

Bakteriyel leke hastalığına neden olan *Xanthomonas* izolatlarının tür düzeyinde tanısı

Diagnosis of *Xanthomonas* isolates causing bacterial spot disease at the species level

Benian Pınar AKTEPE¹, Raziye ÇETİNKAYA YILDIZ², Yeşim AYSAN³

¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Organik Tarım İşletmeciliği Bölümü, Kadirli, Osmaniye, Türkiye.

²Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana, Türkiye.

³Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana, Türkiye.

ARTICLE INFO	ÖZET
<p>Article history: Recieved / Geliş: 24.01.2024 Accepted / Kabul: 01.04.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> <i>Xanthomonas perforans</i> Biber Domates PCR</p> <p>Keywords: <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> <i>Xanthomonas perforans</i> Pepper Tomato PCR</p> <p>✉Corresponding author/Sorumlu yazar: Benian Pınar AKTEPE benianaktepe@osmaniye.edu.tr</p> <p>Makale Uluslararası Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 Lisansı kapsamında yayınlanmaktadır. Bu, orijinal makaleye uygun şekilde atıf yapılması şartıyla, eserin herhangi bir ortam veya formatta kopyalanmasını ve dağıtılmasını sağlar. Ancak, eserler ticari amaçlar için kullanılamaz. © Copyright 2022 by Mustafa Kemal University. Available on-line at https://dergipark.org.tr/tr/pub/mkutbd This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.</p> <p> </p>	<p>Bilimsel amaçlı biyolojik çalışmaların başlangıç noktası olan taksonomi, bir canlının diğer canlılarla akrabalık ilişkilerini ortaya koymaktadır. Taksonomi doğal olarak değişimlik gösterebildiği gibi, yeni teknolojiler, metotlar ve kavramlarla da değişebilir. Diğer canlı türlerinde olduğu gibi bakterilerde de sınıflandırma ve isimlendirmeler gelişen moleküler teknikler ile beraber değişebilmektedir. Sistematüğinde değişiklik olan ve yeni türlere ayrılan bakteriyel etmenlerden biri de domates ve biberde Bakteriyel Leke Hastalığı etmeni <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Syn <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>)'dır. Patojen, yeni moleküler tekniklerin ışığında dört türe ayrılmıştır. DNA homolojisine göre yapılan analizlerde <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>, <i>Xanthomonas vesicatoria</i>, <i>Xanthomonas perforans</i> ve <i>Xanthomonas gardneri</i> olarak isimlendirmiştir. Bu çalışma kapsamında; Adana, Antalya ve Mersin illerinde açık alan ve örtü altında yetiştirilen domates ve biberlerden, fideliklerden ve biber tohumlarından 2004-2021 yılları arasında izole edilmiş 66 adet <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> izolatu klasik PCR testi kullanılarak yeniden sınıflandırılmıştır. Yapılan Klasik PCR testinde izolatların %91'i (60 izolat) <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> olarak ve %9'u (6 izolat) ise <i>Xanthomonas perforans</i> olarak saptanmıştır. Bu makale <i>Xanthomonas perforans</i>'ın Doğu Akdeniz Bölgesi'nde (Adana ve Mersin illeri) varlığını ortaya koyan ilk çalışma niteliğindedir.</p> <p>ABSTRACT</p> <p>The starting point of biological studies for scientific purposes is taxonomy. Taxonomic information reveals the kinship relations of a living thing with other living things. Taxonomy, which can change naturally over time, can also change as a result of new technologies, methods and concepts. As in other living things, classification and nomenclature in bacteria can change with the developing molecular techniques. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Syn <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>), the causal agent of Bacterial Spot Disease of tomato and pepper, is one of the bacterial agents whose systematics have changed and divided into new species. These four species were named as <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>, <i>Xanthomonas vesicatoria</i>, <i>Xanthomonas perforans</i> and <i>Xanthomonas gardneri</i> according to DNA homology analysis. In this study, 66 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> isolates isolated from tomatoes and peppers grown in open field and under cover as well as seedlings and pepper seeds in Adana, Antalya and Mersin provinces between 2004 and 2021 were reclassified using classical PCR test. Based on the results, 91% (60 isolates) were identified as <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> and 9% (6 isolates) were identified as <i>Xanthomonas perforans</i>. This article is the first research on occurrence of <i>Xanthomonas perforans</i> in the Eastern Mediterranean Region (Adana and Mersin provinces).</p>
<p>Cite/Atf</p>	<p>Aktepe, B.P., Yıldız Çetinkaya, R., & Aysan, Y. (2024). Bakteriyel leke hastalığına neden olan <i>Xanthomonas</i> izolatlarının tür düzeyinde tanısı. <i>Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi</i>, 29 (2), 439-449. https://doi.org/10.37908/mkutbd.1424660</p>

