

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI



FINDIKTA BAKTERİYEL YANIKLIK ETMENİ
***XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *CORYLINA*'NIN BİTKİ**
DOKULARINDAN DNA'YA DAYALI TESPİTİ

BİTKİ KORUMA DOKTORA TEZİ

FATİH TEKİN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Göksel ÖZER

BOLU, HAZİRAN 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

Fatih TEKİN tarafından hazırlanan “**FINDIKTA BAKTERİYEL YANIKLIK ETMENİ *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *CORYLINA*'NIN BİTKİ DOKULARINDAN DNA'YA DAYALI TESPİTİ**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bitki Koruma Ana Bilim Dalı Bitki Koruma Doktora Programında Doktora Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir.
30/06/2025

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Göksel ÖZER
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. M. Erhan GÖRE
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR
Ankara Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Muharrem TÜRKKAN
Ordu Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Sibel DERVİŞ
Mardin Artuklu Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu ve Şablonuna uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

.....
FATİH TEKİN

ÖZET

**FINDIKTA BAKTERİYEL YANIKLIK ETMENİ *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *CORYLINA*'NIN BİTKİ DOKULARINDAN DNA'YA DAYALI TESPİTİ
DOKTORA TEZİ
FATİH TEKİN
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI
BİTKİ KORUMA DOKTORA PROGRAMI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÖKSEL ÖZER)**

BOLU, HAZİRAN- 2025

XV + 119 sayfa

Fındık (*Corylus avellana* L.), önemli ekonomik değere sahip bir ürün olup, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) etmeninin neden olduğu bakteriyel yanıklık hastalığı üretimi tehdit etmektedir. Bu hastalık, özellikle genç fidanlıklarda ciddi kayıplara yol açarak fındık tarımının sürdürülebilirliğini olumsuz etkilemektedir. Bu çalışmada, Türkiye fındık alanlarından Xac izolatlarının eldesi, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, genetik ve patojenik özelliklerinin belirlenmesi, hızlı tespiti için güvenilir bir qPCR yöntemi geliştirilmesi ve yaygın fındık çeşitlerinin Xac'a reaksiyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Fındık üretim bölgelerinden toplanan örneklerden elde edilen izolatlar, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. İzolatların genetik parmak izleri SCoT analizi ile belirlenmiş, patojenisiteleri hassas fındık çeşidinde doğrulanmıştır. Xac'ın hızlı ve kantitatif tespiti için, *gyrB* gen bölgesi hedeflenerek özgün primerler tasarlanmış, sentezlenmiş ve SYBR Green I tabanlı bir real-time PCR (qPCR) yöntemi geliştirilerek kapsamlı doğrulaması yapılmıştır. Son olarak, 10 farklı fındık çeşidinin Xac'a karşı reaksiyonları kontrollü koşullarda incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda, 28 izolat Xac olarak tanımlanmış ve tamamının fındıkta patojenik olduğu saptanmıştır. SCoT analizi, izolatların gruplandırılmasında faydalı bir araç olarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen ve doğrulanması tamamlanan qPCR yönteminin, Xac'ı femtogram düzeyinde özgül ve hassas bir şekilde tespit edebildiği ve kantitatif analizlere olanak tanıdığı kanıtlanmıştır. Fındık çeşit reaksiyonu denemelerinde, test edilen çeşitler arasında Xac'a karşı duyarlılık açısından anlamlı farklılıklar bulunmuş; 'Karafındık' çeşidi daha az hassas bir reaksiyon sergilerken, 'Kalınkara' gibi bazı çeşitlerin hastalık şiddeti yüksek bulunmuştur.

Bu çalışma, Türkiye'deki Xac popülasyonlarının anlaşılmasına, hastalığın doğru ve hızlı teşhisine yönelik güvenilir moleküler araçların geliştirilmesine ve fındık bakteriyel yanıklığı ile mücadelede potansiyel tolerant genotiplerin belirlenmesine önemli katkılar sunmaktadır. Elde edilen bulgular ve geliştirilen metodolojiler, entegre hastalık yönetimi stratejilerinin oluşturulması, fındık ıslah programları ve gelecekteki araştırmalar için temel teşkil edecektir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, Fındık Bakteriyel Yanıklığı, SCoT, Moleküler Karakterizasyon, Real-Time PCR, qPCR, Çeşit Reaksiyonu

ABSTRACT

DNA-BASED DETECTION OF THE BACTERIAL BLIGHT AGENT IN HAZELNUT, *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *CORYLINA*, FROM PLANT TISSUES

PHD THESIS

FATİH TEKİN

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
(SUPERVISOR: PROF. DR. GÖKSEL ÖZER)

BOLU, JUNE 2025

XV + 119 pages

Hazelnut (*Corylus avellana* L.), a crop of significant economic value, is threatened by bacterial blight disease caused by the pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac). This disease negatively impacts the sustainability of hazelnut agriculture by causing severe losses, especially in young orchards. This study aimed to isolate Xac from Turkish hazelnut regions, identify them using classical and molecular methods, determine their genetic and pathogenic characteristics, develop a reliable qPCR method for rapid detection, and evaluate the reactions of common hazelnut varieties to Xac. Isolates obtained from samples collected in hazelnut production areas were identified using classical and molecular methods. The genetic fingerprints of the isolates were determined by SCoT analysis, and their pathogenicity was confirmed on a susceptible hazelnut variety. For the rapid and quantitative detection of Xac, novel primers targeting the *gyrB* gene region were designed and synthesized, and a SYBR Green I-based real-time PCR (qPCR) method was developed and comprehensively validated. Finally, the reactions of 10 different hazelnut varieties to Xac were examined under controlled conditions.

As a result of the studies, 28 isolates were identified as Xac, and all were found to be pathogenic on hazelnut. SCoT analysis was evaluated as a useful tool for grouping the isolates. The developed and validated qPCR method was proven to be capable of specifically and sensitively detecting Xac at the femtogram level, enabling quantitative analysis. In the hazelnut variety reaction trials, significant differences in susceptibility to Xac were found among the tested varieties; the 'Karafındık' variety exhibited a less susceptible reaction, whereas some varieties like 'Kalınkara' showed high disease severity. This study provides significant contributions to understanding the Xac populations in Turkey, developing reliable molecular tools for the accurate and rapid diagnosis of the disease, and identifying potentially tolerant genotypes in the fight against hazelnut bacterial blight. The findings and developed methodologies will constitute a foundation for creating integrated disease management strategies, hazelnut breeding programs, and future research.

KEYWORDS: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, Hazelnut Bacterial Blight, SCoT, Molecular Characterization, Real-Time PCR, qPCR, Variety Reaction

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	ix
FOTOĞRAF LİSTESİ	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xv
1. GİRİŞ.....	16
1.1 Fındık Bitkisinin Küresel Önemi.....	16
1.2 Türkiye'nin Fındık Endüstrisindeki Yeri.....	16
1.3 Fındık Gelişimini Engelleyen Abiyotik Faktörler	17
1.3.1 Sıcaklık Stresinin Etkileri	17
1.3.2 Su Stresi, Kuraklık ve Yağış Düzensizliklerinin Etkileri	18
1.3.3 Yüksek Sıcaklıkların Bitki Hastalıkları ile Etkileşimi	19
1.3.4 Tuzluluk Stresinin Etkileri.....	19
1.3.5 Toprak Yapısı	20
1.3.6 Drenaj	20
1.3.7 pH	21
1.3.8 Besin Elementi Dengesizlikleri	21
1.4 Fındık Gelişimini Engelleyen Biyotik Faktörler	22
1.4.1 Fındık Zararlıları.....	22
1.4.2 Fındık Hastalıkları	24
1.5 Fındık Bakteriyel Yanıklık Hastalığı Etmeni: <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> (Xac).....	26
1.5.1 Xac'ın Genel Özellikleri.....	26
1.5.2 Xac'ın Taksonomisi	27
1.5.3 Xac'ın Ekonomik Önemi	27
1.5.4 Xac'ın Neden Olduğu Hastalık Belirtileri.....	28
1.5.5 Sörvey Metodolojileri ve Örneklem Stratejileri	30
1.5.6 İzolasyon Teknikleri.....	30
1.5.7 Klasik Tanılama Yöntemleri	32
1.5.8 Moleküler Tanılama Teknikleri.....	36
1.5.9 Çeşit Reaksiyon Çalışmaları.....	45
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	47
2.1 Materyal.....	47
2.1.1 Hastalıklı Bitki Materyalinin Eldesi ve Sörvey Alanları.....	47
2.1.2 Referans İzolat Temini	48

2.1.3 Patojenisite Testleri için Bitki Materyali.....	48
2.1.4 Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri	49
2.1.5 Moleküler Çalışma Materyalleri.....	50
2.2 Yöntem	50
2.2.1 Etmen İzolasyonu	50
2.2.2 Biyokimyasal Testler.....	51
2.2.3 DNA İzolasyon Protokolü	53
2.2.4 Patojenisite Çalışmaları	54
2.2.5 Moleküler Çalışmalar	55
2.2.6 Real-time çalışmalarında kullanmak üzere <i>X. arboricola</i> 'ya özgü spesifik primer tasarlanması	58
2.2.7 Xac'nın Kantitatif Tespiti için SYBR Green I Tabanlı real-time PCR Analizleri	58
2.2.8 Xac ile Çeşit Reaksiyon Çalışması.....	59
2.2.9 Real-time ile Dokudan Tespit Çalışmaları	61
3. BULGULAR	62
3.1 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> (Xac) İzolatlarının Eldesi ve Tanımlanması	62
3.2 Biyokimyasal ve Fizyolojik Testlerle Doğrulama.....	67
3.2.1 KOH Testi (Gram Reaksiyonu).....	68
3.2.2 Katalaz Aktivitesi	68
3.2.3 Oksidaz Aktivitesi	69
3.2.4 Oksidasyon-Fermantasyon (O/F) Testi	70
3.2.5 NaCl Toleransı.....	70
3.2.6 Gelişme Sıcaklığı Limitleri	71
3.2.7 Tütünde Hipersensitif Reaksiyon (HR)	71
3.2.8 Karbon Kaynaklarının Kullanımı	72
3.3 Patojenisite ve Hastalık Şiddeti Sonuçları.....	76
3.4 Moleküler Tanımlama	78
3.4.1 Genomik DNA İzolasyonu	79
3.4.2 Konvansiyonel PCR ile Tür Düzeyinde Doğrulama	79
3.4.3 SCoT Markör Analizi ile İzolatların Parmak İzi Profilleri.....	79
3.4.4 <i>rpoD</i> Gen Bölgesinin Sekans Analizi.....	82
3.5 Real-time PCR için <i>X. arboricola</i> 'ya Özgü Spesifik Primer Tasarımı ve Doğrulanması	85
3.6 Xac'ın Real-time PCR ile Kantitatif Tespiti	85
3.7 Fındık Çeşitlerinin <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'ya Karşı Reaksiyonları.....	87
3.8 Real-time ile Dokudan Tespit Çalışma Sonuçları	90
4. TARTIŞMA	94
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR	113

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.1** Dünya fındık üretim miktarı (ton) (FAOSTAT, 2025)..... 17
- Şekil 3.1** NTSYS programı kullanılarak fındıktan elde edilen *Xanthomonas arboricola* izolatlarının SCoT markörlerine dayalı Jaccard benzerlik katsayısı ile oluşturulan dendrogram analizi. Kümeleme analizi UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir..... 82
- Şekil 3.2** rpoD gen bölgesine dayalı olarak Maximum Likelihood metodu ile oluşturulan *Xanthomonas* filogenetik ağacı. Bu çalışmada analiz edilen izolatlar (F6, F7, F8) kalın harflerle belirtilmiştir. Filogenetik analize dış grup olarak *Stenotrophomonas maltophilia* ICMP 17033 dahil edilmiştir. Dallanma noktalarındaki sayılar bootstrap destek değerlerini yüzde olarak ifade etmektedir. 84
- Şekil 3.3** Fındık dokusundan tespit çalışmalarında, inokulasyondan sonraki farklı zaman noktalarında (1., 3., 5.gün) Karafındık ve Kalınkara fındık çeşitlerinde tespit edilen *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* DNA miktarları (pg). *** p<0.001, **** p<0.0001 92

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Sörveylerin yapıldığı bahçelere ait konum bilgileri.....	47
Tablo 2.2 Nutrient Agar (NA) İçeriği	49
Tablo 2.3 YPGA İçeriği	49
Tablo 2.4 YGCA İçeriği.....	49
Tablo 2.5 Hugh ve Leifson'un Oksidatif-Fermantatif Besiyeri İçeriği.....	49
Tablo 2.6 Bu Çalışmada Kullanılan Primer Bilgileri	50
Tablo 3.1 Fındık bitkisinden elde edilen izolatların elde edildiği bahçe bilgileri	65
Tablo 3.2 Fındık bitkisinden elde edilen izolatların karakterizasyon testleri...	73
Tablo 3.3 Fındık bitkisinden elde edilen ve tür olarak <i>Xanthomonas arboricola</i> olduğu doğrulanan izolatların fındık bitkisi üzerinde yapılan patojenisite sonrası hastalık şiddeti skalasına göre istatistiksel oranları	77
Tablo 3.4 Bu çalışmada real-time PCR çalışmalarında kullanılan ve <i>X. arboricola</i> 'ya özgü tasarlanan primer ile ilgili bilgiler	85
Tablo 3.5 Bu çalışmada fındıktan elde edilmiş F7 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>corylina</i> izolatının farklı fındık çeşitlerine inokülasyonu sonrası bu çeşitlerin gösterdiği hastalık şiddeti yüzdeleri	89

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 3.1 Sörvey esnasında gözlemlenen <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> ile bulaşık yapraklar	63
Fotoğraf 3.2 Sörvey esnasında gözlemlenen <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> ile bulaşık zuruflar.....	64
Fotoğraf 3.3 Fındıktan elde edilen F1 (A) ve F24 (B) izolatlarının YGCA besiyerindeki koloni görüntüsü	67
Fotoğraf 3.4 Fındıktan elde edilen F7 izolatının YPGA besiyerindeki koloni görüntüsü.....	67
Fotoğraf 3.5 Fındıkta elde edilen F4 izolatının KOH testi sonucu gösterdiği uzama belirtisi ve pozitif reaksiyon.....	68
Fotoğraf 3.6 Fındıkta elde edilen F1 izolatının katalaz aktivitesi sonucu gösterdiği pozitif reaksiyon.....	69
Fotoğraf 3.7 Fındıktan elde edilen izolatlardan F27 izolatının oksidaz negatif sonucu ve SEPi-2 izolat adayının pozitif sonucu.....	69
Fotoğraf 3.8 Fındıktan elde edilen izolatların Oksidatif – Fosforilasyon testi sonucunda üzeri agar ile kapatılmamış (A) izolatların glikozu kullanması sonucu ortamın rengi yeşilden sarıya dönmüş ve üzeri agar ile kapatılmış (B) izolatların bulunduğu ortamda herhangi bir renk değişikliği olmamıştır.....	70
Fotoğraf 3.9 Bu çalışmada fındık bitkisinden elde edilen F7 izolatının farklı NaCl seviyelerini içeren besiyerlerindeki gelişimi, %5 NaCl içeren ortam (A), %2 NaCl içeren ortam (B)	71
Fotoğraf 3.10 Fındık bitkisinden elde edilen izolatlardan tütün bitkisinde hipersensitif pozitif reaksiyon veren F7 (A), F8 (B) izolatı, negatif sonuç veren SÇDa-5 izolat adayı (C).....	72
Fotoğraf 3.11 Fındık bitkisinden elde edilen izolatların <i>Xanthomonas arboricola</i> olarak doğrulanması sonrasında fındık bitkisi üzerinde yapılan patojenisite sonuçlarına ait bazı belirtiler.....	76
Fotoğraf 3.12 Bu çalışmada fındıktan elde edilen <i>Xanthomonas arboricola</i> izolatlarının fındıkta oluşturduğu hastalık şiddetine ait 1-4 skorlaması	77
Fotoğraf 3.13 Fındık bitkisinden elde edilen bakteriyel izolatların PCR ile türe spesifik XarbQ-F/R primeriyle oluşturulmuş 402 bp'daki jel görüntüsü	79
Fotoğraf 3.14 Fındık bitkisinden elde edilen <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>corylina</i> izolatlarının SCoT32 primeriyle oluşturulan parmak izi profili.....	81
Fotoğraf 3.15 Fındıktan elde edilen <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>corylina</i> izolatlarının DNA'sının fındık bitki DNA'sı ile karıştırılması ile oluşturulan seyrelti serisinin (10ng-0,1ng) XargyrB_F/R primeriyle real-time PCR'da çalıştırılması sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri	86
Fotoğraf 3.16 Fındıktan elde edilen <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>corylina</i> izolatlarının DNA'sının fındık bitki DNA'sı ile karıştırılması ile	

- oluşturulan seyrelti serisinin (10ng-0,1ng) XargyrB_F/R primeriyle real-time PCR'da çalıştırılması sonucu elde edilen erime piki..... 86
- Fotoğraf 3.17** Fındıkta elde edilen *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* izolatlarının DNA'sının fındık bitki DNA'sı ile karıştırılması ile oluşturulan seyrelti serisinin (10ng-0,1ng) XargyrB_F/R primeriyle real-time PCR'da çalıştırılması sonucu elde edilen standart eğri ($R^2 > 0,99$) 87
- Fotoğraf 3.18** Real-time çalışmaları sonrasında XargyrB_F/R primer setiyle çalışan fındıktan elde edilmiş *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* örneklerinin elektroforez ile koşturulması sonucunda 104 bp'da oluşan bant profilini gösteren jel görüntüsü 87
- Fotoğraf 3.19** Bu çalışmada fındıktan elde edilmiş F7 *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* izolatının farklı fındık çeşitlerine inokülasyonu sonrası bu fındık çeşitlerinin gösterdiği belirtilerden bazıları 89
- Fotoğraf 3.20** Fındık dokusundan tespit çalışmalarında *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* ile bulaşık fındık yaprağı DNA'sının XargyrB_F/R primerleriyle real-time PCR çalışmaları sonrası elde edilen amplifikasyon eğrisi 91
- Fotoğraf 3.21** Fındık dokusundan tespit çalışmalarında *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* ile bulaşık fındık yaprağı DNA'sının XargyrB_F/R primerleriyle real-time PCR çalışmaları sonrası elde edilen özgül erime eğrisi 91

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

μL: Mikrolitre

μM: Mikromolar

ATCC: American Type Culture Collection

bp: Baz çifti

CaCO₃: Kalsiyum Karbonat

CFBP/CNBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes /
Collection Nationale de Bactéries Phytopathogènes

CFU: Koloni oluşturan birim

Cl: Klorür

Cq: Kuantifikasyon döngüsü

dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksinükleotid trifosfat

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EF: Elongation factor 1-alpha

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPPO: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase
Chain Reaction

FAOSTAT: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical
Database

GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat Dehidrogenaz

g: Gram

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HŞİ: Hastalık Şiddet İndeksi

HR: Hipersensitif Reaksiyon

ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants

ICPB: International Collection of Phytopathogenic Bacteria

IDT: Integrated DNA Technologies

IF: İmmünofloresans

IPM: Entegre M¼cadele Y¼netimi
ITS: Internal Transcribed Spacer
K₂HPO₄: Dipotasylum fosfat
KDK: Katyon Değişim Kapasitesi
KI: Potasylum İyod¼r
KOH: Potasylum Hidroksit
LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification
LoD: Limit of Detection
LSU: Large Subunit
LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent Collection of
Bacteria
Mbp: Milyon baz çifti
MAS: Marker-Assisted Selection
MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
Mg: Magnezyum
MgCl₂: Magnezyum Klor¼r
ML: Maximum Likelihood
MLSA: Multilocus Sequence Analysis
MLST: Multilocus Sequence Typing
mm: Milimetre
mM: Milimolar
Na: Sodyum
NaCl: Sodyum Klor¼r
NaOCl: Sodyum Hipoklorit
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
ng: Nanogram
Ni: Nikel
O/F: Oksidasyon/Fermantasyon
PAL: Fenilalanin Amonyak-Liyaz
PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDDCC: Plant Diseases Division Culture Collection
pg: Pikogram

pH: Hidrojen potansiyeli

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction / Real-time PCR

R²: Doğrusallık katsayısı

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction

RNQP: Düzenlemeye Tabi Karantina Dışı Zararlı

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

rRNA: Ribozomal RNA

SAR: Sistemik Kazanılmış Dayanıklılık

SCoT: Start Codon Targeted

sn: Saniye

SOD: Süperoksit Dismutaz

spp.: Türler

SQ: Süksinat-Kinat

TAE: Tris-Asetat-EDTA

Tm: Erime sıcaklığı

U: Ünite

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

UV: Ultraviyole

V: Volt

YGCA: Glikoz-Maya Ekstraktı-Kalsiyum Karbonat Agar

TEŞEKKÜR

Hayatımın önemli bir dönüm noktası olan bu tez çalışmasının planlanma aşamasından, arazi sürveyine, laboratuvar desteğine, moleküler çalışmalarından, malzeme ve materyal teminine ve diğer gerekli olan her aşamasında engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, kıymetli desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Göksel ÖZER'e,

Tüm bu süre zarfında tezime yaptıkları yönlendirmeleriyle çalışmama katkılar sunan Jüri üyelerim Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE'ye ve Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR'a,

Analiz çalışmalarında katkıda bulunan, Ordu'daki örnekleri toplamada yardımcı olan ve Jüri'mde bulunan Prof. Dr. Muharrem TÜRKKAN'a, Jüri'mde bulunan ve doktora süresince verdiği desteklerden dolayı Prof. Dr. Sibel DERVİŞ'e,

Bu uzun yolda manevi desteğini hiç esirgemeyen Prof. Dr. Turan KARADENİZ'e, Bitkileri temin noktasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Emrah GÜLER'e ve Doç. Dr. Orhan KARAKAYA'ya,

Laboratuvar çalışmalarında her konuda yardımcı olan Zir. Yük. Müh. Mehtap ALKAN'a ve Zir. Yük. Müh. Tuğba BOZOĞLU'na,

Bu tez çalışmasına maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Proje No: 125O302)'a

Hayatım boyunca beni her zaman azimlendiren, her konuda fedakârca destekleyen ve bugünlere ulaşabilmemi sağlayan maddi-manevi en büyük motivasyon kaynaklarım olan değerli babama ve değerli anneme,

Her daim bir arkadaş, bir dost, hatta benim kadar beni düşünen ve kıymeti sonsuz olan kardeşlerime,

Hayatıma katıldığı andan itibaren hayatımı daha da iyileştiren ve desteğini her zaman fazlasıyla hissettiğim sevgili eşime'e,

Umut ve sevinç kaynaklarım olan biricik oğlum ve kızıma,

Çok teşekkür ederim.

Fatih

1. GİRİŞ

1.1 Fındık Bitkisinin Küresel Önemi

Fındık (*Corylus* spp.), Betulaceae familyasından, ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen ve sert kabuklu meyveler arasında yüksek ekonomik değere sahip bir bitkidir. İnsan sağlığı ve beslenmesinde önemli bir yere sahip olan fındık, kolesterolü azaltma özelliği taşımasının yanı sıra, yaklaşık %64 bitkisel yağ, %16,5 protein ve %14 karbonhidrat içerir. Ayrıca fosfor, demir, kalsiyum gibi mineraller ile A, B1, B2, B6, C ve E vitaminleri açısından da zengindir (Bars vd., 2018).

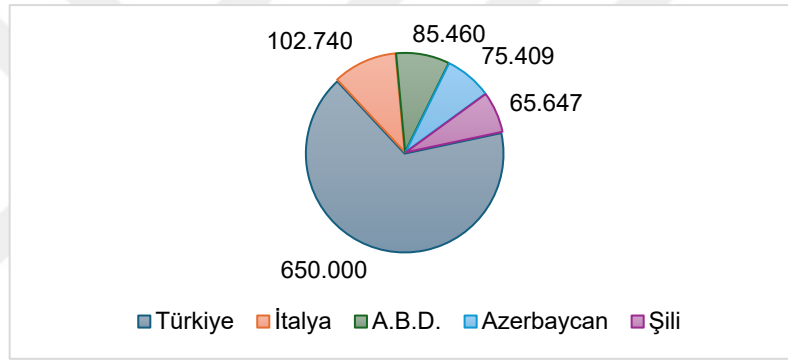
Fındık, sağlık açısından da güçlü antioksidan özellikler gösterir. Fındığın hem içi hem de yeşil yaprakları, belirgin antiradikal aktivite ve antioksidan kapasiteye sahiptir. Bu doğal antioksidan niteliği sayesinde fındık, oksijen (O₂) radikallerini etkisiz hale getirir ve kanser yapıcı (karsinojenik) nitrozoaminlerin oluşumunu engeller. Fındık bu mekanizmalar aracılığıyla hücresel yaşlanma süreçlerini yavaşlatır ve kanseri önlemede fayda sağlar. Ayrıca, fındığın bileşimindeki antioksidanlar vücutta serbest radikal üretimini sınırlar ve oksidatif stres kaynaklı bozuklukların ilerlemesini engeller (Ayyıldız & Sezgin, 2022).

Fındık üretimi, ticareti ve buna bağlı sanayi sektörlerinin, özellikle Avrupa ve Akdeniz havzası başta olmak üzere birçok ülkenin ekonomisinde önemli bir rol oynamakta; bu kapsamda özellikle şekerleme ve pastacılık sektöründe çikolata, bisküvi, kek, ezme ve krema gibi ürünlerin üretiminde temel bir hammadde olarak yaygın olarak değerlendirilmektedir (Avanzato vd., 2009). Dünya genelinde üretilen fındığın kullanımına bakıldığında ise sadece %3-4'ü doğrudan çerez olarak tüketilmekte, asıl büyük bölümü (%80 çikolata sanayinde, %10-12 pastacılık ve benzeri sektörlerde) sanayide işlenerek değerlendirilmektedir. (Uzundumlu vd., 2019).

1.2 Türkiye'nin Fındık Endüstrisindeki Yeri

Küresel fındık üretimi ve ticaretinde Türkiye, baskın ve hegemonik bir konuma sahiptir. Türkiye dünya'nın toplam fındık üretiminin yaklaşık %66'sını tek başına karşılayarak dünyanın açık ara en büyük fındık üreticisidir (FAOSTAT, 2025). Bu yüksek üretim payı, Türkiye'yi dünya fındık piyasalarında fiyatların ve arz-talep dengesinin belirlenmesinde anahtar bir aktör konumuna getirmektedir.

Dolayısıyla, dünya fındık piyasalarının, Türkiye'deki üretim miktarlarında ve rekoltede meydana gelebilecek dalgalanmalara karşı oldukça hassas olduğu belirtilmektedir (Berberoğlu & Uzun, 2018). Türkiye'deki fındık üretimi coğrafi olarak iki ana bölgeye ayrılmaktadır: Geleneksel üretim alanı olan Samsun, Ordu, Giresun ve Trabzon illerini kapsayan "eski üretim bölgesi" ile Sakarya, Zonguldak, Bolu, Düzce gibi illeri içeren "yeni üretim bölgesi" (Ayyıldız & Sezgin, 2022; Turan, 2023). Bu bölgelerde, ekolojik koşullara ve pazar taleplerine göre farklılaşan çeşitli fındık çeşitleri yetiştirilmektedir. Eski üretim bölgesinde özellikle Giresun Yağlısı, Çakıldak ve Palaz gibi kalite ve verim özellikleriyle öne çıkan çeşitler yaygınken (İslam & Çayan, 2019); yeni üretim bölgelerinde Tombul, Foşa ve Sivri gibi çeşitler bölge koşullarına uygun olarak yetiştirilmektedir (Karaosmanoğlu & Üstün, 2017).



Şekil 1.1 Dünya fındık üretim miktarı (ton) (FAOSTAT, 2025)

1.3 Fındık Gelişimini Engelleyen Abiyotik Faktörler

1.3.1 Sıcaklık Stresinin Etkileri

Fındık, özellikle erken ilkbahar döneminde yaygın olan dona ve sıcak ile soğuk hava arasındaki dalgalanmalara karşı hassastır; bu durum, yaygın olarak yetiştirilen Avrupa fındık (*C. avellana* L.) çeşitleri için son derece zararlı olup hızlı polen açılmasına ve yetiştiriciler için önemli olan çeşitlerde dişi çiçek oranında düşüşe yol açabilir (Ayyanath vd., 2023). Kış mevsimlerinin yüksek sıcaklıklarda geçmesi, vejetatif tomurcukların dormansiden çıkması, polen salınımı ve dişi çiçeklerin açılması için gerekli olan soğuklama saatlerinin sayısını sınırlandırabilir; buna karşılık, yaz aylarında maksimum sıcaklığın 35 °C'den yüksek ve bağıl nemin %70'ten düşük olduğu gün sayısındaki artış, meyve büyümesinin erken sonlanması, erken yaprak dökümü, boş fındık meyvesi artışı, iç ağırlığının azalması ve

hastalıklara daha yüksek hassasiyet gibi sonuçlarla ciddi su stresi koşullarına ve dolayısıyla üretim kayıplarına neden olur (Moine vd., 2024).

Özellikle kar şeklinde iyi yağış koşulları, sadece termoregülasyon sağlayarak değil, aynı zamanda ılıman iklim ağaçlarının dormansiye kırması ve çiçek gelişimini başlatması için istediği hassas sıcaklık gradyanını koruyarak fındığın üreme fizyolojisinde önemli rol oynar (Ayyanath vd., 2021). Farklı fındık çeşitleri, en sıcak dönemlerde yapraklarındaki toplam su içeriği ve nem açığı gibi fizyolojik tepkiler açısından farklılıklar göstererek yüksek sıcaklıklara karşı farklı tolerans seviyeleri sergileyebilir (Kosenko vd., 2020). Yaz mevsimindeki iklim stresi, özellikle Temmuz ayının ikinci yarısı ve Ağustos ayının ilk yarısında çekirdekte maksimum yağ birikimi meydana geldiğinde, fındık verimi üzerinde olumsuz bir etki yaratmaktadır (Portarena vd., 2022).

1.3.2 Su Stresi, Kuraklık ve Yağış Düzensizliklerinin Etkileri

Corylus avellana, sınırlı stoma düzenleme yeteneği ve sığ kök sistemi nedeniyle su stresine karşı hassas kabul edilir; bu özellikler özellikle Akdeniz bölgesinde su kıtlığının önemli bir zorluk teşkil etmesine neden olur ve bu dönemde ek sulama genellikle gereklidir (Moine vd., 2024). Bu fizyolojik yetersizlik, yapraktaki fotosentetik aktiviteyi olumsuz etkileyebilir ve kuraklık koşulları uzadığında zayıf meyve dolumuna neden olabilir (Rovira vd., 2022). Özellikle kar şeklindeki düzensiz ve azalan yağışların bazı çeşitlerde zayıf çiçeklenmeye ve kediciklerde (catkins) zararın artmasına neden olduğu bildirilmektedir (Ayyanath vd., 2021).

Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nde geleneksel olarak yağmurla beslenmeye dayalı fındık üretiminde bile, son yıllardaki iklim analizleri bazı aylardaki yağış düzensizliklerinin fındık verimini önemli ölçüde düşürdüğünü göstermiş, Haziran ayındaki meyve demeti dökümünün yetersiz döllenmeye, Temmuz ve Ağustos'taki dökümlerin ise kısmen su stresine bağlı olduğu belirtilmiştir (Akçin & Bostan, 2023). Yakın gelecekte Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yüksek sıcaklıkların bitki su tüketimini artıracığı ve modern sulama tekniklerinin uygulanması gerekeceği öngörülmekte olup, özellikle Haziran ve Temmuz aylarındaki yüksek sıcaklıkların hasat öncesi dökümleri artırdığı, verimin Temmuz'daki güneşli günlerle negatif, yağışla ise pozitif korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Bostan, 2005). Avrupa fındığı, stoma kontrol kapasitesinin düşük olması ve kök sisteminin genellikle

toprak yüzeyinin ilk 0,4–0,5 metresinde yayılması nedeniyle su stresine karşı hassastır (Portarena vd., 2022).

1.3.3 Yüksek Sıcaklıkların Bitki Hastalıkları ile Etkileşimi

Artan çevre sıcaklıkları, bitki hastalıklarının kontrolünü zorlaştırabilmektedir; zira yüksek sıcaklıklar genellikle hastalık gelişimini teşvik etmektedir ve bitkilerin hastalıklara karşı sahip olduğu R-genî etkinliğini azaltabilir. Birçok konukçu-patojen sisteminde, daha yüksek sıcaklıkların, hastalık baskısını arttıracığı ve değişen direnç genî etkinliği nedeniyle bitkilerdeki hastalık direncinin kırılmasını hızlandıracağı öngörülmektedir (Webb vd., 2010). *Xanthomonas* cinsi bazı bitki patojeni bakterilerin üreme hızı ve virülans faktörlerinden olan ksantan sakızı üretimi, sıcaklık artışıyla artış göstermektedir (Shu & Yang, 1990). *Xanthomonas* türlerinin neden olduğu bazı hastalıkların özellikle yüksek yağışlı ve sıcak mevsimlerde ürünlere ciddi zararlar oluşturduğu bildirilmiştir (Areas vd., 2017). Ayrıca, fındık bakteriyel yanıklık hastalığı gibi hastalıkların Avrupa'nın farklı bölgelerindeki yayılımı ve Orta İtalya'daki salgınlarının kısmen iklim değişikliğiyle ve dolayısıyla da sıcaklık artışlarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Lamichhane vd., 2013).

1.3.4 Tuzluluk Stresinin Etkileri

Artan toprak tuzluluğu, özellikle düşük kaliteli sulama suyunun yaygın kullanıldığı Akdeniz bölgeleri gibi alanlarda fındık yetiştiriciliği için önemli bir zorluk teşkil etmekte ve sürdürülebilir üretim için tuza dayanıklı çeşitlerin belirlenmesini gerektirmektedir (Rius-Garcia vd., 2025). Fındıklar, tuza, özellikle de klorür iyonuna karşı hassas olan glükofit bitkilerdir ve aşırı tuzluluk, özellikle iyonik dengesizlik olmak üzere bir dizi olumsuz etkiyi tetikleyebilir; yüksek sodyum ve klorür iyonu konsantrasyonları, bitki ölümüne yol açabilecek zararlı biyokimyasal reaksiyonları başlatır, ozmotik dengesizliğe, hücre zarı yıkımına, büyüme geriliğine ve hücre bölünmesi ile genişlemesinin engellenmesine neden olur (Porghahreman vd., 2024).

