık ve BAN hastalığı esas etmeni olan *Xaj*'nin moleküler tanısı ile yapılan çalışmalar incelendiğinde bu tez çalışmasında olduğu gibi 27F/1492R universal primerleri kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi temelli yapılmış moleküler tanılama sonuçlarının güvenilir olduğu ve klasik tanı sonuçları ile paralellik gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca BAN'da sekonder etkili olan *A. alternata*'nın da ITS gen bölgesi temelli yapılan moleküler tanı sonuçları da morfolojik ve makroskobik tanı sonuçları ile birbirini desteklemektedir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre hem *Xaj* hem de *A. alternata*'nın tanısında klasik tanı yöntemlerinin yanı sıra moleküler yöntemlerinin de kullanılması gerektiği sonucu ortaya çıkmaktadır. Böylece mikroorganizmaların tanısında başarı

sağlanarak, daha kısa zamanda daha güvenilir sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir.

Dünyada ceviz yetiştiriciliği yapılan ülkelerde üretim sezonu boyunca bakteriyel hastalıklar cevizlerde ciddi sorunlara neden olmaktadır. *Xanthomonas* grubuna dahil bitki patojeni bakterilerin neden olduğu hastalıklar ekonomik öneme sahiptir. Son yıllarda *X. arboricola*'nın cevizde neden olduğu hastalıklarla ilgili çalışmalarda oldukça artış görülmektedir. *Xaj*'nin esas sorumlu etmen olduğu ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN'nın tespiti ile ilgili yapılan çok sayıda çalışma olmasına rağmen bu patojenle ilgili bilgiler henüz sınırlıdır. Hastalığın epidemiyolojisi, patojenin taksonomisi, tanılanması, virülensliğindeki değişimler, dayanıklılığın ortaya çıkma nedenlerini daha iyi anlayabilmek için bitki patojenlerinin genetik farklılıkları üzerine çalışmaların yapılması büyük avantajlar sağlamaktadır. DNA parmak izi haritalama yöntemi olan *rep*-PCR (ERIC, BOX, REP) ile *Xaj*'nin coğrafik dağılımının genetik düzeyde farklılığa neden olup olmadığı ile ilgili son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır. Ayrıca *Xaj*'nin izole edildiği bitki dokusunun genç ya da yaşlı olması, ceviz bakteriyel yanıklığı ya da BAN belirtisinden elde edilmesi, farklı çeşitlerin etkisi gibi verilere dayanarak yapılan *rep*-PCR sonuçlarına göre de *Xaj* izolatları arasındaki genetik farklılıklar ortaya konulabilmektedir. Biyokimyasal testler ve *rep*-PCR sonuçlarının birlikte değerlendirilerek *Xaj*'nin genetik farklılıkları hakkında veriler elde edilebilmektedir.

Scortchini et al. (2001), uluslararası kültür koleksiyonlarından ve farklı bakteri hastalıkları laboratuvarlarından topladığı *Xaj* izolatları arasındaki genetik farklılıkları *rep*-PCR ile ortaya koymuştur. *rep*-PCR ile oluşturulan DNA profilleri sonucunda 61 adet *Xaj* izolatını 3 ana grup ve 6 farklı alt gruba ayırmıştır. Çalışmasında Yunanistan ve Sicilya'nın farklı yerlerinden toplanan izolatlar arasında da genetik çeşitliliğin olduğunu kanıtlamıştır. İran'da ceviz bakteriyel yanıklığından izole ettiği *Xaj* izolatlarını klasik ve moleküler yöntemlerle tanılamış, *rep*-PCR ile karakterizasyon çalışması sonucunda farklı bölgelere ait *Xaj* strainlerinin 3 farklı gruba ayrıldığını ve böylece genotipik farklılığın olduğunu ispatlamıştır (Shami et al., 2013). Burokiene and Pulawska (2012)'da Litvanya ve Polonya'da ceviz bakteriyel yanıklığından elde ettikleri *Xaj* strainlerinin genetik

karakterizasyonunu BOX, ERIC ve REP-PCR ile yapmış ve önceki çalışmalarda olduğu gibi *Xaj* strainleri arasında genetik farklılığın olduğunu, *Xaj* strainlerinin gruplandırılmasında REP-PCR'ın en ayrıntılı sonuçları yansıttığını belirtmiştir. Kaluzna et al. (2014), BOX ve ERIC-PCR ile *Xaj*'nin filogenetik çeşitliliği ile ilgili yürüttükleri çalışmalarında Polonya'nın farklı şehirlerinden izole ettikleri *Xaj* strainlerinin dağılımında genetik farklılığa dayanan heterojenliğin olduğunu ve bu durumdan coğrafik dağılımın etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. Sırbistan' da yapılan başka bir araştırmada ise farklı ceviz bahçelerinden elde edilen izolatlar klasik ve moleküler tanı sonucunda *Xaj* olarak tanımlanmış ve ERIC, BOX ve REP-PCR spesifik primerleri ile elde edilen DNA profillerinin değerlendirilmesi sonucunda 15 *Xaj* izolatu farklı gruplara ayrılmıştır. *gyrB* gen sekans sonuçlarına göre de tüm izolatların %100 benzerlik gösterdiği ve önceki çalışmalarda olduğu gibi *Xaj* strainleri arasında coğrafik lokasyona bağlı olarak genetik çeşitliliğin olduğu savunulmuştur (Ivanovic et al., 2015). Benzer şekilde, Zheng et al. (2022), Hubei bölgesinde (Çin) cevizin farklı dokularından elde edilen 60 *Xaj* izolatının *rep*-PCR sonucunda da 8 farklı gruba ayrıldığını bildirmiş ve izolatlar arasındaki genetik çeşitliliğin farklı bitki dokusu ya da coğrafik köken ile ilişkili olduğu görüşünü desteklemektedir. Yürütülen bu tez çalışmasında, Çanakkale, Balıkesir, Manisa il ve ilçelerindeki ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN belirtilerinden elde edilen 31 adet *Xaj* izolatının klasik ve moleküler yöntemlerle tanısı yapılmış olup izolatlar arasında coğrafik ve genetik çeşitliliğin olup olmadığını ortaya koymak için *rep*-PCR ile moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. ERIC-PCR sonucunda 9 grup, BOX ve REP-PCR sonucunda ise 6 gruba ayrılmıştır. ERIC, REP ve BOX-PCR sonuçları karşılaştırıldığında 31 *Xaj* izolatu arasındaki genetik ve coğrafik farklılıklar ERIC-PCR ile daha ayrıntılı ortaya konulmuştur. Ayrıca gruplar arasındaki farklılık sadece coğrafik temelli olmayıp her iki hastalık belirtisinden izole edilen *Xaj* lerin de farklı gruplarda yer alabildiği de görülmüştür. Ivanovic et al. (2015) ve Zheng et al. (2022) dışındaki çalışmalar ve bu çalışmadan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında sonuçlar birbiri ile benzerlik göstermekte ve *rep*-PCR'ın *Xaj*'nin genetik çeşitliliği ile ilgili tutarlı veriler ortaya koyduğu sonucuna varılabilmektedir. Daha önceki çalışmalar ve bu tez çalışması sonuçları dikkate alındığında ceviz yetiştiriciliğinin yapıldığı her alandaki *Xaj* strainleri arasındaki farklılıklar aynı zamanda patojenin virülensliğinin de düşük olma ihtimali ile ilişkilendirilebilir. Çünkü yapılan çalışmalar göstermiştir ki *Xaj* her ne