GİRİŞ

Domates ve biber bitkilerinde dört farklı *Xanthomonas* türleri tarafından neden olunan Bakteriyel Leke Hastalığı dünya genelinde biber ve domates üretimini tehdit eden ekonomik açıdan önemli bir hastalıktır. Hastalık, özellikle yüksek sıcaklık ve nemin aynı anda meydana geldiği üretim alanlarında önemli bir sorundur. İlk olarak 1921 yılında Güney Afrika'da saptanan bu etmen *Bacterium vesicatorium* olarak isimlendirilmiş, 1939 yılında ise *Xanthomonas vesicatoria* olarak adlandırılmıştır. İlerleyen dönemde, Jones ve ark. (2000)'nin bildirdiğine göre patojen, Dye (1978) tarafından *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* olarak yeniden isimlendirilmiştir. Eski Yugoslavya'da domates üretim alanlarında 1957 yılında saptanan ve *Pseudomonas gardneri* olarak isimlendirilen etmen, Dye tarafından yapılan biyokimyasal ve morfolojik testler ile *Xanthomonas* cinsi içerisine yerleştirilmiş ve *Xanthomonas gardneri* olarak adlandırılmış ve bu sınıflandırma yapılan DNA-rRNA hibridizasyon testleri ile desteklenmiştir (Jones ve ark., 2004). Stall ve ark. (1994) tarafından yapılan çalışmalarda *X. campestris* pv. *vesicatoria*'nın genetik açıdan farklı özellikler içeren iki gruba ayrıldığı saptanmış ve bu gruplar A ve B olarak isimlendirilmiştir. Araştırmacılar genetik açıdan farklı olan bu grupların biber ve domates bitkilerinde aynı hastalığı oluşturduğunu belirlemişlerdir. Şahin ve Miller (1998) ise domateslerde üç farklı ırk (T1, T2, ve T3) bulunduğunu, buna karşın biberlerde on bir farklı ırkın (P0, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10) saptandığını bildirmişlerdir. Ancak 2004 yılında Jones ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'nın taksonomisi yeniden değişmiş ve etmen *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri* ve *Xanthomonas vesicatoria* olmak üzere dört farklı türe ayrılmıştır (Jones ve ark., 2004; EPPO, 2013; Zhang ve ark., 2021). Bakteriyel leke hastalığına neden olan etmenler arasındaki taksonomik karmaşıklıklar nedeniyle, dört türün sınıflandırması son on yılda birkaç kez değişmiştir. Son yıllarda yapılan moleküler tabanlı çalışmalar ile *Xanthomonas perforans*'ın terminolojisi *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* olarak yeniden düzenlenmiştir. Ayrıca son dönemlerde geliştirilen genom dizileme teknolojileri bu etmenin genomik çeşitliliği hakkında yeni bilgileri ortaya koymaktadır (Osdaghi ve ark., 2021; Abrahamian ve ark., 2021). Türe özgü DNA tabanlı teknolojiler (PCR; Real Time PCR; vb.) domates ve biberde Bakteriyel Leke Hastalığına neden *Xanthomonas* türlerinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Lin ve ark., 2020). Birden çok sayıda heterojen yapıya sahip *Xanthomonas* türünün oluşturduğu karmaşık bir hastalık olan Bakteriyel Leke Hastalığı, örtü altında yetiştirilen domates ve biber bitkilerinin yanı sıra özellikle sıcak ve nemli koşullarda açık alanlarda yetiştirilen domates ve biber bitkilerinde de sorun olmaktadır. Etmen çok şiddetli enfeksiyonlarda, pazarlanabilir meyve veriminde %23-44 arasında değişen oranlarda direkt ürün kaybına neden olurken, yoğun enfeksiyonun görüldüğü bitkilerde ise yaprakların dökülmesi nedeniyle meyveler doğrudan güneş ışığına maruz kalmakta ve güneş yanığı gibi ikincil kayıplar da gözlenmektedir (Şahin ve ark., 2013). Etmen Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonunun (EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization) karantina etmenleri listesi A2'de yer almaktadır. Ülkemizde ise Bitki Karantinası Yönetmeliği Ek 2B "Türkiye'de sınırlı olarak bulunan karantinaya tabii organizmalar" listesinde bulunmaktadır (Anonim, 2024).

Bu çalışmada 2004-2021 yılları arasında Adana, Mersin ve Antalya illerinde tarla ve fidelikte yetiştirilen domates ve biber bitkilerinden, örtü altında yetiştirilen domates bitkilerinden ve biber tohumlarından izole edilmiş ve Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 66 adet *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* izolatu klasik PCR testi kullanılarak yeniden sınıflandırılmıştır. Türkiye'nin farklı illerindeki tarla, örtü altı, ve fideliklerde hasta domates ve biber bitkileri ile biber tohumlarından izole edilmiş olan 66 adet izolatu tür düzeyinde, yeni taksonomik sınıflandırmaya uygun teşhisleri ortaya konmuştur.