Yüksek sodyum ve klorür toksisitesi, besin alımını bozar ve toprak çözeltilerinin ozmotik potansiyelini düşürerek fizyolojik kuraklığa neden olur; bu durum fındık çeşitlerinde önemli biyokütle azalmasına yol açabilir ve yapraklardaki klorür konsantrasyonlarını çarpıcı biçimde artırabilir (Rius-Garcia vd., 2025). Tuzluluk stresi koşullarında yanıt olarak O_2 , H_2O_2 , OH^- gibi yüksek reaktif

moleküller olan Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretilir. ROS, proteinlere, zar lipidlerine, hücresel yapılara ve nükleik asitlere başta olmak üzere bitki hücre yapılarında çeşitli hasarlara neden olur (Porghahreman vd., 2024).

1.3.5 Toprak Yapısı

Fındık genellikle toprak yüzeyinin ilk 40-50 cm'lik kısmında yayılan sığ bir kök sistemine sahip olmasıyla bilinir (Portarena vd., 2022). Bu sığ köklenme özelliği, bitkinin özellikle kuraklık gibi su stresi koşullarına karşı hassasiyetini artırmaktadır (Moine vd., 2024; Rovira vd., 2022). Toprak yapısı ve derinliği, fındığın su ve besin maddesi alımını doğrudan etkiler. Kaba (kumlu), yıkanma nedeniyle çok ayrılmış ve asitli topraklar, magnezyum (Mg) gibi bazı besin elementlerini zayıf tutma eğilimindedir. Magnezyumun büyük hidrasyon yarıçapı, bu tür topraklarda özellikle asidik topraklarda tutunmasını zorlaştırır ve yıkanarak kaybolmasına neden olur (Chaudhry vd., 2021). Bu durum, toprak yapısının besin elementi eksikliklerinin ortaya çıkmasında önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

Farklı fındık türleri veya anaçları, toprak koşullarına farklı adaptasyonlar gösterebilir. Örneğin, *Corylus colurna* (Türk fındığı) üzerine yapılan çalışmalar, bu türün *C. avellana*'ya kıyasla 3-4 metre derinliğe ulaşabilen daha güçlü ve dikey bir kök sistemine sahip olduğunu ortaya koymuştur (Mir vd., 2023; Portarena vd., 2022). Bu derin kök sistemi, *C. colurna*'nın ve bu anaç üzerine aşıllı çeşitlerin kuraklığa karşı daha dayanıklı olmasını sağlar ve değişken toprak koşullarına daha iyi uyum göstermelerine olanak tanır (Mir vd., 2023). Dolayısıyla, toprak yapısı ve derinliği ile bitkinin köklenme özellikleri arasındaki etkileşim, fındık yetiştiriciliğinde stres koşullarına dayanıklılık açısından kritik bir öneme sahiptir (Rovira vd., 2022).

1.3.6 Drenaj

Fındık yetiştiriciliği, su ihtiyacının yağışlarla yeterince karşılanamadığı bölgelerde sınırlanmaktadır. Özellikle Akdeniz iklim kuşağı gibi bölgelerde, geç ilkbahar ve erken yaz dönemlerinde su kıtlığı önemli bir sorun teşkil etmekte ve ek sulama ihtiyacı doğurmaktadır (Moine vd., 2024). Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi gibi geleneksel olarak yağmur suyuyla beslenen fındık üretim alanlarında bile son yıllarda gözlenen yağış düzensizlikleri ve artan sıcaklıklar, bitkinin su tüketimini artırarak verimi olumsuz etkilemekte ve modern sulama tekniklerinin

uygulanmasını gerekli kılmaktadır (Akçin & Bostan, 2023; Tonkaz & Bostan, 2016). Yetersiz su temini veya düzensiz yağışlar, sadece vejetatif gelişimi değil, aynı zamanda çiçeklenmeyi ve meyve tutumunu da olumsuz etkiler (Ayyanath vd., 2021).

Toprak drenajı, hem suyun bitki kök bölgesindeki mevcudiyetini hem de besin elementlerinin yıkanmasını etkileyen önemli bir faktördür. İyi drene olmayan topraklar kök bölgesinde oksijensiz koşullar yaratabilirken, aşırı drenaj besin maddelerinin yıkanarak kaybolmasına yol açabilir (Chaudhry vd., 2021). Ayrıca, aşırı toprak tuzluluğu, toprak çözeltisinin ozmotik potansiyelini düşürerek bitkinin su alımını engeller ve “fizyolojik kuraklık” olarak adlandırılan bir duruma neden olur (Porghahreman vd., 2024; Rius-Garcia vd., 2025). Kar örtüsünün varlığı ve erimesiyle oluşan su sızıntısı (perkolasyon) ise toprak sıcaklığını düzenleyerek ve dormansinin kırılması için gerekli hassas sıcaklık gradyanını koruyarak fındığın üreme fizyolojisinde rol oynar (Ayyanath vd., 2021).

1.3.7 pH

Toprak pH'ı, fındık bitkisinin besin elementi alımını ve genel sağlığını etkileyen kritik bir faktördür. Yıkanma nedeniyle çok ayrılmış, asidik ve özellikle düşük katyon değişim kapasitesine (KDK) sahip topraklarda, besin elementleri zayıf tutunur ve yağış veya sulama suyu ile kolayca yıkanarak kaybolur (Chaudhry vd., 2021).

Diğer yandan, yüksek pH değerlerine sahip alkali ve kireçli topraklar da fındık beslenmesi için sorunlar yaratabilir. Kireçli topraklarda yüksek düzeyde bulunan Kalsiyum (Ca) ve bikarbonatlar (HCO_3^-), bitkide besin eksikliğine neden olmaktadır. Benzer şekilde, alkali topraklarda Mg, bitkinin yararlanamayacağı magnezyum karbonat ve jips gibi bileşikler oluşturarak çökme eğilimindedir, bu da Mg'nin bitkiye yararlılığını azaltır (Chaudhry vd., 2021). Bu durumlar hem düşük hem de yüksek pH koşullarının fındıkta besin elementi dengesizliklerine neden olabileceğini göstermektedir. (Porghahreman vd., 2024; Rius-Garcia vd., 2025).

1.3.8 Besin Elementi Dengesizlikleri

Fındık yetiştiriciliğinde besin elementi dengesizlikleri önemli bir abiyotik stres faktörüdür (Rabinovich vd., 2024). Fındık, tuza ve özellikle klorür (Cl) iyonuna karşı hassas (glikofit) bir bitkidir. Aşırı tuzluluk, öncelikle iyonik

dengeşizliğe yol açar. Yüksek konsantrasyonlardaki sodyum (Na) ve klorür (Cl) iyonları, bitki için toksik etki gösterir, zararlı biyokimyasal reaksiyonları tetikler, hücre zarlarına zarar verir, ozmotik dengeşizliğe neden olur ve sonuçta bitki ölümüne kadar varabilen ciddi hasarlara yol açabilir. Na ve Cl toksisitesi ayrıca diğer besin elementlerinin alımını engeller, fizyolojik kuraklığa neden olur ve dokuların su geçirgenliğini azaltabilir (Porghahreman vd., 2024; Rius-Garcia vd., 2025).

1.4 Fındık Gelişimini Engelleyen Biyotik Faktörler

Fındık yetiştiriciliği hem ürün miktarını hem de kalitesini tehdit eden çeşitli biyotik faktörlerin olumsuz etkilerine maruz kalmaktadır. Bu faktörler arasında, Türkiye fındık alanlarında ekonomik zarara yol açabilen çeşitli böcek türleri (Ak vd., 2014) ve dünya genelinde fındık üretimini etkileyen çok sayıda fungal patojen (Türkkan vd., 2018) önemli bir yer tutar. Ayrıca, çeşitli patojenik etkenler ve bazı zararlı böcek grupları, önemli üretim bölgelerinde kalıcı birer tehdit oluşturmaktadır (Turco vd., 2024).

1.4.1 Fındık Zararlıları

Fındık zararlıları, Türkiye'de fındık üretimini hem miktar hem de kalite bakımından olumsuz yönde etkileyen önemli bir etmen grubudur (I. Erper vd., 2016). Avrupa'da fındıklar Coleoptera (Kıncanatlılar), Diptera (Çiftkanatlılar), Lepidoptera (Pulkanatlılar), Orthoptera (Düzkanatlılar) ve Rhynchota (Yarımkanatlılar) gibi çeşitli böcek takımlarına ait türler ile Acarina (akarlar) alt sınıfına mensup zararlıların tehdidi altındadır (Pezzi vd., 2024). Genel olarak ağaç kabuğu böcekleri, yaprak bitleri, kabuklu bitler ve yaprakbüktenler gibi diğer gruplar da zaman zaman ekonomik öneme ulaşabilir (AliNiazee, 1998).

Fındık bahçelerinde gözlemlenen birçok zararlı türü, bitkinin farklı kısımlarında ve fenolojik dönemlerinde hasara yol açmaktadır. Bunlardan, Fındık Kurdu larvaları meyve içinde beslenip olgunlaşınca 1,5-2 mm çapında bir delik açarak toprağa inerken, Fındık Teke Böceği larvaları genç sürgünlerin öz kısmında ilk yıl 40-60 cm'ye varan galeriler açarak kurumalarına neden olur. Fındık Koşnilleri (*Parthenolecanium* spp.) bitki özsuğunu emerek ve tatlımsı madde salgılayarak fumajin oluşumuna yol açarken, Fındık Filiz Güvesi'nin larvaları kışlama sonrası genç sürgünlerin içine girerek kurumalarına sebep olur. Amerikan Beyaz Kelebeği larvaları fındık yapraklarını sadece ana damarları kalacak şekilde

yiyip ağ örerken, "manas" olarak da bilinen Mayıs Böceği larvaları fındık köklerini kopararak ocaklarda uç kurumalarına ve ileri dönemde ana dalların ölümüne yol açar. Bunların yanı sıra, Fındık Virgül Kabuklu Biti bitki özsuğunu emerek dalların kurumasına, Fındık Gal Sineği larvaları yaprak, çotanak, zuruf veya sürgün uçlarında galler oluşturarak ve Fındık Yaprak Deleni erginleri genç yapraklarda delikler açarak zarar meydana getirir. Dalkıran (*Xyleborus dispar*) ergin dişileri de fındık ağaçlarının gövde ve dallarında galeriler açarak önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Tuncer vd., 2002).

Yapılan bölgesel çalışmalarda, bazı zararlıların yaygınlığı ve etki düzeyleri değişiklik göstermektedir. Samsun ilindeki fındık bahçelerinde yürütülen surveyslerde Fındık Kurdu (*Curculio nucum*), Dalkıran (*Xyleborus dispar*), Fındık Kozalak Akarları (*Phytoptus avellanae* ve *Cecidophyopsis vermiformis*) ve Fındık Teke Böceği (*Obera linearis*) en önemli ve yaygın zararlılar olarak belirlenmiştir; özellikle Fındık Teke Böceği'nin bazı ilçelerde ocak başına zarar görmüş sürgün sayısının 5 ile 14 arasında değiştiği ve Fındık Kozalak Akarlarının örneklenen bahçelerde çok yaygın olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmalarda Amerikan Beyaz Kelebeği, Fındık Filiz Güvesi, Kahverengi Koşnil (*Parthenolecanium corni*, *P. rufulum*) ve Fındık Yaprak Biti (*Myzocallis coryli*) ikincil zararlılar olarak bulunurken, *Lymantria dispar* (Kırtırtılı) ve *Lepidosaphes ulmi* (Fındık Virgül Kabuklu Biti) çok düşük seviyelerde kaydedilmiştir. Fındık Yaprak Biti'nin Nisan başından Eylül sonuna kadar yaprakların alt yüzeylerinde görülen, yaygın bir ikincil zararlı olduğu da vurgulanmıştır (Saruhan & Tuncer, 2000).

Fındık Kurdu, Avrupa genelinde de en yıkıcı zararlılardan biri olarak kabul edilir ve kontrol edilmediğinde %30-40 ürün kaybına yol açabilir (AliNiazee, 1998). Fındık Kozalak Akarları da (*Phytoptus avellanae* ve *Cecidophyopsis vermiformis*) fındıkta "büyük tomurcuk" belirtilerine neden olarak önemli verim düşüşlerine yol açar (Ozman-Sullivan & Akça, 2005), bunlardan *P. avellanae*'nin üretim kayıplarından birincil derecede sorumlu olduğu kabul edilir (Contarini vd., 2024). Meyve kalitesini etkileyen Pentatomidae familyası üyelerinden Fındık Yeşil Kokarcası (*Palomena prasina*), Türkiye fındık bahçelerinde %85 yaygınlıkla en baskın türdür (Özdemir, Tuncer, vd., 2023). Son yıllarda küresel bir tehdit haline gelen Kahverengi Kokarca (*Halyomorpha halys*) ise Doğu Asya kökenli istilacı bir tür olup fındıkta önemli verim ve kalite sorunlarına yol açmaktadır (Haye vd., 2015; Özdemir, Karakaya, vd., 2023).

Bunların dışında, Yüzük Kelebeği (*Malacosoma neustria*) ve Kızılağaç Yaprak Böceği (*Agelastica alni*) gibi yaprak yiyiciler (Sezen vd., 2008), odun dokusunda zarar yapan Yazıcı Böceklerden *Xylosandrus germanus* (İ. Erper vd., 2019) ile son dönemde Türkiye fındık bahçelerinde yeni tehdit olarak belirlenen Fındık Testereli Arısı (*Croesus septentrionalis*) ve Turunçgil Uzun Anteli Böceği (*Anoplophora chinensis*) (Tuncer vd., 2020) de fındık üretimini tehdit eden diğer önemli biyotik faktörler arasında yer alır.

1.4.2 Fındık Hastalıkları

Fındık yetiştiriciliği, zararlıların yanı sıra çeşitli fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerinin de tehdidi altında olup, bu etmenler önemli ekonomik kayıplara yol açabilmektedir. Dünya genelinde fındık üretimi birçok fungal patojenin olumsuz etkileriyle karşı karşıyadır (Türkkan vd., 2018) ve bunun yanında fındık üretimini kısıtlayan viral etmenlerin varlığı da rapor edilmiştir (Ertunç vd., 2011).

Fungal hastalıkların başında gelen ve fındıkta yaygın olarak görülen Külleme Hastalığı, başlıca iki fungus türünden kaynaklanır. Uzun yıllardır bilinen *Phyllactinia guttata*, yaprak altlarında beyaz miselyum ve kasmotesyumlar oluşturarak erken yaprak dökümüne neden olur (İ. Erper vd., 2012). Ancak son yıllarda Türkiye'de hızla yayılan *Erysiphe corylacearum*, yaprak, meyve salkımları ve sürgünlerde enfeksiyona yol açarak hem verimi hem de kaliteyi önemli ölçüde düşürmekte ve *P. guttata*'dan çok daha tehlikeli kabul edilmektedir (Matić vd., 2024; Sezer vd., 2017). Bu yeni külleme etmeninin, özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, fındık yapraklarındaki fungal patojen dinamiklerini belirgin şekilde değiştirdiği vurgulanmaktadır (Türkkan, Özer, vd., 2024).

Dal ve gövdelerde görülen kanser hastalıkları da fındık için büyük bir sorundur. Doğu Fındık Yanıklığı (EFB), etmeni *Anisogramma anomala* olan ve özellikle Kuzey Amerika'da yıkıcı etkiler yaratan, Avrupa fındık çeşitlerinde çok yıllık ölümcül kanserlere, dal ve taç kurumalarına yol açarak ağaç ölümlerine neden olabilen önemli bir hastalıktır (Türkkan, Özer, vd., 2024; Wiman vd., 2019). Bu hastalığın küresel fındık üretimi için önemli bir zorluk olduğu ve dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarının sürdüğü bilinmektedir (Botta vd., 2019). *Nectria galligena*'nın neden olduğu Avrupa Kanseri de Türkiye fındık alanlarında rapor edilmiş olup, dallarda ve gövdelerde belirgin kanser yaraları oluşturur (Türkkan vd.,

2018). Diğer önemli dal kanseri etmenleri arasında *Cytospora* türleri (Lamichhane, 2014), *Diplodia* türleri (*D. sapinea*, *D. seriata*, *D. mutila*), *Dothiorella* türleri (*Do. iberica*, *Do. parva*, *Do. symphoricarposicola*, *Do. omnivora*), *Valsa cf. eucalypti*, *Gnomoniopsis smithogilvyi*, *Anthostoma decipiens*, *Diaporthella cryptica* ve *Botryosphaeria dothidea* gibi funguslar bulunmaktadır; bu etmenlerin bir kısmı Türkiye için yeni kayıt niteliğindedir ve fındık ağaçlarında ciddi kurumalara ve ölümlere yol açabilir (Linaldeddu vd., 2016; Polat vd., 2022; Türkkan, Bozoğlu, vd., 2024).

Kök çürüklükleri de fındık ağaçlarının sağlığını tehdit etmektedir. *Armillaria* Kök Çürüklüğü, *Armillaria* cinsi funguslar (özellikle Türkiye'de rapor edilen *A. mellea*) tarafından oluşturulur ve enfekteli ağaçlarda genel zayıflık, yaprak sararması ve ölüme neden olabilir (Türkkan, Bozoğlu, vd., 2024). *Rosellinia necatrix*'in neden olduğu Beyaz Kök Çürüklüğü de Türkiye'de fındıkta rapor edilmiş olup, köklerde ve kök boğazında çürümelere yol açar (Türkkan vd., 2018). Son yıllarda Türkiye'de fındıkta yeni bir kök çürüklüğü etmeni olarak *Phytophthora polonica* tanımlanmıştır. Literatürde fındıkla ilişkilendirilen diğer *Phytophthora* türleri arasında *P. cinnamomi* ve *P. cactorum* da bulunmaktadır (Türkkan, Özer, vd., 2024). Ayrıca, Samsun'da fındık ağaçlarında dip gövde çürüklüğüne neden olan *Ganoderma adpersum*'un varlığı da ilk kez rapor edilmiştir (Türkkan, Bozoğlu, vd., 2024).

Fındık meyve, salkım ve iç kalitesini etkileyen çeşitli diğer fungal etmenler de vardır. *Diaporthe* türleri (*D. eres*, *D. foeniculina*, *D. rudis*) içlerde lekelenme, küf ve renk değişimine yol açar (Arciuolo vd., 2020). *Colletotrichum fioriniae* salkımlarda çökük lezyon ve çürüklük yaparken, *Pestalotiopsis* türleri dal, sürgün ve salkımlarda yanıklık oluşturur (Karaca & Erper, 2001). *Didymella corylicola* meyve kusurlarıyla, *Cryptosporiopsis tarraconensis* ise dal kuruması, yaprak ve salkım yanıklığıyla ilişkilidir (Türkkan, Özer, vd., 2024). Ayrıca pas, monilya, kurşuni küf, yaprak lekesi (*Alternaria*, *Ramularia* spp.), dane küfü (*Nematospora coryli*) ve *Phomopsis* dal yanıklıkları da görülür (Türkkan vd., 2018).

Viral hastalıklardan Fındık Mozaik Hastalığı'na ise başlıca Elma Mozaik İlarvirüsü (ApMV) neden olur. Bu virüs, fındık yapraklarında mozaik desenleri, halkalı lekeler veya alaca beneklenmelere yol açar ve enfekteli üretim materyali ile yayılır; Türkiye'deki fındık alanlarında varlığı tespit edilmiştir (Ertunç vd., 2011).

1.5 Fındık Bakteriyel Yanıklık Hastalığı Etmeni: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac)

Xanthomonas arboricola pv. *corylina* (Xac), fındık ağaçlarında bakteriyel yanıklık hastalığına neden olan bir bakteridir (Prokic vd., 2012). Bu patojen, özellikle genç fındık ağaçlarında ekonomik kayıplara yol açarak dünya genelinde fındık üretimini tehdit etmektedir (Kalındamar, 2021; Osdaghi, 2022). Yüksek konukçu hassasiyeti gösteren Xac, yalnızca fındık bitkilerini enfekte eder (Pothier vd., 2011; Webber vd., 2020).

1.5.1 Xac'ın Genel Özellikleri

Xac, *Xanthomonas* cinsinin tipik özelliklerini sergiler; Gram-negatif, çubuk şeklinde bir bakteridir ve hücre boyutları genellikle 1,1-3,8 µm uzunluğunda ve 0,3-0,7 µm genişliğindedir (Kaluzna vd., 2021; Kazempour vd., 2006). Xac, çoğu *Xanthomonas* türü gibi genellikle tek bir polar kamçı aracılığıyla hareket eder ve obligat aerobik bir metabolizmaya sahiptir (Akın & Aygün, 2021; Vauterin vd., 1995).

Kültür ortamlarında Xac, karakteristik koloni morfolojileri sergiler. YDCA (yeast extract-dekstroze-kalsiyum karbonat agar), YGCA (glikoz-yeast extract-kalsiyum karbonat agar), YPGA (yeast extract-pepton-glikoz agar), NGA (Nutrient-glikoz agar), YPGA (yeast extract-pepton glikoz agar) gibi besiyerlerinde 26-28 °C'de 2-4 gün içinde gelişen koloniler; sarı renkte, parlak, mukoid (sümüksü) yapıda, yuvarlak kenarlı ve kubbemsi (konveks) bir görünümündedir (EPPO, 2004; Öztürk, 2023; Prokic vd., 2012). Bu sarı renk, *Xanthomonas* cinsi için karakteristik olan ve suda çözünmeyen ksantomonadin pigmentlerinden kaynaklanır; mukoid görünüm ise ksantan zankı adı verilen hücre dışı bir polisakkarit üretimiyle ilişkilidir (Kaluzna vd., 2021; Osdaghi, 2022; Vauterin vd., 1995).

Genomik özellikler açısından Xac suşlarının ortalama genom büyüklüğü yaklaşık 5,13 milyon baz çifti (Mbp) civarındadır ve G+C içeriği ortalama %65,53 mol% olarak rapor edilmiştir (Kalındamar, 2021). Farklı Xac suşları arasında genom boyutları 5,05 Mbp ile 5,29 Mbp arasında değişebilirken, G+C içerikleri de %65,37 ile %65,56 arasında farklılık gösterebilmektedir (Nunez vd., 2022; Pothier vd., 2022).

1.5.2 Xac'ın Taksonomisi

Xac, fındık bakteriyel yanıklık hastalığı etmeni olup, taksonomik olarak Bacteria alemi, Proteobacteria şubesi, Gammaproteobacteria sınıfı, Lysobacterales (önceki sinonimi Xanthomonadales) takımı ve Lysobacteraceae (önceki sinonimi Xanthomonadaceae) familyasında yer alan *Xanthomonas* cinsine ait *Xanthomonas arboricola* türünün bir patovarıdır (EPPO, 2004). Etmen ilk olarak 1915 yılında *Phytomonas corylina* olarak isimlendirilmiş (Miller vd., 1940), daha sonraki yıllarda *Xanthomonas corylina* ve takiben *Xanthomonas campestris* pv. *corylina* olarak sınıflandırılmıştır (Osdaghi, 2022). Vauterin vd. (1995) tarafından yapılan kapsamlı DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda, *Xanthomonas* cinsi yeniden tanımlanmış; fındık yanıklığı etmeni, *X. campestris* pv. *corylina*'dan ayrılarak yeni önerilen ve pv. *juglandis*, pv. *pruni* gibi diğer önemli meyve ve sert kabuklu yemiş ağacı patojenlerini de içeren *Xanthomonas arboricola* türü içine *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* olarak dahil edilmiştir. *X. arboricola* patovarlari, filogenetik olarak birbirine yakın olsalar da konukçu hassasiyetleri ve neden oldukları hastalıklarla ayırt edilirler (Scortichini vd., 2005). Modern moleküler yöntemlerden *rpoD* (RNA polymerase sigma 70 factor) gen dizisi analizi, Xac'ın diğer *X. arboricola* patovarlariyla birlikte monofiletik bir grup oluşturduğunu ancak kendi içinde de bir kümelenme gösterdiğini doğrulamıştır (Hajri vd., 2012). Benzer şekilde, Multilokus Sekans Analizi (MLSA) gibi yöntemler, Xac'ın filogenetik konumunu ve diğer yakın akraba patovarlardan ayrımını netleştirmede kullanılmıştır (Fischer-Le Saux vd., 2015). Xac'ın patotip suşu ATCC 19313 (=NCPPB 935 =LMG 689 = CFBP 1159) olarak kabul edilmektedir (Kaluzna vd., 2021).

1.5.3 Xac'ın Ekonomik Önemi

Xac, dünya genelinde fındık üretim alanlarında ciddi ekonomik kayıplara yol açan önemli bir bakteriyel patojendir (Kalındamar, 2021; Osdaghi, 2022; Prokic vd., 2018). Özellikle fındık üretiminde dünya lideri olan Türkiye'de, bu hastalık verimliliği olumsuz etkileyen başlıca etmenlerden biridir. Hastalığın en yıkıcı etkisi, özellikle 1 ila 4 yaş arasındaki genç fındık fidanlıkları ve yeni kurulan bahçelerde görülmekte olup, bu alanlarda %10'a varan, hatta bazı durumlarda %100'e ulaşabilen ağaç ölümlerine neden olabilmektedir (EPPO, 2004; Pulawska vd., 2010; Scortichini vd., 2002). Genç ağaçların ölümü, bahçe tesisini ve fındık

endüstrisinin sürdürülebilirliğini ciddi şekilde tehdit eder (Moore vd., 1974; Webber vd., 2020).

Yaşlı ağaçlarda Xac nadiren ölüme yol açsa da tomurcuk kurumaları, meyve veren sürgünlerin ve dalların kaybı nedeniyle %1 ila %10 arasında değişen oranlarda verim kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Karahan vd., 2013; Lamichhane vd., 2013). Bazı yıllar ve bölgelerde bu kayıpların %25'i aşabildiği de rapor edilmiştir (Alay vd., 1973). Fransa'da 1975-1986 yılları arasında 350.000'den fazla genç fidanın ve yaklaşık 2000 genç ağacın hastalık nedeniyle kaybedildiği, ayrıca sürgün ölümlerinin üretime geçişi 1-2 yıl geciktirdiği belirtilmiştir (Gardan & Devaux, 1987). Xac, Avrupa Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO) tarafından uzun yıllar A2 karantina listesinde yer almış (EPPO, 2004; Scortichini vd., 2002), yakın zamanda ise Düzenlemeye Tabi Karantina Dışı Zararlı (RNQP) olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Pothier vd., 2022). Bu durum, hastaliksız fidan materyali üretiminin ve ticaretinin önemini artırmakta, enfekteli dikim materyallerinin transferinin reddedilmesine ve uluslararası ticarete kısıtlamalara yol açabilmektedir (Kaluzna vd., 2021).

1.5.4 Xac'ın Neden Olduğu Hastalık Belirtileri

Xac'ın neden olduğu fındık bakteriyel yanıklık hastalığı, fındık ağacının toprak üstü aksamalarının birçoğunda çeşitli belirtilere yol açar. Hastalık, özellikle fidanlıklarda ve genç bahçelerde yıkıcı olabilir (Kaluzna, 2023). Belirtiler yapraklarda, tomurcuklarda, genç sürgünlerde, dallarda, gövdede ve nadiren de olsa zuruf ve meyvelerde gözlenir (Bradbury & UK, CAB International, 1987; Lamichhane, 2014). Hastalığın şiddeti ve belirtilerin tipi, bitkinin yaşına, fındık çeşidine, çevre koşullarına ve enfeksiyonun zamanına bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Osdaghi, 2022).

Yapraklarda Görülen Belirtiler: Yapraklardaki belirtiler yaprak yüzeyinde küçük, köşeli (angular) veya düzensiz dairesel, soluk sarı-yeşil renkte, suya doymuş görünümlü (yağlımsı) lekeler oluşur; nekrotik yaprak dokusu bazen açık yeşil veya klorotik bir hale ile çevrili olabilir ve bu hale karakteristik 'V' şeklinde de görülebilir (Kaluzna vd., 2021). Bu lezyonlar zamanla büyüyerek kırmızımsı kahverengi veya koyu kahverengi nekrotik bir hal alır ve genellikle 1-3 mm çapındadır (Alay vd., 1973; Karahan vd., 2013). Lekeler sıklıkla yaprak damarlarıyla sınırlı olup, özellikle yaprak ucuna yakın kısımlarda birleşerek daha

geniş nekrotik alanlar oluşturabilir (Lamichhane, 2014). Şiddetli enfeksiyonlarda, yaprak ayasında genel bir kloroz, yapraklarda kıvrılma ve erken yaprak dökümü görülebilir (Gardan & Devaux, 1987; Ibarra vd., 2012; Osdaghi, 2022).

Tomurcuklarda Görülen Belirtiler: Tomurcuklar, Xac için önemli bir enfeksiyon ve kışlama noktasıdır. Enfekteli tomurcuklarda kararma, kuruma (tomurcuk ölümü/dieback) ve açılmama gibi belirtiler görülür (EPPO, 2004; Gardan & Devaux, 1987). Enfeksiyon tomurcuğun dış pullarından başlayarak iç kısımlara doğru ilerleyebilir ve tomurcuğun tamamen ölmesine neden olabilir (Lamichhane, 2014). Kısmen zarar görmüş tomurcuklardan çıkan sürgünler de genellikle enfekteli olur ve bu durum hastalığın yayılmasına katkıda bulunur (Karahan vd., 2013). İlkbahar sonlarında tomurcuklardan çıkan yeni filizlerin nekrozu, hastalığın en karakteristik belirtilerinden biridir (Osdaghi, 2022).

Sürgünlerde Görülen Belirtiler: Genç, otsu sürgünler Xac enfeksiyonlarına karşı oldukça hassastır. Sürgün uçlarında başlayan ve aşağı doğru ilerleyen yağlımsı lezyonlar ve nekrozlar gelişebilir; enfekteli sürgünler kararır, solar, kurur ve bazen "çoban değneği" (shepherd's crook) şeklinde kıvrılabilir (Ibarra vd., 2012; Osdaghi, 2022; Pulawska vd., 2010). Sürgünlerde ayrıca uzunlamasına, koyu kahverengiden siyaha dönen şerit benzeri lezyonlar veya çökük, kahverengi-mor renkli lekeler de gelişebilir (Kazempour vd., 2006). Bu lezyonların sürgünü tamamen sarması sonucu üst kısmın ölümü (dieback) görülebilir (Lamichhane, 2014).

Dallarda ve Gövdede Görülen Belirtiler: Hastalık ilerledikçe, ince dallarda, daha kalın dallarda ve hatta ana gövdede belirtiler oluşabilir (EPPO, 2004; Gardan & Devaux, 1987). Bu belirtiler genellikle uzunlamasına gelişen kabuk çatlakları şeklinde başlar ve zamanla genişleyebilir (Lamichhane, 2014). Bu bölgelerde kabuk dokusu kaldırıldığında, altındaki kambiyum dokusunda kahverengi nekrozlar (Lamichhane vd., 2013) veya kırmızımsı kahverengi küçük lekeler görülebilir (Alay vd., 1973). Özellikle genç ağaçların gövdelerinde oluşan belirtiler, ağacı çepeçevre sararak (girdling) üst kısımların tamamen kurumasına ve ağacın ölümüne neden olabilir (Bradbury & UK, CAB International, 1987; Moore vd., 1974; Webber vd., 2020). Yüksek nem ve yağışlı dönemlerde, enfekte olmuş kanserli bölgelerden ve diğer nekrotik lezyonlardan çok sayıda bakteri içeren yapışkan, sümüksü bir akıntı (bakteriyel sızıntı/eksudat) gözlenebilir (Kaluzna vd., 2021).

Zuruf ve Meyvede Görülen Belirtiler: Fındık zuruflarında (meyveyi saran yeşil kabuk) ve sert meyve kabuğunda da belirtiler görülebilir. Zuruflarda başlangıçta yağlımsı, daha sonra kahverengiye veya siyaha dönen, genellikle 0,5-1,5 mm çapında yuvarlak veya uzunumsu nekrotik lekeler oluşabilir (Osdaghi, 2022). Alay vd. (1973) ise zuruftaki lekelerin 1-2 mm çapında, koyu kahverengi, başlangıçta yüzeysel olup zamanla çukurlaşp sertleştiğini bildirmiştir. Sert meyve kabuğu üzerindeki lekeler genellikle yüzeysel olup, küçük, siyah veya koyu kahverengi, yuvarlak veya düzensiz şekilli olabilir ve kabuğun sadece birkaç milimetre altına kadar etki edebilir (Lamichhane, 2014). Meyvelerde bazen "siyah topuk" (talon noir) olarak adlandırılan, meyvenin dala bağlandığı dip kısmında ve zurufun iç kısmında sarımsı mukusun eşlik ettiği kahverengi bir leke şeklinde bir belirti de görülebilir (EPPO, 2004; Gardan & Devaux, 1987).

1.5.5 Sörvey Metodolojileri ve Örnekleme Stratejileri

Xac kaynaklı fındık bakteriyel yanıklık hastalığı tespiti için sörveyler, hastalığın belirtilerinin en belirgin olduğu vejetasyon dönemi boyunca, ilkbahar sonlarından sonbahar başlarına kadar gerçekleştirilir (Lamichhane vd., 2013).

Örnek toplama sırasında, Xac'ın neden olduğu tahmin edilen hastalık belirtilerini gösteren bitki kısımları seçilir ve bu örnekler, kontaminasyonu önlemek ve laboratuvara kadar canlılıklarını korumak amacıyla etiketlenerek ayrı steril plastik torbalara veya kese kağıtlarına konulup serin koşullarda taşınır. Laboratuvarda, toplanan örnekler öncelikle morfolojik belirtiler açısından değerlendirilir.