kadar %50'nin üstünde verim kaybına neden olsa da ceviz ağaçlarında çok nadir ölüme sebep olmaktadır.

Günümüzde housekeeping genleri, bakteri türlerinin filogenetik analizleri veya tür içi değişkenliğin araştırılmasında standart haline gelmiş ve yeni türlerin tanımlanmasında DNA-DNA hibridizasyon yöntemine alternatif olmuştur. *Xaj* strainlerinin moleküler tanısı ve genetik farklılıkları üzerine yapılan çalışmalar, hastalıkların epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasında yeni bakış açıları geliştirmektedir. MLSA, protein kodlayan birkaç gen sekansının birleştirilerek, mikroorganizmaların filogenetik çeşitliliklerini araştırmada yaygın olarak kullanılan önemli yöntemlerdendir. MLSA'da 4-7 arasında housekeeping genleri kullanılarak güvenilir sonuçların elde edilmesi mümkündür. Her housekeeping gen sekansı teksele olarak değerlendirilebileceği gibi tüm sekanslar birleştirilerek de değerlendirilmektedir. Böylece strainlerdeki housekeeping genlerinde polimorfizm olup olmadığı da belirlenebilmektedir.

Burokine and Pulawska (2012), *gyrB*, *fyuA* ve *rpoD* genleri ile yaptığı MLSA sonucu oluşturulan dendrogramda Litvanya *Xaj* izolatları ayrı bir grup oluştururken Polonya *Xaj* izolatları kendi içinde 2 farklı gruba ayrılmıştır. Bu çalışma sonuçları *Xaj* strainleri arasında genetik çeşitliliğin olduğunu kanıtlamaktadır. *Xaj*'nin genetik farklılıklarının belirlenmesi için *gyrB*, *fyuA* ve *rpoD* housekeeping genlerinin kullanıldığı MLSA sonucunda her genin sekans sonuçlarını teksele ve birleştirilerek değerlendirmiştir. *Xaj*'nin *fyuA* geni dendrogramında *Xaj* strainleri 3 farklı grup oluşturmuştur. 2 aminoasit değişikliği olan izolatlar diğerlerinden tamamen farklı bir grupta yer almıştır. *gyrB* geni dendrogramında ise 2 strain *X.a. pv. corylina* ile farklı bir grupta yer almıştır. *rpoD* geni dendrogramında *Xaj* strainleri 2 grupta toplanmıştır. *gyrB*, *fyuA* ve *rpoD* sekansları birleştirilerek değerlendirildiğinde ise Polonya *Xaj* strainleri 3 ana grupta toplanmıştır. Sadece *Xaj* ICMP35 straini *X.a. pv. corylina* ile 4. ayrı bir grup oluşturmuştur. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlarda *Xaj* izolatları arasında genetik farklılıkların ve heterojen dağılımın olduğu görüşünü desteklemektedir. Giovanardi et al. (2015), Romagna (İtalya) bölgesinde yürüttüğü çalışmasında 77 *Xaj* izolatının MLSA analizi *atpD*, *dnaK*, *rpoD*, *gyrB*, *efp*, *fyuA*, *glnA* housekeeping genleri ile yapılmıştır. *X. arboricola* pathovarlarının farklı patotip strainleri (*juglandis*, *pruni*,