MATERYAL ve YÖNTEM

Xanthomonas izolatları

Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan tarla, sera ve fideliklerde yetişen domates bitkileri ile tarla ve fideliklerde yetişen biber bitkilerinden ve biber tohumlarından izole edilen *Xanthomonas* spp. izolatları çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur. Karşılaştırma kültürü olarak Erciyes Üniversitesi'nden Doç. Dr. Sümer HORUZ tarafından *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanılanan SH-4-1 kodlu bölge izolatı (Horuz, 2019) ve Florida Üniversitesinden Dr. J.B. JONES'un kültür koleksiyonundan Zir. Yük. Müh. Serhat KARA tarafından temin edilen GEV kodlu *Xanthomonas perforans* izolatı kullanılmıştır. Ayrıca RST65/RST69; Bs-XeF/Bs-XeR ve Bs-XpF/Bs-XpR primer çiftleri, çeşitli kimyasallar ile laboratuvar araç ve gereçleri de çalışmanın materyalini oluşturmaktadır.

Çalışmada kullanılan izolatlara ait bilgiler

Çalışmada tarla, sera ve fideliklerde yetişen domates bitkileri ile tarla ve fideliklerde yetişen biber bitkilerinden ve biber tohumlarından 2004-2021 yılları arasında izole edilen 66 izolatın 59 adeti Adana, 5 adeti Mersin, 2 adeti Antalya illerinden elde edilmiştir. Bu izolatlara ek olarak, iki izolat daha karşılaştırma kültürü olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Türkiye'nin farklı illerinden izole edilen 66 adet *Xanthomonas* izolatınının 36 adeti domatesten ve 30 adeti biberden elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatların bir tanesi örtü altı domates yetiştiriciliği yapılan üretim alanından, 5 adeti biber tohumundan, 10 adeti sofralık üretim yapılan tarladan ve 50 adeti de ticari sebze fide üretimi yapılan fideliklerden izole edilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan *Xanthomonas* izolatlarına ait bilgiler

Table 1. Information on the *Xanthomonas* isolates used in the study

	Kod	Konukçu	Üretim Alanı	İl	İzolasyon Yılı
1	YA-603	Biber	Tarla	Adana	2004
2	YA-604	Biber	Tarla	Adana	2004
3	YA-605	Biber	Tarla	Adana	2004
4	YA-606	Biber	Tarla	Adana	2004
5	YA-608	Biber	Tarla	Adana	2004
6	YA-611	Domates	Fidelik	Adana	2012
7	YA-612	Domates	Fidelik	Adana	2012
8	YA-614	Biber	Fidelik	Adana	2013
9	YA-616	Domates	Fidelik	Adana	2013
10	YA-617	Domates	Fidelik	Adana	2013
11	YA-618	Domates	Fidelik	Adana	2013
12	Ya-619	Biber	Fidelik	Adana	2013
13	YA-620	Domates	Fidelik	Adana	2013
14	YA-621	Biber	Tarla	Adana	2013
15	YA-623	Biber	Tarla	Adana	2013
16	YA-624	Domates	Fidelik	Antalya	2013
17	YA-625	Domates	Fidelik	Antalya	2013
18	YA-626	Domates	Tarla	Adana	2014
19	YA-627	Domates	Tarla	Mersin	2016
20	YA-628	Domates	Sera	Mersin	2016
21	YA-629	Domates	Fidelik	Adana	2016
22	YA-633	Biber	Tarla	Adana	2016
23	YA-839	Biber	Fidelik	Adana	2018