1.5.6 İzolasyon Teknikleri

Xac'nın fındık dokularından başarılı bir şekilde kültüre alınması, hastalığın doğru teşhisi ve etmen üzerinde yapılacak araştırmalar için temel bir adımdır. Patojenin izolasyonu, özellikle enfeksiyonun ileri aşamalarındaki örneklerden veya saprofit mikroorganizmaların yoğun olduğu durumlarda zorluklar içerebilir; bu nedenle örnekleme stratejisi ve kullanılan izolasyon yöntemleri büyük önem taşır (Prokic vd., 2012).

İzolasyon için örnekler ilkbahar ve yaz aylarında, hastalığın aktif olarak görüldüğü fındık ağaçlarından toplanır (Lamichhane vd., 2013). Belirti gösteren yapraklar, tomurcuklar, genç sürgünler, dallar ve zuruflar patojenin izolasyonu için uygun materyallerdir (Karahan vd., 2013; Popović vd., 2023). Özellikle yeni

oluşmuş, genç lezyonların kenar kısımlarından (Osdaghi, 2022) veya suyla ıslanmış görünümdeki köşeli yaprak lekelerinden örnek alınması, izolasyon başarısını artırabilir. Bazı araştırmacılar, görünüşte sağlıklı dokuların kenarından da *Xac* izole edebildiklerini bildirmiştir (Pulawska vd., 2010). Latent enfeksiyonların tespiti amacıyla, belirti göstermeyen ancak patojeni barındırma potansiyeli olan tomurcuklar da önemli bir örnek kaynağı olarak kabul edilir (EPPO, 2004). Örneklerin laboratuvara uygun koşullarda, buz çantası gibi kaplarda ve etiketlenmiş olarak taşınması, bakteri canlılığının korunması açısından önemlidir.

Laboratuvara ulaşan örneklerdeki yüzey kontaminantlarını uzaklaştırmak amacıyla, %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) 1 dakika süreyle (Lamichhane vd., 2013; Popović vd., 2023) veya %70'lik etil alkol gibi (Karahan vd., 2013) dezenfektanlar kullanılır. Sterilizasyon sonrası dokular steril saf su ile birkaç kez durulanır. Sterilize edilmiş doku parçaları steril su, steril fizyolojik su (%0,85 NaCl) veya fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde ezilerek veya kesilerek bakteri süspansiyonu elde edilir (Prokic vd., 2012). Bu süspansiyonun bir süre bekletilmesi, bakterilerin dokudan süspansiyona geçişini kolaylaştırır.

Elde edilen bakteri süspansiyonundan 10-100 µl alınarak uygun besi yerlerine ekilir. *Xanthomonas* türleri için genel amaçlı, seçici olmayan NA (Nutrient Agar) veya King's B gibi genel besi yerleri kullanılabilmeyle birlikte (Osdaghi, 2022), YDCA (Kazempour vd., 2006), YGCA (EPPO, 2004) ve YPGA (Prokic vd., 2012) gibi besi yerleri de kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda, fungal kontaminasyonu baskılamak amacıyla YDCA besi yerine sikloheksimid eklenmiştir (Karahan vd., 2013). Bunların yanı sıra, *Xanthomonas*'ların nişasta veya Tween gibi maddeleri hidrolize etme yeteneğine dayanan Brilliant Cresyl-Blue Starch (BS) agar, modifiye Tween medium veya SX agar gibi diğer yarı seçici besi yerleri de izolasyon ve ileri tanımlama aşamalarında kullanılabilir (Lamichhane & Varvaro, 2014). Moore (1974), fındık gövde dokularından izolasyon için King B besiyeri, 3-ketolaktoz besiyeri ve patates-dekstroza agar (PDA) kullandığını rapor etmiştir.

Ekim yapılan petri kapları 26-28 °C sıcaklık aralığında 2 ila 4 gün inkübasyona bırakılır (EPPO, 2004). Bu süre sonunda, *Xanthomonas* için tipik olan sarı, mukoid (sümüksü), parlak, yuvarlak ve kubbemsi koloniler seçilerek saf kültür elde etmek amacıyla uygun bir besi yerine tekrar ekim yapılır (Popović vd., 2023). Saflaştırılan *Xanthomonas* kültürlerinin saklanması için %20-40 oranında gliserol

içeren Nutrient Broth (NB) içerisinde -20 °C veya -80 °C'de derin dondurucuda saklama yöntemi tercih edilir (Pothier vd., 2022).

1.5.7 Klasik Tanılama Yöntemleri

Xanthomonas'ların tanılanmasında klasik yöntemler önemli bir yer tutsa da bu metotların tek başına kullanıldığında kesin ve güvenilir sonuçlar vermede yetersiz kaldığı ve çeşitli tutarsızlıklar içerdiği bilinmektedir. Özellikle *X. arboricola* izolatlarının fenotipik ve biyokimyasal özellikler açısından birbirlerine oldukça benzemesi, sadece bu testlere dayanarak patovar düzeyinde net bir ayrım yapılmasını güçleştirmektedir (Pulawska vd., 2010). Fenotipik karakterlerde, bilhassa bazı karbon kaynaklarının kullanımında suşlar arasında ve hatta standart referanslarla kıyaslandığında farklılıklar gözlenebilmesi, bu yöntemlerin güvenilirliğini azaltan ve yanıltıcı sonuçlara yol açabilen bir diğer önemli unsurdur (Kaluzna vd., 2021). Bu nedenlerle, *Xac*'ın doğru ve kesin bir şekilde tanımlanabilmesi için klasik tanılama yaklaşımlarının daha özgül ve hassas olan moleküler yöntemlerle desteklenmesi bir zorunluluk olarak kabul edilmektedir.

Morfolojik Testler: *Xanthomonas*'ların ön tanısında, besi yerlerindeki koloni morfolojisi kolaylık sağlamaktadır. *Xanthomonas* türleri YDCA, YPGA veya YGCA gibi yarı seçici kabul edilen besi yerlerinde 2-4 gün içinde tipik koloniler oluşturur. Bu koloniler çoğunlukla sarı renkte, parlak yüzeyli, mukoid (sümüksü) kıvamda, yuvarlak kenarlı ve hafif kubbemsi (konveks) bir yapı sergiler (Osdaghi, 2022; Prokic vd., 2012). Koloni rengi, *Xanthomonas* cinsi için karakteristik olan ksantomonadin pigmentlerinden kaynaklanır ve soluk limondan bakırmı sarıya kadar ton farklılıkları gösterebilir (Vauterin vd., 1995). Bu gözlemlenebilir özellikler, şüpheli izolatların ilk değerlendirmesinde değerli olsa da benzer morfolojiye sahip diğer bakterilerden ayırt etmek için tek başlarına yeterli değildir (Moore vd., 1974).

Temel Biyokimyasal Testler: *Xanthomonas* cinsi bakterilerin genel tanısında kullanılan bazı temel biyokimyasal testler, *Xac*'nın teşhisinde de ilk adımları oluşturur. *Xanthomonas*'lar, Gram-negatif bakterilerdir; bu özellik, Gram boyama veya daha hızlı bir yöntem olan %3'lük potasyum hidroksit (KOH) testi ile belirlenebilir. KOH testinde, Gram-negatif bakteriler çözeltide ipliksi bir yapı oluşturarak erirler (Kazempour vd., 2006; Öztürk, 2023). Katalaz testi *Xanthomonas* için pozitifdir ve hidrojen peroksit uygulandığında gaz kabarcığı

çıkışıyla kendini belli eder. Buna karşın, oksidaz testi negatiftir (Prokic vd., 2012; Vauterin vd., 1995). Bakterinin karbonhidratları kullanma şeklini gösteren oksidasyon/fermantasyon (O/F) testinde ise *Xanthomonas*, glukozu oksidatif yolla metabolize eder ve fermentatif özellik göstermez (EPPO, 2004). Bu testler, izolatin *Xanthomonas* cinsine ait olup olmadığı konusunda önemli bilgiler sunsa da tür ve patovar düzeyinde kesin tanı için yetersiz kalır ve ek testlerle desteklenmeleri şarttır.

Ayırt Edici Biyokimyasal Testler: *Xanthomonas arboricola* türünü diğer *Xanthomonas* türlerinden ayırmada bazı daha özgül biyokimyasal testler kritik rol oynar. Bu testlerin başında kinat metabolizması gelir. *X. arboricola* suşları, süksinat-kinat (SQ) besi yerinde kinik asidi metabolize etme yeteneğine sahiptir ve bu yaklaşık 4-6 gün içinde bakteri gelişimi etrafında yeşilimsi veya kahverengi-yeşil bir renk halesinin oluşumuyla gözlenir (Lee, 1992).

NaCl tolerans testi de ayırt edici bir özelliktir; *X. arboricola* suşları %5 NaCl içeren ortamlarda gelişemez (Öztürk, 2023).

Gelişme sıcaklığı açısından ise *X. arboricola*, 35 °C’de gelişebilirken (EPPO, 2004), 37 °C’de gelişme gösteremez (Vauterin vd., 1995).

Diğer önemli testler arasında nişasta ve eskülin hidrolizi sayılabilir; *X. arboricola* suşları bu iki testi de pozitif sonuç verir, yani bu substratları parçalayabilirler (Scortichini vd., 2002). Ancak, özellikle farklı karbonhidratların kullanımı gibi bazı biyokimyasal testlerde suşlar arasında veya literatürdeki referanslarla tutarsızlıklar olabileceği, bu durumun da bu testlerin tek başına tanı koymadaki sınırlılıklarını gösterdiği unutulmamalıdır (Pulawska vd., 2010).

Hipersensitif Reaksiyon (HR): Hipersensitif reaksiyon (HR), bir bakteriyel izolatin potansiyel bitki patojeni olup olmadığını anlamak için kullanılan hızlı ve yaygın bir gösterge testidir. Test, şüpheli bakteri süspansiyonunun tütün (*Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*), domates (Essakhi vd., 2015), fasulye kabukları (Lamichhane vd., 2013) veya pelargonium (Popović vd., 2023) gibi konukçu olmayan (indikator) bitkilerin yaprak dokusuna enjekte edilmesiyle gerçekleştirilir (Prokic vd., 2012; Webber vd., 2020). Patojenik bakteriler ve dolayısıyla *X. arboricola*, bu bitkilerde genellikle 24-48 saat içinde enjeksiyon bölgesinde hızlı bir hücre ölümü ve doku çökmesi şeklinde kendini gösteren bir savunma tepkisi oluşmasına neden olur. HR testinin sonucu, sıcaklık, ışık ve bakteri konsantrasyonu gibi çevresel faktörlerden etkilenebilir ve ayrıca pozitif bir HR,

bakterinin sadece patojenik potansiyelini gösterir, konukçuya özgü patojenisitesini kanıtlamaz. Bu nedenle HR sonuçları, diğer tanımlama ve patojenisite testleriyle birlikte değerlendirilmelidir.

Serolojik Testler: Serolojik yöntemler, *X. arboricola* gibi bakteriyel etmenlerin tanısında kullanılan, antijen (bakteri) ile antikor arasındaki özgül bağlanma prensibine dayanan tekniklerdir. Bu yöntemler arasında ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ve IF (İmmüno Floresans) en yaygın olanlardır ve özellikle çok sayıda örneğin hızlı taranması veya erken tespit için kullanılabilirler (Prokic vd., 2012). *X. arboricola* için geliştirilmiş bazı poliklonal antikorlar ve bu antikorları kullanan ticari kitler bulunsa da (Palacio-Bielsa vd., 2011), bu serolojik testlerin özgüllüğü ve hassasiyeti sınırlıdır. *Xanthomonas* cinsi içindeki türler ve özellikle *X. arboricola* patovaryaları arasında antijenik benzerlikler nedeniyle çapraz reaksiyonlar görülebilir, bu da yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (Kaluzna vd., 2021). EPPO (2004) 'da Xac için rutin tespitte kullanılabilecek standart ve özgül antikorların eksikliğine dikkat çekmiştir. Bu sınırlamalar nedeniyle, serolojik testlerden elde edilen pozitif sonuçların kesin tanı için mutlaka izolasyon, biyokimyasal ve patojenisite testleri ve tercihen moleküler yöntemlerle doğrulanması önerilmektedir (Lamichhane & Varvaro, 2014).

Klasik Tanılamanın Genel Durumu: Xac'ın tanımlanmasında klasik yöntemler; morfolojik incelemeler, temel ve ayırt edici biyokimyasal testler, hipersensitif reaksiyon ve konukçu üzerinde yapılan patojenisite testlerini kapsayan çok aşamalı bir süreçtir. Bu yöntemler, şüpheli bir izolatın *Xanthomonas* cinsine ve *X. arboricola* türüne olası aidiyetini belirlemede, ayrıca patojenik potansiyelini ortaya koymada önemli veriler sunar (EPPO, 2004; Osdaghi, 2022). Koloni özellikleri ve temel biyokimyasal reaksiyonlar ön eleme için kullanılırken, kinat metabolizması gibi testler tür düzeyinde daha spesifik bilgiler sağlar (Lee, 1992). Patojenisite testleri ise bir izolatın Xac olarak kesin tanımlanması için vazgeçilmez bir adımdır. Ancak, fenotipik özelliklerde gözlenebilen değişkenlikler (Scortichini vd., 2002), bazı biyokimyasal testlerdeki tutarsızlıklar (Pulawska vd., 2010) ve serolojik yöntemlerin çapraz reaksiyon riskleri, klasik tanılamanın tek başına her zaman kesin ve hatasız sonuç vermesini engeller. Bu nedenle, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda veya karantina uygulamalarında, klasik yöntemlerle elde edilen bulguların, yüksek hassasiyete sahip moleküler yöntemlerle (PCR,

sekans analizi gibi) teyit edilmesi ve entegre bir yaklaşımla değerlendirilmesi günümüzde standart bir uygulama haline gelmiştir (Öztürk, 2023).

1.5.7.1 Patojenisite

Patojenisite testleri, bir mikroorganizmanın belirli bir konukçu bitkide hastalık oluşturma yeteneğinin kanıtlandığı, Koch postulatlarının esas alındığı laboratuvar çalışmalarıdır. Xac şüpheli izolatların kesin tanısı ve patovar düzeyinde teşhisi için, hassas bir fındık çeşidi üzerinde yapay koşullarda hastalık belirtilerinin oluşturulması ve ardından etkenin hastalıklı dokulardan yeniden izole edilerek doğrulanması temel bir gerekliliktir (EPPO, 2004; Prokic vd., 2012). Bu testler, Xac'ı fenotipik olarak benzeyebilen diğer ksantomonadlardan veya *Xanthomonas arboricola*'nın diğer patovarlarından ayırt etmede kritik bir rol oynar (Lamichhane & Varvaro, 2014).

Xac için patojenisite testlerinde kullanılacak inokulum, bakteri izolatlarının uygun bir besi yerinde 24-48 saat, 26-28 °C sıcaklıkta geliştirilmesiyle hazırlanır. Gelişen taze bakteri kültürlerinden steril fizyolojik su kullanılarak süspansiyon elde edilir. Bu süspansiyonun konsantrasyonu, spektrofotometre ile 10^8 CFU/mL arasına ayarlanır (Popović vd., 2023; Webber vd., 2020).

Fındık bitkilerinde Xac patojenisitesini test etmek amacıyla çeşitli inokülasyon yöntemleri ve farklı bitki kısımları kullanılmakta ve 1-2 yaşındaki genç, saksılı fındık fidanları tercih edilmektedir. Yaprak inokülasyonları, hazırlanan bakteri süspansiyonunun yaprakların alt veya üst yüzeyine el pülverizatörü veya basınçlı püskürtücüler yardımıyla püskürtülmesi (spreyleme) şeklinde uygulanabilir (Karahan vd., 2013; Lamichhane vd., 2013). Alternatif olarak, iğnesiz bir şırınga kullanılarak yaprak parankimasına infiltrasyon da bir yöntemdir (Prokic vd., 2012). Tomurcuk inokülasyonu sonuçları zaman alsa da Xac'ın doğal enfeksiyon döngüsünü taklit etmesi için kullanılabilir; bu yöntemde tomurcuklar steril bir iğne ile hafifçe delinerek yaralandıktan sonra yaklaşık 10 µL bakteri süspansiyonu yara üzerine damlatılır veya enjekte edilir (EPPO, 2004; Scortichini vd., 2002; Webber vd., 2020). Sürgün ve dallarda patojenisite testi için ise, steril bir bistüri ile yaklaşık 1 cm uzunluğunda yüzeysel ve uzunlamasına yaralar açılıp, bu yaralara belirli bir hacimde (10-15 µL) bakteri süspansiyonu uygulanabilir (Karahan vd., 2013). Moore (1974) bakteri süspansiyonuna batırılmış makaslarla yan dalları budayarak inokülasyon yapmış,

Gardan ve Devaux (1987) ise yaprak sapı yaraları veya tomurcukların yüzeysel kontaminasyonu gibi farklı yöntemler de denemiştir. Prokic vd. (2012) ayrıca, yaralanmış gövde ve tomurcukların bulunduğu bitki kısmının bakteri inokulumuna daldırılması yöntemini de açıklamıştır.

İnokulasyon sonrası bitkiler, enfeksiyon gelişimi için uygun koşulların sağlandığı 26-28 °C sıcaklık ve %70 üzeri yüksek nispi nem (Lamichhane vd., 2013; Popović vd., 2023) ortamında tutulmaktadır. İlk aşamada yüksek nemin sağlanabilmesi amacıyla inokulasyon sonrası ilk 48-72 saat boyunca bitkilerin plastik torbalarla örtülmesiyle sağlanmalıdır. Hastalık belirtilerinin gelişimi, inokulasyon yöntemi, inoküle edilen bitki kısmı ve çevre koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmekle birlikte; yapraklarda 10 gün ile 4 hafta arasında, tomurcuk ve dallarda ise 2 hafta ile birkaç ay sürebilmektedir (Karahan vd., 2013; Lamichhane & Varvaro, 2014).

Patojenisite testlerinin uygulanmasında bazı zorluklar mevcuttur. Tarla koşullarında yapılan testler, kontrol edilemeyen çevresel faktörler nedeniyle değişken sonuçlar verebilirken (Pulawska vd., 2010), laboratuvar veya sera koşullarında dahi bazı inokulasyon yöntemlerinin başarı oranı düşük olabilmektedir (EPPO, 2004). Prokic vd. (2012) bitki daldırma yönteminin uzun sürmesi ve belirtilerin sınırlı kalması gibi dezavantajlarından bahsetmiştir. Ayrıca, Xac'ın konukçu dokusunda uzun süreler belirti oluşturmada latent kalabilme potansiyeli (Moore vd., 1974), patojenisite sonuçlarının yorumlanmasında dikkate alınması gereken bir diğer önemli faktördür.

1.5.8 Moleküler Tanılama Teknikleri

Klasik bakteriyel tanılama yöntemlerinin, özellikle Xac gibi fenotipik olarak değişkenlik gösterebilen ve diğer yakın akraba ksantomonadlarla benzer özellikler sergileyebilen patojenlerin kesin ve hızlı teşhisindeki sınırlılıkları, moleküler tekniklerin geliştirilmesini ve yaygın kullanımını zorunlu kılmıştır. Nükleik asitlerin (DNA veya RNA) analizine dayanan bu yöntemler, patojenlerin tespiti ve tanılanmasını yüksek özgüllük, hassasiyet ve hız sunmaktadır (Lamichhane & Varvaro, 2014). Moleküler yaklaşımlar, geleneksel yöntemlerle uzun sürede sonuç veren mikroorganizmaların bile hızlıca tespitine olanak tanınması, çok düşük miktarlardaki (pikogram veya femtogram düzeyinde) patojen varlığını saptayabilmesi ve elde edilen genetik bilgilerle filogenetik ilişkilerin

aydınlatılarak epidemiyolojik çalışmalara temel oluşturması gibi önemli avantajlara sahiptir (Alkan vd., 2022; Maes, 1993). Bu teknikler, özellikle latent enfeksiyonların veya bulaşık çoğaltım materyallerindeki düşük yoğunluktaki patojenlerin saptanmasında büyük kolaylıklar sağlamaktadır (Çelik vd., 2024).

Xac'nın doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlanması için klasik yöntemlere ek olarak veya onların yerine çeşitli DNA tabanlı moleküler yöntemler ve bu yöntemlere uygun primerler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında, *Xanthomonas* cinsine özgü genel primerler (Maes, 1993) veya *X. arboricola* türüne spesifik *qumA* genini hedefleyen XarbQ primerleri gibi (Pothier vd., 2011) gen bölgelerini hedefleyen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı testler ön plandadır. Ayrıca, izolatlar arası genetik farklılıkların kökenini belirlemede kullanılan çeşitli DNA parmak izi teknikleri (Öztürk, 2023) ve patojenin genomundaki spesifik dizilere dayanarak kantitatif ölçümlere de imkan tanıyan real-time PCR (qPCR) gibi daha ileri teknolojiler de Xac tanısında başarıyla kullanılmaktadır (Kaluzna, 2023). Bu moleküler araçlar, özellikle tür ve patovar düzeyinde kesin ayırım yapılmasında ve hastalığın erken teşhisinde klasik yöntemlere kıyasla önemli üstünlükler ve güvenilirlik sağlamaktadır (Kaluzna vd., 2021).

1.5.8.1 Konvansiyonel PCR

Konvansiyonel PCR, bakteri DNA'sındaki spesifik hedef gen bölgelerinin enzimatik olarak çoğaltılması esasına dayanan ve bu sayede bakteri cins, tür veya patovar düzeyinde hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasına olanak tanıyan temel bir moleküler tekniktir. Klasik tanılama yöntemlerine kıyasla daha yüksek özgüllük ve hız sunması, PCR'ı fitopatoloji laboratuvarlarında vazgeçilmez bir araç haline getirmiştir.

Xanthomonas cinsi bakterilerin genel tanımlanmasında, 16S ribozomal RNA (rRNA) gen bölgesi başlangıçta filogenetik çalışmalar ve genel bakteri tanımlaması için hedeflenmiştir (Kim vd., 2021; Weisburg vd., 1991). Bu konuda Maes (1993) tarafından *Xanthomonas* cinsine spesifik bir 16S rRNA gen bölgesini hedefleyen X1 ve X2 primerleri geliştirmiştir. Bu primerlerle yapılan PCR sonucunda, test edilen tüm *Xanthomonas* patovarlarından yaklaşık 480 baz çifti (bp) büyüklüğünde tek bir DNA fragmanı elde edilmiştir. Ancak 16S rRNA geni, özellikle yakın akraba türler ve patovarlar arasında yeterli ayırt ediciliği sağlayamamaktadır (Lamichhane vd., 2013).

Pagani (2004) bu konuda bazı çalışmalar yapmış ve *X. arboricola* pv. *pruni* için primer denemeleri yapmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *fstX* gen bölgesini hedefleyen XapY17-F ve XapY17-R primerleri geliştirilmiş ve *X. arboricola* pv. *pruni* için iyi sonuç verdiği belirtilmiştir. Fakat bu primerin daha sonra diğer patovarlarla çapraz reaksiyona tabi tutulduğunda Xac ile çapraz reaksiyon verdiği rapor edilmiştir (Lopez-Soriano vd., 2017; Pothier vd., 2011; Prokic vd., 2012).

Pothier vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ise *X. arboricola*'nın *qumA* gen bölgesi hedeflenmiş ve bu bölge için çalışan XarbQ-F (5'-GCGCGAGATCAATGCGACCTCGTC-3') ve XarbQ-R (5'-GGTGACCACATCGAACCGCGCA-3') primer çifti geliştirilmiştir. Bu primerler, *X. arboricola* suşlarından yaklaşık 402 bp büyüklüğünde bir PCR ürünü oluşturarak tür düzeyinde etkin bir tanımlama yaptığı bildirilmiştir (Pothier vd., 2011).

Xanthomonas arboricola'nın patovar düzeyinde ve diğer yakın akraba patovarlarından ayırt edilerek konvansiyonel PCR ile tanımlanması uzun süre bir zorluk teşkil etmiştir (Prokic vd., 2012). Bu durum, XapY17 primerlerinin Xac tespiti için kullanılabileceğini ancak Xac'a özgü olmadığını göstermektedir. XarbQ ve XapY17 primerlerinin dubleks PCR yöntemiyle bir arada kullanıldığında *X. arboricola* türü içinde hem *pruni* hem de *corylina* 'yı aynı anda saptayarak tanı güvenilirliğini artırmaya yönelik bir yaklaşım olarak kullanılmıştır (Lamichhane & Varvaro, 2014).

Yakın zamanda ise, Kaluzna vd. (2023) tarafından Xac genomundaki benzersiz bölgeler hedeflenerek Xac'a spesifik primer denemesi çalışmaları yapılmıştır. Çalışma neticesinde bazı primerlerin çalışmaya değer olduğu belirtilmiş ve üzerinde çalışmaların devam ettiği belirtilmiştir. Bu çalışma yeni olarak belirtilen Xac2.4-1, Xac2.4-4, XacPPU-1, Xac45-1, Xac45, XacPPU54630 şeklinde 6 farklı primer setinin ampikon boyutları, kullanılan primer çiftine bağlı olarak 159 bp ile 1,455 bp arasında değiştiği bildirilmiştir.

1.5.8.2 Rep- ve ERIC- PCR

Tekrarlayan dizi temelli PCR (Rep-PCR) yöntemleri, bakteriyel genomlarda çeşitli yerlerde bulunan kısa, tekrarlayan DNA dizilerini hedef alarak polimorfik DNA fragmanları üreten ve bu sayede suş düzeyinde genetik parmak izi profilleri oluşturan moleküler tipleme teknikleridir. Bu yöntemler arasında ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction),

REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction) ve BOX elementi dizilerine dayalı PCR (BOX-PCR) en yaygın kullanılanlardır. *X. arboricola* patovarylarının, Xac dahil olmak üzere, genetik çeşitliliğinin araştırılmasında, popülasyon yapısının anlaşılmasında ve izolatların birbirleriyle olan genetik ilişkilerinin belirlenmesinde bu DNA parmak izi teknikleri değerli bilgiler sunmaktadır (Kaluzna vd., 2014; Scortichini vd., 2002). Özellikle ERIC-PCR ve BOX-PCR'ın, REP-PCR'a kıyasla Xac suşları ve bu türün diğer patovarylarının ayırımında daha yüksek ayırt edicilik gücüne sahip olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Ivanović vd., 2015; Prokic vd., 2012).

Yakın zamanda Öztürk (2023) tarafından Türkiye'deki Xac izolatlarıyla yapılan bir çalışmada da ERIC-PCR kullanılarak izolatların genetik parmak izleri çıkarılmış ve izolatların çoğunun referans suşlarla benzer profiller sergilediği, ancak bazı farklı genetik profillerin de varlığı tespit edilmiştir. Bu tür parmak izi teknikleri, Xac'ın epidemiyolojik takibinde ve genetik çeşitliliğinin karakterize edilmesinde önemli araçlar olarak kabul edilir (Pulawska vd., 2010).

1.5.8.3 SCoT Primerleri ve Bu Primerlerin Bakterilerde Kullanımı

Start Codon Targeted (SCoT) markörler, Collard ve Mackill (2009) tarafından bitki genomlarındaki start kodonunu çevreleyen kısa ve görece korunmuş DNA bölgelerini hedefleyerek polimorfik DNA profilleri, yani genetik parmak izleri oluşturmak amacıyla geliştirilmiş, PCR tabanlı dominant DNA markör sistemleridir. Bu teknik, 18 baz çifti uzunluğunda olan ve PCR reaksiyonunda hem forward hem de reverse primer olarak işlev gören tek bir primer kullanır; bu yönüyle çalışma prensibi Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) gibi diğer tek primerli amplifikasyon sistemlerine benzerlik göstermektedir (Tekin vd., 2024). SCoT primerleri, uygulama basitliği, maliyet etkinliği ve tekrarlanabilir polimorfik bantlar üreterek genetik ilişkilerin ve çeşitliliğin aydınlatılmasına katkıda bulunması nedeniyle kısa sürede yaygınlık kazanmıştır. SCoT primerleri, RAPD ve ISSR markörlerin avantajlarına sahip olup aynı zamanda basit, hızlı, ekonomik ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, SCOT markörleri hedef diziler hakkında ön bilgi gerektirmemesi nedeniyle SSR markörlerinden çalışması daha avantajlı ve daha kolaydır (Rahimi & Ranjbaran, 2023).

Başlangıçta bitkilerde genetik çeşitliliğin belirlenmesi, akrabalık ilişkilerinin saptanması ve genetik haritalama gibi alanlarda yaygın olarak kullanılan SCoT markörlerini (Ochi-Ardabili vd., 2024; Yeken vd., 2024), ökaryotik mikroorganizmalarda genetik parmak izi oluşturma ve benzerliğe dayalı gruplandırma çalışmalarında başarıyla uygulandığı rapor edilmiştir (Aydın vd., 2022; Güney vd., 2023; Palacıoğlu vd., 2023). Bu yöntem, doğrudan bir tanı aracı olmaktan ziyade, genetik çeşitliliği ve bireyler/gruplar arasındaki genetik uzaklığı ortaya koyarak dolaylı olarak sınıflandırma ve karakterizasyon çalışmalarına hizmet eder.

SCoT markörlerinin prokaryotik organizmalar olan bakterilerdeki kullanımı, özellikle genetik çeşitliliklerinin ve popülasyon yapılarının incelenerek benzer genetik parmak izine sahip suşların gruplandırılması amacıyla yeni bir alan olarak gelişmektedir. Yakın zamanda Tekin vd. (2024) tarafından yapılan ve bakterilerde SCoT kullanımının ilk kapsamlı örneklerinden biri olan çalışmada, bu primerlerin çeşitli bakteri türleri ve suşları arasında ayırt edici DNA parmak izi profilleri oluşturabildiği gösterilmiştir. SCoT analizi ile elde edilen polimorfik bant desenleri, farklı bakteri izolatlarının genetik benzerliklerine göre kümelenmesine ve gruplandırılmasına olanak tanır. Bu tür bir gruplandırma, doğrudan bir tanı yöntemi olmasa da tanı sürecine dolaylı yoldan önemli katkılar sağlayabilir. Yeni izole edilen bir bakterinin SCoT parmak izi, bilinen patojenik veya non-patojenik suşların oluşturduğu genetik gruplarla karşılaştırılarak, bu izolatın potansiyel özellikleri veya hangi grupta daha yakın ilişkili olduğu hakkında hızlı bir ön fikir edinilebilir. Bu bilgi, daha sonraki spesifik tanı testlerinin daha hedefli bir şekilde seçilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca, SCoT ile benzer genetik profile sahip suşların bir araya getirilmesi, salgınların kaynağının araştırılması, belirli bir coğrafi bölgedeki bakteri popülasyonlarının genetik çeşitliliğinin ve yapısının anlaşılması gibi epidemiyolojik çalışmalarda da değerli bir araç olabilir. Bu yöntem, bakteri koleksiyonlarının yönetimi ve karakterizasyonunda, genetik olarak benzer suşların hızlı bir şekilde bir araya getirilerek daha kapsamlı analizler için önceliklendirilmesine ve bu sayede tanısal süreçlerin desteklenmesine yardımcı olur.

1.5.8.4 MLSA

Multilocus Sequence Analysis (MLSA) veya Multilocus Sequence Typing (MLST), bakteri türlerinin ve özellikle birbirine genetik olarak çok yakın olan patovaryaların doğru bir şekilde tanımlanması, filogenetik ilişkilerinin aydınlatılması ve popülasyon yapılarının anlaşılmasında yaygın olarak kullanılan güçlü bir moleküler yaklaşımdır. Bu yöntem hücrenin temel fonksiyonlarında görev alan ve evrimsel süreçte nispeten yavaş değişen birkaç farklı "housekeeping" gen bölgesinin kısmi dizilerinin elde edilip birleştirilerek analiz edilmesine dayanır. Tek gen analizlerine kıyasla, birden fazla gen bölgesinden elde edilen verilerin birleştirilmesi, daha sağlam ve güvenilir filogenetik çıkarımlar yapılmasını sağlar ve böylece taksonomik belirsizlikleri azaltır (Ivanović vd., 2015). *Xanthomonas* cinsi içinde ve özellikle *X. arboricola* türünün patovaryaları arasındaki karmaşık ilişkileri çözmek için MLSA şemaları başarıyla uygulanmaktadır (Fischer-Le Saux vd., 2015).

Xanthomonas arboricola patovaryalarının, Xac dahil, filogenetik analizi ve ayırımında sıklıkla kullanılan temel gen bölgeleri arasında *gyrB* (DNA gyrase subunit B), *rpoD* (RNA polymerase sigma 70 factor), *dnaK* (chaperone protein; 70-kDa heat shock protein) ve *fyuA* (transmembrane protein; Ton-B-dependent transporter) bulunmaktadır (Young vd., 2008). Fischer-Le Saux vd. (2015) tarafından yapılan kapsamlı bir çalışmada, bu dört genin yanı sıra *atpD* (ATP synthase chain), *efp* (elongation factor P) ve *glnA* (glutamine synthetase 1) gibi genleri de içeren yedi genlik bir MLSA şeması kullanılarak *X. arboricola* patovaryalarının iyi desteklenen monofiletik gruplar oluşturduğu ve Xac suşlarının da bu grupta içinde kendi kümesini oluşturduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, özellikle *gyrB* ve *rpoD* genlerinin birleşik analizinin, Xac ve *pv. pruni* gibi ekonomik öneme sahip patovaryaları tanımlamada yeterli filogenetik bilgi sağladığı, ancak tek başına *gyrB* geninin kullanımının bazen yanıltıcı sonuçlar verebileceği de vurgulanmıştır. Nitekim, Öztürk (2023) tarafından yapılan çalışmada, *rpoD* gen sekanslarının Xac suşlarını diğer *X. arboricola* patovaryalarından ayırmada *gyrB* genine göre daha yüksek ayırt ediciliğe sahip olduğu ortaya konmuştur. *X. arboricola*'nın bir diğer önemli patovaryası olan ve Xac ile yakın akraba olan ceviz yanıklığı etmeni *X. a. pv. juglandis* için yapılan çalışmalarda da *fyuA*, *gyrB* ve *rpoD* genlerinin MLSA analizlerinde kullanışlı olduğu doğrulanmıştır (Kaluzna vd., 2014).