corylina, *fragariae*, *populi*) ile yapılan filogenetik analiz sonucunda *Xaj* izolatlarının filogenetik olarak diğer patotiplere göre *X. a. pv. juglandis* ile daha yakın ilişkili olduğu görülmüştür. Birleştirilmiş sekansların filogenetik ağacında tüm *Xaj* izolatları 3 farklı alt gruba ayrılırken diğer *X. arboricola* pathovarları farklı gruplarda yer almıştır. 7 housekeeping geninde en fazla polimorfizm *rpoD*, en az polimorfizm ise *gyrB* geninde görüldüğü bildirilmiştir. Ivanovic et al. (2015) ise *Xaj* strainleri arasındaki genetik farklılığı belirlemede sadece *gyrB* geni ile çalışmış ve elde ettiği sonuçların NCBI veri tabanındaki *Xaj* türleri ile %100 eşleşmediğini belirtmiştir. Genetik farklılık çalışmalarında *gyrB* geninin tek başına yetersiz olduğunu vurgulamıştır. Sawada et al. (2017), klasik ve moleküler yöntemlerle *Xaj* olarak tanıladığı izolatlar arasındaki genetik çeşitliliği *atpD*, *dnaK*, *rpoD*, *gyrB*, *efp*, *fyuA*, *glnA* housekeeping genlerinin birleştirilmiş sekanslarını MLSA ile değerlendirmiştir. Diğer çalışmaların aksine *Xaj* strainlerinin homojen dağılım gösterdiğini ve tek bir klonun bakteriyel yanıklığa neden olduğunu bildirmiştir. Kore’de *Xaj* ile ilgili Kim et al. (2021) yapmış olduğu çalışmada klasik ve 16S rRNA ile tanılamasını yaptığı *Xaj* strainlerinin genetik çeşitliliğini araştırmak için 4 housekeeping geni (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *rpoD*) sekanslarını birleştirerek MLSA yapmıştır. Farklı lokasyonlardan, genç/yaşlı ağaçlardan elde edilen *Xaj* strainlerinin farklı gruplarda yer aldığını bildirmiştir. MLSA sonucunda *Xaj* strainlerinin diğer *X. arboricola* pathovarları ile aradadaki farkın çok belirgin olduğunu savunmaktadır. Fu et al. (2021) önceki çalışmalara benzer olarak, Çin’ de bakteriyel yanıklık belirtisinde elde ettiği 206 izolatın 60’ ını PCR sonucunda *Xaj* olarak tanılamıştır. *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *gyrB* housekeeping genlerinin birleştirilmiş sekansı ile yaptığı MLSA sonucunda tüm izolatlar 2 ana gruba ayrılmıştır. Giovanardi et al. (2015) yapmış olduğu çalışmada *rpoD* geninden en fazla polimorfizm bulmuşken bu çalışmada ise *glnA* geninde en fazla polimorfizm olduğu bildirilmiştir. *Xaj* strainleri arasındaki genetik çeşitlilik ile ilgili Ivanovic et al. (2015) ile benzer sonuçlar bulmuştur. Ayrıca *gyrB* gen bölgesi yüksek düzeyde korunmuş olduğundan *Xaj* strainleri arasındaki çeşitlilikte sadece bu bölgenin dikkate alınmaması gerektiğini de vurgulamaktadır. Bu tez çalışmasında da moleküler yöntemle *Xaj* olarak tanılanan 8 *Xaj* straininin, 7 housekeeping geni (*atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *rpoD*, *fyuA*, *glnA*, *efp*) kullanılarak hem teksele hem de birleştirilmiş sekansları ile MLSA yapılmıştır. Birleştirilmiş sekans sonuçlarına göre oluşturulan dendrogram 8 *Xaj* straini 4 farklı gruba ayrılmıştır. *Xaj* strainleri arasında heterojen

dağılım olduğu görülmektedir. Ceviz bakteriyel yanıklığından elde edilen *Xaj* strainleri 4 gruba dağılmışken BAN' dan elde edilen 3 *Xaj* straininden 2'si aynı grupta yer almaktadır. Ayrıca Balıkesir ve Çanakkale illerine ait *Xaj* strainleri de farklı gruplarda yer almıştır. Elde edilen bu sonuçlar ile önceki çalışmaların sonuçları birbiri ile paralellik göstermektedir. Sonuç olarak, *Xaj* popülasyonundaki çeşitliliğin coğrafik lokasyon (Scortchini et al., 2001), üretim materyali (Giovanardi et al., 2015), çevresel koşullara adaptasyon (Scortchini et al., 2001; Kaluzna et al., 2014), genomdaki esneklik veya virülenslik (Ivanovic et al., 2015; Kaluzna et al., 2014; Scortchini et al., 2001) gibi faktörlerle ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır. Böylece strainler arasında heterojen dağılım olduğu da görülmektedir. Farklı il ve ilçelerden elde edilen *Xaj* strainlerinin farklı gruplara ayrılması ve tür içinde heterojen dağılımın olduğunun kanıtlanması yapılmış olan diğer çalışmaları da destekler niteliktedir.

Önceki çalışmalar ve bu çalışma verilerine dayanarak, MLSA'nın strainlerin tür düzeyinde saptanmasında etkili, tür içi düzeyde patojen tanılamada kolay ve tekrarlanabilir olması, popülasyondaki farklılıkların daha ayrıntılı şekilde belirlenmesi konusunda önemli bir yöntem olduğu sonucuna varılabilmektedir. Ayrıca sekans analizleri de strainler arasındaki ilişkiyi moleküler düzeyde doğru bir şekilde tanımlamaktadır. Tüm çalışmalardan elde edilen bulgular, *Xaj* popülasyonları ve epidemiyolojileri arasında varyasyonun daha fazla araştırılması ve anlaşılması için bir temel oluşturmaktadır.

Xanthomonas genusu taksonomisi, geçtiğimiz yüzyılda kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve kategorize edilmiş olup, geniş bitki konukçu çeşitliliği nedeniyle, üyelerinin sınıflandırılması ve isimlendirilmesine ilişkin bazı anlaşmazlıkları gündeme getirmiştir. Son zamanlarda MLSA, average nucleotide identity (ANI) ve biyokimyasal analize dayanan çalışmalar, *Xanthomonas* türlerinin yeniden sınıflandırılmasında ve çeşitli strainlerin tanımının değişmesinde verimli olduğu kanıtlanmıştır. Bu teknikler, *Xanthomonas*'ın genetik çeşitliliği hakkında alttürler arasında daha ayrıntılı bilgilere ulaşmamızı sağlamaktadır.

X. arboricola *Xanthomonas* genusunda, en çok patojen olmayan straine sahip türdür (Merda et al., 2016). Spesifik konukçulardan izole edilen ve patojen olmayan

birçok *X. arboricola* türünün karakterizasyonu sonucunda hastalık oluşturan türlerden filogenetik olarak farklılık göstermektedir. Genetik olarak birbirine yakın ya da uzak bakteriler ve konukçuları arasında farklı etkileşimlerin olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda, simptomatik dokulardan elde edilen *X. arboricola* izolatlarının da patojen olmayan *Xanthomonas* türleri ile ilişkili bulunabildiği ile ilgili çalışmalarda artış görülmesi, *Xanthomonas* türünün konukçuya bağlı yaşam şeklinin ya da konukçu çeşitliliği ile ilgili belirsizliklerin olduğunu göstermektedir.