Çizelge 1 (devamı). Çalışmada kullanılan Xanthomonas izolatlarına ait bilgiler

Table 1 (continued). Information on the Xanthomonas isolates used in the study

24	YA-840	Biber	Fidelik	Adana	2018
25	YA-842	Biber	Fidelik	Adana	2018
26	YA-843	Biber	Fidelik	Adana	2018
27	YA-844	Biber	Fidelik	Adana	2018
28	YA-845	Biber	Fidelik	Adana	2018
29	YA-846	Biber	Fidelik	Adana	2018
30	YA-855	Biber	Fidelik	Adana	2018
31	YA-856	Biber	Fidelik	Adana	2018
32	YA-858	Biber	Fidelik	Adana	2018
33	YA-859	Biber	Fidelik	Adana	2018
34	YA-860	Biber	Fidelik	Adana	2018
35	YA-861	Biber	Fidelik	Adana	2018
36	YA-862	Biber	Tohum	Adana	2018
37	YA-863	Biber	Tohum	Adana	2018
38	YA-864	Biber	Tohum	Adana	2018
39	YA-865	Biber	Tohum	Adana	2018
40	YA-866	Biber	Tohum	Adana	2018
41	YA-874	Domates	Fidelik	Mersin	2018
42	YA-876	Domates	Fidelik	Mersin	2018
43	YA-877	Domates	Fidelik	Mersin	2018
44	YA-1052	Domates	Fidelik	Adana	2021
45	YA-1053	Domates	Fidelik	Adana	2021
46	YA-1054	Domates	Fidelik	Adana	2021
47	YA-1055	Domates	Fidelik	Adana	2021
48	YA-1056	Domates	Fidelik	Adana	2021
49	YA-1057	Domates	Fidelik	Adana	2021
50	YA-1058	Domates	Fidelik	Adana	2021
51	YA-1059	Domates	Fidelik	Adana	2021
52	YA-1060	Domates	Fidelik	Adana	2021
53	YA-1061	Domates	Fidelik	Adana	2021
54	YA-1062	Domates	Fidelik	Adana	2021
55	YA-1063	Domates	Fidelik	Adana	2021
56	YA-1064	Domates	Fidelik	Adana	2021
57	YA-1066	Domates	Fidelik	Adana	2021
58	YA-1067	Domates	Fidelik	Adana	2021
59	YA-1068	Domates	Fidelik	Adana	2021
60	YA-1069	Domates	Fidelik	Adana	2021
61	YA-1070	Domates	Fidelik	Adana	2021
62	YA-1071	Domates	Fidelik	Adana	2021
63	YA-1072	Domates	Fidelik	Adana	2021
64	YA-1074	Domates	Fidelik	Adana	2021
65	YA-1076	Biber	Fidelik	Adana	2021
66	YA-1078	Biber	Fidelik	Adana	2021
67	SH-4-1	Erciyes Üniversitesi Doç. Dr. S. HORUZ Kültür Koleksiyonu			
68	GEV	Florida Üniversitesi Dr. J.B. JONES Kültür Koleksiyonu			

Xanthomonas izolatlarının genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve -20°C'de Eppendorf tüplerde muhafaza edilen Xanthomonas izolatları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan

izolatlar +4°C'de 9.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu süre sonunda tüplerde oluşan süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen pellet DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Referans kültürler de dahil olmak üzere *Xanthomonas* türlerine ait toplam 68 izolatın DNA izolasyonu, DNA prufikasyon kiti (Katalog numarası: K0721, Roche marka) kullanılarak üretici firma protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Elde edilen nükleik asitlerin saflık ve miktar tayini 100 ng/µl yoğunluğa ayarlanmıştır. Elde edilen 68 izolata ait genomik DNA'lar klasik PCR çalışmasında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

***Xanthomonas* izolatlarının moleküler tanısı**

Xanthomonas izolatlarının moleküler tanısı iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, izolatların *Xanthomonas* cinsine dahil olup olmadıkları moleküler olarak ortaya konulmuş, ikinci aşamada ise *Xanthomonas* cinsi içerisinde yer alan izolatların türleri belirlenmiştir.

***Xanthomonas* izolatların cins düzeyinde moleküler tanısı**

Sera, tarla ve fideliklerde domates bitkilerinde elde edilen izolatlar ile tarla ve fideliklerdeki biber bitkilerinden ve biber tohumlarından izole edilen izolatların *Xanthomonas* cinsine ait olup olmadıklarını belirlemek için klasik PCR testi yapılmıştır. Çalışmada *Xanthomonas* cinsi içerisinde yer alan türlerin patojenisitesinden sorumlu hrpB7-s bölgesinden elde edilen RST65 ve RST69 primerleri kullanılmıştır (Obradovic ve ark., 2004). PCR çoğaltmalarında 8.5 µl nuclease free su, 12.5 µl PCR Master Mix (Promega, M7502), 1.0 µl RST65, 1.0 µl RST69 (10 pmol/ µl) ve 2.0 µl genomik DNA olmak üzere toplam 25.0 µl içerik kullanılmıştır. Çalışmada Thermocycler cihazı, PCR döngüleri 95°C'de 5.0 dakika, 95°C'de 60.0 saniye, 55°C'de 30.0 saniye, 72°C'de 45.0 saniye (29 döngü) ve son aşamada 72°C'de 5.0 dakika olacak şekilde programlanmıştır. Çalışmada kullanılan RST65 ve RST69 primerlerinin baz dizimleri ve beklenen bant büyüklüğü Çizelge 2'de yer almaktadır.

Çizelge 2. PCR çalışmalarında kullanılan RST65 ve RST69 primerlerinin baz dizimleri ve beklenen bant büyüklüğü

Table 2. Base sequences and expected band size of RST65 and RST69 primers used in the PCR studies

Primer	Baz dizimleri	Bant Büyüklüğü (bp)
RST65	5 GTCGTCGTTACGGCAAGGTGGTCG 3	420
RST69	5 TCGCCCAGCGTCATCAGGCCATC-3	