1.5.8.5 LAMP ve MALDI-TOF

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), DNA'yı yaklaşık 60-65 °C sabit bir sıcaklıkta ve yüksek bir özgülükle çoğaltarak çalışan, bu sayede termal döngü protokollerine ve cihazlarına ihtiyaç duymayan, hızlı, basit ve uygun maliyetli bir moleküler tanı yöntemi olduğu belirtilmektedir (Çelik vd., 2024). Yüksek hassasiyetinin yanı sıra, sonuçların bazen basit görsel yöntemlerle de değerlendirilebilmesi, LAMP tekniğini özellikle arazi koşullarında veya kısıtlı laboratuvar imkanlarına sahip yerlerde patojen tespiti için oldukça elverişli olduğu belirtilmektedir. Yakın zamanda, Xac'ya özgü genomik hedefler kullanılarak LAMP tabanlı tanı sistemleri geliştirilmiş ve bu sistemlerin, çok düşük patojen miktarlarını dahi hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit edebildiği rapor edilmiştir (Kaluzna, 2023).

MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) ise, bakterilerin özellikle ribozomal proteinleri gibi hücresel proteinlerinin oluşturduğu özgün kütle parmak izlerini analiz ederek hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde tür ve hatta bazı durumlarda alt tür/patovar düzeyinde tanımlama yapabilen proteomik tabanlı modern bir teknolojidir (Schumann & Maier, 2014). MALDI-TOF MS, özellikle çok sayıda izolatin rutin teşhisinde yüksek işlem kapasitesi, otomasyona uygunluğu ve analiz başına düşen maliyet etkinliği sayesinde klasik biyokimyasal testlere ve hatta bazı nükleik asit bazlı yöntemlere göre avantajlar sunduğu belirtilmiştir (Pothier vd., 2011). *X. arboricola* patovarlarının (Palacio-Bielsa vd., 2011), Xac dahil, tanımlanmasında ve doğrulanmasında başarıyla uygulandığı bildirilmiştir. Öztürk (2023) tarafından yapılan bir çalışmada Türkiye'den izole edilen Xac suşlarının MALDI-TOF MS ile elde edilen protein spektrumlarının referans Xac suşlarıyla yüksek skorlarla eşleşerek teşhisinin etkili bir şekilde doğrulandığı ve bu yöntemin Xac'ın tanımlanmasında kullanışlı olduğu bildirilmiştir.

1.5.8.6 Real-time PCR

Real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-time PCR veya qPCR), geleneksel PCR yönteminin ileri bir uygulaması olup, DNA amplifikasyonunu reaksiyon sırasında, her bir döngüde gerçek zamanlı olarak izleme ve ölçme prensibine dayanır. Bu izleme, PCR ürününün miktarıyla orantılı olarak artan floresan sinyallerinin tespiti ile gerçekleştirilir. Real-time PCR, klasik PCR'a göre

daha hızlı sonuç vermesi, daha yüksek hassasiyete sahip olması, kontaminasyon riskini azaltması (kapalı tüp sistemi sayesinde) ve en önemlisi hedef DNA miktarının sayısal olarak belirlenmesine (kantifikasyon) olanak tanınması gibi önemli avantajlar sunar (Schaad & Frederick, 2002; Schena vd., 2004). Bu özellikleriyle, bitki patojeni bakterilerin erken ve doğru teşhisinde, enfeksiyon düzeyinin belirlenmesinde, konukçu direnç mekanizmalarının incelenmesinde ve epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan güçlü bir araç haline gelmiştir (Alkan vd., 2022).

Real-time PCR analizlerinde floresan sinyalinin üretilmesi için SYBR Green I gibi DNA'ya bağlanan non-spesifik boyalar ve TaqMan problemleri gibi diziyeye özgü floresan problemler gibi iki farklı kimyasal kullanılır.

SYBR Green I, çift sarmallı DNA'nın küçük oluşuna bağlanarak floresans yayan bir boyadır; dolayısıyla PCR döngüleri sırasında yeni oluşan tüm çift sarmallı DNA ürünlerine bağlanarak sinyal üretir (Çelik vd., 2024). SYBR Green I kullanımının temel avantajları, maliyetinin prob bazlı yöntemlere göre daha düşük olması, protokol basitliği ve herhangi bir hedef için sadece primer çifti gerektirmesidir. Ancak, SYBR Green I'in tüm çift sarmallı DNA'ya bağlanması nedeniyle, reaksiyon özgüllüğünün dikkatle optimize edilmesi ve doğrulanması kritik öneme sahiptir. Bu amaçla, PCR reaksiyonu sonunda yapılan "erime eğrisi (melt curve) analizi", SYBR Green I tabanlı qPCR'ın vazgeçilmez bir parçasıdır. Erime eğrisi analizi, farklı DNA ürünlerinin erime sıcaklıklarındaki (T_m) farklılıklara dayanarak spesifik hedef ampikonu, primer dimerlerinden ve diğer spesifik olmayan ürünlerden ayırt etmeye olanak tanır; tek bir spesifik pikin gözlenmesi reaksiyonun özgüllüğünü teyit eder (Alkan vd., 2022; Özer vd., 2023). Kötü tasarlanmış primerler, SYBR Green I analizlerinde primer-dimer oluşumuna ve yanlış pozitif sonuçlara yol açarak yöntemin performansını düşürebilir; ancak doğru optimizasyonla SYBR Green I yöntemi, prob bazlı yöntemlerle karşılaştırılabilir kalitede sonuçlar verebilir (Tajadini vd., 2014).

TaqMan problemleri ise, hedef DNA dizisine özgü olarak tasarlanan, bir ucunda floresan bir raportör (reporter) boya ve diğer ucunda bu raportörün floresansını baskılayan bir söndürücü (quencher) boya taşıyan oligonükleotidlerdir. Prob, PCR sırasında hedef DNA'ya bağlandığında, Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi sayesinde prob parçalanır, raportör boya söndürücüdenden ayrılır ve floresan sinyali yaymaya başlar; oluşan sinyal miktarı, çoğaltılan hedef DNA miktarıyla

doğru orantılıdır. TaqMan problemleri hem primerlerin hem de probun hedef diziye bağlanması gerektiğinden dolayı SYBR Green I'e göre daha yüksek bir özgüllük sunar ve genellikle multipleks analizlere daha uygundur. Ancak, her bir hedef için ayrı bir prob tasarlanması ve sentezlenmesi gerektiğinden dolayı maliyeti SYBR Green I yöntemine göre daha yüksektir.

Real-time PCR'ın en önemli özelliklerinden biri yüksek hassasiyetidir; çok düşük miktarlardaki hedef DNA'yı veya az sayıdaki bakteri hücrelerini tespit etme kapasitesine sahiptir (Alkan vd., 2022; Kaluzna, 2023). Bu hassasiyet, patojenin enfeksiyonun erken evrelerinde veya latent (gizli) olarak bulunduğu durumlarda bile saptanabilmesini sağlar. SYBR Green I kullanıldığında ise özgüllük, erime eğrisi analizi ile teyit edilir. Real-time PCR'ın bir diğer güçlü yönü kantifikasyon yeteneğidir. Floresan sinyallerinin her döngüde ölçülmesi sayesinde, standart eğriler kullanılarak veya göreceli kantifikasyon yöntemleriyle örnekteki başlangıç hedef DNA miktarı kesin olarak belirlenebilir. Bu kantitatif veri, patojen yükünün saptanması, hastalık ilerleyişinin takibi, tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi veya konukçu direncinin sayısal olarak ifade edilmesi gibi birçok uygulama için değerlidir (Özer vd., 2023).

1.5.8.7 *Xanthomonas arboricola* Patovarylarının Ayrımında Real-time Tekniklerinin Kullanımı

Real-time PCR (qPCR) teknolojisi, *X. arboricola* türü içinde yer alan ve birbirlerine genetik olarak çok benzeyen patovaryların hızlı, hassas ve özgül bir şekilde ayırt edilmesinde ve enfekteli bitki dokularından doğrudan tespit edilmesinde önemli imkanlar sunmaktadır. Bu patovaryların neden olduğu hastalıkların doğru teşhisi, etkili mücadele stratejilerinin geliştirilmesi ve karantina önlemlerinin uygulanması için patovar düzeyinde ayırım yapabilen güvenilir tanı yöntemleri kritik öneme sahiptir.

Xanthomonas arboricola türünü hedefleyen bazı qPCR analizleri geliştirilmiş olsa da bu testler her zaman patovar düzeyinde yeterli ayırım gücüne sahip olmayabilir. Nitekim Palacio-Bielsa vd. (2011) tarafından *X. arboricola* pv. *pruni* üzerine yapılan bir çalışmada, *X. arboricola* türüne özgü Xap-2F/R primerleri kullanılarak geliştirilen bir real-time PCR yönteminin, Xac patovaryının yanı sıra *X. arboricola* pv. *pruni* (Xap) ve *X. arboricola* pv. *fragariae* (Xaf) gibi diğer bazı patovaryları da saptadığı, dolayısıyla bu patovarylar arasında spesifik bir ayırım yapmadığı belirtilmiştir. Ballard vd. (2011) tarafından geliştirilen ve Xap'a özgü bir

DNA dizisini hedefleyen 29F/R primer çiftini kullanan SYBR Green I tabanlı bir real-time PCR yönteminin, Xap'ı Xac dahil diğer tüm *X. arboricola* patovarylarından ayırt edebildiği rapor edilmiştir.

Xac'ın diğer patovarylardan spesifik olarak ayrılması ve tespiti konusunda son zamanlarda Kaluzna (2023) tarafından yapılan bir çalışmada, karşılaştırmalı genomik analizlerle Xac genomuna özgü benzersiz DNA bölgeleri tanımlanmış ve bu hedeflere yönelik olarak hem SYBR Green I hem de TaqMan probu tabanlı Xac'a özgü qPCR protokolleri geliştirilmiştir. Geliştirilen bu Xac-spesifik qPCR testlerinin, diğer *Xanthomonas* türleri, *X. arboricola*'nın diğer patovaryları veya ilişkisiz bakteri ve funguslarla çapraz reaksiyon vermediği, yüksek bir özgüllük sergilediği doğrulanmıştır. Hassasiyet analizlerinde ise, bu qPCR yöntemlerinin femtogram veya pikogram düzeyindeki Xac DNA'sını ve hatta ham hücre lizatlarından reaksiyon başına 1 CFU gibi çok düşük bakteri miktarlarını bir saatten kısa sürede tespit edebildiği gösterilmiştir.

Bitki dokularından Xac tespiti için, Kaluzna et al. (2023) çalışmasında, geliştirilen qPCR yöntemlerinin yapay olarak enfekte edilmiş fındık bitki materyallerinden Xac DNA'sını başarıyla saptadığı belirtilmiştir. Bu süreçte, DNA izolasyonu için ticari kitlerin kullanılmasının, PCR reaksiyonunu engelleyebilecek bitkisel inhibitörlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olduğu ve dolayısıyla fındık dokularında Xac DNA'sının tespiti için kit kullanımının daha güvenilir sonuçlar verdiği vurgulanmıştır.

1.5.9 Çeşit Reaksiyon Çalışmaları

Fındık çeşitlerinin Xac'ya karşı gösterdikleri reaksiyonların belirlenmesi, hastalıkla mücadelede dayanıklı genotiplerin saptanması ve yeni çeşit geliştirme programları için hayati öneme sahiptir. Bu amaçla, farklı ülkelerde yetiştirilen ticari ve yerel fındık çeşitlerinin Xac'a karşı hassasiyet düzeylerini ortaya koyan çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Avrupa'da yapılan çalışmalarda, bazı yaygın fındık çeşitlerinin Xac'a karşı yüksek düzeyde hassas olduğu sıkça rapor edilmiştir. Bu raporlardan birinde Fransa'da 'Fertile de Coutard' çeşidinin hastalığa oldukça hassas olduğu belirtilmiştir (Frutos, 2010; Gardan & Devaux, 1987). İtalya'da ise 'Tonda Romana', 'Tonda Gentile delle Langhe' ve 'Nocchione' gibi önemli çeşitlerin, *C. avellana*'dan izole edilen Xac suşları tarafından enfekte edilebildiği ve hastalık belirtileri

geliştirdiği saptanmıştır (Scortichini vd., 2002). Polonya'da 'Webb's Prize Cob', 'Cosford' ve 'Early Long Zeller' çeşitlerinde Xac tespit edilmiş, özellikle 'Webb's Prize Cob' üzerinde ciddi belirtiler gözlenmiştir (Pulawska vd., 2010). Bununla birlikte, bazı Avrupa çeşitlerinin Xac'a karşı daha dayanıklı veya kısmen dayanıklı olduğu da bildirilmiştir; Frutos (2010), 'Negret', 'Merveille de Bollwiller' ve 'Segorbe' gibi çeşitlerin neredeyse dayanıklı olduğunu aktarmıştır. Benzer şekilde Osdaghi (2022), bu çeşitlere ek olarak 'Gunslebert' ve 'Logued'Espagne'yi de dayanıklı olarak listelemiş, 'Graham' fındık türü ve *Corylus pontica*'nın da belirli bir direnç gösterebildiğini belirtmiştir. Ancak, genel kanı, Xac'a karşı tam bir bağışıklığa sahip bir fındık çeşidinin henüz bulunmadığı yönündedir.

Türkiye'de yetiştirilen fındık çeşitlerinin Xac'a karşı reaksiyonları üzerine yapılan araştırmalar da önemli veriler sunmaktadır. Akın (2012) tarafından yürütülen kapsamlı bir tez çalışmasında ve bu çalışmaya dayanan Akın ve Aygün (2021) makalesinde, 'Acı', 'Çakıldak', 'Foşa', 'İncekara', 'Kalınkara', 'Kan', 'Kargalak', 'Kuş', 'Mincane', 'Palaz', 'Sivri', 'Tombul', 'Uzunmusa', 'Yassı Badem' ve 'Yuvarlak Badem' gibi çok sayıda Türk fındık çeşidinin Xac'a karşı tepkileri incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, değerlendirilen kriterlere göre 'İncekara' çeşidi hastalığa karşı en dayanıklı genotiplerden biri olarak öne çıkarken, 'Yassı Badem' çeşidinin en hassas olduğu belirlenmiştir. Ecevit vd. tarafından yapılan bir çalışmada (1996), Karadeniz Bölgesi çeşitlerinden 'Mincane'nin en dayanıklı, 'Allahverdi'nin ise yüksek hassasiyet gösterdiği kaydedilmiştir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde, özellikle Doğu Fındık Yanıklığı (EFB) hastalığına dayanıklılık amacıyla geliştirilen yeni fındık çeşitlerinin Xac'a karşı gösterdiği reaksiyonlar da ilgi çekici sonuçlar vermiştir. Webber vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, EFB'ye dayanıklı 'Jefferson', 'McDonald', 'Wepster', 'Dorris', 'Yamhill' ve 'York' gibi yeni çeşitlerin, Xac'a karşı hassasiyeti yüksek olan kontrol çeşidi 'Barcelona' kadar, hatta bazı durumlarda ondan daha fazla hassas olduğu saptanmıştır. Bu durum, bir patojene karşı geliştirilen dayanıklılığın, başka bir patojene karşı da etkili olacağı anlamına gelmediğini ve Xac'ın yeni geliştirilen çeşitler için de önemli bir tehdit oluşturmaya devam ettiğini göstermektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Hastalıklı Bitki Materyalinin Eldesi ve Sörvey Alanları

Bu çalışmada kullanılan *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) izolatlarını elde etmek amacıyla, Türkiye'nin Karadeniz ve Marmara'da önemli fındık üretim bölgeleri olan Bolu, Düzce, Sakarya, Samsun, Ordu bölgelerinden güdümlü örnekleme yapılmıştır (Tablo 2.1). Sörveyler, Xac enfeksiyonlarının fındık bitkilerinde ilk belirtilerinin görülmeye başladığı ilkbahar aylarından başlanmış, hastalığın yaygınlık ve şiddetinin arttığı yaz ve sonbahar aylarına kadar olan vejetasyon periyodunda gerçekleştirilmiştir. Sörveyler sırasında, Xac'ın neden olduğu fındık bakteriyel yanıklık hastalığına ait olduğu düşünülen belirtiler dikkatlice gözlemlenmiştir. Yapraklarda küçük, köşeli, damarlarla sınırlı, yağlımsı veya suyla ıslanmış görünümde ya da sarımsı-yeşilden kahverengi-siyaha dönüşen nekrotik lezyonlar, tomurcuklarda, kararma, nekroze olma, zuruflarda yağlımsı görünümde daha sonra koyu kahverengi veya siyah renge dönüşen, yuvarlak veya düzensiz şekilli nekrotik lekeler aranmıştır. Hastalık belirtisi gösteren yaprak, tomurcuk, enfekteli sürgün ve dal parçaları, belirtili meyve ve zuruf gibi bitki kısımlarından örnekler alınmıştır. Örnek alınırken taze bitki parçaları alınmasına özen gösterilmiştir. Her bir örnek, toplandığı bahçe, tarih ve koordinatlar gibi bilgileri içeren bir etiketle etiketlenmiştir. Toplanan bitki materyalleri, laboratuvara gelene kadar patojenin canlılığını korumak ve saprofitik mikroorganizmaların aşırı gelişimini önlemek amacıyla, steril plastik poşetlere veya kese kağıtlarına ayrı ayrı konularak, serin koşullarda bir buz çantası içerisinde korunmuştur. Laboratuvara getirilen örnekler, izolasyon işlemlerine başlanana kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Sörvey yapılan ve örnek toplanan bahçelere ait lokasyon ve koordinat bilgileri Tablo 2.1'de sunulmaktadır.

Tablo 2.1 Sörveylerin yapıldığı bahçelere ait konum bilgileri

Sıra No	Şehir	İlçe/Köy	Bahçe No	Bahçe Kodu	Koordinat
1	Bolu	Merkez/Çayırköy		BMÇa	40.722611, 31.563583
2	Bolu	Merkez/Çayırköy	2	BMÇa2	40.723861, 31.580583
3	Bolu	Merkez/Doğancı		BMDö	40.720778, 31.556944
4	Bolu	Merkez/Doğancı	2	BMDö2	40.721500, 31.558167
5	Düzce	Akçakoca/Doğancılar		DADö	41.069806, 31.158222
6	Düzce	Akçakoca/Döngelli		DADö	41.082861, 31.191694
7	Düzce	Gümüşova/Yeşilyayla		DGYe	40.788028, 30.836111
8	Ordu	Altınordu/Merkez		OAMe	40.959250, 37.932250

9	Ordu	Altınordu/Terzili	OATe	40.950972, 37.927694
10	Ordu	Fatsa/Bağlarca	OFBa	40.995056, 37.531278
11	Ordu	Fatsa/Kavraz	OFKa	40.986306, 37.572417
12	Ordu	Ünye/Merkez	OÜMe	41.117722, 37.264306
13	Ordu	Ünye/Yunus Emre	OÜYu	41.114500, 37.238083
14	Sakarya	Erenler/Nakışlar	SENa	40.737639, 30.461250
15	Sakarya	Erenler/Pirahmetler	SEPi	40.737639, 30.461250
16	Sakarya	Erenler/Sarıcalar	SESa	40.737639, 30.461250
17	Sakarya	Hendek/Akçayır	SHAk	40.819528, 30.831028
18	Sakarya	Hendek/Güldibi	SHGü	40.825556, 30.828528
19	Samsun	Çarşamba/Akçatarla	SÇAk	41.289972, 36.769000
20	Samsun	Çarşamba/Dalbahçe	SÇDa	41.218583, 36.815833
21	Samsun	Çarşamba/Turgutlu	SÇTu	41.234694, 36.622250
22	Samsun	Terme/Söğütlü	STSö	41.220778, 36.864167

2.1.2 Referans İzolat Temini

Tanımlama çalışmalarının doğruluğunu sağlamak ve elde edilen yerel izolatlarla karşılaştırmalar yapabilmek amacıyla, Xac'ın Amerikan Fındığından (*Corylus maxima*) elde edilmiş ve uluslararası kabul görmüş patotip suşu ATCC 19313 (Ayrıca NCPPB 935, CFBP/CNBP 1159, DSM 50854, DSM 60239, ICMP 5726, ICPB XC12, Miller 5262, LMG 689, PDDCC 5726, Starr XC12, VdM 42 gibi farklı kültür koleksiyonu numaralarıyla da bilinmektedir), Polonya'daki Avrupa Fındığından (*C. avellana*) elde edilmiş RIPF X09, RIPF X23 (Pulawska vd., 2010), Amerika'nın Origen eyaletindeki tescilli *C. avellana* çeşitlerinden elde edilmiş JL2600, JL2602, JL2606, JL2611 ve JL2614 (Webber vd., 2020) suşları temin edilmiştir. ATCC 19313 suşu *C. maxima*'dan izole edilmiştir ve *C. avellana*'da patojen olmadığı farklı çalışmalarda bildirilmiştir. Bu suş bu çalışmaya biyokimyasal testlerde kıyaslama yapma amacıyla eklenmiştir.

2.1.3 Patojenisite Testleri için Bitki Materyali

Patojenisite ve çeşit reaksiyon denemelerinde kullanılmak üzere Türk çeşitlerinden 'Çakıldak', 'Tombul', 'Yomra', 'Kalınkara', 'Palaz', 'Karafındık', 'Mincane' ile İtalyan çeşitlerinden 'Mortarella', 'Nocchione=Siciliana=Montebello', 'Tonda di Giffoni' ve 'Tonda Romana' fındık fidanları temin edilmiştir.

Denemelerde 1-2 yaşındaki genç fındık fidanları tercih edilmiştir. Temin edilen fidanlar, patojenisite testleri öncesinde kontrollü iklim odası koşullarına alınarak denemeler için hazır tutulmuştur.

2.1.4 Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri

Tablo 2.2 Nutrient Agar (NA) İçeriği

Nutrient Agar (NA) İçeriği (Lelliott & Stead, 1987)	Miktar/L
Nutrient Broth	8 g
Agar	18 g

Tablo 2.3 YPGA İçeriği

YPGA İçeriği (EPPO, 2004)	Miktar/L
Yeast Extract	5 g
Pepton	5 g
Glikoz	10 g
Agar	18 g

Tablo 2.4 YGCA İçeriği

YGCA İçeriği (EPPO, 2004)	Miktar/L
Yeast Extract	5 g
Glikoz	10 g
Kalsiyum Karbonat (CaCO ₃)	30 g
Agar	18 g

Tablo 2.5 Hugh ve Leifson'un Oksidatif-Fermantatif Besiyeri İçeriği

Hugh ve Leifson'un Oksidatif-Fermantatif Besiyeri İçeriği (Hugh & Leifson, 1953)	Miktar/L
Pepton	2 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
NaCl	5 g
Agar	3 g
Glikoz	1 g
Bromthymol Blue ¹	0,03 g

¹:Bromthymol Blue ve Glikoz soğuk sterilizasyon yapılmalıdır.

2.1.5 Moleküler Çalışma Materyalleri

Primerler:

İzolatların SCoT profillemeye ile parmak izlerinin çıkarılması amacıyla sekans dizisi olan SCoT32 primeri kullanılmıştır (Tablo 2.6).

İzolatları *X. arboricola* olarak tür düzeyinde tanımlayabilmek için XarbQ primer çiftleri kullanılmıştır (Tablo 2.6).

Tablo 2.6 Bu Çalışmada Kullanılan Primer Bilgileri

Primer Adları	Gen Bölgesi	Amplikon	Sekans Dizisi (5' – 3')	Referans
XarbQ-F XarbQ-R	<i>qumA</i>	402 bp	5'-GCGCGAGATCAATGCGACCTCGTC-3' 5'-GGTGACCACATCGAACC GCGCA-3'	(Pothier vd., 2011)
SCoT32	Start Kodonu	-	5'-CCATGGCTACCACCGCAC-3'	(Collard & Mackill, 2009)
XrpoD1F XrpoD1R	<i>rpoD</i>	875 bp	TGGAACAGGGCTATCTGACC CATTCTYAGGTTGGTCTGRTT	(Young vd., 2008)

DNA İzolasyon Kiti:

Fındık bitkisi ve bakteriyel izolatların genomik DNA izolasyonunda GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kiti kullanılmıştır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Etmen İzolasyonu

Hastalık etmenlerinin izolasyonu amacıyla, sörveyler sırasında toplanan ve +4 °C'de buzdolabında saklanan belirtili fındık bitkisi dokularının özellikle lezyonların aktif olduğu ilerleyen kenar kısımlarından veya taze, yeni oluşmuş belirtilerden, steril bir bistüri yardımıyla yaklaşık 1-2 mm × 2-4 mm boyutlarında küçük doku parçaları kesilerek çıkarılmıştır. Alınan bu doku parçaları, yüzeylerinde bulunabilecek epifitik ve diğer kontaminant mikroorganizmaları uzaklaştırmak amacıyla öncelikle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Bu işlem için yaprak gibi narin bitki organlarında %70'lik etil alkol içerisinde 45 saniye ile 1 dakika arasında bekletme, zuruf, sürgün gibi daha kalın bitki organlarında ise %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 1 dakika muamele ve ardından birkaç kez steril saf su ile dikkatlice durulama işlemi uygulanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan ve fazla suyu steril kurutma kâğıdı ile alınmış olan doku parçaları, içerdikleri bakterilerin süspansiyon haline geçmesini sağlamak amacıyla steril bir havan içerisinde, 3-5 mL steril steril fizyolojik su eklenerek havaneliyle dikkatlice ezilmiş

ve bakterilerin sıvı ortama difüzyonunu sağlamak amacıyla yaklaşık 60 dakika oda sıcaklığında steril kabin içerisinde bekletilmiştir. Elde edilen bu ham bakteri süspansiyonundan öze ile *Xanthomonas*'ların gelişimi için yarı seçici olan YPGA ve YGCA besi yerlerine ekilmiştir. Ekim işlemi, steril bir öze kullanılarak çizgi ekim tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılmış olan petri kapları, ağızları alta gelecek şekilde, 26-28 °C sıcaklıkta, tipik koloniler gelişinceye kadar inkübasyona bırakılmış ve gelişmeleri sürekli takip edilmiştir.

İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri arasından *Xanthomonas* koloni tipinde benzerlik gösterenler seçilmiştir. Seçim kriteri olarak 2-3 mm çapında, sarı renk tonlarında, mukoid (sümüksü, yapışkan) bir kıvamda, parlak bir yüzeye sahip, konveks (kubbemsi, kabarık) yapıda ve düzgün, yuvarlak kenarlı koloniler seçilmiştir (EPPO, 2004).

Seçilen koloniler saf kültür elde etmek amacıyla steril öze yardımıyla taze hazırlanmış NA besi yerine, çizgi ekim yöntemi kullanılarak ekilerek geliştirilmiştir. Saflaştırılan izolatlar daha sonraki aşamalarda yapılacak olan biyokimyasal, moleküler ve patojenisite testlerinde kullanılmak üzere ve uzun süreli muhafaza amacıyla %40'lık steril gliserol içeren Nutrient Broth (NB) sıvı besi yerinde kriyojenik tüplerde -20 °C ve -80 °C derin dondurucularda saklanmıştır.

2.2.2 Biyokimyasal Testler

Saflaştırılan ve *Xanthomonas* olduğundan şüphelenilen bakteri izolatlarının tanımlanmasını daha ileri düzeyde desteklemek ve fenotipik özelliklerini karakterize etmek amacıyla, uluslararası standartlarda kabul görmüş ve özellikle Pulawska vd. (2010) tarafından Xac için kullanılmış bir dizi temel biyokimyasal ve fizyolojik test uygulanmıştır. Bu testler, izolatların beklenen reaksiyonları verip vermediğini kontrol etmek ve literatürdeki diğer Xac suşlarıyla karşılaştırmalar yapmak için temel oluşturmuştur.

Gram Reaksiyonu

Gram reaksiyonunun belirlenmesi için Gram boyama testi yerine, bakterilerin Gram-negatif veya Gram-pozitif ayrımını hızlı bir şekilde yapmak amacıyla %3'lük potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi kullanılarak KOH testi yapılmıştır (Öztürk, 2023). Bu testte, bir cam lam veya plastik petri kapağı üzerine taze bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak üzerine solisyon haline getirilmiş %3 KOH çözeltisinden bir damla damlatılmış ve 10-15 saniye iyice karıştırılmıştır. Steril öze ile yukarı doğru çekildiğinde ipliksi, sümüksü bir uzama olup olmadığı gözlemlenmiştir; bu tür bir uzamanın varlığı ile KOH pozitif yani Gram-negatif olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz Aktivitesi

İzolatların katalaz aktivitesinin varlığı, bir lam veya plastik petri kapağı üzerine alınan bakteri kültürüne bir damla %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi damlatılması ve hemen ardından gaz kabarcığı çıkışının (pozitif reaksiyon) olup olmadığının dikkatlice gözlemlenmesiyle saptanmıştır (Vauterin vd., 1995). Burada dikkat edilmesi gereken konu H_2O_2 'nin metal nesneler ile etkileşime girebilecek olması nedeniyle damlatılma işlemi sonrası metal nesne kullanılmaması gerektiğidir.

Oksidaz Aktivitesi

Oksidaz aktivitesi ise steril filtre kağıdı üzerine bakteri kolonilerinden bir öze dolusu alınıp sürülerek üzerine %1'lik solisyon haline getirilmiş N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür damlatılması ve 10-30 saniye içinde şeritte mavi-mor bir renk gelişiminin olup olmadığının kontrol edilmesiyle belirlenmiştir (Pulawska vd., 2010).

Hugh ve Leifson'un Oksidatif ve Fermantatif Metabolizması Aktivitesi

Bakterilerin glukozu metabolize etme şeklini belirlemek amacıyla, Hugh ve Leifson'un oksidatif-fermantatif besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri otoklav edildikten sonra 10 mL hacimdeki tüpler içerisine 4,5 mL besiyeri ve soğuk sterilizasyon yapılmış ve solisyon haline getirilmiş %0,03'lük Bromthymol blue'dan 0,5 mL eklenerek hazırlanan tüplere öze ile daldırma şeklinde izolatlar aşılanmıştır. 3 tekerürlü 2 set olacak şekilde toplam 6 tüp halinde hazırlanmış tüplerden; bir setin üzeri 1 mL %1,2'lik eritilmiş steril agar ile örtülerek anaerobik (fermantatif) koşullar sağlanmış, diğer set ise aerobik (oksidatif) koşullar için açık bırakılmıştır. Agar yerine eritilmiş agaroz, eritilmiş vaspar veya steril mineral yağ da kullanılabilir. Bu tüpler 26-28 °C'de 2-4 gün inkübe edilmiş ve besi yerindeki renk değişimine (asit üretimi sonucu sararma) bakılarak oksidatif veya fermentatif metabolizma varlığı değerlendirilmiştir (Vauterin vd., 1995).

NaCl Tolerans Aktivitesi

İzolatların belirli fizyolojik koşullara toleransı da incelenmiştir. Bu amaçla, izolatlar standart NA üzerine %2 ve %5 olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda sodyum klorür (NaCl) eklenerek hazırlanan besi yerlerine ekilmiş ve 26-28 °C'de inkübe edilerek gelişme durumları kaydedilmiştir (Öztürk, 2023).

35 °C'de Gelişim

Gelişme sıcaklığı limitlerini belirlemek için ise, normal NA besiyerlerine ekilen izolatlar 35 °C ve 37 °C gibi farklı sıcaklıklarda ayrı ayrı inkübe edilmiştir; Xac'ın 35 °C'de gelişebildiği (Pulawska vd., 2010) ancak 37 °C'de gelişemediği ya da çok az geliştiği bilinmektedir (Palacio-Bielsa vd., 2011).

Karbon Kaynaklarının Kullanımı

Karbon kaynaklarının kullanımı için Lelliott ve Stead (1987) ve Pulawska vd. (2010) tarafından belirtilen, özellikle *X. arboricola* türlerinin tanımlamasına ve ayrımında yardımcı olan glukoz, sukroz, L-arabinoz, maltoz ve mannitol gibi karbon kaynakları incelenmiştir; bu testlerde Xac suşları arasında zaman zaman farklı sonuçlar alınabileceği önceki çalışmalarda belirtilmiştir.

Hipersensitif Reaksiyon

İzolatların patojenliğini test eden hipersensitif reaksiyon testi öncelikle tütün bitkisinde denenmiş burada pozitif olanlar ayrılmış, negatif olanlar ise ayrıca domates bitkisinde de hipersensitif karakter açısından değerlendirilmiştir. Bu amaçla NA besiyerinde taze olarak geliştirilen bakteri kolonilerinden spektrofotometre ile 1×10^8 CFU/mL yoğunlukta süspansiyonlar hazırlanmış ve bu süspansiyonlar steril iğnesiz bir şırınga yardımıyla tütün yapraklarının alt kısımlarına yaprak mezofiline süspanse edilmek suretiyle infiltre edilmiştir. İnfiltrasyondan sonraki 24-48 saat içinde tütün yapraklarında hızlı bir doku çökmesiyle ilk aşamada şeffaf bir zone gibi görünen sonraki saatlerde ise nekroz ile karakterize edilmiştir. Benzer şekilde domates bitkisinde de değerlendirmeler yapılmıştır.

2.2.3 DNA İzolasyon Protokolü

Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak yüksek saflıkta ve yeterli yoğunlukta genomik DNA'nın elde edilmesi, sonraki analizlerin güvenilirliği açısından kritik bir adımdır. Bu çalışmada, hem saflaştırılmış ve Xac olduğundan şüphelenilen bakteri izolatlarından hem de gerektiğinde fındık bitki dokularından genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemlerinde, bitki ve bakteri DNA'sı elde edilmesi için uygunluğu onaylanmış olan GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılmış ve tüm adımlar kit üreticisinin standart protokolüne eksiksiz uyularak uygulanmıştır.