Martins et al. (2020), bakteriyel yanıklık belirtisi görülen tek bir ceviz ağacından elde ettiği izolatları *Xanthomonas* olarak tanılamış fakat patojenisite testi sonucunda bazı izolatların belirti oluşturmadığını belirtmiştir. *atpD*, *rpoD*, *gyrB*, *fyuA*, *glnA*, *efp*, *dnaK* housekeeping genleri ile yaptığı MLSA sonucunda belirti oluşturmayan CPBF 367 ve belirti oluşturan CPBF 424 izolatlarının *Xaj* ile farklı grupta yer aldığı kanıtlanmıştır. Ayrıca ANI ve DNA-DNA hibridizasyon sonucunda da söz konusu izolatlar *X. arboricola* olmayan strainler ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Ve sonuç olarak bu iki izolatın yeni bir tür olan *Xanthomonas euroxanthea* olarak isimlendirildiği bildirilmiştir. Fernandes et al. (2021) ise daha önceki çalışmada *X. euroxanthea* olarak saptanmış CPBF 367 ve CPBF 424 izolatları ve *Xaj* olduğu bilinen strainler ile farklı yöntemler kullanarak yürüttüğü çalışma sonucunda *X. euroxanthea*'nin genomik olarak *Xaj* ile benzerliğinin düşük olduğunu saptamış olup elde ettiği sonuçlar Martins et al., (2020) ile birbirini desteklemektedir. Ayrıca Eshakhi et al. (2015) ve Fernandes et al. (2018) 'in patojen olarak değerlendirmedikleri ve moleküler çalışmalar sonucunda *Xaj* ile farklı gruplarda yer aldığını belirttiği izolatların bu çalışma sonucunda *X. euroxanthea* olduğu kanıtlanmıştır. Portekiz'de yapılan benzer bir çalışmada da aynı ceviz ağacından elde edilen 131 *Xanthomonas* izolatından çoğu *Xaj* ile ilişkili 17 farklı grupta yer alırken diğer izolatların *Xaj*'den farklı gruplarda yer aldığı görülmüştür. Bu grupların ise *X. arboricola* ve *X. euroxanthea* ile eşleştiği görülmüştür. *Xaj* ile *X. euroxanthea* arasındaki temel farklılığın T2SS ile ilişkili pektolitik enzim profilindeki farklılıklardan kaynaklandığını savunmaktadır. Martins et al. (2020) ve Fernandes et al. (2021)'de olduğu gibi bu çalışma sonucunda da patojen olmayan izolatların *X. euroxanthea* ile genetik benzerliği kanıtlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen diğer ilginç sonuç ise turuncgileden elde edilen ve patojen olmayan (LMG8993) izolatının *X. arboricola* türüne ait olduğu

ve filogenetik analizler sonucunda cevizde patojen olmayan (CFBP7634-CFBP7651) *X. arboricola* türü ile yakın ilişkili olduğu bulunmuştur. Yürütülen bu tez çalışmasında da 31 *Xaj* izolatından 11'i ham ceviz meyvelerinde patojenisite testinde herhangi bir belirti oluşturmamış ve sıfır olarak değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanarak patojen olarak değerlendirilmeyen 11 izolatın *X. eurxanthea* olma ihtimali bulunmaktadır. 11 izolatın MLSA ve diğer genomik yöntemlerle *Xaj* ya da *X. eurxanthea* ile ilişkilerinin olup olmadığı daha sonraki çalışmalarda araştırılması hedeflenmektedir.

X. arboricola pathovarları birçok sert çekirdekli ve sert kabuklularda önemli hastalıklara neden olmaktadır (Lamichhane, 2014). pv. *juglandis* ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN'nın esas etmeni iken pv. *corylina*'da dünya genelinde fındık yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan fındık bakteriyel yanıklığından esas sorumlu etmendir. Son yıllarda söz konusu hastalıkların dünya genelinde yaygınlaşması ve genomik yöntemlerin gelişmesi ile bu iki pathovar arasındaki filogenetik benzerlikle ilgili çalışmalara da rastlanmaktadır. Kaluzna et al. (2021), tür içindeki farklılığı belirlemek için MLSA sonucunda izolatların 2 farklı monofilogenetik gruba ayrıldığını belirtmiştir. *Xaj* ve *Xac* konukçuya özelleşmiş strainlerinin bulunduğunu fakat ortak atadan geldiklerini kanıtlamıştır. Bu tez çalışmasında da 8 *Xaj* izolatının MLSA dendrogramında *Xac* ile aynı grupta yer alan izolatların olduğu görülmektedir. Martins et al. (2020) ve Fernandes et al. (2021), virülensliği düşük ya da hiç olmayan *Xaj* ve *Xac*'nin aynı grupta toplandığını, patojen ve patojen olmayan strainlerini ise *X. euoxanthea* olarak sınıflandırmıştır. Ve bu yeni türün soyağacında farklı bir grup oluşturduğunu ispatlamıştır. Farklı bölgelerden elde edilen *Xaj* strainleri arasında farklılık olduğunu, ayrıca, *X. euroxanthea*'nın *Xaj* ile filogenetik olarak farklı olduğunu da doğrulamıştır.

Sonuç olarak, *Xaj*'nin ceviz yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede yaygın olduğu, populasyon yapısı ve alt-tür çeşitliliği hakkında yeni verilerin toplandığı, *Xaj*'nin patojenik soylarının cevizle ilgili *Xanthomonas*'ın bir parçası olma ihtimalinin yüksek olabileceği ve her iki *Xanthomonas*'ın da aynı ağaçta bulunabileceği ortaya konulmuştur.