***Xanthomonas* spp. izolatlarının tür düzeyinde tanısı**

Xanthomonas cinsi içerisinde yer aldığı moleküler olarak teyit edilen izolatların türünü belirlemek için yapılan klasik PCR çalışmasında *Xanthomonas euvesicatoria*'ya spesifik Bs-XeF ve Bs-XeR primer çifti ile *Xanthomonas perforans*'a spesifik Bs-XpF ve Bs-XpR primer çifti kullanılmıştır (Koenraadt ve ark., 2009). PCR analizlerinde içerik 8.5 µl nuclease free su, 12.5 µl PCR Master Mix (Promega, M7502), 1.0 µl primer 1, 1.0 µl primer2 (10 pmol/ µl) ve 2.0 µl genomik DNA olmak üzere toplam 25.0 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR çalışmasında Thermocycler cihazıyla PCR döngüsü 94°C'de 2 dakika 1 döngü, 95°C'de 30 saniye, 67°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye (40 döngü) ve son döngüde 72°C'de 5 dakika olarak programlanmıştır. Bs-XeF ve Bs-XeR primer çifti ile Bs-XpF ve Bs-XpR primerlerinin baz dizimleri ve beklenen bant büyüklükleri Çizelge 3'de yer almaktadır.

Elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi

PCR ürünlerinin görüntülenmesinde yapılan agaroz jel elektroforezi için 1X TAE tamponu kullanılarak %2'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Ardından, 50°C'ye soğutulmuş agaroz jel'e %5 oranında Syber Safe eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında jelin donması beklenmiştir. Jel tankı içerisine jeli örtünceye kadar 0.5X TBE buffer konulmuştur. Ardından agaroz jel çukurlarına 10 µl PCR ürünü ile 2 µl loading buffer karışımı bir mikropipet kullanılarak yüklenmiştir. Moleküler ağırlık işaretleyici (Marker) (Katalog numarası: SM0241, ThermoFisher firması) olarak 100 bp DNA ladder

Çizelge 3. PCR çalışmasında kullanılan primer çiftlerine ait baz dizimleri ve beklenen bant büyüklükleri

Table 3. Base sequences and expected band sizes of the primer pairs used in the PCR study

Primer	Baz dizimleri	Bant büyüklüğü (bp)
Bs-XeF	5'-CAT GAA GAA CTC GGC GTA TCG-3'	173
Bs-XeR	5'-GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATA C3'	
Bs-XpF	5'- GTC GTG TTG ATG GAG CGT TC -3'	197
Bs-XpR	5'- GTG CGA GTC AAT TAT CAG AAT GTG G 3'	

kullanılmıştır. PCR ürünleri 80V elektrik akımında 2 saat yürütüldükten sonra transliminatörde ultraviyole ışıkta bantlar incelenerek kaydedilmiştir (Sambrook ve ark., 1989).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Xanthomonas izolatlarının genomik DNA izolasyonu

2004-2021 yılları arasında Adana, Antalya ve Mersin illerindeki fidelik, tarla ve seralarda yaprak lekesi belirtisi gösteren domates ve biber bitkilerinden ve biber tohumlarından izole edilmiş olan 66 adet *Xanthomonas* izolatının ve karşılaştırma kültürü olarak temin edilen iki izolatın genomik DNA'ları izole edilmiştir. Elde edilen nükleik asitlerin saflık ve miktar tayini spektrofotometre kullanılarak 100 ng/μl yoğunluğa ayarlanmıştır.

Xanthomonas izolatların cins düzeyinde tanısı

Elde edilen izolatların *Xanthomonas* cinsine ait olup olmadığını belirlemek için yapılan PCR çalışmasında 66 bölge izolatı 420 bp büyüklükte bant oluşturmuş ve moleküler olarak *Xanthomonas* spp. olarak tanılanmıştır.

Xanthomonas izolatların tür düzeyinde tanısı

Xanthomonas cinsine ait olduğu moleküler olarak teyit edilen 66 adet izolatın tür düzeyinde tanılanması için BSXeF ve BSXeR primer çifti kullanılarak yapılan PCR testinde 60 adet izolat 173 bp büyüklükte bant oluşturmuş ve moleküler olarak *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanılanmıştır. *Xanthomonas euvesicatoria*'ya özgü BSXeF ve BSXeR primer çifti kullanılarak yapılan PCR testinde tanılanamayan altı adet izolat ise Bs-XpF ve Bs-XpR primerlerinin kullanıldığı klasik PCR çalışmasında 197 bp büyüklükte bant oluşturmuş ve moleküler olarak *Xanthomonas perforans* olarak tanılanmıştır. Çizelge 4'de çalışmada kullanılan *Xanthomonas* cinsine ait izolatların türleri yer almaktadır. *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanılanan 60 izolatın 30 adedi domatesten, 30 adedi ise biberden farklı yıllarda izole edilmiştir. Bu izolatların 45 adedi fidelikten, 9 adedi tarladan, 5 adedi tohumdan, 1 adedi ise örtüaltından izole edilmiştir. *Xanthomonas perforans* olarak tanılanan 6 domates izolatının 5 adedi fidelikten, 1 adedi ise tarladan elde edilmiştir (Çizelge 4). *Xanthomonas* türlerinin kesin olarak ayırt edilmesinde biyokimyasal testler, nişasta hidrolizi, pektolitik aktivite ve karbon kaynaklarından yararlanma kilit rol almaktadır (Jones ve ark., 2004).