Bakteriyel genomik DNA izolasyonu için, NA besiyerinde 26–28 °C'de 24–48 saat inkübe edilen taze ve saf kültürlerden hücre pelletleri toplanmış, kitin ön hazırlık aşamalarını takiben liziz işlemi uygulanarak DNA açığa çıkarılmıştır. Fındık yapraklarından izolasyonda ise genç ve sağlıklı dokular, öncelikle sıvı azot altında steril havanda mekanik olarak öğütülüp homojenize edilmiş, ardından kit protokolü doğrultusunda liziz ve safsızlık giderme adımları yürütülmüştür. Bu ticari kit yaklaşımı, bitki dokularında bol miktarda bulunan sekonder metabolit ve polisakkaritlerin yanı sıra PCR inhibitörlerinin uzaklaştırılmasına imkân tanıyarak analizler için uygun kalitede DNA elde edilmesini sağlamıştır.

Elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık kontrolleri, Denovix DS-11 FX+ NanoDrop spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonu ng/μL cinsinden saptanmış; saflık düzeyi, protein kontaminasyonunu gösteren A₂₆₀/A₂₈₀ oranı (~1,8) ve organik kalıntıları gösteren A₂₆₀/A₂₃₀ oranı (~2,0–2,2) ile değerlendirilmiştir. Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre uygun örnekler, kullanıcı ihtiyaçlarına göre 20 ng/μL veya 50 ng/μL çalışma konsantrasyonuna ayarlanarak –20 °C’de muhafaza edilmiştir (Özer vd., 2023).

2.2.4 Patojenisite Çalışmaları

Bu çalışmada, biyokimyasal testleri yapılan ve XarbQ primeriyle *X. arboricola* olduğu doğrulanan izolatların hastalık yapma yetenekleri test edilmiştir. Bu amaçla bir yaşındaki, sağlıklı ‘Tombul’ fındık fidanları kullanılmıştır.

Patojenisite testleri için inokulum, her bir izolatın NA besiyerinde 26–28 °C’de 48 saat inkübe edilen taze kültürlerinden hazırlanmıştır. Gelişen bakteri biyokütlesi, steril fizyolojik tuz çözeltisinde süspanse edilerek spektrofotometrik yöntemle yaklaşık 1×10⁸ CFU/mL’ye ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon, fidanların genç ve tam açılmış yapraklarının hem üst hem de alt yüzeylerine el pülverizatörü ile eşit olarak püskürtülmüştür. Her izolat için ayrı fidan grupları hazırlanmış; pozitif kontrol olarak RIPF X23, negatif kontrol olarak ise yalnızca steril su aynı koşullar altında uygulanmıştır. İnokülasyonu takiben fidanlar, 26–28 °C ve %70–80 nispi nemin korunduğu bir iklim odasına alınmış, yüksek nemin sürekliliği için ilk 48–72 saat boyunca şeffaf plastik torbalarla örtülmüştür (Pulawska vd., 2010).

Bitkiler, inokülasyondan sonraki 1–3 haftalık dönemde düzenli aralıklarla gözlemlenmiş; yapraklarda nekrotik lezyonlar, yağ lekesi ya da su-emmiş lezyon görünümü ve sararma gibi hastalık belirtileri kaydedilmiştir (EPPO, 2004). Her bir izolatın fındık yapraklarındaki hastalık şiddeti, Akın (2012) tarafından fındık bakteriyel yanıklık için önerilen ve lezyon yüzdesine dayanan 1–4 skalası kullanılarak belirlenmiştir:

- 1: Yaprak alanının ≤ %25’i lezyonlu
- 2: Yaprak alanının %25–50’si lezyonlu
- 3: Yaprak alanının %50–75’i lezyonlu
- 4: Yaprak alanının > %75’i lezyonlu

Elde edilen lezyon derecesi verileri, izolatlar arasındaki virülans farklılıklarının karşılaştırılmasında kullanılmış; ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılıklar One-way ANOVA ve Fisher's LSD testi ile XLSTAT programı (version 2016.02.28451, Addinsoft, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Koch postulatlarının son aşaması olarak, semptomlu dokulardan steril koşullarda bakteri yeniden izole edilerek orijinal izolatlarla morfolojik ve

biyokimyasal özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Negatif kontrol bitkilerinde hastalık semptomu gözlenmemesi ve etmen izolasyonunun başarısız olması, deneylerin geçerliliğini pekiştirmiştir.

Kontrollü iklim odası koşullarında yürütülen bu patojenisite testleri, tarla koşullarındaki çevresel değişkenliklerin etkisini ortadan kaldırarak güvenilir ve tekrarlanabilir veriler elde edilmesini sağlamıştır (Pulawska vd., 2010).

2.2.5 Moleküler Çalışmalar

2.2.5.1 PCR Çalışmaları ve Protokolü

Xac olduğundan şüphelenilen izolatların tür düzeyinde doğrulanması amacıyla, *qumA* geninin özgün bir bölgesini hedefleyen XarbQ-F ve XarbQ-R primer çifti kullanılarak konvansiyonel PCR çalışması gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonları, optimize edilmiş koşullarda T100 model termal döngü cihazı (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak yürütülmüştür.

Reaksiyon karışımları 50 µl hacminde hazırlanmış; bu karışımlarda 1× PCR tamponu, her bir dNTP'den 0,2 mM, 2 mM MgCl₂, her primerden 0,2 µM, 1,25 U *Taq* DNA Polimeraz (New England Biolabs, Beverly, MA, ABD) ve 50 ng genomik DNA (1 µl) yer almıştır. Termal döngü protokolü, 95 °C'de 3 dk ön aktivasyon ile başlatıldıktan sonra 30 döngü boyunca 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 54 °C'de 30 sn annealing ve 72 °C'de 60 sn uzama aşamalarını içermiş; son uzatma adımı ise 72 °C'de 7 dk süreyle gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyon sonucunda ortaya çıkan yaklaşık 402 bp'lik spesifik fragment, %1,4 agaroz jelde elektroforez ve etidyum bromür boyaması sonrasında G:BOX F3 (Syngene, Cambridge, İngiltere) sistemi ile görüntülenmiştir.

2.2.5.2 Elektroforez Protokolü

Elektroforez analizleri için %1,4 yoğunluğunda Prona marka agaroz (BIOMAX, Ardoz-Madrid, İspanya) kullanılarak hazırlanan jeller, 1× TAE tamponu içerisinde mikrodalga fırında homojen bir kıvam alana dek ısıtıldıktan sonra yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutulmuş ve uygun sayıda kuyucuk oluşturmak üzere tarak yerleştirilmiş jel tepsilerine dökülmüştür. Jeller, oda sıcaklığında 20–30 dakika boyunca katılaştıktan sonra taraklar çıkarılmış ve elektroforez tankına aktarılmıştır; tank, jelin üzerini kaplayacak şekilde 1× TAE tamponu ile doldurulmuştur. PCR reaksiyonlarından alınan 10 µl'lik ürünler, bromofenol mavisi içeren 6× yükleme boyası ile 1:5 oranında karıştırılarak kuyucuklara özenle yüklenmiştir. Çalışma 120 V'luk sabit gerilim altında 90 dakika devam ettirilmiştir; aynı kuyucuklara GeneRuler 100 bp+ DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) yüklenerek moleküler ağırlık

tayini sağlanmıştır. Elektroforez tamamlandıktan sonra jeller, $1\times$ TAE tamponu içindeki 0,5 $\mu\text{g/mL}$ etidyum bromür çözeltisinde yaklaşık 15 dakika boyanıp fazla boya distile su ile uzaklaştırılmıştır. Son adımda, bant görselleştirmesi UV transillüminatör veya G:BOX F3 (Syngene, Cambridge, İngiltere) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir; özellikle XarbQ primer çiftiyle amplifiye edilen ve ~402 bp boyutunda beklenen spesifik bantların varlığı ve yoğunluğu bu görüntüler üzerinden değerlendirilmiştir.

2.2.5.3 İzolatlar arasında SCoT Profili Oluşturma

XarbQ primeriyle ve patojenisite ile doğrulanan izolatlar arasındaki genetik çeşitliliğin ve olası klonal ilişkilerin belirlenmesi amacıyla Start Codon Targeted (SCoT) polimorfizm markör sistemi kullanılarak DNA parmak izi profilleri oluşturulmuştur. SCoT markörleri, izolatların genomik farklılıklarına dayalı olarak benzer genetik yapıya sahip bireyleri gruplandırmaya ve popülasyondaki genetik varyasyonu kantitatif olarak ortaya koymaya yönelik bir araç olarak uygulanmıştır. Bu yaklaşım, genetik mesafelerin hesaplanmasına, benzerliğe dayalı gruplamaların yapılmasına ve popülasyon yapısının anlaşılmasına imkân tanımıştır. Ayrıca farklı genetik altyapıya sahip izolatların daha sonraki tanısal çalışmalarda seçilmesine yardımcı olmuştur. Analizlerde, farklı organizmalarda polimorfizm oluşturduğu ve genetik çeşitlilik analizlerinde başarılı sonuçlar verdiği kanıtlanmış olan ve Collard ve Mackill (2009) tarafından tasarlanan ve Tekin vd. (2024) tarafından kullanılan SCoT 32 primeri ve ilgili protokoller esas alınmıştır.

SCoT-PCR amplifikasyonları, 20 μL hacminde hazırlanmış reaksiyon karışımları ile gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon; DreamTaq DNA polimeraz tamponu ($1\times$ MgCl_2 içeren), 0,2 mM her bir dNTP, 0,8 μM SCoT 32 primeri, 1 U DreamTaq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ve 1 μL (20 ng) genomik DNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Uygulanan termal döngü programı; 95 °C’de 3 dk ön denatürasyon, ardından 35 döngü boyunca 95 °C’de 1 dk denatürasyon, 50 °C’de 1 dk annealing ve 72 °C’de 2 dk uzama adımlarından oluşmuş; son uzatma ise 72 °C’de 10 dk sürmüştür. Tüm amplifikasyonlar, T100 termal döngü cihazı (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak uygulanmıştır.

Amplifikasyon sonucunda elde edilen bant profilleri, “Elektroforez Protokolü” başlığı altındaki koşullarda %1,4 agaroz jelde elektroforez ve etidyum bromür boyaması sonrasında görüntülenmiştir. Belirgin bantların varlığı (1) veya yokluğu (0) şeklinde kodlanarak oluşturulan ikili veri matrisi; genetik benzerlik katsayılarının hesaplanması, UPGMA dendrogramlarının oluşturulması, AMOVA ve PCoA analizlerinin yapılması ile izolatların genetik yapısı incelenmiştir.

2.2.5.4 Sekans Bilgisi ve Verilerin Analizi

Çalışmada, *rpoD* gen bölgesinin çoğaltılması amacıyla, "PCR Çalışmaları ve Protokolü" başlığında detayları verilen PCR mix içerikleri kullanılmış ve aşağıda belirtilen PCR protokolü uygulanmıştır. Primer olarak "Primer Listesi" başlığı altında belirtilen XrpoD1F ve XrpoD1R primer çifti kullanılmıştır. Bu primer çiftleriyle;

- Başlangıç denatürasyonu: 94 °C, 3 dakika
- 30 döngü:
 - Denatürasyon: 94 °C, 30 saniye
 - Bağlanma (annealing): 54 °C, 30 saniye
 - Uzama (extension): 72 °C, 1 dakika
- Son uzama: 72 °C, 5 dakika

PCR işlemi yürütülmüş, amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra, elde edilen PCR ürünleri, dizileme çalışmalarına temel oluşturacak şekilde, "Elektroforez Protokolü" başlığında belirtilen prosedürlere göre 50 µL olacak şekilde agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Dizileme için uygun kalitede ve doğru boyutta bant verdiği belirlenen izolatların PCR ürünleri, kullanılan XrpoD1F ve XrpoD1R primerleri ile birlikte çift yönlü DNA dizilemesi için Macrogen (Seul, Güney Kore) firmasına gönderilmiştir.

Firma tarafından gönderilen ham sekans verileri (kromatogramlar), öncelikle baz kalitesini ve olası hataları değerlendirmek amacıyla FinchTV v1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA, ABD) yazılımı kullanılarak görsel olarak incelenmiştir. Bu aşamada, düşük kaliteli bazlar, sekans uçlarındaki belirsiz kısımlar ve primer dizileri manuel olarak düzeltilmiş veya kesilerek çıkarılmıştır. Her bir izolatın *rpoD* gen bölgesi için elde edilen forward ve reverse sekanslar, örtüşen bölgeler kullanılarak birleştirilmiş ve her bir amplikon için ortak bir DNA dizisi oluşturulmuştur. Bu birleştirme işlemi için MEGA 12 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar vd., 2024) yazılımının sekans birleştirme araçları kullanılmıştır.

Oluşturulan ortak *rpoD* sekansları, National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank nükleotit veri tabanındaki (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sekanslarla karşılaştırılarak BLAST analizi (NCBI BLASTn, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) yapılmıştır. Bu analiz ile izolatların genel tanısı ve diğer *Xanthomonas* türleri, özellikle de *X. arboricola* patovarylarına ait referans sekanslarla en yakın akrabalıkları hakkında ön bilgiler edinilmiştir.

Daha detaylı filogenetik analizler için, elde edilen izolat sekansları ile GenBank'tan indirilen referans *Xac* suşları, diğer *X. arboricola* patovaryları ve uygun bir dış grup (outgroup) olarak seçilen diğer *Xanthomonas* türlerine ait homolog *rpoD* gen bölgesi sekansları bir araya

getirilmiştir. Bu sekanslar, MEGA 12 yazılımı içerisinde bulunan ClustalW algoritması (Thompson vd., 1994) kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanmış veri seti kullanılarak, filogenetik ağaçlar Maximum Likelihood (ML) algoritması ile MEGA 12 yazılımında oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç dallarının istatistiksel güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla 1000 tekrarlı bir bootstrap analizi yapılmış ve dallara ait bootstrap destek değerleri hesaplanmıştır.

Oluşturulan filogenetik ağaçlar; izolatların referans *Xac* suşları ve diğer *X. arboricola* patovaryları ile olan kümelenme (clustering) desenleri, dallanma yapıları ve bootstrap destek değerleri dikkate alınarak yorumlanmıştır. Bu analizler, izolatların tür ve patovar düzeyinde kesin teşhisinin doğrulanmasına, *Xac* popülasyonu içindeki genetik ilişkilerin ve olası alt grupların belirlenmesine olanak tanımıştır.

2.2.6 Real-time çalışmalarında kullanmak üzere *X. arboricola*'ya özgü spesifik primer tasarlanması

Bu amaçla izolatların *gyrB* gen bölgesine ait sekans verileri ile *Xanthomonas* cinsinin farklı türlerine ait sekanslar kullanılmıştır. *Xanthomonas arboricola*'ya spesifik primer optimizasyonları ise Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>; Untergasser et al., 2012) ve IDT'nin UNAFold (<https://eu.idtdna.com/unafold/>) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan primerlerin NCBI veri tabanında kayıtlı olan tüm DNA dizilerine karşı spesifiteleri ile %GC içeriği, erime sıcaklıkları ve olası ampikon ürün uzunlukları NCBI'nin Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) aracı kullanılarak in silico olarak değerlendirilmiştir. Bu in silico analizlerle, tasarlanan özgül primerlerin öncelikle fındık genomu ve veri tabanlarındaki diğer ilişkili veya ilişkisiz organizmalarla potansiyel bir amplifikasyon yapıp yapmadığı titizlikle kontrol edilmiştir. Spesifikite analizlerinin bir sonraki aşamasında, primerlerin özgüllüğünü doğrulamak amacıyla, qPCR çalışmalarına kontrol olarak fındık DNA'sı eklenmiş ve doğrulanmıştır. Böylece primerlerin yalnızca *X. arboricola*'ya özgü ürün oluşturup oluşturmadığı kesinleştirilmiştir.

2.2.7 *Xac*'nın Kantitatif Tespiti için SYBR Green I Tabanlı real-time PCR Analizleri

Xac'nın hem saf kültürlerden izole edilen genomik DNA'dan hem de doğrudan fındık bitki dokularından kantitatif olarak tespiti ve miktar tayini amacıyla, *X. arboricola*'ya özgü tasarlanmış spesifik primer çiftleri kullanılarak SYBR Green I temelli qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonunun kalitesi, qPCR analizlerinin hassasiyeti ve güvenilirliği açısından kritik bir öneme sahip olduğundan, bu aşamaya özel bir titizlik gösterilmiştir. Saf Xac kültürlerinden DNA izolasyonu, 'DNA izolasyon protokolü başlığına' göre gerçekleştirilmiştir.

SYBR Green I temelli qPCR analizleri, Bio-Rad CFX96 qPCR Sistemi (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR reaksiyonu, toplam 20 µL hacimde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; 2× konsantrasyonda SYBR Green içeren RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon, Odense, Danimarka), *X. arboricola*'ya özgü forward ve reverse primerlerden her biri için 0,25 µM son konsantrasyon ve 10 ng 1 µL genomik DNA ve moleküler saflıkta su içermiştir. qPCR termal döngü protokolü şu adımları kapsamıştır: 95 °C'de 2-3 dakikalık başlangıç denatürasyon aşaması; 45 döngü 95 °C'de 15 saniye denatürasyon, 62 °C'de 30 saniye primer bağlanması ve DNA uzaması. Çoğaltma döngülerinin tamamlanmasının ardından, SYBR Green I boyasının spesifik olmayan ürünlere veya primer dimerlerine bağlanması sonucu oluşabilecek yanlış pozitif sinyalleri elimine etmek ve ampikonun özgüllüğünü doğrulamak amacıyla erime eğrisi (melt curve) analizi yapılmıştır. Bu analizde, sıcaklık 65 °C'den 95 °C'ye kademeli olarak (her adımda 0,5 °C artışla) yükseltilirken floresan sinyalindeki değişiklikler sürekli olarak kaydedilmiştir.

Xac DNA'sının kantitatif tayini için, 10 ng'den 0,01 pg'a kadar logaritmik seyreltmelerle saf Xac genomik DNA'sı kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuştur. Bilinmeyen örneklerden elde edilen kantifikasyon döngüsü (Cq) değerleri, bu standart eğri ile karşılaştırılarak örneklerdeki başlangıç Xac DNA miktarı hesaplanmıştır. Standart eğri verilerinden hareketle, qPCR reaksiyonunun verimliliği (Efficiency, E), doğrusallık katsayısı (R²) ve yöntemin analitik hassasiyetini ifade eden tespit limiti (Limit of Detection, LoD) gibi performans parametreleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, qPCR ürünlerinin varlığı ve beklenen ampikon boyutunun doğruluğu, agaroz jel elektroforezi ile teyit edilmiştir.

2.2.8 Xac ile Çeşit Reaksiyon Çalışması

Bu çalışmanın önemli hedeflerinden biri, Türkiye'de ve dünyada yetiştiriciliği yapılan bazı önemli fındık çeşitlerinin Xac'ya karşı gösterdikleri reaksiyon düzeylerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması olmuştur. Bu amaçla kontrollü koşullar altında bir çeşit reaksiyon denemesi yürütülmüştür. Denemede kullanılan fındık çeşitleri; 'Çakıldak', 'Tombul', 'Yomra', 'Kalınkara', 'Palaz', 'Karafındık', 'Mincane' (Akın, 2012) ile 'Nocchione', 'Tonda di Giffoni' ve 'Tonda Romana' olmuştur (Contarini vd., 2024; Scortichini vd., 2002). Bu çeşitlerin seçiminde, ekonomik önemleri, yaygınlıkları ve literatürde farklı hassasiyet seviyelerine sahip

olabileceklerine dair ön bilgiler dikkate alınmıştır. Temin edilmiş fındık çeşitlerinden 'Mortarella' bitkileri kurumalar nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır.

Denemede kullanılacak bitki materyali önceki bölümlerde detaylandırıldığı gibi 1 yaşındaki, sağlıklı fındık fidanlarından oluşmuştur. Her bir fındık çeşidi için 3 tekerrür kullanılarak tesadüf blokları deneme desenine göre bir düzenleme yapılmıştır. Fidanlar, inokülasyon öncesinde ve sonrasında kontrollü iklim odası koşullarında 26-28 °C sıcaklık, %60-70 nispi nem ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık aydınlatma ile saklanmıştır.

İnokulum kaynağı olarak patojenisite çalışmaları sonucunda virülans kabiliyeti yüksek olduğu belirlenmiş yerel bir Xac izolatı seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilen her bir fındık çeşidine, 'Patojenisite çalışmaları' bölümünde detaylandırılan inokülasyon protokolü uygulanmıştır. İnokülasyon işlemi, bitkilerin stomalarının daha açık olduğu akşam saatlerinde yapılmış ve enfeksiyonun yerleşmesini teşvik etmek amacıyla inokülasyonu takiben ilk 48 saat boyunca bitkiler yüksek nem koşulları altında olması amacıyla üzerleri şeffaf plastik torbalarla örtülerek tutulmuştur. Kontrol olarak steril su püskürtülmüştür.

Hastalık belirtilerinin gelişimi, inokülasyondan sonraki 3-4 hafta boyunca düzenli aralıklarla gözlemlenmiş ve kaydedilmiştir (Akın & Aygün, 2021; EPPO, 2004). Hastalık değerlendirmesi yaprak lezyon oranı dikkate alınmıştır:

Yaprak Lezyon Derecesi: Her bir fidan için tesadüfi olarak seçilen 10 adet yaprak üzerinde, lezyonların yaprak ayasında kapladığı alanın yüzdesin bir skala kullanılarak hastalık şiddeti değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, Akın (2012) tarafından fındık bakteriyel yanıklık hastalığı için kullanılan 1-4 skalası esas alınmıştır. Bu skala şunu temsil etmektedir:

- 1: Yaprak alanının %25'ine kadar olan kısmında lezyon varlığı.
- 2: Yaprak alanının %25 ila %50'si arasında lezyon varlığı.
- 3: Yaprak alanının %50 ila %75'i arasında lezyon varlığı.
- 4: Yaprak alanının %75'inden daha fazlasında lezyon varlığı ve/veya yaprakta şiddetli nekroz ve dökülme.

Elde edilen enfekteli yaprak yüzdesi ve yaprak lezyon derecesi verileri, One-way ANOVA ve Fisher's LSD testi ile XLSTAT programı kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı fındık çeşitlerinin Xac'a karşı gösterdiği reaksiyonlar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla varyans analizi (ANOVA) ve ortalamaların karşılaştırılması testleri (LSD) uygulanmıştır. Bu analizler sonucunda, denemede yer alan fındık çeşitleri Xac'a karşı gösterdikleri reaksiyonlara sıralanmışlardır. Bu bilgiler, Xac ile mücadelede dayanıklı çeşitlerin seçimi ve kullanımı ile gelecekteki fındık ıslahı çalışmalarına temel oluşturması açısından değerlendirilmiştir.

2.2.9 Real-time ile Dokudan Tespit Çalışmaları

Çeşit reaksiyon çalışmalarında hastalık şiddeti düşük çıkan ve yüksek çıkan çeşitlerden 1.gün, 3.gün ve 5.günde yaprak örnekleri alınmış daha sonra bu yaprak örneklerinin DNA'ları 'DNA İzolasyon Protokolü' başlığındaki yönteme göre elde edilmiştir. Buradan elde edilen genomik DNA ile ' Xac'nın Kantitatif Tespiti için SYBR Green I Tabanlı real-time PCR Analizleri' başlığındaki protokole göre yeni tasarlanan primer çifti ile real-time çalışmaları yapılmıştır.



3. BULGULAR

3.1 *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) İzolatlarının Eldesi ve Tanımlanması

Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'ndeki fındık üretim alanlarından (Bolu, Düzce, Sakarya, Samsun, Ordu) ilkbahar, yaz ve sonbahar vejetasyon periyotlarında toplanan ve fındık bakteriyel yanıklık hastalığı belirtileri gösteren bitki örnekleri laboratuvara getirilmiştir (Fotoğraf 3.1, Fotoğraf 3.2, Tablo 3.1).

Bu örneklerden, özellikle yaprak lezyonları, zuruflar ve enfekteli tomurcuklardan yapılan izolasyonlarda daha yüksek başarı elde edilmiştir. Standart izolasyon prosedürleri ve YPGA besi yeri kullanılarak yapılan ekimler sonucunda, *Xanthomonas* kolonilerine benzeyen sarı renkli, mukoid, parlak, konveks 70 bakteri izolatu saf olarak elde edilmiştir (Fotoğraf 3.3; Fotoğraf 3.4). Morfolojik, biyokimyasal testler gibi klasik yöntemlerle 70 izolatın 28'i literatür bilgilerine uygun sonuçlar vermiş diğer izolat adayları ise elemine edilmiştir. Bu izolatlardan klasik testlerle Xac'ya uyumlu olan 28 tanesi daha sonra *X. arboricola*'ya özgü moleküler primer olan XarbQ primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda tür düzeyinde doğrulanmıştır. Tür düzeyinde doğrulanan izolatların patojenik özellikleri patojenisite testiyle testlenmiş ve bu 28 izolatın hepsi fındık bitkisinde patojenik reaksiyon göstermiştir. Patojenisite testleri sonrası virülenslik skalası oluşturulmuş ve istatistiksel analiz yapılarak izolatlar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı incelenmiştir. Daha sonra SCoT profili ile seçilen gruptan temsili olan izolatlar sekansa gönderilerek izolatların Xac olduğu doğrulanmış ve bundan sonra real-time çalışmalarına geçilmiştir.



Fotoğraf 3.1 Sörvey esnasında gözlemlenen *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* ile bulaşık yapraklar

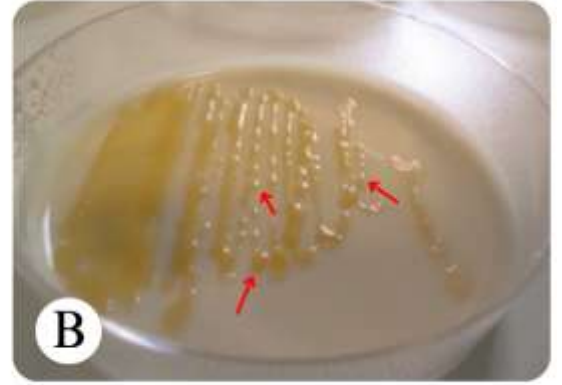
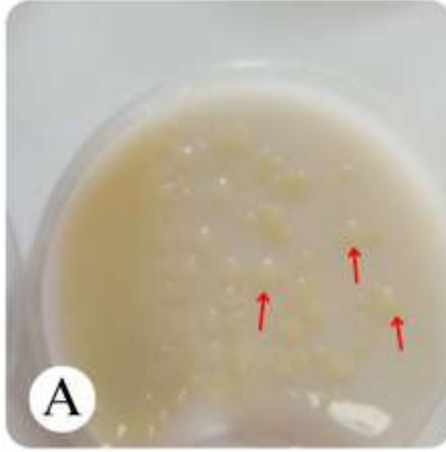


Fotoğraf 3.2 Sörvey esnasında gözlemlenen *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* ile bulaşık zuruflar

Tablo 3.1 Fındık bitkisinden elde edilen izolatların elde edildiği bahçe bilgileri

Sıra No	İzolat Adayı	Şehir	İlçe/Köy
1	BMÇa-1	Bolu	Merkez/Çayırköy
2	BMÇa-2	Bolu	Merkez/Çayırköy
3	BMÇa-3	Bolu	Merkez/Çayırköy
4	BMÇa2-1	Bolu	Merkez/Çayırköy
5	BMÇa2-2	Bolu	Merkez/Çayırköy
6	BMÇa2-3	Bolu	Merkez/Çayırköy
7	BMDö-1	Bolu	Merkez/Doğancı
8	BMDö-2	Bolu	Merkez/Doğancı
9	BMDö-3	Bolu	Merkez/Doğancı
10	BMDö2-1	Bolu	Merkez/Doğancı
11	BMDö2-2	Bolu	Merkez/Doğancı
12	BMDö2-3	Bolu	Merkez/Doğancı
13	DADö-1	Düzce	Akçakoca/Doğancılar
14	DADö-2	Düzce	Akçakoca/Doğancılar
15	DADö-3	Düzce	Akçakoca/Doğancılar
16	DADö-1	Düzce	Akçakoca/Döngelli
17	DADö-2	Düzce	Akçakoca/Döngelli
18	DADö-3	Düzce	Akçakoca/Döngelli
19	DGYe-1	Düzce	Gümüşova/Yeşilyayla
20	DGYe-2	Düzce	Gümüşova/Yeşilyayla
21	DGYe-3	Düzce	Gümüşova/Yeşilyayla
22	OAMe-1	Ordu	Altınordu/Merkez
23	OAMe-2	Ordu	Altınordu/Merkez
24	OAMe-3	Ordu	Altınordu/Merkez
25	OATe-1	Ordu	Altınordu/Terzili
26	OATe-2	Ordu	Altınordu/Terzili
27	OATe-3	Ordu	Altınordu/Terzili
28	OFBa-1	Ordu	Fatsa/Bağlarca
29	OFBa-2	Ordu	Fatsa/Bağlarca
30	OFBa-3	Ordu	Fatsa/Bağlarca
31	OFKa-1	Ordu	Fatsa/Kavraz
32	OFKa-2	Ordu	Fatsa/Kavraz
33	OFKa-3	Ordu	Fatsa/Kavraz
34	OÜMe-1	Ordu	Ünye/Merkez
35	OÜMe-2	Ordu	Ünye/Merkez
36	OÜMe-3	Ordu	Ünye/Merkez
37	OÜYu-1	Ordu	Ünye/Yunus Emre
38	OÜYu-2	Ordu	Ünye/Yunus Emre

39	OÜYu-3	Ordu	Ünye/Yunus Emre
40	SENa-1	Sakarya	Erenler/Nakışlar
41	SENa-2	Sakarya	Erenler/Nakışlar
42	SENa-3	Sakarya	Erenler/Nakışlar
43	SEPi-1	Sakarya	Erenler/Pirahmetler
44	SEPi-2	Sakarya	Erenler/Pirahmetler
45	SEPi-3	Sakarya	Erenler/Pirahmetler
46	SESa-1	Sakarya	Erenler/Sarıcalar
47	SESa-2	Sakarya	Erenler/Sarıcalar
48	SESa-3	Sakarya	Erenler/Sarıcalar
49	SHAk-1	Sakarya	Hendek/Akçayır
50	SHAk-2	Sakarya	Hendek/Akçayır
51	SHAk-3	Sakarya	Hendek/Akçayır
52	SHGü-1	Sakarya	Hendek/Güldibi
53	SHGü-2	Sakarya	Hendek/Güldibi
54	SHGü-3	Sakarya	Hendek/Güldibi
55	SÇAk-1	Samsun	Çarşamba/Akçatarla
56	SÇAk-2	Samsun	Çarşamba/Akçatarla
57	SÇAk-3	Samsun	Çarşamba/Akçatarla
58	SÇDa-1	Samsun	Çarşamba/Dalbahçe
59	SÇDa-2	Samsun	Çarşamba/Dalbahçe
60	SÇDa-3	Samsun	Çarşamba/Dalbahçe
61	SÇTu-1	Samsun	Çarşamba/Turgutlu
62	SÇTu-2	Samsun	Çarşamba/Turgutlu
63	SÇTu-3	Samsun	Çarşamba/Turgutlu
64	STSö-1	Samsun	Terme/Söğütlü
65	STSö-2	Samsun	Terme/Söğütlü
66	STSö-3	Samsun	Terme/Söğütlü
67	SÇDa-4	Samsun	Çarşamba/Dalbahçe
68	SÇDa-5	Samsun	Çarşamba/Dalbahçe
69	SÇDa-6	Samsun	Çarşamba/Dalbahçe
70	SÇTu-4	Samsun	Çarşamba/Turgutlu



Fotoğraf 3.3 Fındıktan elde edilen F1 (A) ve F24 (B) izolatlarının YGCA besiyerindeki koloni görüntüsü



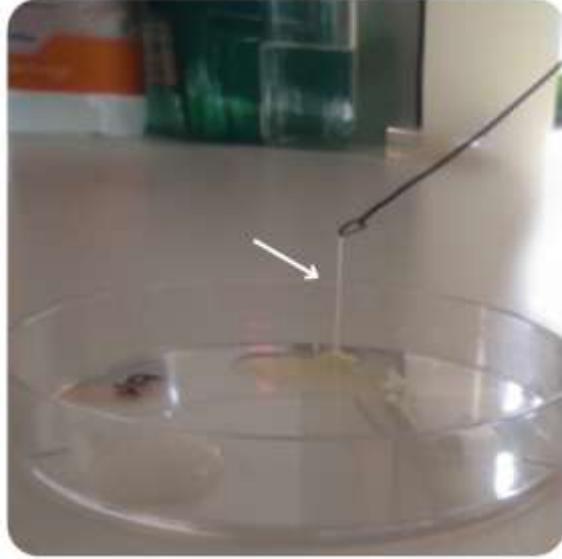
Fotoğraf 3.4 Fındıktan elde edilen F7 izolatının YPGA besiyerindeki koloni görüntüsü

3.2 Biyokimyasal ve Fizyolojik Testlerle Doğrulama

İzolatların fenotipik özelliklerini karakterize etmek ve ön tanıyı desteklemek amacıyla temel biyokimyasal ve fizyolojik testler gerçekleştirilmiştir. Bu testler, Xac için literatürde referans alınan standart prosedürlere göre uygulanmıştır.

3.2.1 KOH Testi (Gram Reaksiyonu)

Gram reaksiyonunun hızlı bir şekilde belirlenmesi amacıyla yapılan %3'lük Potasyum Hidroksit (KOH) testi sonucunda, incelenen izolatlardan 28'inin pozitif reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Pozitif tüm izolatlar, KOH çözeltisi ile karıştırılıp öze ile yukarı çekildiğinde ipliksi, sümüksü bir uzama göstermiş, bu durum izolatların Gram-negatif bakteri olduğunu doğrulamıştır (Fotoğraf 3.5).