Ceviz ağaçlarının farklı *Xanthomonas* soyları tarafından ortak kolonizasyonu, tür içi rekombinasyon ve genetik takasları kolaylaştırdığı düşünülmektedir. *X. euroxanthea*'nin de genomundaki farklılıklar, ceviz ile ilgili *Xanthomonas*ların patojenisitelerinin ortaya çıkışını ve evrimsel sürecini değerlendirmede önemli olabilir. Aynı ceviz bitkisinde *Xanthomonas* tür çeşitliliğinin, *Xanthomonas*-ceviz patojenisitesini ve yeni soyların evrimini ne kadar etkilediğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Ceviz yetiştiriciliği ülkemizde giderek artış göstermektedir. Dünyada ceviz üretiminde ekonomik açıdan önemli olarak belirlenen ceviz bakteriyel yanıklığı başta olmak üzere son yıllarda BAN hastalığına da sık rastlanması ve ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır. Her iki hastalığın ülkemizde de yaygın olarak bulunmasından dolayı önüne geçilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması, Türkiye’de ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalıkları hakkında detaylı verilerin elde edildiği ilk çalışma niteliğindedir. Yürütülen bu çalışmada elde edilen veriler, her iki hastalığın neden olduğu verim kayıplarının en aza indirilmesinde ve sağlıklı ürünlerin elde edilmesine katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığı ile ilgili detaylı verilerin elde edildiği bu tez çalışmasında, her iki hastalıktan esas sorumlu etmen olan *Xaj*'nin moleküler tanısının yapıldığı ve moleküler karakterizasyon yöntemleri ile farklı lokasyonlardaki *Xaj* strainleri arasında genetik çeşitliliğin olup olmadığının ortaya konulduğu ilk çalışma niteliğindedir. Dünyada ceviz üretiminde önemli verim kayıplarına neden olduğu bildirilen ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN'nın, ülkemizde de ceviz yetiştiriciliğini yapıldığı önemli illerin başında gelen Balıkesir, Çanakkale ve Manisa illerinde yaygın olduğu belirlenmiştir.

Yürütülen bu tez çalışmasından elde etmiş olduğumuz veriler doğrultusunda yapılacak öneriler aşağıda özetlenmiştir.

1. Ceviz bakteriyel yanıklığı ve BAN hastalığına neden olan etmenlerin saptanmasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda, *Xaj*'in her iki hastalıktan sorumlu esas etmen olduğu, BAN hastalığının ileriki dönemlerinde ise fungusların da sekonder etmen olarak devreye girdiği ve belirti tablosunu şiddetlendirdiği saptanmıştır.

2. BAN hastalığında etkili olan *A. alternata* fungal etmeninin *Xaj*'nin enfekte ettiği meyve dokusunda sekonder etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

3. LOPAT, GATTa, nişastanın hidrolizi, karbon kaynaklarının kullanımı, aerobik gelişim testleri *Xaj*'in klasik tanısında kullanılan anahtar testlerdendir.

4. Ham ceviz meyveleri ile yapılan patojenisite testleri, her iki hastalığın esas etmeni olan *Xaj*'nin ve *A. alternata*'nın varlığının saptanması amacı ile kullanılabilecek güvenilir ve pratik bir yöntemdir. Patojenisite testi sonuçlarının fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları ile karşılaştırıldığında birbirlerini destekler nitelikte olduğu görülmektedir. Bu testler, her iki hastalığın teşhisinde kullanılabilecek tanı protokolü niteliğinde olduğu düşünülmektedir. Böylece etmenlerin tanısı kolaylıkla gerçekleştirilebilir.

5. Bu tez çalışmasında, klasik tanı yöntemleri her ne kadar *Xaj* izolatları için aynı sonuçları verse de kesin tanı yapılabilmesinde yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır. 16S rRNA gen bölgesi *Xaj*'nin, ITS gen bölgesi ise *A. alternata*'nın moleküler tanısında oldukça önemlidir. Bu genler ile yapılan PCR testleri sonuçları kesin sonuç vermekte ve klasik tanı testleri sonuçları ile birbirini desteklemektedir. Böylece etmenlerin tanısında klasik tanıların her zaman tek başına yeterli olamayacağı, daha doğru ve güvenilir sonuçlar için her iki yöntemin mümkün olduğunca birlikte kullanılması önerilebilir.

6. Farklı lokasyonlardaki *Xaj* strainleri arasında genetik çeşitliliğin olup olmadığı DNA parmak izi haritalama yöntemlerinden biri olan *rep*-PCR (BOX, ERIC, REP) ile belirlenmiştir. *Xaj* strainlerinin *rep*-PCR ile elde edilen DNA profilleri sonucunda il ve ilçe düzeyinde genetik çeşitliliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır.