Çalışmada kullanılan 66 izolatın tamamının nişastayı hidrolize ettiği önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Mirik, 2005; Horuz, 2019). Areas ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada 59 adet *Xanthomonas* izolatının nişastayı hidrolize etmediğini ve patatesta pektolitik aktivite oluşturmadığını ancak yapılan moleküler testlerde izolatların 173 bp'lik bant oluşturarak *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanılandığını bildirmişlerdir. Jones ve ark. (2004) yaptığı çalışmada *Xanthomonas perforans* izolatlarının nişastayı çok yüksek oranda, *Xanthomonas euvesicatoria* izolatlarının ise nişastayı düşük oranda hidrolize ettiğini ve pektolitik aktivite oluşturduğunu, *Xanthomonas gardneri* izolatlarının ise nişastayı hidrolize etmediğini bildirmişlerdir. Horuz (2019) ise, 2016 ve 2017 yıllarında Türkiye'nin Kayseri ilindeki biber üretim alanlarından elde ettiği 12 izolatı BS-XeF/BSXeR primerleriyle yapılan PCR sonuçlarına göre *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanılamıştır. Bir diğer çalışmada Ontario'da domates arazilerindeki hasta yaprak ve meyvelerden izole edilen 98 izolatın 35'inin *Xanthomonas gardneri*, 26'sinin da *Xanthomonas perforans* olduğu

belirlenmiş ve bölgenin hakim türleri ortaya konulmuştur. Ayrıca araştırmacılar *Xanthomonas vesicatoria* ve *Xanthomonas euvesicatoria*'nın daha az yaygınlık gösterdiğini bildirmişlerdir (Abbasi ve ark., 2015). Bu mevcut çalışmada ise, kullanılan *Xanthomonas* izolatlarının 60 adeti *Xanthomonas euvesicatoria*, altı tanesi de *Xanthomonas perforans* olarak saptanmış ve buna bağlı olarak *Xanthomonas euvesicatoria* bölgemizde en yaygın tür olarak belirlenmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. *Xanthomonas* izolatlarının tür düzeyinde tanısı

Table 4. Diagnosis of *Xanthomonas* isolates at species level

No	Kod	Konukçu	Üretim Alanı	Tür
1	YA-603	Biber	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
2	YA-604	Biber	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
3	YA-605	Biber	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
4	YA-606	Biber	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
5	YA-608	Biber	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
6	YA-611	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
7	YA-612	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
8	YA-614	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
9	YA-616	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
10	YA-617	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
11	YA-618	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas perforans</i>
12	Ya-619	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
13	YA-620	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
14	YA-621	Biber	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
15	YA-623	Biber	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
16	YA-624	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
17	YA-625	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
18	YA-626	Domates	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
19	YA-627	Domates	Tarla	<i>Xanthomonas perforans</i>
20	YA-628	Domates	Sera	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
21	YA-629	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
22	YA-633	Biber	Tarla	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
23	YA-839	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
24	YA-840	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
25	YA-842	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
26	YA-843	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
27	YA-844	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
28	YA-845	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
29	YA-846	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
30	YA-855	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
31	YA-856	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
32	YA-858	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
33	YA-859	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
34	YA-860	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
35	YA-861	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
36	YA-862	Biber	Tohum	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
37	YA-863	Biber	Tohum	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
38	YA-864	Biber	Tohum	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
39	YA-865	Biber	Tohum	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
40	YA-866	Biber	Tohum	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
41	YA-874	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas perforans</i>

Çizelge 4 (devamı). *Xanthomonas* izolatlarının tür düzeyinde tanısı

Table 4 (continued). *Diagnosis of Xanthomonas isolates at species level*

42	YA-876	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas perforans</i>
43	YA-877	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas perforans</i>
44	YA-1052	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
45	YA-1053	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
46	YA-1054	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
47	YA-1055	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
48	YA-1056	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
49	YA-1057	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
50	YA-1058	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
51	YA-1059	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
52	YA-1060	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
53	YA-1061	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
54	YA-1062	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
55	YA-1063	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
56	YA-1064	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
57	YA-1066	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
58	YA-1067	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
59	YA-1068	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
60	YA-1069	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
61	YA-1070	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
62	YA-1071	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
63	YA-1072	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas perforans</i>
64	YA-1074	Domates	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
65	YA-1076	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
66	YA-1078	Biber	Fidelik	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>