Fotoğraf 3.5 Fındıkta elde edilen F4 izolatının KOH testi sonucu gösterdiği uzama belirtisi ve pozitif reaksiyon

3.2.2 Katalaz Aktivitesi

Bakteri izolatlarının katalaz enzim aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan test sonucunda, değerlendirmeye alınan izolatlardan 48'inin %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi ile temas ettirildiğinde hemen gaz kabarcığı çıkışı oluşturduğu ve pozitif sonuç verdiği saptanmıştır (Fotoğraf 3.6).



Fotoğraf 3.6 Fındıkta elde edilen F1 izolatının katalaz aktivitesi sonucu gösterdiği pozitif reaksiyon

3.2.3 Oksidaz Aktivitesi

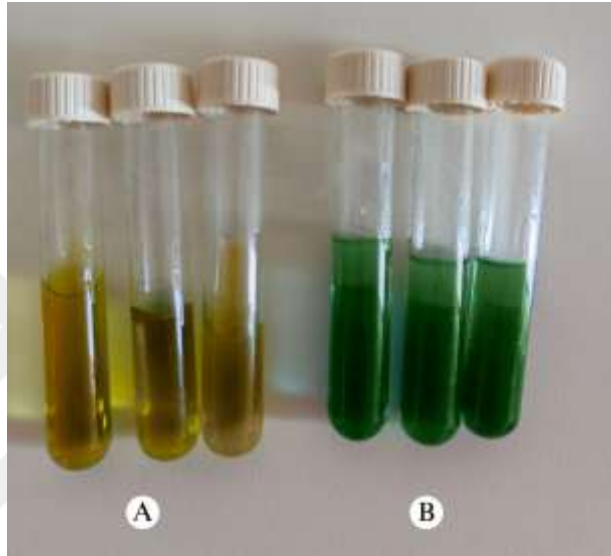
Tanımlama çalışmaları kapsamında izolatların oksidaz aktivitesi test edilmiştir. Bakteri kültürlerinin üzerine oksidaz solisyonundan damlatılması sonucunda test edilen izolatlardan 34'ünün negatif sonuç verdiği ve renk değişimine neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgu Xac için de beklenen bir sonuçtur (Fotoğraf 3.7).



Fotoğraf 3.7 Fındıktan elde edilen izolatlardan F27 izolatının oksidaz negatif sonucu ve SEPi-2 izolat adayının pozitif sonucu

3.2.4 Oksidasyon-Fermantasyon (O/F) Testi

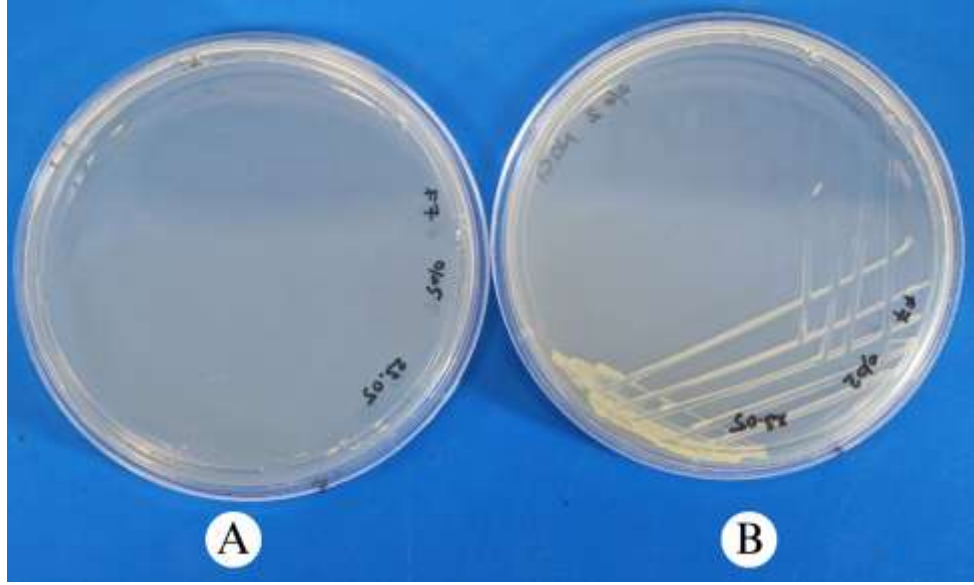
İzolatların glukozu metabolize etme şekillerini belirlemek amacıyla Hugh-Leifson'ın Oksidasyon-Fermantasyon (O/F) besi yeri kullanılarak yapılan testlerde, 48 izolatın üzeri kapatılmış besiyerinde glikozu kullanmadığı ve herhangi bir renk değişimine neden olmadığı tespit edilmiştir. Diğer izolatlar ise asit oluşumuna neden olmuştur. Bu 48 izolat aerobik koşullarda bırakılan tüplerde ise asit üretimine bağlı olarak besi yerinde sararma meydana gelmiştir. Bu sonuçlar, 48 izolatın fermentatif değil, oksidatif metabolizmaya sahip olduğunu göstermiştir.



Fotoğraf 3.8 Fındıktan elde edilen izolatların Oksidatif – Fosforilasyon testi sonucunda üzeri agar ile kapatılmamış (A) izolatların glikozu kullanması sonucu ortamın rengi yeşilden sarıya dönmüş ve üzeri agar ile kapatılmış (B) izolatların bulunduğu ortamda herhangi bir renk değişikliği olmamıştır.

3.2.5 NaCl Toleransı

İzolatların farklı sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonlarına toleransı incelenmiş ve bu amaçla izolatlar, %2 ve %5 olmak üzere iki farklı konsantrasyonda NaCl içeren NA besiyerlerine ekilmiştir. İnkübasyon sonucunda, izolatlardan 45 tanesinin %2 NaCl içeren besi yerinde normal bir şekilde geliştiği gözlenmiştir. Ancak, %5 NaCl içeren besiyerinde izolatların hiçbirinde gelişme saptanmamıştır. Bu bulgular, izolatların %2 NaCl konsantrasyonunu tolere edebildiğini ancak %5 NaCl konsantrasyonunda gelişimlerinin engellendiğini ortaya koymuştur (Fotoğraf 3.9).



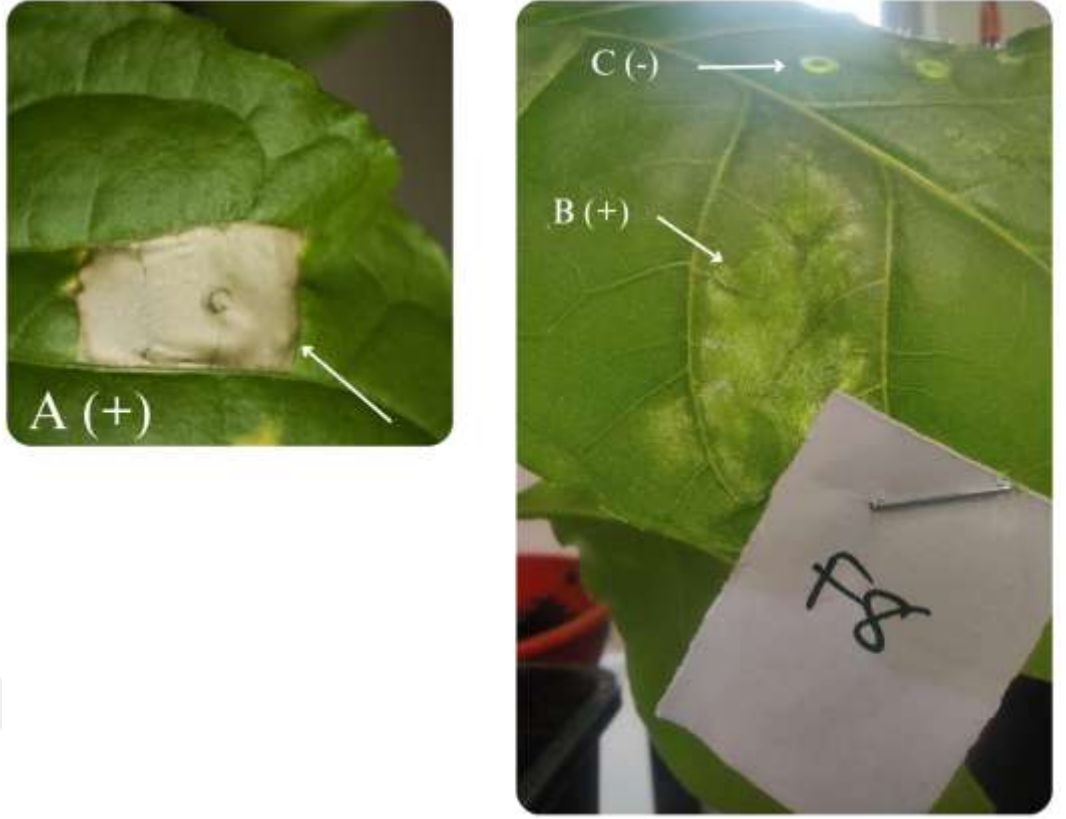
Fotoğraf 3.9 Bu çalışmada fındık bitkisinden elde edilen F7 izolatının farklı NaCl seviyelerini içeren besiyerlerindeki gelişimi, %5 NaCl içeren ortam (A), %2 NaCl içeren ortam (B)

3.2.6 Gelişme Sıcaklığı Limitleri

İzolatların farklı sıcaklıklardaki gelişme durumları incelenmiş ve bu doğrultuda izolatlar normal NA besi yerine ekildikten sonra 35 °C ve 37 °C'de ayrı ayrı inkübe edilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda, izolatlardan 37 tanesinin 35 °C'de iyi bir şekilde gelişme gösterdiği, ancak 37 °C'de izolatların hiçbirinin ya hiç gelişmediği ya da çok zayıf bir gelişme sergilediği tespit edilmiştir. Bu bulgu, Xac'ın gelişme sıcaklığı profili ile de uyumludur.

3.2.7 Tütünde Hipersensitif Reaksiyon (HR)

İzolatların hipersensitif reaksiyon oluşturma potansiyelleri incelenmiş ve 'biyokimyasal testler' başlığında belirtildiği gibi çalışmalar yapılmıştır. Bu testler sonucunda izolatlardan 26'sının tütünde hipersensitif özellik gösterdiği belirlenmiştir. Tütünde negatif sonuç veren izolatlar ayrıca domates bitkisinde de reaksiyonda tabi tutulmuş ve tütünde belirti göstermeyen 2 izolat domateste hipersensitif belirti göstermiştir. Bu sonuçlarla 28 izolatın hipersensitif karakterizasyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu bilgiler bize literatürde belirtildiği gibi Xac izolatlarının birden fazla indikatör bitkisiyle hipersensitif reaksiyon gösterebileceğini göstermiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan steril su infiltrasyonlarında ise herhangi bir reaksiyon gözlenmemiştir (Fotoğraf 3.10).



Fotoğraf 3.10 Fındık bitkisinden elde edilen izolatlardan tütün bitkisinde hipersensitif pozitif reaksiyon veren F7 (A), F8 (B) izolatı, negatif sonuç veren SÇDa-5 izolat adayı (C)

3.2.8 Karbon Kaynaklarının Kullanımı

İzolatların çeşitli karbon kaynaklarını kullanma yetenekleri, *X. arboricola* türlerinin tanımlanmasında ve ayrımında yardımcı olan glukoz, sukroz, L-arabinoz, maltoz ve mannitol gibi karbon kaynaklarını kullanma istekleri test edilmiştir. Test edilen izolatların bu karbon kaynaklarını kullanma durumları Tablo 3.2'de özetlenmiştir.

Tablo 3.2 Fındık bitkisinden elde edilen izolatların karakterizasyon testleri

İzolot Adayı/ Testler	İzolot Numarası	Glikoz	Sukroz	L-arabinoz	Maltoz	Mannitol	KOH (Gram)	Katalaz	Oksidaz	O/F	%2 NaCl	%5 NaCl	35 °C'de Gelişim	37 °C'de Gelişim	HR	Patojenisite	XarbQ Primer
BMÇa-1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Fermantatif	+	-	-	-	-	-	-
BMÇa-2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	Oksidatif	-	-	-	-	-	-	-
BMÇa-3	F1	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
BMÇa2-1	F2	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
BMÇa2-2	-	+	+	-	+	-	+	-	+	Fermantatif	+	-	-	-	-	-	-
BMÇa2-3	F3	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
BMDo-1	-	-	+	-	+	-	+	+	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
BMDo-2	F4	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
BMDo-3	-	+	-	+	+	+	+	+	+	Fermantatif	-	-	+	-	-	-	-
BMDo2-1	-	+	+	-	-	-	+	-	-	Oksidatif	+	-	-	-	-	-	-
BMDo2-2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	Oksidatif	-	-	-	-	-	-	-
BMDo2-3	F5	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
DADo-1	F6	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
DADo-2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
DADo-3	-	-	+	-	+	-	+	-	+	Oksidatif	+	-	-	-	-	-	-
DADö-1	-	+	+	-	-	+	+	-	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
DADö-2	F7	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
DADö-3	-	+	-	-	-	-	+	-	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
DGYe-1	F8	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
DGYe-2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	Fermantatif	+	-	-	-	-	-	-

DGYe-3	F9	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
OAMe-1	F10	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
OAMe-2	-	-	+	-	+	-	+	+	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
OAMe-3	-	+	+	+	+	-	+	-	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
OATe-1	F11	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
OATe-2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Fermantatif	+	-	-	-	-	-	-
OATe-3	-	+	+	-	+	-	+	-	+	Oksidatif	+	-	+	-	-	-	-
OFBa-1	-	+	+	+	+	-	+	+	-	Oksidatif	-	-	-	-	-	-	-
OFBa-2	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Oksidatif	+	-	-	-	-	-	-
OFBa-3	-	+	+	+	+	-	+	-	+	Fermantatif	-	-	+	-	-	-	-
OFKa-1	-	+	+	-	+	+	+	+	+	Oksidatif	+	-	-	-	-	-	-
OFKa-2	F12	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
OFKa-3	-	-	+	-	+	-	+	-	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
OÜMe-1	F13	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
OÜMe-2	-	+	-	-	+	-	+	-	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
OÜMe-3	F14	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
OÜYu-1	F15	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
OÜYu-2	-	+	+	-	+	-	+	-	+	Oksidatif	-	-	-	-	-	-	-
OÜYu-3	F16	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SENa-1	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Fermantatif	-	-	+	-	-	-	-
SENa-2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	Fermantatif	+	-	-	-	-	-	-
SENa-3	F17	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SEPi-1	-	+	+	-	+	-	+	+	-	Oksidatif	-	-	-	-	-	-	-
SEPi-2	-	+	+	+	+	-	+	-	+	Oksidatif	-	-	+	-	-	-	-
SEPi-3	F18	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+

SESa-1	-	+	+	-	+	-	+	-	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
SESa-2	F19	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SESa-3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	Fermantatif	+	-	-	-	-	-	-
SHAk-1	F20	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SHAk-2	-	-	+	-	+	+	+	+	+	Oksidatif	-	-	+	-	-	-	-
SHAk-3	-	+	+	-	+	-	+	-	+	Oksidatif	+	-	-	-	-	-	-
SHGü-1	F21	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SHGü-2	F22	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SHGü-3	-	+	+	-	+	-	+	+	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
SÇAk-1	-	+	+	-	-	+	+	-	-	Oksidatif	+	-	+	-	-	-	-
SÇAk-2	-	+	+	+	+	-	+	-	+	Fermantatif	+	-	-	-	-	-	-
SÇAk-3	F23	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SÇDa-1	F24	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SÇDa-2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
SÇDa-3	F25	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SÇTu-1	-	-	-	-	+	-	+	-	+	Oksidatif	+	-	+	-	-	-	-
SÇTu-2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	Oksidatif	-	-	-	-	-	-	-
SÇTu-3	-	+	+	-	+	-	+	-	+	Oksidatif	-	-	-	-	-	-	-
STSö-1	-	+	-	+	+	-	+	+	-	Oksidatif	-	-	+	-	-	-	-
STSö-2	-	+	+	-	+	-	+	-	+	Oksidatif	+	-	-	-	-	-	-
STSö-3	F26	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SÇDa-4	-	+	+	-	+	-	+	+	+	Fermantatif	-	-	-	-	-	-	-
SÇDa-5	-	+	-	-	-	-	+	-	+	Oksidatif	+	-	-	-	-	-	-
SÇDa-6	F27	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+
SÇTu-4	F28	+	+	+	+	+	-	+	-	Oksidatif	+	-	+	-	+	+	+

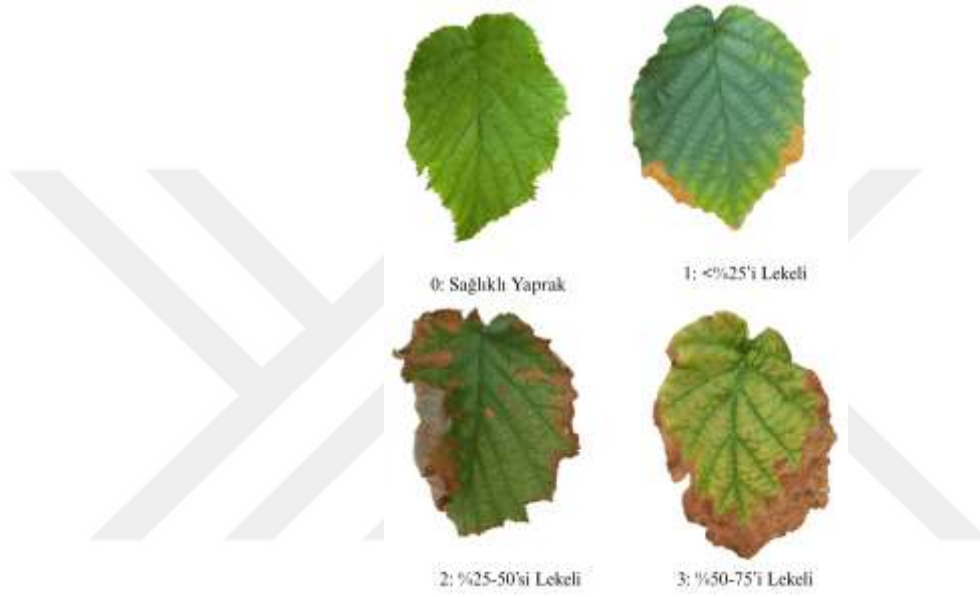
3.3 Patojenisite ve Hastalık Şiddeti Sonuçları

Biyokimyasal testlerde literatüre uygunluk gösteren ve *X. arboricola* türüne özgü XarbQ-F ve XarbQ-R primeriyle doğrulanan 28 izolatın patojenik karakterizasyonunu yapmak ve virülens düzeylerini değerlendirmek amacıyla sağlıklı 'Tombul' fındık çeşidi fidanları üzerinde kontrollü koşullarda 'patojenisite çalışmaları' başlığında verilen bilgiler doğrultusunda patojenisite çalışmaları yapılmıştır. 28 izolatın tamamının fındık bitkisinde Xac'ın neden olduğu belirtileri gösterdiği gözlenmiştir (Fotoğraf 3.11).



Fotoğraf 3.11 Fındık bitkisinden elde edilen izolatların *Xanthomonas arboricola* olarak doğrulanması sonrasında fındık bitkisi üzerinde yapılan patojenisite sonuçlarına ait bazı belirtiler

İzolatlara ait virülenslik düzeyleri arasındaki önemli farklılıklar bulunmuştur. 1-4 skalasına göre (Fotoğraf 3.12) yapılan değerlendirmede en yüksek virülenslik değerine sahip olan izolatın 67,5 hastalık şiddet indeksi ile F7 olduğu belirlenmiştir, çalışmadaki herhangi bir bitkide 4 skorunu alan bir semptom oluşumuna rastlanmamıştır. Bu virülenslik farklılıkları ayrıca istatistiksel olarak da değerlendirilmiş ve sonraki bölümdeki çeşit reaksiyon çalışmasına temel oluşturmuştur (Tablo 3.3). Bu doğrultuda en yüksek virülenslik gösteren F7 izolatı çeşit reaksiyon çalışmalarında kullanılmıştır.



Fotoğraf 3.12 Bu çalışmada fındıktan elde edilen *Xanthomonas arboricola* izolatlarının fındıkta oluşturduğu hastalık şiddetine ait 1-4 skorlaması

Tablo 3.3 Fındık bitkisinden elde edilen ve tür olarak *Xanthomonas arboricola* olduğu doğrulanan izolatların fındık bitkisi üzerinde yapılan patojenisite sonrası hastalık şiddeti skalasına göre istatistiksel oranları

İzolat Numarası	Hastalık Şiddeti İndeksi*
F1	30,0 ⁱ
F2	50,0 ^{bf}
F3	40,0 ^{ei}
F4	40,0 ^{ei}
F5	55,0 ^{ad}
F6	37,5 ^{fi}

F7	67,5 ^a
F8	62,5 ^{ab}
F9	52,5 ^{be}
F10	27,5 ⁱ
F11	40,0 ^{ei}
F12	27,5 ⁱ
F13	40,0 ^{ei}
F14	60,0 ^{ac}
F15	35,0 ^{gi}
F16	32,5 ^{hi}
F17	50,0 ^{bf}
F18	40,0 ^{ei}
F19	47,5 ^{cg}
F20	35,0 ^{gi}
F21	45,0 ^{dh}
F22	32,5 ^{hi}
F23	27,5 ⁱ
F24	40,0 ^{ei}
F25	40,0 ^{ei}
F26	32,5 ^{hi}
F27	57,5 ^{ad}
F28	32,5 ^{hi}

LSD Değeri:	13,512
--------------------	--------

*Elde edilen skorlar önce hastalık şiddeti indeksine dönüştürülmüş, ardından istatistiksel analizler öncesinde varyans homojenliğini sağlamak amacıyla karekök dönüşümüne tabi tutulmuştur.

3.4 Moleküler Tanımlama

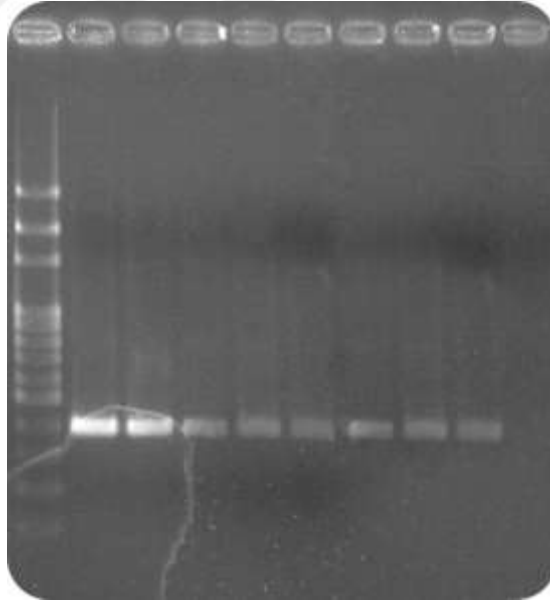
Biyokimyasal ve fizyolojik testlerle ön tanısı yapılan izolatların moleküler düzeyde doğrulanması ve karakterizasyonu amacıyla çeşitli moleküler analizler gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 Genomik DNA İzolasyonu

Moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere, saf kültürleri elde edilmiş olan izolatların genomik DNA'sı "DNA İzolasyon Protokolü" başlığında belirtilen protokollerle gerçekleştirilmiştir ve yüksek kalitede DNA elde edilmiştir. DNA örneklerinin Denovix DS-11 FX+ NanoDrop cihazıyla yapılan kalite ve miktar kontrollerinde, A260/A280 oranlarının $\sim 1,8$, A260/A230 oranlarının ise 2,0-2,2 aralığında olduğu ve PCR çalışmaları için yeterli konsantrasyonda DNA elde edildiği saptanmıştır.

3.4.2 Konvansiyonel PCR ile Tür Düzeyinde Doğrulama

İzolatların *Xanthomonas arboricola* türüne ait olup olmadıklarının kesinleştirilmesi amacıyla, bu türün kinat metabolizmasında rol oynayan *qumA* genine özgü XarbQ-F ve XarbQ-R primerleri kullanılarak konvansiyonel PCR yapılmıştır. Test edilen izolatlarda yapılan PCR amplifikasyonu sonucunda 28 izolatın agaroz jel elektroforezinde *X. arboricola* için beklenen yaklaşık 402 baz çifti (bp) büyüklüğünde spesifik bir DNA fragmanı elde edilmiştir. Bu sonuçla, 28 izolat *Xanthomonas arboricola* türü olarak moleküler düzeyde doğrulanmıştır (Fotoğraf 3.13).



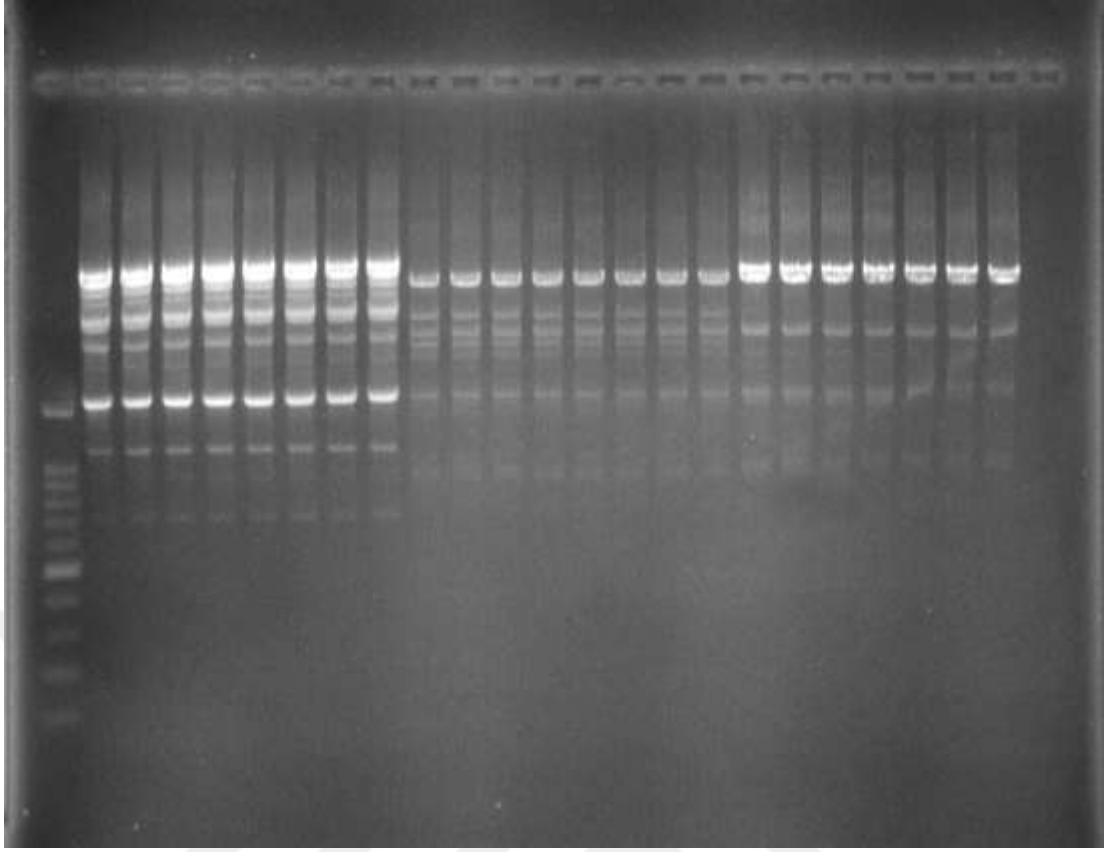
Fotoğraf 3.13 Fındık bitkisinden elde edilen bakteriyel izolatların PCR ile türe spesifik XarbQ-F/R primeriyle oluşturulmuş 402 bp'daki jel görüntüsü

3.4.3 SCoT Markör Analizi ile İzolatların Parmak İzi Profilleri

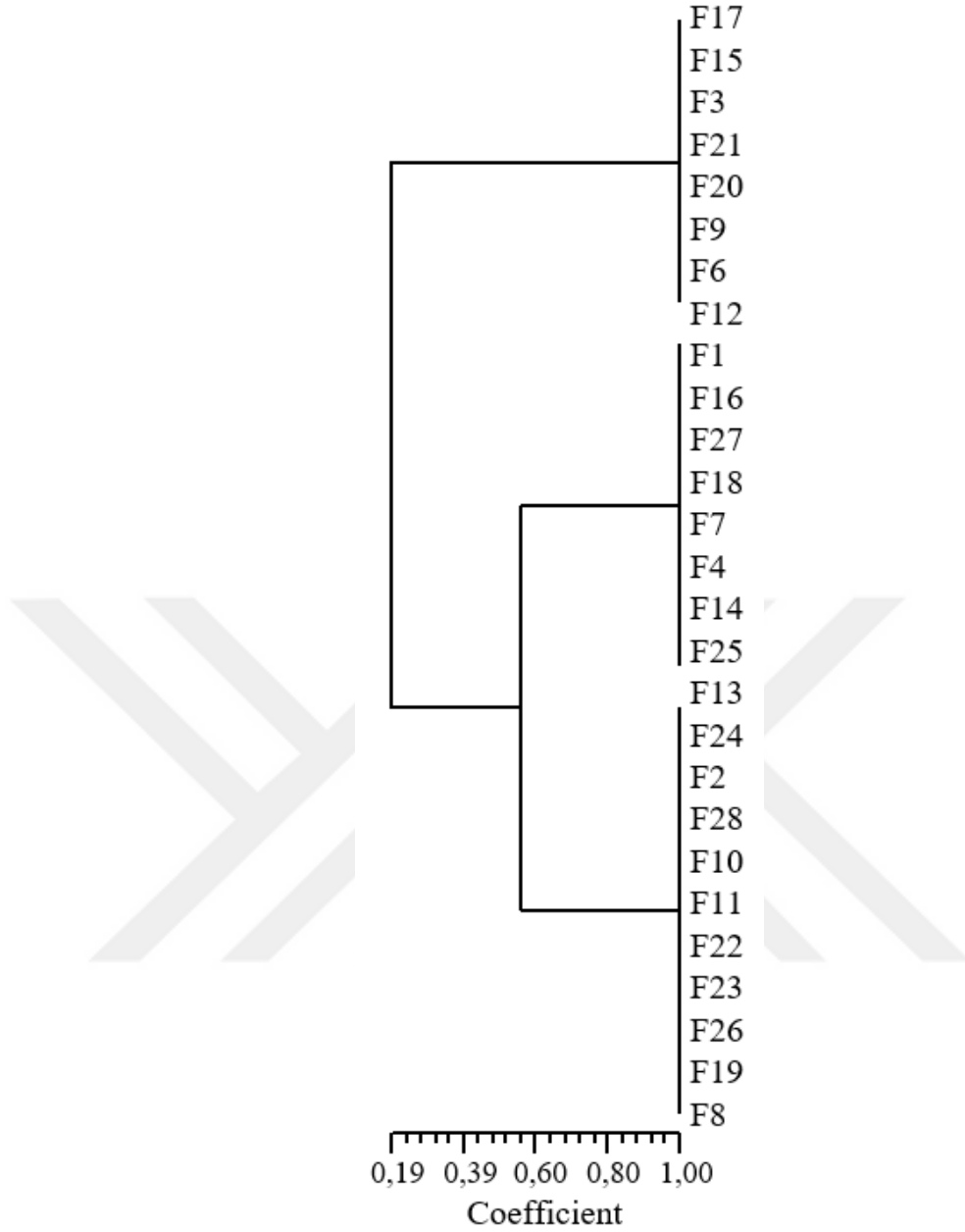
DNA izolasyonu yapılan 28 izolat arasındaki genetik ilişkilerin ön değerlendirmesi ve parmak izi profillerinin oluşturulması amacıyla Start Codon

Targeted (SCoT) polimorfizm markör sistemi kullanılmıştır. Seçilen SCoT primerleri ile yapılan PCR çalışmaları sonucunda, izolatlar arasında polimorfik bant profilleri elde edilmiştir. Her bir izolat için tekrarlanabilir ve belirgin genetik parmak izleri oluşturulmuş, bu profiller izolatlar arasında genetik farklılıkların ve benzerliklerin bulunduğunu göstermiştir. SCoT markörlerine dayalı kümeleme analizi sonucunda, fındıktan elde edilen 28 *Xanthomonas arboricola* izolatı 0,19-1,00 benzerlik katsayısı aralığında üç belirgin ana gruba ayrılmış olup, izolatlar arasında oldukça yüksek genetik çeşitlilik tespit edilmiştir (Fotoğraf 3.14; Şekil 3.1)





Fotoğraf 3.14 Fındık bitkisinden elde edilen *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* izolatlarının SCoT32 primeriyle oluşturulan parmak izi profili



Şekil 3.1 NTSYS programı kullanılarak fındıktan elde edilen *Xanthomonas arboricola* izolatlarının SCoT markörlerine dayalı Jaccard benzerlik katsayısı ile oluşturulan dendrogram analizi. Kümeleme analizi UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.4 *rpoD* Gen Bölgesinin Sekans Analizi

İzolatların moleküler karakterizasyonunu ve filogenetik konumlarını daha detaylı incelemek amacıyla, XarbQ-F ve XarbQ-R primerleriyle *X. arboricola* olduğu doğrulanan ve SCoT parmak izi profili ile gruplandırılarak benzer gruplardan temsili olarak seçilen 3 izolatın (F6, F7, F8) *rpoD* gen bölgesine ait PCR ürünlerinden çift yönlü DNA sekans analizi yapılmıştır. Elde edilen ham

sekans verileri düzenlendikten sonra NCBI BLAST ile yapılan analizlerde, tüm sekansların GenBank veri tabanındaki Xac referans suşlarına yaklaşık %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sekanslar kullanılarak MEGA yazılımında oluşturulan filogenetik ağaçlarda, çalışılan izolatların tamamının, güçlü bootstrap destek değerleri temelinde referans Xac suşlarıyla aynı ana dalda kümelendiği ve diğer *Xanthomonas* türlerinden, ayrıca *X. arboricola* patovarylarından net bir şekilde ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 3.2).