7. MLSA ile yapılan moleküler karakterizasyon çalışmalarında 7 housekeeping geni (*atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *rpoD*, *fyuA*, *efp*, *glnA*) kullanılmış ve elde edilen sekans sonuçları ile *Xaj* strainleri arasındaki filogenetik çeşitlilik değerlendirilmiş olup farklı coğrafik bölgelerden ve her iki hastalık belirtisinden elde edilen *Xaj* strainlerinin farklı gruplarda yer aldığı sonucu elde edilmiştir. *Xaj* strainleri arasındaki genetik farklılığın araştırılmasında *rep*-PCR ve MLSA sonuçları tutarlılık göstermektedir. Böylece *rep*-PCR ve MLSA gibi moleküler karakterizasyon yöntemleri ile coğrafik farklılıklara göre strainler arasındaki genetik çeşitliliğin araştırılarak hastalıkların epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasının, patojenin taksonomisi, tanınması ve alternatif mücadele yöntemlerinin geliştirilmesinin mümkün olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adaskaveg, J., Förster, H., Thompson, D., Driever, G., Connell, J., Buchner, R., Prichard, J. and Wade, L.,** 2008, Epidemiology and management of walnut blight, *Walnut Research Reports*, 181-193 pp.
- Akat, S., Özaktan, H. and Yolageldi, L.,** 2016, Stduied on the etiology and control of brown apical necrosis (BAN) walnu fruits in TURKEY, *ActaHorticulturae*, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1149.10>
- Arquero, O., Lovera, M., Rodriguez R., Salguero, A. and Trapero, A.,** 2005, Characterization and development of necrotic lesions of walnut tree fruits in southern spain, *Acta Horticulturae*, 705:457-461 pp.
- Ayers, S. H., and Johnson, W. T.,** 1919, A study of the alkali-forming bacteria in milk, U.S. Department of Agriculture Bull., 782:1-39 pp.
- Bandi, A., Toth, M. and Hevesi, M.,** 2014, Comparison of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates from walnut trees grown in Romania and Hungray, *International Journal of Horticultural Science*, 20(1-2):65-69 pp.
- Bandi, A., Hevesi, M., Szani, Z. and Hevesi, M.,** 2015, Assesment of bacterial blight toleramce of persian walnut based on immature nut test, *Notulae Scientia Biologicae*, 7(2):253-257 pp.
- Bayazit, S., Tefek, H. ve Çalışkan, O.,** 2016, Türkiye’de Ceviz (*Juglans regia* L.) Araştırmaları, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11(1):168-179 s.
- Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L. and Balmas, V.,** 2002, Occurence and etiology of brown apical necrosis on persian (English) Walnut Fruit, *Plant Disease*, 86:599-602 pp.
- Belisario, A., Santori, A., Potente, G., Fiorin, A., Saphy, B., Reigne, J.L., Pezzini, C., Bortolin, E. and Valier, A.,** 2010, Brown apical necrosis (BAN): a fungal disease causing fruit drop of english walnut, *Acta Hort.* 861:449-452 pp.
- Benzhong, F., Zou, L., Lee, C. and Wnag, L.,** 2021, Antagonism and biocontrol of walnut blight by sweet osmanthus endophytic bacterium OFE17, *Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00901-6>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Benzhong, F., Yu, L., Wang, B. and Zheng, C.,** 2021, Screening of antagonistic bacteria from endophytes against walnut blight pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(3):1384-1392 pp.
- Bora, T. ve Karaca, İ.,** 1970, Kültür Bitkilerinde Hastalık ve Zararın Ölçülmesi, Bornova-Ege Üniversitesi Matbaası, 39.
- Boudon, S., Manceau, C. and Notteghem, J.L.,** 2005, Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in western Europe, *Phytopathology*, 95: 1081-1088 pp.
- Bradbury, J.F.,** 1986, Guide to Plant Pathogenic Bacteria, CAB International Publications, UK, 332 p.
- Burokiene, D. and Pulawska, J.,** 2012, Characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolated from walnuts in Lithuania, *Journal of Plant Pathology*, 94:23-27 pp.
- Essakhi, S., Cesbron, S., Fischer Le-Saux, M., Bonneau, S. and Jacques, M.A.,** 2015, Phylogenetic and variable-number tandem-repeat analyses identify nonpathogenic *Xanthomonas arboricola* lineages lacking the canonical type III secretion system, *Applied Environmental Microbiology*, 81:5395-5410 pp.
- Eskandari, S., Khakvar, R. and Torchi, M.,** 2018, Detection of bacterial blight of walnut (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) in northwest of Iran and investigation of its pathogenicity on different native walnut cultivars, *Biochem. Cell. Arch.* 18(2):1785-1788 pp.
- FAO,** 2022, Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org> Erişim tarihi: 11.04.2023
- Fargier, E., Saux, M.F-L. and Manceau, C.,** 2011, A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer attacking pathovars of this species, *Syst. Appl. Microbiol.* 34:156-165 pp.
- Fernandes, C., Sousa, R., Tavares, F. and Cruz, L.,** 2018, First report of *Xanthomonas arboricola* causing bacterial blight on pecan trees in Portugal, *Plant Disease*, 102:2632 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fernandes, C., Martins, L., Teixeira, M., Blom, J., Pothier, J. F., Fonseca, N. A. and Tavares, F.,** 2021, Comparative genomics of *Xanthomonas eurxanthea* and *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains isolated from a single walnut host tree, *Microorganisms*, 9(3):624 pp.
- Fernanades, C., Albuquerque, P., Mariz-Ponte, N., Cruz, L. and Tavares, F.,** 2021, Comprehensive diversity assessment of walnut-associated xanthomonads reveal the occurrence of distinct *Xanthomonas arboricola* lineages and of a new species (*Xanthomonas euroxanthea*) within the same tree, *Plant Pathology*, 70:943-958 pp.
- Fu, B., Zhu, J., Lee, C. and Wang, L.,** 2021, Multilocus sequence analysis and copper ion resistance detection of 60 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates from China, *Plant Disease*, 105:3715-3719 pp.
- Giovanardi, D., Bonneau, S., Gironde, S., Fischer Le-Saux, M., Manceau, C. and Stefan, E.,** 2015, Morphological and genotypic features of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* populations from walnut groves in Romagna region, Italy, *European Journal of Plant Pathology*, 145:1-16 pp.
- Hugh, R. and Leifson, E.,** 1953, The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria, *Journal of Bacteriology*, 66:24-26 pp.
- Ivanović, Z., Popović, T., Janse, J., Kojić, M., Stanković, S., Gavrilović, V. and Fira, D.,** 2015, Molecular assesment of genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains from Serbia by various DNA fingerprinting techniques, *European Journal of Plant Pathology*, 141:133-145 pp.
- Kadakoğlu, B., Bayav, A. ve Karlı, B.,** 2022, Türkiye’ de ceviz üretim projeksiyonu ve rekabet gücü analizi, *Fruit Science*, 9(1):8-15 s.
- Kaluzna, M., Pulawska, J., Waleron, M. and Sobiczewski, P.,** 2014, The genetic characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight in Poland, *Plant Pathology*, 63:1404-1416 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaluzna, M., Fischer Le Saux, M., Pothier, J. F., Jacques, M. A., Obradovic, A., Tavares, F. and Stefani, E.,** 2021, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and pv. *corylina*: brothers or distant relatives? Genetic clues, epidemiology and insights for disease management, *Molecular Plant Pathology*, 22:1481-1499 pp.
- Karaca, İ.,** 1974, Sistematik Bitki Hastalıkları, EÜ Ziraat Fakültesi Yayınları, Cilt 4. No: 217
- Kim, H.S., Cheon, W., Lee, Y., Kwon, H., Seo, S., Balaraju, K. and Jeon, Y.,** 2021, Identification and characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* causing bacterial blight of walnuts in Korea, *The Plant Pathology Journal*, 37(2):137-151 pp.
- Klement, Z., Farkas, G. L., and Lourekovich, L.,** 1966, Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf, *Phytopathology*, 54:474-477 pp.
- Klement, Z.,** 1990, Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas, *Nature*, 199:299-300 pp.
- Lamichhane, J.R.,** 2014, *Xanthomonas arboricola* disease of stone fruit, almond and walnut trees: progress toward understanding and management, *Plant Disease*, 98:1600-1610 pp.
- Lang, M.D. and Evans, K.J.,** 2010, Epidemiology and status of walnut blight in Australia, *Journal of Plant Pathology*, 92:49-55 pp.
- Lazarov, A. and Grigorov, P.,** 1961, Karantina na Rastenijata, Zemizdat, Sofia, 258 pp.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E.,** 1987, Methods for Diagnosis of Bacterial Disease of Plants, Blackwell Scientific Publications, 216 pp.
- Martini, C. and Bertolini, P.,** 2012, Phenotype and genotype characterization of *Monilinia* spp. isolates and preformed antifungal compounds in peach peel fruit at different developmental stages, University of Bologna, Department of Agriculture Science, Plant Pathology, PhD thesis