Biber ve domates bitkilerinden elde edilen *Xanthomonas* izolatlarının %9.1'ini (6 izolat) *Xanthomonas perforans*, %90.9'unu (60 izolat) ise *Xanthomonas euvesicatoria* izolatlarının oluşturduğu tespit edilmiştir. Elde edilen tüm izolatların üretim alanlarına göre dağılımı incelendiğinde domates fideliklerinden izole edilen *Xanthomonas perforans* izolatlarının %7.57 (5 izolat), tarlada yetiştirilen domates bitkilerinden izole edilenlerin ise %1.51 (1 izolat) oranında olduğu belirlenmiştir. *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanımlanan biber izolatlarının %25.76'sının (17 izolat) fideliklerden, %12.12'sinin (8 izolat) tarlada yetiştirilen biber bitkilerinden ve %7.57'sinin (5 izolat) ise tohumlardan elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanımlanan domates izolatlarının %42.42'sinin (28 izolat) fideliklerden, %1.51'inin (1 izolat) seralardan, %1.51'inin (1 izolat) ise tarlada yetiştirilen domates bitkilerinden elde edildiği saptanmıştır (Çizelge 5).

Çizelge 5. Biber ve domates bitkilerinden elde edilen *Xanthomonas* izolatlarının farklı üretim alanlarına göre dağılımı
Table 5. The distribution of *Xanthomonas* isolates obtained from pepper and tomato plants according to different production areas

Üretim Alanı	Biber		Domates		Toplam
	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	<i>Xanthomonas perforans</i>	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	<i>Xanthomonas perforans</i>	
Fidelik	17	0	28	5	50
Sera	0	0	1	0	1
Tarla	8	0	1	1	10
Tohum	5	0	0	0	5
Toplam	30	0	30	6	66

Farklı illerden izole edilen *Xanthomonas* izolatlarının yıllara göre dağılımı incelendiğinde; 2004 ve 2012 yıllarında elde edilen izolatların %100'ü (sırasıyla 5 ve 2 izolat) *Xanthomonas euvesicatoria* olarak saptanmıştır. 2013 yılında elde edilen 10 izolatın %90'ı *Xanthomonas euvesicatoria*, %10'u ise *Xanthomonas perforans* olarak tespit edilmiştir. 2014 yılında ise; elde edilen bir izolat *Xanthomonas euvesicatoria* olarak tanılanmıştır. 2016 yılında elde edilen izolatların %75'i *Xanthomonas euvesicatoria*, %25'i ise *Xanthomonas perforans* olarak saptanmıştır. 2018 yılında toplam 21 izolat elde edilmiş olup %85.71'i *Xanthomonas euvesicatoria*, 14.13'ü ise *Xanthomonas perforans* olarak tanılanmıştır. 2021 yılında toplam 23 izolat elde edilmiş bu izolatların %95.62'si *Xanthomonas euvesicatoria*, %4.34'ü *Xanthomonas perforans* olarak belirlenmiştir.

Xanthomonas perforans izolatlarının illere göre dağılımı incelendiğinde; Adana ilinden 2 izolat, Mersin ilinden ise 4 izolat elde edildiği saptanmıştır. *Xanthomonas euvesicatoria* izolatlarının illere göre dağılımı incelendiğinde 57 izolatın Adana ilinden, ikişer izolatın ise Antalya ve Mersin illerinden izole edildiği belirlenmiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Farklı illerden izole edilen *Xanthomonas* izolatlarının yıllara göre dağılımı

Table 6. Distribution of *Xanthomonas* isolates isolated from different provinces by years

Yıl	Adana		Antalya		Mersin		Toplam
	<i>X.euvesicatoria</i>	<i>X.perforans</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X.perforans</i>	
2004	5	0	0	0	0	0	5
2012	2	0	0	0	0	0	2
2013	7	1	2	0	0	0	10
2014	1	0	0	0	0	0	1
2016	2	0	0	0	1	1	4
2018	18	0	0	0	0	3	21
2021	22	1	0	0	0	0	23
Toplam	57	2	2	0	1	4	66
	59		2		5		

Sonuç olarak, domates ve biberde Bakteriye Leke Hastalığına neden olan *Xanthomonas* türleri bitkinin yeşil aksamı, tohumu ve meyvesi ile taşınabilme/yayılabılme özelliğine sahip olması nedeniyle bitkilerde hastalık oluşturan önemli bakteriyel bitki patojenleri arasında yer almaktadır. *Xanthomonas* türleri hem ülkemizin hemde EPPO (Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü)'nun karantina listesinde yer almaktadır (Anonim 2024; EPPO, 2021). Dört farklı tür tarafından oluşturulan domates ve biberde Bakteriye Leke Hastalığına hangi türün neden olduğunun bilinmesi, farklı türlerin yeni alanlara bulaşmasını önlemek için önemlidir. Özellikle bakteriyel leke etmenlerinin tür düzeyinde tanısının yapılması hem ithal hem de ihraç edilen üretim materyallerinde önem arz etmektedir. Yapılan moleküler tanı çalışmaları sonucunda tespit edilen *Xanthomonas euvesicatoria* izolatlarının, hem domates hem de biber bitkilerinde hastalık oluşturmaları bu türde konukçu çeşidi düzeyinde özelleşme olmadığını göstermektedir. Bu çalışmada Adana, Antalya ve Mersin illerindeki fidelik, tarla ve seralarda yaprak lekesi belirtisi gösteren domates ve biber bitkilerinden ve biber tohumlarından izole edilen *Xanthomonas* türlerinin *Xanthomonas euvesicatoria* ve