Şekil 3.2 rpoD gen bölgesine dayalı olarak Maximum Likelihood metodu ile oluşturulan *Xanthomonas* filogenetik ağacı. Bu çalışmada analiz edilen izolatlar (F6, F7, F8) kalın harflerle belirtilmiştir. Filogenetik analize dış grup olarak *Stenotrophomonas maltophilia* ICMP 17033 dahil edilmiştir. Dallanma noktalarındaki sayılar bootstrap destek değerlerini yüzde olarak ifade etmektedir.

3.5 Real-time PCR için *X. arboricola*'ya Özgü Spesifik Primer Tasarımı ve Doğrulanması

Xac'ın hassas ve hızlı tespiti amacıyla kullanılmak üzere, izolatların *gyrB* gen bölgesine ait *X. arboricola*'ya özgü polimorfik alanlar hedeflenerek spesifik real-time PCR primerleri tasarlanmıştır. Primer3 ve UNAFold yazılımları kullanılarak tasarlanan aday primerlerin NCBI Primer-BLAST ile yapılan in silico analizlerinde, hedef dışı organizmalarla (özellikle fındık genomu ile) eşleşme göstermedikleri ve uygun erime sıcaklığı, %GC içeriği gibi parametrelere sahip oldukları belirlenmiştir. Seçilen primer çiftlerinin doğrulanması, Xac DNA'sı ve negatif kontrol olarak fındık DNA'sı kullanılarak yapılan qPCR denemeleri ile gerçekleştirilmiş ve primerlerin yalnızca *X. arboricola* DNA'sını spesifik olarak çoğalttığı doğrulanmıştır. Tasarlanan ve doğrulan primerlere ait sekanslar, hedef gen, erime sıcaklıkları ve beklenen ampikon uzunlukları gibi bilgiler Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4 Bu çalışmada real-time PCR çalışmalarında kullanılan ve *X. arboricola*'ya özgü tasarlanan primer ile ilgili bilgiler

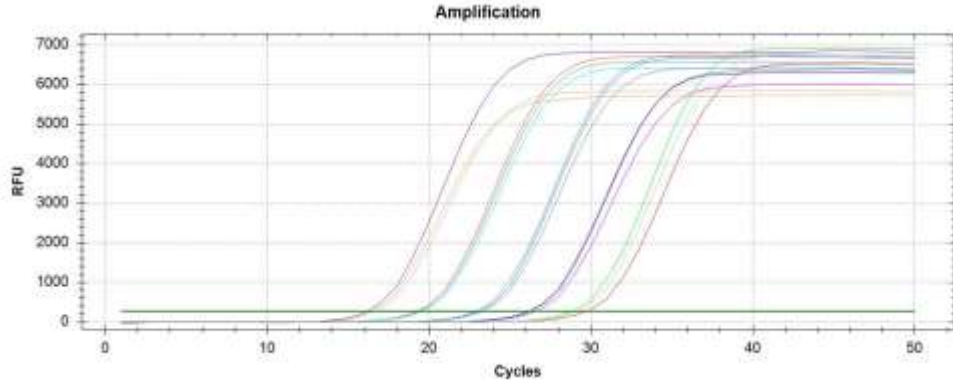
Primerler	H. Böl. ¹	Amp. U. ²	Sekans D. ³ (5' – 3')	Baz U. ⁴ (bp)	Tm	%GC	SC ⁵	SC ⁶
XargyrB_F	gyrB	104 bp	5'- ACAAGTTGCAGGCCGAAG-3'	18	58,25	55,56	5	0
XargyrB_R			5'- GTCGAAACGCAGCTGGTAG-3'	19	58,93	57,89	6	2

¹: Hedef Bölge, ²: Ampikon Uzunluğu, ³: Sekans Dizisi, ⁴: Baz Uzunluğu, ⁵: Self Complementarity, ⁶: 3' Self Complementarity

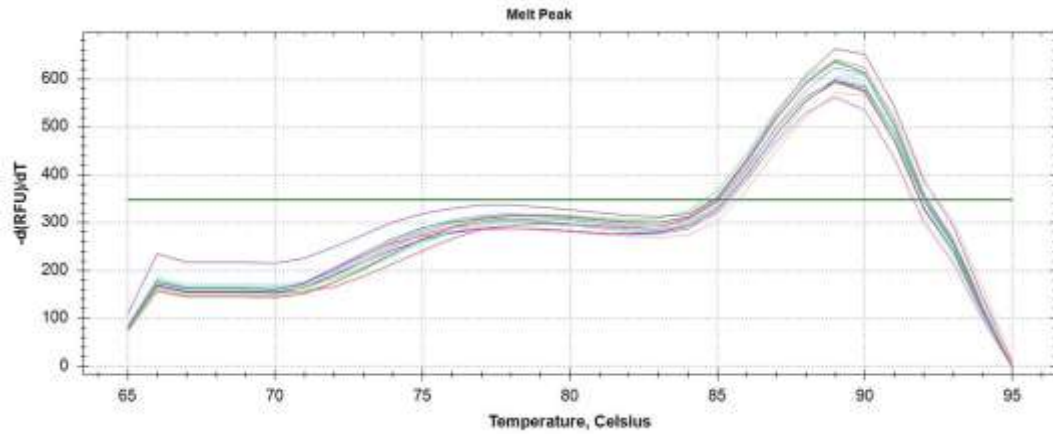
3.6 Xac'ın Real-time PCR ile Kantitatif Tespiti

Önceki aşamada tasarlanan ve doğrulan *X. arboricola*'ya özgü spesifik primer çiftleri kullanılarak, SYBR Green I temelli bir real-time PCR yöntemi geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bu yöntemin performansı, bilinen konsantrasyonlarda saf Xac genomik DNA'sı (10 ng'dan 0,01 pg'a kadar logaritmik seyreltilmiş) kullanılarak oluşturulan standart eğri ile değerlendirilmiştir. Geliştirilen qPCR yönteminin yüksek verimliliğe ($E \approx \%98-102$), iyi bir doğrusallığa ($R^2 \geq 0,99$) ve düşük bir tespit limitine sahip olduğu belirlenmiştir. Erime eğrisi analizleri, çoğaltılan PCR ürününün spesifik olduğunu ve primer dimerleri gibi istenmeyen ürünlerin oluşmadığını doğrulamıştır. Bu optimize edilmiş qPCR yöntemi ile Xac DNA'sının hem saf kültürlerden elde edilen genomik DNA'dan hem de doğrudan fındık bitki dokularından hassas ve kantitatif olarak tespit edilebildiği gösterilmiştir. Bilinmeyen örneklerdeki Xac DNA miktarı, elde

edilen Cq değerlerinin standart eğri ile karşılaştırılmasıyla başarılı bir şekilde hesaplanmıştır (Fotoğraf 3.15).

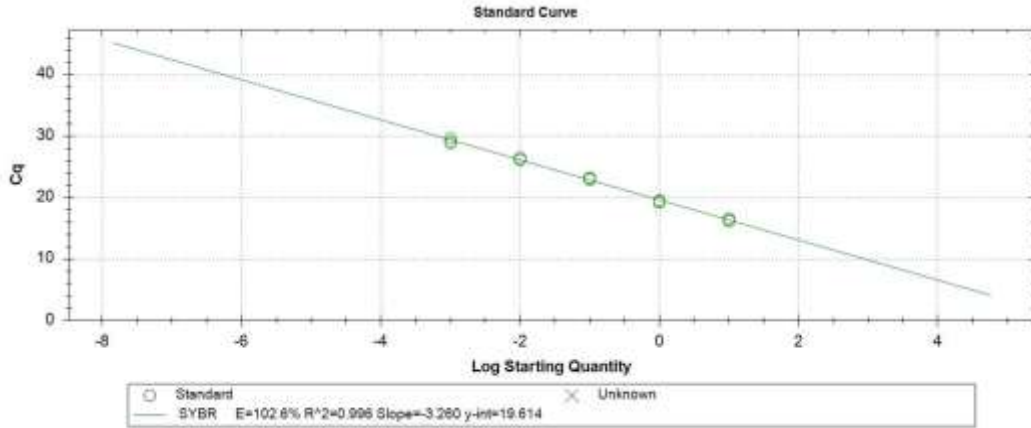


Fotoğraf 3.15 Fındıktan elde edilen *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* izolatlarının DNA'sının fındık bitki DNA'sı ile karıştırılması ile oluşturulan seyrelti serisinin (10ng-0,1ng) XargyrB_F/R primeriyle real-time PCR'da çalıştırılması sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri

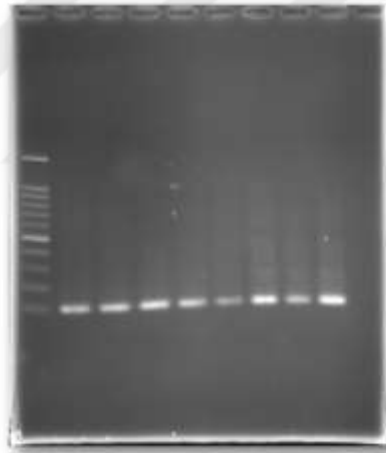


Fotoğraf 3.16 Fındıktan elde edilen *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* izolatlarının DNA'sının fındık bitki DNA'sı ile karıştırılması ile oluşturulan seyrelti

serisinin (10ng-0,1ng) XargyrB_F/R primeriyle real-time PCR'da çalıştırılması sonucu elde edilen erime piki



Fotoğraf 3.17 Fındıkta elde edilen *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* izolatlarının DNA'sının fındık bitki DNA'sı ile karıştırılması ile oluşturulan seyrelti serisinin (10ng-0,1ng) XargyrB_F/R primeriyle real-time PCR'da çalıştırılması sonucu elde edilen standart eğri ($R^2 > 0,99$)



Fotoğraf 3.18 Real-time çalışmaları sonrasında XargyrB_F/R primer setiyle çalışan fındıktan elde edilmiş *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* örneklerinin elektroforez ile koşturulması sonucunda 104 bp'da oluşan bant profilini gösteren jel görüntüsü

3.7 Fındık Çeşitlerinin *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'ya Karşı Reaksiyonları

Türkiye'de ve dünya genelinde önemli bir yere sahip olan 'Çakıldak', 'Tombul', 'Yomra', 'Kalınkara', 'Palaz', 'Karafındık', 'Mincane' gibi yerel fındık çeşitleri ile İtalya orijinli 'Nocchione', 'Tonda di Giffoni' ve 'Tonda Romana' olmak

üzere toplam 10 adet fındık çeşidinin, Xac'ya karşı gösterdikleri reaksiyon düzeyleri kontrollü iklim odası koşullarında incelenmiştir. Bu amaçla, önceki patojenisite çalışmalarında yüksek virülens sergilediği belirlenen yerel F7 Xac izolatının 1×10^8 CFU/mL yoğunluğundaki süspansiyonu, bir yaşındaki fidanların yapraklarına püskürtme yöntemiyle uygulanmıştır. İnokülasyonu takiben 3-4 haftalık periyotta hastalık belirtilerinin gelişimi düzenli olarak izlenmiş ve her bir çeşit için 10 farklı yaprak üzerinden 1-4 skalasına göre yaprak lezyon derecesi kaydedilerek ortalama hastalık şiddeti belirlenmiştir.

Yapılan değerlendirmelere göre fındık çeşitlerinin Xac inokülasyonuna karşı farklı hastalık şiddeti yüzdeleri sergilediğini göstermektedir. Hastalık şiddeti değerleri çeşitlere göre şu şekilde bulunmuştur: 'Kalınkara' %70, 'Tonda Romana' %65, 'Tonda di Giffoni' %62,5, 'Nocchione' %52,5, 'Mincane' %45, 'Çakıldak' %40, 'Palaz' %37,5, 'Tombul' %27,5, 'Yomra' %27,5 ve 'Karafındık' %17,5. Bu sonuçlar, çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğunu ortaya koymaktadır; en yüksek değer 'Kalınkara'da, en düşük değer ise 'Karafındık'ta ölçülmüştür. Çalışma kapsamında temin edilen 'Mortarella' çeşidine ait fidanlar adaptasyon sürecinde canlılıklarını yitirdikleri için bu değerlendirmeye dahil edilememiştir.

Bu kantitatif sonuçlar, fındık bakteriyel yanıklığı ile mücadelede dayanıklı çeşitlerin seçimi ve gelecekteki ıslah programlarının şekillendirilmesi açısından önemli veriler sunmaktadır (Fotoğraf 3.19, Tablo 3.5).



Fotoğraf 3.19 Bu çalışmada fındıktan elde edilmiş F7 *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* izolatının farklı fındık çeşitlerine inokülasyonu sonrası bu fındık çeşitlerinin gösterdiği belirtilerden bazıları

Tablo 3.5 Bu çalışmada fındıktan elde edilmiş F7 *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* izolatının farklı fındık çeşitlerine inokülasyonu sonrası bu çeşitlerin gösterdiği hastalık şiddeti yüzdeleri

Çeşit	Hastalık Şiddeti İndeksi (HŞİ)*
Çakıldak	40,0 ^d
Kalınkara	70,0 ^a

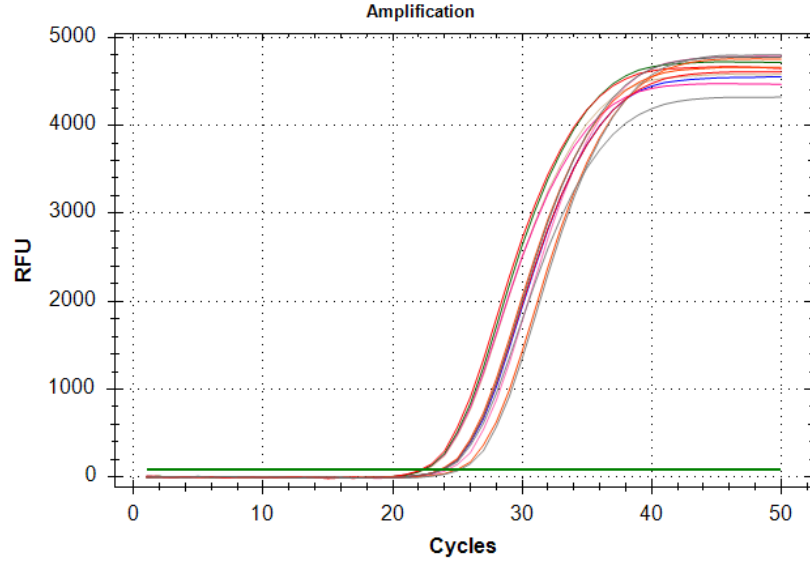
Karafındık	17,5 ^f
Mincane	45,0 ^{cd}
Nocchione	52,5 ^{bc}
Palaz	37,5 ^{de}
Tombul	27,5 ^{ef}
Tonda di Giffoni	62,5 ^{ab}
Tonda Romana	65,0 ^a
Yomra	27,5 ^{ef}
LSD Değeri:	10,932

* Elde edilen skorlar önce hastalık şiddeti indeksine dönüştürülmüş, ardından istatistiksel analizler öncesinde varyans homojenliğini sağlamak amacıyla karekök dönüşümüne tabi tutulmuştur.

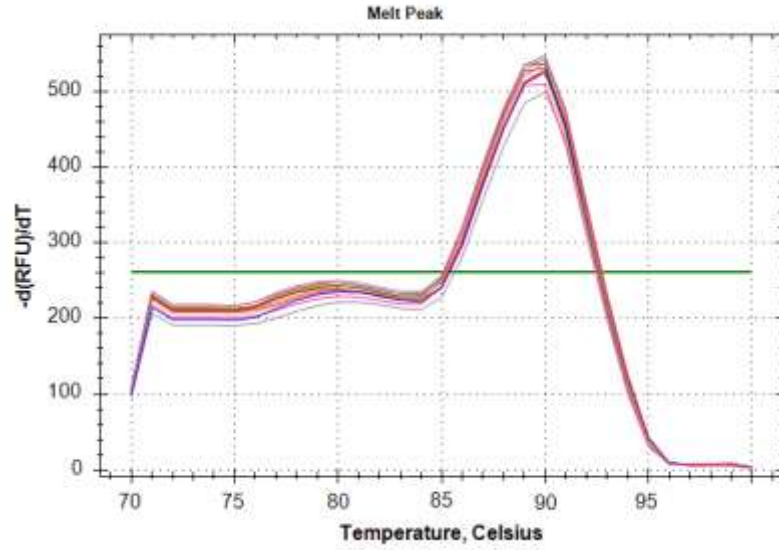
3.8 Real-time ile Dokudan Tespit Çalışma Sonuçları

Çeşit reaksiyon çalışmaları sonucunda en yüksek hastalık şiddeti gösteren 'Kalınkara' çeşidi ile en düşük hastalık şiddeti gösteren 'Karafındık' çeşitleri ile dokudan tespit limiti amacıyla real-time çalışmaları yapılmıştır. Çeşitlerden 1.gün, 3.gün ve 5.günde yaprak örnekleri alınmış daha sonra bu yaprak örneklerinden elde edilen genomik DNA ile bu çalışmada tasarlanan XargyrB_F/R primerleriyle qPCR çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar ile Xac ile bulaşık fındık bitki dokusundan Xac etmeni başarıyla tespit edilmiştir. Amplifikasyon grafiği sonuçlarında bu primer, tüm örneklerde, döngü sayısı arttıkça floresan sinyalinin (RFU) arttığı eğriler gözlenmiştir. Bu durum, *gyrB* primerlerinin hedef DNA dizisini başarılı bir şekilde çoğalttığını göstermektedir. Negatif kontrollerde ise amplifikasyon gözlenmemiştir. Bu durum reaksiyonların kontaminasyondan arı olduğunu kanıtlamaktadır (Fotoğraf 3.20).

Melting analiz sonucunda ise tüm örnekler için yaklaşık 89-90°C'de tek ve keskin bir erime piki elde edilmiştir. Bu sonuç, qPCR reaksiyonunun oldukça spesifik/özgül olduğunu, primer-dimer veya istenmeyen yan ürünler oluşmadan sadece hedef *gyrB* gen bölgesinin çoğaltıldığını doğrulamaktadır. Bu durum, elde edilen kantitatif verilerin doğruluğu için kritik öneme sahiptir (Fotoğraf 3.21).



Fotoğraf 3.20 Fındık dokusundan tespit çalışmalarında *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* ile bulaşık fındık yaprağı DNA'sının XargyrB_F/R primerleriyle real-time PCR çalışmaları sonrası elde edilen amplifikasyon eğrisi

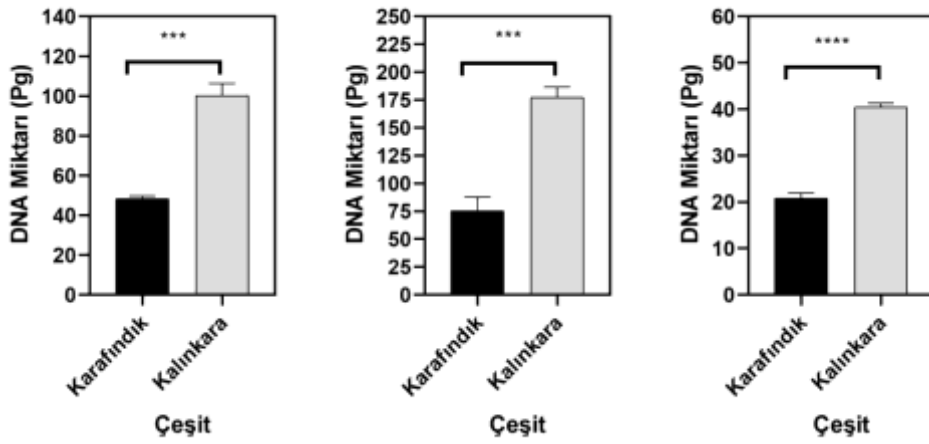


Fotoğraf 3.21 Fındık dokusundan tespit çalışmalarında *Xanthomonas arboricola* pv *corylina* ile bulaşık fındık yaprağı DNA'sının XargyrB_F/R primerleriyle real-time PCR çalışmaları sonrası elde edilen özgül erime eğrisi

'Kalınkara' ve 'Karafındık' çeşitlerinden farklı günlerde alınan örneklerdeki bakteri DNA miktarları (Pg olarak) karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir. Patojenin verilmesinden 24 saat sonra alınan örneklerden yapılan ölçümlerde, HŞİ yüksek 'Kalınkara' çeşidindeki bakteri DNA miktarı

ortalama 40,4 Pg olarak ölçülürken, HŞİ düşük 'Karafındık' çeşidinde bu değer ortalama 20,8 Pg olarak saptanmıştır. İki çeşit arasındaki bu fark, yapılan istatistiksel analizler sonucunda da anlamlı çıkmıştır ($p < 0,0001$, ****). Bu bulgu, 'Kalınkara' çeşidinin dokularında bakterinin daha ilk günden itibaren hızlı bir şekilde çoğalmaya başladığını göstermektedir.

Real-time PCR analizi sonuçları, tasarlanan primer setlerinin yüksek spesifite ve duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Her üç zaman noktasında da 'Kalınkara' çeşidinde 'Karafındık' çeşidine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bakteriyel DNA miktarları tespit edilmiştir (t-test, $p \leq 0.05$) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Fındık dokusundan tespit çalışmalarında, inokulasyondan sonraki farklı zaman noktalarında (1., 3., 5.gün) Karafındık ve Kalınkara fındık çeşitlerinde tespit edilen *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* DNA miktarları (pg). *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Patojenisitenin 3. gününde, her iki çeşitte de bakteri popülasyonunun arttığı ancak aradaki farkın daha da belirginleştiği görülmüştür. 'Kalınkara' çeşidindeki bakteri miktarı yaklaşık 177,4 Pg'a ulaşarak en yüksek seviyesine çıkarken, 'Karafındık' çeşidindeki miktar yaklaşık 75,5 Pg olarak ölçülmüştür. Aradaki fark, bu zaman diliminde de istatistiksel olarak çok anlamlı çıkmıştır ($p < 0,001$, ***). Bu durum, patojenin daha hassas bir konukçuda ne kadar agresif bir şekilde çoğaldığını, daha dayanıklı çeşitte ise bakteri gelişmesinin etkin bir şekilde baskılanmaya devam ettiğini ortaya koymaktadır.

Patojenin verilmesinin 5. günde, her iki çeşitte de önceki ölçün olan 3. güne kıyasla bakteri miktarında bir miktar azalma eğilimi gözlenmiştir. Ancak,

'Kalınkara' çeşidindeki bakteri miktarı (ortalama 100,1 Pg) hala 'Karafındık' çeşidine (ortalama 48,4 Pg) göre yaklaşık iki kat daha fazla çıkmıştır. İki çeşit arasındaki fark, bugünde de istatistiksel anlamlılığını korumuştur ($p < 0,001$, ***)



4. TARTIŞMA

Bu çalışmanın temel amacı, Türkiye'nin iki önemli fındık üretim bölgesi olan Karadeniz ve Marmara'da, fındık bakteriyel yanıklığı etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'yı (Xac) çok yönlü olarak incelemektir. Bu doğrultuda patojenin izolasyonu ve kimliği doğrulanmış, genetik yapısı analiz edilmiş, modern moleküler teşhis yöntemleri geliştirilmiş ve fındık çeşitlerinin hastalığa tepkileri ortaya konulmuştur. Bulgular, mevcut bilimsel birikim çerçevesinde analiz edilerek sonuçlar sunulmuştur.

Fındık bakteriyel yanıklığı, dünya genelindeki fındık üretim alanlarında, özellikle genç fidanlıklarda ve yeni kurulan bahçelerde önemli ekonomik kayıplara yol açan bir hastalıktır. Bu çalışmada, Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'ndeki fındık üretim alanlarından (Bolu, Düzce, Sakarya, Samsun, Ordu) ilkbahar, yaz ve sonbahar vejetasyon periyotlarında fındık bakteriyel yanıklığı belirtileri gösteren bitki örnekleri toplanmıştır. Örnekleme stratejisi olarak, hastalığın en belirgin olduğu ve etmenin aktif olarak çoğaldığı dönemlerin seçilmesi, başarılı izolasyon için kritik bir adımdır. Nitekim bu çalışmada da yaprak lezyonları, enfekteli tomurcuklar ve genç sürgünler gibi taze ve aktif belirti gösteren dokulardan daha yüksek başarı elde edilmiştir. Bu durum, patojenin özellikle yeni oluşmuş, genç lezyonların kenar kısımlarında daha yüksek yoğunlukta bulunduğu işaret eden önceki çalışmalarla uyumludur (Osdaghi, 2022). İzolasyon sürecinde, *Xanthomonas* spp. için yarı seçici olarak kabul edilen YPGA besiyerinin kullanılması, *Xanthomonas* cinsinin koloni rengi ayırt etmede kolaylık sağlaması ve diğer saprofitik mikroorganizmaların gelişimini baskılayarak hedef patojenin elde edilmesini kolaylaştırmıştır. Xac izolasyonunun, özellikle ileri enfeksiyon aşamalarındaki örneklerden veya saprofit mikroorganizmaların yoğun olduğu durumlarda zorluklar içerebildiği ve bu nedenle uygun besiyeri seçiminin önemli olduğu bilinmektedir (Prokic vd., 2012). Çalışmada elde edilen sarı renkli, mukoid, parlak ve konveks yapılı 70 bakteri izolatının morfolojik özellikleri, *Xanthomonas* cinsinin tipik koloni özellikleriyle örtüşmektedir (Vauterin vd., 1995; Kaluzna, Pulawska vd., 2021). Bu morfolojik benzerlik, ön tanılama için önemli bir kriter olmakla birlikte, kesin teşhis için yeterli değildir; çünkü benzer morfolojiye sahip diğer bakterilerle karıştırılma riski bulunmaktadır (Moore, 1974). Bu nedenle, elde edilen 70 izolat aday, ileri düzey tanılama basamaklarına tabi tutulmuştur.

Klasik tanılama yöntemleri, şüpheli izolatların kimliğinin doğrulanmasında temel bir basamağı oluşturmaktadır. Bu çalışmada, morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda 70 izolat adayından 28'inin literatür bilgileriyle uyumlu olduğu ve Xac olma potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir. Fenotipik karakterlerde, özellikle bazı karbon kaynaklarının kullanımında suşlar arasında veya standart referanslarla kıyaslandığında farklılıklar gözlenebilmesi, bu yöntemlerin tek başına kesin sonuç vermesini engelleyebilmektedir (Pulawska vd., 2010). Bu nedenle, bu çalışmada da olduğu gibi klasik yöntemlerle yapılan ön eleme sonrası elde edilen aday izolatların daha özgül ve hassas olan moleküler yöntemlerle doğrulanması, modern bakteriyel tanılama yaklaşımlarının bir gerekliliğidir (Kaluzna 2021, Fischer-Le Saux vd., 2015). Çalışmamızda klasik testlerle uyumlu bulunan 28 izolat, *X. arboricola* türüne özgü *XarbQ* primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizleriyle tür düzeyinde doğrulanmıştır. Bu izolatların tamamının patojenisite testlerinde fındık bitkisinde hastalık oluşturmaları ve SCoT profilleri ile gruplandırılıp temsili izolatların sekanslanması ile Xac olduklarının kesinleştirilmesi, tanılama sürecinde izlenen çok aşamalı ve entegre yaklaşımın güvenilirliğini ortaya koymaktadır. Bu yaklaşım, sadece belirti veya morfolojiye dayalı olası hataları en aza indirerek, etmenin kimliğinin net bir şekilde belirlenmesini sağlamıştır.

Bakteriyel patojenlerin tanımlanmasında biyokimyasal ve fizyolojik testler, izolatların fenotipik özelliklerini karakterize etmek ve cins veya tür düzeyinde ön bilgi edinmek amacıyla yaygın olarak kullanılan temel yöntemlerdir. Bu çalışmada da saflaştırılan 70 izolat adayını, Xac için literatürde belirtilen standart prosedürlere göre bir dizi teste tabi tutulmuştur. Bu testler, izolatların beklenen reaksiyonları verip vermediğini kontrol ederek ve referans suşlarla karşılaştırmalar yaparak tanı sürecine önemli katkılar sağlamıştır. Gram reaksiyonu, bakteri tanımlamasının en temel adımlarından biridir ve bakterileri hücre duvarı yapılarına göre iki ana gruba ayırır. *Xanthomonas* cinsi, Gram-negatif bakteri grubunda yer alır. Bu çalışmada, Gram reaksiyonunun hızlı bir şekilde belirlenmesi için klasik Gram boyama yerine %3'lük Potasyum Hidroksit (KOH) testi kullanılmıştır (Öztürk, 2023). İncelenen 70 izolattan 28'inin KOH testine pozitif reaksiyon vererek ipliksi ve sümüksü bir uzama göstermesi, bu izolatların Gram-negatif olduğunu doğrulamış ve *Xanthomonas* cinsi için beklenen sonuçla uyum göstermiştir. Diğer izolatların bu teste negatif yanıt vermesi, onların Gram-pozitif olabileceğini veya testin hassasiyet

sınırlarının dışında kaldığını düşündürmüş ve bu izolatlar sonraki değerlendirmelerden elenmiştir.

Katalaz testi, bir organizmanın hidrojen peroksit (H_2O_2)'i suya ve oksijene parçalama yeteneğini ölçer ve aerobik veya fakültatif anaerobik bakterilerin ayrımında sıkça kullanılır. *Xanthomonas* cinsi üyeleri, aerobik metabolizmaya sahip olduklarından dolayı katalaz enzimi üretirler ve bu teste pozitif yanıt verirler. Bu çalışmada, hidrojen peroksit damlatıldığında gaz kabarcığı çıkışı gözlemlenen 48 izolatın katalaz pozitif olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, *Xanthomonas* cinsi için literatürde belirtilen genel özellikle (Vauterin vd., 1995) ve spesifik olarak Xac için yapılan önceki çalışmalarla (Prokic vd., 2012) tutarlıdır. Testin pozitif sonuç vermesi, izolatların *Xanthomonas* olma potansiyelini destekleyen bir başka kanıt olmuştur. Oksidaz testi, bir bakterinin sitokrom c oksidaz enzimine sahip olup olmadığını belirler ve özellikle Gram-negatif bakterilerin ayrımında önemli bir tanı aracıdır. *Xanthomonas* cinsi, bu enzime sahip olmadığı için tipik olarak oksidaz negatiftir. Çalışmamızda, test edilen izolatlardan 34'ünün oksidaz testine negatif sonuç vererek renk değişimine neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, Xac için de beklenen bir sonuç olup, hem genel *Xanthomonas* tanımlama şemalarıyla (Vauterin vd., 1995) hem de Xac üzerine yapılan spesifik çalışmalarla (Kazempour vd., 2006) uyum içindedir. Pozitif sonuç veren izolatlar ise bu aşamada elenmiştir.

Bakterilerin karbonhidratları metabolize etme şekli, tanımlamada kritik bir özelliktir. O/F testi, bir bakterinin glukozu oksidatif (oksijenli solunum) yolla mı yoksa fermentatif (oksijensiz) yolla mı kullandığını belirler. *Xanthomonas* cinsi, zorunlu aerobik bir bakteri olup glukozu sadece oksidatif yolla metabolize eder ve fermentatif özellik göstermez. Bu çalışmada, Hugh-Leifson'un O/F besiyeri kullanılarak yapılan testlerde, 48 izolatın üzeri kapatılarak anaerobik koşullar sağlanan tüplerde glukozu kullanmadığı, ancak aerobik koşullarda bırakılan tüplerde asit üreterek ortamın sarı renge dönmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, 48 izolatın fermentatif değil, oksidatif metabolizmaya sahip olduğunu göstermiş ve *Xanthomonas* cinsi için karakteristik olan bu temel özellikle (Vauterin vd., 1995) tam bir uyum sergilemiştir.

Bakterilerin farklı tuz konsantrasyonlarına karşı gösterdikleri tolerans, fizyolojik karakterizasyonları ve taksonomik ayrımları için kullanılan bir kriterdir. *Xanthomonas arboricola* türü, genellikle yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı hassastır ve %5 NaCl içeren ortamlarda gelişemediği rapor edilmiştir. Bu

çalışmada, izolatların %2 ve %5 olmak üzere iki farklı NaCl konsantrasyonuna toleransı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 45 izolatın %2 NaCl içeren besiyerinde normal bir şekilde geliştiği, ancak %5 NaCl içeren besiyerinde hiçbirinin gelişme göstermediği saptanmıştır. Bu bulgu, izolatların %2'lik tuzluluğu tolere edebildiğini ancak %5'lik konsantrasyonun gelişimlerini engellediğini ortaya koymuştur. Bu durum, Xac'ın da içinde bulunduğu *X. arboricola* türü için beklenen bir özelliktir ve Öztürk (2023) ile Vauterin vd. (1995) tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. *Xanthomonas arboricola* için literatürde, türün 35 °C'de iyi bir şekilde gelişebildiği, ancak 37 °C'de ya hiç gelişemediği ya da çok zayıf bir gelişme gösterdiği bildirilmektedir. Bu çalışmada da izolatların gelişme sıcaklığı limitlerini belirlemek amacıyla NA besiyerine ekilen izolatlar 35 °C ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda, 37 tanesinin 35 °C'de iyi bir gelişme gösterdiği, ancak hiçbirinin 37 °C'de gelişmediği veya çok zayıf geliştiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, Xac'ın sıcaklık profili ile ilgili literatür bilgileriyle tam bir uyum içindedir ve bu izolatların *X. arboricola* olma olasılığını destekleyen güçlü bir kanıttır (Pulawska vd., 2010; Palacio-Bielsa vd., 2011).