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martins, L., Fernandes, C., Blom, J., Dia, N.C., Pothier, J.F. and Tavares, F.,** 2020, *Xanthomonas eurxanthea* sp. nov., a new xanthomonad species including pathogenic and non-pathogenic strains of walnut, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70:6024-6031 pp.
- Merda D., Bonneau, S., Guimbaud J-F., Durand, K. and Brin, C.,** 2016, Recombination-prone bacterial strains form a reservoir from which epidemic clones emerge in agroecosystems, *Environmental Microbiology Reports*, 8:572-581 pp.
- Mitchell, T.G., Freedman, E., White, T.J. and Taylor, J.W.,** 1994, Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cyrtococcus neoformans*, *Journal of Clinical Microbiology*, 32(1):253-255 pp.
- Moragrega, C., Montesinos, E., Santamaria, G., Matias, J., Rovira, M. and Aleta, N.,** 2007, Infectious biology and population dynamics of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in spanish walnut orchards, diagnostic and monitoring of bacterial disease of stone fruits and nuts, Joined meeting of WG 1 and 2 of COST Action 873, Angers, France
- Moragrega, C., Matias, J., Aleta, N. and Rovira, M.,** 2009, Epidemiology and Causal Agent of Brown Apical Necrosis of Walnut, Annual Meeting of Working Groups, 45
- Moragrega, C. and Özaktan, H.,** 2010, Apical necrosis of persian (English) walnut (*Juglans regia*): An update, *Journal of Plant Pathology*, 92:67-71 pp.
- Moragrega, C., Matias, J., Aleta, N., Montesinos, E. and Rovira, M.,** 2011, Apical necrosis and premature drop of persian (english) walnut fruit caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, *Plant Disease*, 95:1565-1570 pp.
- Moragrega, C.,** 2012, Detection and identification methods and new test as developed and used in the framework of Cost 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts, *Journal of Plant Pathology*, 94:155-159 pp.
- Moya-Elizondo E.A., Lagos, M.J., Martin, J. and Ruiz, B.,** 2021, First report of *Alternaria alternata* and *Fusarium* spp. causing brown apical necrosis in walnut fruit in southern Chile, *Plant Health Progress*, 22:573-574 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Obradovic, A.**, 2010, Pseudomonas Pathogens of Stone Fruits and Nuts: Classical And Molecular Phytobacteriology, COST873 Stone Fruit Nut Health Trainig Course Handbook, Belgrade, 69 p.
- Özaktan, H., Uslu, A., Erdal, M., Akköprü, A. and Bozkurt, A.**, 2007, Determination of Bacterial Diseases on Peach in Aegean and on Walnut in Western Anatolian Regions of Turkey. COST ACTION 873 Diagnostic and Monitoring of Bacterial Disease of Stone Fruits and Nuts, Joint meeting of working groups 1 and 2, 17-19 April 2007, Angers, FRANCE, 28 pp.
- Özaktan, H., Erdal, M., Akköprü, A., Bozkurt, A. and Aslan, E.**, 2007, Biological Control of Walnut Blight: Screening of Antagonistic Bacteria for *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and Evaluation of Their in vitro Efficiency. Host Resistance and Control Strategies Against Bacterial Diseases of Stone Fruits and Nuts, Joint meeting of working groups 3 and 4. 23-25 October, Murcia-SPAIN, 26 pp.
- Özaktan, H., Akat, S., Akköprü, A. and Erdal, M.**, 2009, Etiological Approach to Brown Apical Necrosis on Walnut in Turkey. Files of the COST 873 WG1-4 Meeting: Active research to combat bacterial diseases of stone fruits and nuts resistance and control strategies against bacterial disease of stone fruits and nuts (Cetara, Italy) October 26– 29, Cetara, İtalya, Book of abstracts 49 pp.
http://www.cost873.ch/uploads/files/Hozaktan_BANTurkey_Italy_1.pdf.
- Özaktan, H., Akat, S. and Yolageldi, L.**, 2010, Etiological Approach to Apical Necrosis on Walnut Fruits in Turkey Results from 2009 and 2010. 15-16 July 2010- Brown Apical Necrosis of Walnut - Etiological Conclusions, Girona, Spain.
- Özaktan, H., Erdal, M., Akköprü, A. and Aslan, E.**, 2012, Biological control of bacterial blight of walnut by antagonistic bacteria, *Journal of Plant Pathology*, 53-56 pp.
- Özgönen, H. ve Kılıç, Ç.H.**, 2009, Isparta İli'nde Elmalarda Sorun Olan Hasat Sonrası Hastalıkların ve Yaygınlık Oranlarının Belirlenmesi, Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi 2(2):53-60 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Parveaud, C.E., Romain, S. and Verhaegha, A.,** 2010, The relationship between walnut blight expression and tree water status, *Acta Horticulturae*, 861:435-438 pp.
- Prokic, A., Gasic, K. and Ivanovic, M.,** 2012, Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruit and nuts, *Journal of Plant Pathology*, 94:27-33 pp.
- Rademaker, J.L.W. and De Bruijn,** 1997, Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analyses, *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews*, 151-171 pp.
- Radix, P., Seigle-Murandi, F. and Charlot, G.,** 1994, Walnut blight: development of fruit infection in two orchards, *Crop Protection*, 13(8):629-631 pp.
- Sawada, H., Yokosawa, S., Uematsu, H., Nishiquchi, T. and Kondo, K.,** 2017, First report of walnut blight caused by WB strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Japan, *Japanese Journal of Phytopathology*, 83(1):10-21pp.
- Saygılı H., Aysan, Y., Şahin, F., Soylu, S. ve Mirik, M.,** 2019, Bitki Bakteri Hastalıkları, 223-227, 382 s. Yayın no: 2.08-025-0028/B-1.