Xanthomonas perforans olduğu saptanmıştır. Ayrıca *Xanthomonas euvesicatoria*'nın Adana ve Antalya illerindeki domates ve biber üretim alanlarında *Xanthomonas perforans*'tan daha yaygın olduğu, Mersin ilinde ise *Xanthomonas perforans*'ın daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Bu makale *Xanthomonas perforans*'ın Doğu Akdeniz Bölgesinde (Adana ve Mersin illeri) varlığını ortaya koyan ilk çalışma niteliğindedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullandığımız SH-4-1 kodlu *Xanthomonas euvesicatoria* izolatını bize sağlayan Doç. Dr. Sümer HORUZ'a derin teşekkürlerimizi sunarız.

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

ETİK ONAY BEYANI

Bu makalede insan veya hayvan deneklerle herhangi bir çalışma bulunmaması nedeniyle etik onaya gerek duyulmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbasi, P.A., Khabbaz, S.E., Weselowski, B., & Zhang, L. (2015). Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, 61 (10), 753-761. <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/cjm-2015-0228>
- Abrahamian, P., Klein-Gordon, L.M., Jones, J.B., & Vallad, G.E. (2021). Epidemiology, diversity, and management of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 6143-6158. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11459-9>
- Anonim (Jan, 2024). *Bitki karantinası yönetmeliği*. [www.http.mevzuat.gov.tr](http://www.mevzuat.gov.tr)
- Areas, M.S., Gonçalves, R.M., Soman, J.M., Sakate, R.K., Gioria, R., da Silva Júnior, T.A., & Maringoni, A.C. (2015). Prevalence of *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 163 (11-12), 1050-1054. <https://doi.org/10.1111/jph.12349>
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). (2013). Diagnostics, PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 43 (1), 7-20.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). (Aug, 2021). A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests- version 2021-09 – https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list
- Horuz, S. (2019). Identification of *Xanthomonas* spp. disease agent/s and the effect of chemical seed treatments to control bacterial spot of pepper. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28 (9), 6786-6792.
- Jones, J.B., Bouzar, H., Stall, R.E., Almira, E.C., Roberts, P.D., Bowen, B.W., Sudberry, J., Strickler P.M., & Chun J. (2000). Systematic analysis of Xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1211-1219. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1211>
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., & Schaad, N.W. (2004). Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (6), 755-762. <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>

- Koenraad, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J.B., Oosterhof, J., Rijlaarsdam, A., Roorda, P., & Woudt, B. (2009). Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. Proceedings of the 2nd International Symposium on Tomato Diseases (Eds H. Saygili, F Sahin & Y Aysan), *Acta Horticulturae*, 808, 99-102.
- Lin, Y.R., Lee, S., Lu, C.H., & Chu, C.C. (2020). Genetic and phenotypic characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *maculifoliogardeniae* causing bacterial leaf spot of Ixora in Taiwan. *Journal Phytopathology*, 168, 478-489. <https://doi.org/10.1111/jph.12912>
- Mirik, M. (2005). Biberde bakteriyel leke etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanakları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 178 s.
- Obradovic, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Balogh, B., & Olson, S.M. (2004). Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease*, 88 (7), 736-740. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.7.736>
- Osdaghi, E., Jones, J.B., Sharma, A., Goss, E.M., Abrahamian, P., Newberry, E.A., Potnis, N., Carvalho, R., Choudhary, M., Paret, M.L., Timilsina, S., & Vallad, G.E. (2021). A centenary for bacterial spot of tomato and pepper. *Molecular Plant Pathology*, 22 (12), 1500. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8578828/>
- Sambrook, J.E., Fritsch, F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual Appendixes*, (2nd Edition p. 6.4- 6.20). Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Şahin, F., & Miller, S.A. (1998). Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper race 6. *Plant Disease*, 82, 794-799. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.7.794>
- Şahin, F., Mirik, M., & Aysan, Y. (2013). Bitki bakteri hastalıkları. H. Saygılı, F. Şahin, Y. Aysan (Eds.). Biber ve Domates Bakteriyel Yaprak Lekesi Hastalığı Bacterial Leaf Spot of Pepper and Tomato, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, (2. Baskı, s. 183-187). Meta Basım Matbaacılık.
- Zhang, X., Li, N., Liu, X., Wang, J., Zhang, Y., Liu, D., Wang, Y., Cao, H., Zhao, B., & Yang, W. (2021) Tomato protein Rx4 mediates the hypersensitive response to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* race T3. *The Plant Journal*, 105, 1630-1644. <https://doi.org/10.1111/tpj.15138>