- Schaad, N. W., Jones, B. J., and Chun, W.,** 2001, Laboratory Guide for Identification Plant Pathogenic Bacteria, APS Press, USA, 543 pp.
- Scortichini, M., Marchesi, M., and Di Prospero, P.,** 2001, Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *Juglandis*, *X. juglandis* pv. *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting. *Journal of Phytopathology*, 149:325-332 pp.
- Scotton M., Bortolin, E., Fiorin, A., and Belisario, A.,** 2015, Environmental and pathogenic factors inducing brown apical necrosis on fruit of english (persian) walnut, *The American Phytopathological Society*, 105: 1427-1436 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shami, M., Ghasemi, A., Alizade Ali-Abadi, A. and Eskandari, A.,** 2013, Genetic diversity and phylogenetic study of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* the causal agent of walnut bacterial blight disease, *Journal of Nuts*, 4(4):57-62 pp.
- Sneath, P.H.A.,** 1956, Cultural and biochemical characteristics of the genus chromobacterium, *Journal of Genetic Microbiology*, 15:70-98 pp.
- Solar, A., Jakopic, J., Nour, V., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Botu, M. and Stampar, F.,** 2012, Prohexadione-Ca induces reduction in bacterial blight severity and alteration in phenolic content in walnuts, *Journal of Phytopathology*, 94:47-52 pp.
- Stolp, H. and Starr, M.P.,** 1964, Bacteriophage reaction and speciation on phytopathogenic *Xanthomonas*, *Phytopathologische Zeitschrift*, 442-478 pp.
- Şen, S.M.,** 2005, Türkiye’de cevizin dünü, bugünü, yarını, *Bahçe ceviz*, 34(1):15-27 s.
- Temperini, C.V., pardo, A.G. and Pose G.N.,** 2017, First report of apical necrosis in walnut cultivars from northern argentinean patagonia, *Journal of Plant Pathology&Microbiology*, 8(7). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.100041>
- Thornley, M.J.,** 1960, The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism, *Journal of Applied Bacteriology*, 1:37-52 pp.
- TÜİK,** 2022, Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>, Erişim tarihi: 11.04.2023
- Üstün, N., Poyraz, D. and Arslan, N.,** 2016, Outbreak and etiology of brown apical necrosis on walnut in Balıkesir province of Turkey. II Int. Workshop on Bacterial Diseases of Stone Fruits and Nuts, İzmir, TÜRKİYE.
- Wang, Y.X., Chen, J.Y., Xu, X.W. and Wang, Q.Z.,** 2019, First report of brown apical necrosis of walnut fruit caused by *Fusarium avenaceum* in Hubei, China, *Plant Disease*, 103 (11). <https://doi.org/10.94/PDIS-05-19-0954-PDN>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J.,** 1991, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, 173:697– 703 pp.
- Wu, J., Jiang, X., Jiang, Y., Lu, S., Zou, F. and Zhou, H.,** 2010, Effects of polymerase, template dilution and cycle number on PCR based 16R rRNA diversity analyses using the deep sequencing method, *Bio Med Central Microbiology*, 10:255 pp.
- Yang, K.Q., Qu, W.W., Liu, X., Liu, H.X. and Hou, L.Q.,** 2011, First report of *Pantoea agglomerans* causing Brown apical necrosis of walnut in China, *Plant Disease*, 95(6)773, <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-11-0060>
- Zheng, C., Zhu, J., Yang, X. and Fu, B.,** 2022, Short Communication: Genetic diversity of walnut blight-associated bacteria from China using rep-PCR, *Biodiversitas*, 23(11):5681-5686 pp.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın başlangıcından tamamlanma aşamasına kadar olan süreçte kıymetli bilgi, beceri ve tecrübeleri ile her zaman bana yol gösteren, bu uzun ve zorlu süreçte yardım ve desteğini esirgemeyen, akademik bilgi ve tecrübesinin dışında da hayatımda örnek aldığım değerli danışmanım Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez izleme komitesinde yer alan ve her konuda desteklerini esirgemeyen ve yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ'e, Prof. Dr. Fatih ŞEN'e, Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ'ye ve Doç. Dr. Didem CANİK OREL'e teşekkür ederim. Tez çalışmasının yürütülmesinde bütçe sağlayan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü' ne ve tezim boyunca her türlü desteği sağlayan Bornova Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Hayatımda her zaman yanımda olan, doğru yolu gösteren, beni maddi-manevi destekleyen, bugünlere gelmemde emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem Hatice ERTİMURTAŞ'a ve babam Süreyya ERTİMURTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan, desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Yeşim EĞERCİ, Dr. Ceren CER, Araş. Gör. Utku ŞANVER ve Dr. Morteza HAGHİ'ye teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğrenimini Adapazarı'nda, lise öğrenimini İzmir' de tamamladı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden 2010 yılında mezun olan araştırmacı aynı yıl yüksek lisans eğitimine başlayarak 2012 yılında Fitopatoloji ABD'nda "Sert Çekirdeklielerde Bakteriyel Kansere Neden Olan *Pseudomonas syringae* Pathovarlarının Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Tanısı" konulu yüksek lisans tez çalışmasını bitirmiştir. 2012-2017 yılları arasında İzmir Zirai Karantina Müdürlüğü'nde, 2017 yılından bu yana da Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde bitki bakteri hastalıkları ve biyolojik mücadelesi ile ilgili çalışmaktadır. İngilizce ve İtalyanca bilmektedir.