Hipersensitif reaksiyon (HR), bir bakteri izolatının potansiyel bir bitki patojeni olup olmadığını anlamak için kullanılan hızlı ve yaygın bir gösterge testidir. Patojenik bakteriler, konukçusu olmayan bazı bitki türlerinin (indikatör bitki) dokularına enjekte edildiğinde, genellikle 24-48 saat içinde hızlı bir hücre ölümü ve doku çökmesiyle karakterize edilen bir savunma tepkisini tetikler. Xac gibi *Xanthomonas* türleri genellikle tütün (*Nicotiana tabacum*), domates ve fasulye gibi indikatör bitkilerde HR pozitif sonuç verirler. Bu çalışmada, öncelikle tütün bitkisinde denenen testler sonucunda 26 izolatın HR oluşturduğu belirlenmiştir. Tütünde belirti göstermeyen iki izolatın ise domates bitkisinde HR belirtisi göstermesiyle birlikte toplam 28 izolatın HR pozitif olduğu kabul edilmiştir. Bu bulgu literatürde belirtildiği gibi Xac izolatlarının birden fazla indikatör bitkide HR gösterebileceği bilgisiyle uyumludur ve izolatların patojenik potansiyele sahip olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir (Essakhi vd., 2015). Bakterilerin çeşitli karbon kaynaklarını metabolize etme yetenekleri, onların biyokimyasal parmak izlerini oluşturur ve tür düzeyinde ayrımlarına yardımcı olabilir. *Xanthomonas arboricola* türü ve patovaryaları için L-arabinoz, maltoz, gliserol, D-ksiloz, laktoz ve raffinöz gibi karbon kaynaklarının kullanımında suşlar arasında ve literatür raporları arasında farklılıklar olabileceği bildirilmiştir (Pulawska vd.,

2010; Kaluzna vd., 2021). Bu durum, bu testlerin tek başına tanı için her zaman güvenilir olmayabileceğini, ancak genel bir fenotipik karakterizasyon için değerli olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada da izolatların glukoz, sukroz, L-arabinoz, maltoz ve mannitol gibi çeşitli karbon kaynaklarını kullanma yetenekleri test edilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.2'de özetlenmiştir. Bulgular incelendiğinde, bazı izolatların belirli şekerleri kullanma profillerinin literatürdeki genel Xac profiliyle tam olarak örtüşmediği görülmüştür. Örneğin, Pulawska vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, Polonya izolatlarının laktoz ve rafinoz kullanımı gibi bazı özellikler açısından standart EPPO protokolünden farklılık gösterdiği ancak referans Xac suşu LMG 688 ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde, bu çalışmada da izolatlar arasında karbon kaynağı kullanımında bir heterojenlik gözlenmiştir. Bu durum, Xac popülasyonu içinde metabolik bir çeşitliliğin varlığına işaret etmektedir ve coğrafi köken, konukçu adaptasyonu veya genetik farklılıklar gibi faktörlerden kaynaklanabilir. Bu nedenle, karbon kaynağı kullanım testleri, moleküler ve patojenisite verileriyle birlikte yorumlandığında daha anlamlı hale gelmektedir.

Klasik tanılama yöntemlerinin, özellikle fenotipik değişkenlik ve yakın akraba türler arasındaki benzerlikler nedeniyle kesin teşhiste yetersiz kalabildiği durumlarda, moleküler yöntemler yüksek özgüllük, hassasiyet ve hız sunarak vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, biyokimyasal ve fizyolojik testlerle Xac olduğu düşünülen 28 izolatın kimliğinin kesin olarak doğrulanması ve aralarındaki genetik ilişkilerin ortaya konulması amacıyla bir dizi modern moleküler analiz gerçekleştirilmiştir. Moleküler analizlerin başarısı, başlangıç materyali olan genomik DNA'nın kalitesine ve saflığına doğrudan bağlıdır. Bu çalışmada hem bakteri izolatlarından hem de gerektiğinde fındık bitki dokularından genomik DNA izolasyonu için ticari bir kit (GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit) kullanılmıştır. Ticari kitlerin kullanılması, standartlaştırılmış protokoller sunarak tekrarlanabilir sonuçlar alınmasını ve PCR inhibitörlerinin etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlar. Nitekim, elde edilen DNA örneklerinin kalitesi ve miktarı NanoDrop spektrofotometresi ile kontrol edildiğinde, hem saflık oranlarının ($A_{260}/A_{280} \sim 1,8$ ve $A_{260}/A_{230} \sim 2,0-2,2$ aralığında) hem de konsantrasyonlarının sonraki moleküler çalışmalar için yeterli konsantrasyonda DNA elde edildiği saptanmıştır. Bu, seçilen DNA izolasyon yönteminin çalışmanın hedefleri için uygun ve başarılı olduğunu göstermektedir.

Farklı bakteri izolatları arasındaki genetik ilişkileri ve popülasyon yapısını anlamak için çeşitli DNA parmak izi yöntemleri kullanılmaktadır. Geleneksel olarak rep-PCR (ERIC, BOX, REP) gibi yöntemler bu amaçla yaygın olarak tercih edilse de (Scortichini vd., 2002; Prokic vd., 2012; Ivanović vd., 2015), bu çalışmada özgün bir yaklaşım olarak Start Codon Targeted (SCoT) polimorfizm markör sistemi kullanılmıştır. SCoT markörleri, başlangıçta bitki genomlarındaki gen başlangıç kodonlarını (ATG) çevreleyen korunmuş bölgeleri hedeflemek üzere geliştirilmiş, basit, tekrarlanabilir ve düşük maliyetli bir yöntemdir (Collard ve Mackill, 2009). Bu tekniğin basitliği, RAPD ve ISSR gibi diğer markörlerin avantajlarını birleştirmesi, onu genetik çeşitlilik, parmak izi ve popülasyon yapısı analizleri için güçlü bir araç haline getirmiştir (Rahimi ve Ranjbaran, 2023). SCoT markörleri, bitkiler (Ochi-Ardabili vd., 2024; Yeken vd., 2024), funguslar (Güney vd., 2023; Palacioğlu vd., 2023) ve mayalar (Aydın vd., 2022) gibi çok çeşitli ökaryotik organizmalarda genetik çeşitliliğin ve filogenetik ilişkilerin aydınlatılmasında başarıyla kullanılmıştır. Ancak, prokaryotik organizmalar olan bakterilerdeki kullanımı oldukça yenidir. Tekin vd. (2024) tarafından yapılan öncü bir çalışma, SCoT markörlerinin Xac dahil olmak üzere çok çeşitli bakteri türleri arasında yüksek ayırt edicilik gücüne sahip, tekrarlanabilir genetik parmak izi profilleri oluşturabildiğini ve bu tekniğin bakteri popülasyonlarındaki genetik farklılaşmayı ve biyoçeşitliliği değerlendirmede etkili olduğunu kanıtlamıştır. Bu çalışmada da SCoT32 primeri kullanılarak 28 Xac izolatı arasındaki genetik ilişkiler incelenmiş ve polimorfik bant profilleri elde edilerek her bir izolat için tekrarlanabilir genetik parmak izleri oluşturularak dendrogram oluşturulmuştur. Jaccard benzerlik katsayısına göre oluşturulan dendrogramda izolatların çok düşük benzerlik katsayısında (0,19) ayrılması, *Xanthomonas arboricola* popülasyonunda çok yüksek genetik polimorfizmin varlığını ortaya koymakta ve bu durum patojenin geniş coğrafi dağılımı, farklı çevresel koşullara adaptasyonu evrimsel süreçlerin etkisini yansıtır olabilir. Bu sonuçlar, SCoT markör sisteminin sadece ökaryotlarda değil, aynı zamanda bakteriyel patojenlerin genetik çeşitliliğini ve popülasyon yapısını incelemeye de güçlü ve kullanışlı bir araç olduğunu doğrulamaktadır. SCoT analizi ile izolatlar arasında hem genetik farklılıkların hem de benzerliklerin bulunması, Türkiye'deki Xac popülasyonunun homojen olmadığını ve farklı genetik gruplar içerebileceğini göstermiştir. Bu genetik parmak izi verileri, izolatların gruplandırılması, epidemiyolojik çalışmalarda salgınların

kaynağının takibi ve daha ileri analizler için temsili izolatların seçilmesi için sağlam bir temel oluşturmuştur.

Şüpheli izolatların kimliğinin tür düzeyinde kesin olarak doğrulanması, modern bakteriyel tanının vazgeçilmez bir adımıdır. Bu amaçla, hedef organizmanın genomundaki spesifik bir DNA bölgesini çoğaltan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tabanlı testler yaygın olarak kullanılmaktadır. *Xanthomonas* cinsi için genel bir tanımlama amacıyla 16S rRNA gen bölgesini hedefleyen primerler (Maes, 1993) geliştirilmiş olsa da bu gen bölgesi yakın akraba türlerin ve özellikle patovarların ayırımında yeterli çözünürlüğü sağlayamamaktadır. Bu nedenle, daha spesifik gen bölgelerini hedefleyen primerlere ihtiyaç duyulmuştur. Pothier vd. (2011) tarafından *X. arboricola* türünün kinat metabolizmasında rol oynayan *qumA* genine özgü olarak geliştirilen XarbQ-F ve XarbQ-R primer çiftinin, bu türün suşlarından yaklaşık 402 bp büyüklüğünde spesifik bir DNA fragmanı üreterek, tür düzeyinde etkin bir tanımlama sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da biyokimyasal testlerle Xac olma potansiyeli gösteren 28 adayın kimliğini moleküler düzeyde kesinleştirmek amacıyla bu primer çifti kullanılarak konvansiyonel PCR yapılmıştır. Test edilen 28 adet izolatın tamamından, yapılan PCR amplifikasyonu sonucunda agaroz jel elektroforezinde *X. arboricola* için beklenen yaklaşık 402 baz çifti (bp) büyüklüğünde spesifik bir DNA fragmanı elde edilmiştir. Bu sonuç, izolatların *X. arboricola* türü olduğunu moleküler düzeyde doğrulamıştır. Bu bulgu, *XarbQ* primerlerinin Türkiye'deki Xac popülasyonlarının tür düzeyinde hızlı ve güvenilir bir şekilde teşhis edilmesi için de oldukça etkili ve spesifik bir araç olduğunu göstermektedir.

Bir mikroorganizmanın belirli bir hastalığın etmeni olarak kesin bir şekilde tanımlanabilmesi için Koch postulatlarının yerine getirilmesi, yani izole edilen mikroorganizmanın sağlıklı konukçu bitkide aynı hastalık belirtilerini oluşturma yeteneğinin kanıtlanması zorunludur. Bu nedenle patojenisite testleri, özellikle Xac gibi fenotipik olarak benzer diğer ksantomonadlardan veya *X. arboricola*'nın diğer patovarlarından ayırt edilmesinde kritik bir rol oynar. Bu çalışmada, moleküler ve biyokimyasal testlerle *X. arboricola* olduğu doğrulanan 28 izolatın tamamı, patojenik karakterizasyonlarının yapılması amacıyla 'Tombul' fındık çeşidi üzerinde patojenisite testine tabi tutulmuştur. İnokulum hazırlığı ve uygulama yöntemleri, patojenisite testlerinin başarısı için hayati öneme sahiptir. Literatürde Xac için farklı inokülasyon yöntemleri (yaprak spreyi, tomurcuk enjeksiyonu, yara

inokülasyonu) ve 10^6 - 10^8 CFU/mL aralığında inokulum yoğunlukları kullanıldığı rapor edilmiştir (Karahan vd., 2013; Webber vd., 2020). Bu çalışmada da literatürle uyumlu olarak, fidanların yapraklarına püskürtme yöntemiyle 1×10^8 CFU/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonu uygulanmıştır. İnokülasyon sonrası bitkilerin yüksek nem koşullarında tutulması, enfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için gerekli bir adımdır (Pulawska vd., 2010). Test edilen 28 izolatın tamamının fındık bitkisinde Xac'a özgü belirtileri oluşturması, bu izolatların patojenik doğasını ve fındık bakteriyel yanıklığı hastalığının etmeni olduklarını kesin olarak kanıtlamıştır. Hastalık şiddetinin değerlendirilmesi, izolatlar arasındaki virülans farklılıklarını ortaya koymak ve çeşitlerin dayanıklılık düzeylerini belirlemek için önemlidir. Bu çalışmada, Akın (2012) tarafından önerilen ve yaprak üzerindeki lezyonlu alan yüzdesine dayanan 1-4 skalası kullanılmıştır. Değerlendirme sonucunda, izolatlar arasında virülenslik açısından önemli farklılıklar olduğu saptanmıştır. En yüksek hastalık şiddeti indeksine (HŞİ) 67,5 ile F7 izolatının sahip olması, popülasyon içinde yüksek derecede virulent bireylerin varlığını göstermektedir. F2, F5, F8, F9, F14 ve F27 gibi diğer birçok izolatın da yüksek HŞİ değerleri göstermesi, Türkiye'deki Xac popülasyonunun genel olarak fındık için önemli bir patojenik potansiyele sahip olduğuna işaret etmektedir. Bu virülenslik farklılıklarının istatistiksel olarak da anlamlı bulunması, sonraki çeşit reaksiyonu çalışmalarında kullanılacak en uygun (en virulent) izolatın seçimi için bilimsel bir temel oluşturmuştur. Nitekim, en yüksek virülensi gösteren F7 izolatının bu amaçla seçilmesi, çeşitlerin hastalığa karşı gerçek potansiyel reaksiyonlarının en doğru şekilde ölçülmesini sağlamıştır.

Housekeeping genlerinin (hücrenin temel fonksiyonlarında görev alan ve evrimsel süreçte görece yavaş değişen genler) sekans analizi, bakteri türlerinin ve patovaryalarının filogenetik ilişkilerini aydınlatmak ve taksonomik konumlarını doğrulamak için güçlü bir moleküler araçtır. Geleneksel olarak 16S rRNA geni bu amaçla kullanılmış olsa da yakın akraba türler ve özellikle patovaryalar arasında yeterli ayırt ediciliği sağlayamamaktadır. Bu nedenle, *gyrB* (DNA gyrase subunit B) ve *rpoD* (RNA polymerase sigma 70 factor) gibi daha hızlı evrimleşen protein kodlayan genler, *Xanthomonas* cinsi içindeki filogenetik çalışmalarda standart olarak kullanılmaya başlanmıştır (Young vd., 2008; Fischer-Le Saux vd., 2015). Bu çalışmada da SCoT analizi ile belirlenen farklı genetik grupları temsil eden 3 izolatın kimliğini daha detaylı bir şekilde doğrulamak ve filogenetik konumlarını

netleştirmek amacıyla *rpoD* gen bölgesinin sekans analizi yapılmıştır. Elde edilen ham sekans verileri düzenlendikten sonra NCBI BLAST ile yapılan analizlerde, tüm sekansların GenBank veri tabanındaki *Xac* referans suşlarına yaklaşık %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sekanslar kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlarda, çalışılan izolatların tamamının, güçlü bootstrap destek değerleri temelinde referans *Xac* suşlarıyla aynı ana dalda kümelendiği ve diğer *Xanthomonas* türlerinden, ayrıca *X. arboricola*'nın diğer patovarylarından net bir şekilde ayrıldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, Hajri vd. (2012) tarafından yapılan ve *rpoD* analizinin *Xac* suşlarını monofiletik bir grup olarak kümelendirdiğini gösteren çalışma ile de uyumludur. Bu sonuçlar hem izolatların doğru tanımlandığını hem de *rpoD* geninin Türkiye'deki *Xac* izolatlarının filogenetik analizi için güvenilir ve ayırt edici bir markör olduğunu göstermektedir.

Hastalık etmenlerinin hızlı, hassas ve güvenilir bir şekilde tespiti, bitki hastalıklarıyla mücadelede ve karantina önlemlerinin etkin bir şekilde uygulanmasında kritik öneme sahiptir. Geleneksel izolasyon ve tanılama yöntemleri zaman alıcı ve zahmetli olabilirken, konvansiyonel PCR testleri ise kantitatif bilgi sunmamakta ve bazen düşük hassasiyete sahip olabilmektedir. Real-time PCR (qPCR), bu sınırlılıkları aşarak patojen DNA'sını gerçek zamanlı olarak çoğaltıp miktarını belirleyebilen, son derece hassas ve özgül bir teknolojidir. *Xac* gibi ekonomik öneme sahip bir patojenin, özellikle latent enfeksiyonları veya bulaşık çoğaltım materyallerindeki düşük yoğunluktaki varlığını saptamak için qPCR tabanlı yöntemlerin geliştirilmesi büyük bir ihtiyaçtır. Bu çalışmanın en özgün yönlerinden biri, *Xac*'in hassas ve hızlı tespiti amacıyla *gyrB* gen bölgesindeki polimorfik alanları hedefleyen, türe özgü yeni real-time PCR primerlerinin (*XargyrB_F/R*) tasarlanması ve doğrulanmasıdır. Primer tasarımında Primer3 ve UNAFold gibi standart biyoinformatik yazılımların kullanılması ve tasarlanan aday primerlerin NCBI Primer-BLAST ile *in silico* (bilgisayar ortamında) analizlerinin yapılması, modern primer tasarım stratejileriyle uyumludur. Bu analizler, primerlerin hedef dışı organizmalarla, özellikle de konukçu bitki olan fındık genomu ile eşleşme göstermediğini doğrulamak için kritik bir adımdır (Alkan vd., 2022). Seçilen primer çiftinin doğrulanmasıyla sadece *X. arboricola* DNA'sını spesifik olarak çoğalttığını ve fındık DNA'sı gibi negatif kontrollerde sinyal üretmediğini göstermesi, geliştirilen testin yüksek özgüllüğünü

kanıtlamıştır. Tasarlanan ve doğrulanan bu yeni primer seti, Türkiye'deki Xac popülasyonlarının tespiti için güvenilir ve spesifik bir moleküler araç sunmaktadır.

Geliştirilen ve doğrulanan *X. arboricola*'ya özgü primerler kullanılarak SYBR Green I temelli bir real-time PCR yönteminin optimize edilmesi, bu çalışmanın bir diğer önemli ve özgün katkısıdır. SYBR Green I, maliyet etkinliği ve kullanım kolaylığı nedeniyle qPCR analizlerinde yaygın olarak tercih edilen bir floresan boyadır (Çelik vd., 2024). Yöntemin performansının, bilinen konsantrasyonlardaki saf Xac genomik DNA'sı kullanılarak oluşturulan bir standart eğri ile değerlendirilmesi, kantitatif analizlerin doğruluğu için standart bir prosedürdür. Bu çalışmada elde edilen standart eğrinin yüksek verimliliğe ($E \approx 102,6\%$) ve mükemmel bir doğrusallığa ($R^2=0,996$) sahip olması, geliştirilen qPCR yönteminin hem güvenilir hem de tekrarlanabilir olduğunu ve patojen DNA'sını doğru bir şekilde miktarlandırma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu değerler, Alkan vd. (2022) ve Özer vd. (2023) tarafından yapılan çalışmalarda rapor edilen ve kabul edilebilir standartlar olarak belirtilen verimlilik ve doğrusallık değerleriyle uyumludur. Yöntemin tespit limiti (LoD), yani saptayabildiği en düşük patojen miktarı, bir tanı testinin hassasiyetini belirleyen en önemli parametrelerden biridir. Geliştirilen yöntemin pikogram veya femtogram düzeyindeki Xac DNA'sını tespit edebilmesi, onun çok düşük patojen yoğunluklarında bile, örneğin enfeksiyonun erken evrelerinde veya latent bulaşık fidanlarda, etkili bir şekilde tanı koyma potansiyelini göstermektedir. Bu hassasiyet seviyesi, Kaluzna (2023) tarafından Xac için geliştirilen diğer qPCR testlerinin hassasiyetiyle karşılaştırılabilir düzeydedir. Ayrıca, SYBR Green I tabanlı testlerin en kritik doğrulama adımı olan erime eğrisi analizlerinde, çoğaltılan PCR ürününün spesifik olduğunu ve primer dimerleri gibi istenmeyen ürünlerin oluşmadığını teyit etmiştir. Bu optimize edilmiş qPCR yöntemi ile Xac DNA'sının hem saf kültürlerden elde edilen genomik DNA'dan hem de doğrudan fındık bitki dokularından hassas ve kantitatif olarak tespit edilebildiği gösterilmiştir. Bu durum, fındık bakteriyel yanıklığı ile mücadelede, özellikle hastalıksız fidan materyali üretiminde ve sertifikasyon programlarında kullanılabilecek güçlü, hızlı ve güvenilir bir tanı aracı sunmaktadır.

Fındık bakteriyel yanıklığı ile mücadelede en etkili ve sürdürülebilir yöntemlerden biri, hastalığa karşı dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıdır. Bu nedenle, ticari öneme sahip ve yaygın olarak yetiştirilen fındık çeşitlerinin Xac'a karşı

gösterdikleri reaksiyon düzeylerinin belirlenmesi, ıslah programları ve üretici tavsiyeleri için hayati öneme sahiptir. Bu çalışmada, Türkiye'de ve dünyada önemli yere sahip 10 farklı fındık çeşidinin ('Çakıldak', 'Tombul', 'Yomra', 'Kalınkara', 'Palaz', 'Karafındık', 'Mincane', 'Nocchione', 'Tonda di Giffoni', 'Tonda Romana') Xac'a karşı reaksiyonları, kontrollü iklim odası koşullarında, yüksek virulent F7 izolatu kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre fındık çeşitlerinin Xac inokulasyonuna karşı farklı hastalık şiddeti yüzdeleri sergilediği görülmüştür. Hastalık şiddeti değerlerinin %17,5 ile %70 arasında değişmesi, çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğunu ortaya koymaktadır. En yüksek hastalık şiddetinin 'Kalınkara' çeşidinde saptanması, bu çeşidin Xac'a karşı çok hassas olduğunu göstermektedir. İtalyan orijinli 'Tonda Romana' ve 'Tonda di Giffoni' çeşitlerinin de yüksek hastalık şiddeti göstermesi, Scortichini vd. (2002) tarafından yapılan ve bu çeşitlerin Xac suşları tarafından enfekte edilebildiğini gösteren raporu desteklemektedir. 'Çakıldak', 'Mincane' ve 'Nocchione' gibi çeşitlerin de yüksek hastalık şiddeti göstermesi, Türkiye'de ve dünyada yetiştirilen birçok önemli çeşidin hastalık riski altında olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmanın en dikkat çekici sonuçlarından biri, 'Yomra' ve 'Tombul' çeşitlerinin (%27,5 HŞİ) ve özellikle 'Karafındık' çeşidinin (%17,5 HŞİ), test edilen diğer çeşitlere kıyasla anlamlı derecede daha az hastalık şiddeti reaksiyonu göstermesidir. Bu, bu çeşitlerin genetik olarak Xac'a karşı daha dirençli savunma mekanizmalarına sahip olabileceği ihtimaline işaret etmektedir. Akın (2012) tarafından yapılan çalışmada 'Mincane' çeşidinin daha dayanıklı bulunduğu rapor edilmişken, bu çalışmada 'Mincane'nin hastalık şiddetinin yüksek çıkması, 'Yomra', 'Tombul' ve özellikle 'Karafındık'ın ise hastalık şiddetinin düşük çıkması, kullanılan Xac izolatının virülans özellikleri, test koşulları veya değerlendirme kriterlerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Her iki durumda da Türk fındık gen kaynakları içerisinde Xac'a karşı dayanıklılık kaynaklarının bulunduğu ve bu çeşitlerin gelecekteki fındık ıslah programlarında dayanıklılık kaynağı olarak kullanılabileceği açıktır. Bu durum dayanıklılık ve ıslah çalışmaları sürecinde tek bir izolat yerine yerel kaynaklardan elde edilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş birden daha fazla izolat karışımını anlamlandırmaktadır. Kantitatif sonuçlar, fındık bakteriyel yanıklığı ile entegre mücadele stratejilerinin bir parçası olarak dayanıklı çeşit seçimi konusunda üreticilere ve araştırmacılara önemli veriler

sunmaktadır. Çeşit reaksiyon çalışmaları sonrasında yeni türe spesifik primer ile dokudan tespit amacıyla yapılan real-time çalışmalarında elde edilen sonuçlarda 'Karafındık' çeşidinin Xac'ya karşı 'Kalınkara' çeşidinden daha dayanıklı olduğunu moleküler düzeyde doğrulamaktadır. Real-time PCR analizi, geleneksel hastalık değerlendirme yöntemlerine kıyasla daha objektif, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlamıştır.

Hastalık şiddeti yüksek bulunan çeşitte tespit edilen yüksek bakteriyel DNA miktarları, patojenin başarılı kolonizasyonunu ve çoğalmasını işaret etmektedir. Hastalık şiddeti düşük çıkan çeşitte gözlenen düşük bakteri miktarı, muhtemelen savunma mekanizmalarının etkin çalışması ile açıklanabilir.

Zamana bağlı olarak bakteri miktarının artması, enfeksiyonun ilerlemesi ve hastalık gelişimi açısından kritik öneme sahiptir. Özellikle 3. günde gözlenen en yüksek değerler, patojenin logaritmik çoğalma fazında olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, erken teşhis ve müdahale stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli bilgiler sunmaktadır.

Geliştirilen qPCR protokolü, 0,1 pg'a kadar düşük konsantrasyonlarda patojen DNA'sını tespit edebilme kapasitesi ile literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu performans sergilemiştir (Kaluzna, 2023). Bu yöntemin hassas ve güvenilir sonuçlar vermesi, gelecekteki dayanıklılık çalışmalarında, ıslah programlarında genotip seçiminde ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabilirliğini desteklemektedir.

Bu bulgular, dayanıklı çeşitlerin fındık bakteriyel yanıklık hastalığının entegre yönetiminde etkili bir strateji olabileceğini göstermekte ve çeşit seçiminin hastalık kontrolündeki stratejik önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, moleküler markörlerle desteklenen seleksiyon programlarının geliştirilmesi ve dayanıklılık genlerinin tanımlanması için temel oluşturmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Fındık bakteriyel yanıklığı, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac) kaynaklı olarak, hem Türkiye'nin lider konumda olduğu küresel fındık üretimini hem de yerel yetiştiricileri ciddi anlamda tehdit eden, ekonomik yansımaları büyük bir hastalıktır. Bu hastalığın etkin bir şekilde yönetilebilmesi, her şeyden önce patojenin doğru ve süratli bir şekilde tanımlanmasını, popülasyon özelliklerinin anlaşılmasını ve konukçu fındık çeşitlerinin bu patojene karşı gösterdiği dayanıklılık profillerinin net bir şekilde ortaya konmasını gerektirmektedir. Bu çalışma, bu temel ihtiyaçlara cevap verecek nitelikte metodolojik yaklaşımlar sunmuş ve elde ettiği bulgularla fındık-Xac etkileşiminin daha iyi anlaşılmasına, dolayısıyla daha etkin mücadele stratejilerinin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında yürütülen ve birçok farklı disiplini bir araya getiren araştırmalar neticesinde, Türkiye'nin önemli fındık üretim merkezlerinden toplanan Xac izolatlarının kapsamlı bir karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Xac'ın tanımlanması ve mücadelesine yönelik mevcut bilgi birikimine önemli katkılar sunarken, aynı zamanda gelecekteki araştırmalar için de bir yol haritası çizmektedir. Klasik bakteriyolojik yöntemlerin patojenin ön elemesinde ve genel grup özelliklerinin belirlenmesinde değerli bir ilk adım olduğu doğrulanmıştır. Ancak, özellikle *Xanthomonas* gibi fenotipik çeşitliliğin ve yakın akraba tür/patovarlar arası benzerliğin yüksek olduğu bakteri gruplarında, sadece klasik yöntemlere dayalı bir tanımlamanın yetersiz kalabileceği ve yanıltıcı sonuçlara yol açabileceği gerçeği bir kez daha teyit edilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda *qumA* genini hedefleyen türe özgü PCR ve filogenetik analizler için yüksek çözünürlük sunan *rpoD* gen bölgesi sekanslaması gibi moleküler tekniklerin entegre kullanımı, izolatların Xac olarak kesin ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasında vazgeçilmez bir rol oynamıştır. Bu entegre yaklaşım, gelecekte yürütülecek epidemiyolojik sörvey çalışmaları, karantina uygulamaları ve fidanlık sertifikasyon programları için sağlam bir tanılama protokolü sunmaktadır. Böyle bir protokol, şüpheli vakalarda tanı sürecini hızlandıracak ve doğruluğunu artırarak, hastalık yönetimi kararlarının daha etkin alınmasına olanak tanıyacaktır.

Bu çalışmada, Start Codon Targeted (SCoT) polimorfizm analizi, Xac izolatlarının genetik parmak izlerinin çıkarılması ve popülasyon içi genetik ilişkilerin ön değerlendirmesi amacıyla kullanılmıştır. SCoT tekniği, genomik DNA

üzerinde rastgele ancak tekrarlanabilir ve polimorfik bant profilleri oluşturarak, çok sayıda izolatin bulunduğu mikrobiyal koleksiyonlarda, genetik olarak birbirine benzeyen veya farklılaşan grupların hızla ayırt edilmesine olanak sağlamaktadır. Dünya literatüründe bu patojen grubu için ilk defa kullanılan markör sisteminin sunduğu pratik avantajlardan biri, genetik olarak farklılık gösteren ve popülasyonu temsil edebilecek nitelikteki izolatların, daha kapsamlı, maliyetli ve zaman gerektiren ileri moleküler analizler için stratejik bir önceliklendirme ile seçilebilmesidir. Böylece, kısıtlı olan araştırma kaynakları daha verimli ve odaklı bir şekilde kullanılarak, patojen popülasyonunun genetik mimarisi ve çeşitliliği hakkında daha kısa sürede daha derinlemesine ve anlamlı bilgilere ulaşılması kolaylaşabilir. SCoT ile elde edilen genetik parmak izi profilleri, aynı zamanda, yeni bir hastalık salgınının kaynağını belirleme çabalarında veya farklı coğrafi orijinli izolatlar arasındaki olası epidemiyolojik bağlantıları araştırırken, hızlı bir ön tarama ve gruplandırma yapabilme potansiyeli sunarak değerli bir öncül araç işlevi görebilir.

Bir mikroorganizmanın spesifik bir hastalığın etkeni olarak tanımlanmasında Koch postulatlarının doğrulanması temel bir aşama olup, patojenisite testleri bu sürecin merkezinde yer almaktadır; bu çalışmada da bu testlerin önemi ortaya konmuştur. Moleküler düzeyde Xac olarak tanımlanan tüm izolatların, hassas bir fındık çeşidinde hastalık semptomları meydana getirme kapasitelerinin doğrulanması, bu izolatların sadece tür düzeyinde değil, aynı zamanda fındığa özgü patojenik form olan patovar düzeyindeki kimliklerini de güçlendirmiştir. Patojenisite testlerinin sağladığı bir diğer mühim bulgu, incelenen Xac izolatları arasında hastalık oluşturma şiddeti, yani virülenslik açısından farklılıkların bulunmasıdır. Bu çeşitlilik bilgisi, özellikle fındık genotiplerinin hastalığa karşı tepkilerinin değerlendirileceği tarama çalışmalarında kullanılacak inokulumun seçimi bakımından stratejik bir değere sahiptir. Nitekim, tarla koşullarındaki doğal enfeksiyon baskısını daha iyi temsil edebilecek, bölgesel popülasyonu yansıtan ve farklı virülens seviyelerine sahip izolatların kullanılması, çeşitlerin gerçek dayanıklılık potansiyellerinin daha isabetli bir şekilde saptanmasına imkan tanıyabilir.

Günümüzde bitki hastalıklarının etkin yönetimi ve uluslararası ticarete bitki sağlığı standartlarının korunması, latent enfeksiyonlar veya düşük yoğunluktaki patojen varlığı gibi zor tespit edilen durumlarda, hızlı, hassas ve kantitatif sonuçlar

üretebilen tanı yöntemlerinin varlığını zorunlu kılmaktadır. Bu önemli gereksinimden yola çıkarak, çalışmamızda Xac'ın tespiti için, filogenetik çalışmalarda da değerli bilgiler sunan ve görece korunmuş gen bölgeleri olan *gyrB*'yi hedefleyen, SYBR Green I boyasına dayalı yeni, özgül ve kapsamlı bir şekilde doğrulanmış bir real-time PCR (qPCR) protokolü geliştirilmiştir. Geliştirilen bu qPCR yönteminin, yapılan doğrulama çalışmaları sonucunda yüksek bir özgüllük (hedef dışı DNA ile reaksiyon vermeme), etkileyici bir hassasiyet (çok düşük patojen DNA miktarlarını dahi saptayabilme), geniş bir dinamik aralıkta güvenilir kantitatif ölçüm yapabilme kapasitesi ve yüksek tekrarlanabilirlik gibi üstün performans kriterlerine sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu qPCR yöntemi, sadece rutin bir tanı aracı olmanın ötesinde, fındık gibi ekonomik değeri yüksek bir ürünün çoğaltım materyallerinin Xac'tan ari olup olmadığının belgelenmesi ve sertifikasyon süreçlerinin desteklenmesinde; karantina uygulamaları kapsamında ülkeye giriş yapması muhtemel şüpheli bitkisel materyallerin hızla ve güvenilir bir şekilde taranmasında; görünürde sağlıklı olan ancak gizli enfeksiyon taşıyabilecek asemptomatik bitkilerdeki patojen varlığının erken dönemde saptanmasında ve hastalığın yayılma dinamikleri, farklı ortamlardaki patojen yükü gibi konuların incelendiği epidemiyolojik araştırmalarda güçlü bir analitik potansiyel sunmaktadır. Ayrıca, konukçu bitkinin patojene karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda veya farklı kimyasal ya da biyolojik mücadele stratejilerinin etkinliğinin değerlendirildiği kontrollü denemelerde, konukçu dokusundaki patojen miktarının hassas ve tekrarlanabilir bir şekilde ölçülmesi için de vazgeçilmez bir analitik araç niteliği taşımaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, 'Kalınkara' ve 'Karafındık' fındık çeşitlerinin *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'ya karşı gösterdikleri farklı hastalık reaksiyonlarının temelinde, konukçu dokusu içindeki bakteri popülasyonunu kontrol etme yeteneklerinin yattığını kantitatif olarak kanıtlamaktadır. Ayrıca qPCR sonuçları, makroskobik olarak gözlemlenen hastalık şiddeti (yüksek/düşük) ile bitki dokusundaki bakteri miktarı arasında doğrudan ve güçlü bir pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar hastalık şiddeti indeksi (HŞİ) yüksek olan 'Kalınkara' çeşidinin, bakterinin hızla çoğalması için uygun bir ortam sunduğunu, HŞİ düşük olan 'Karafındık' çeşidinin de patojenin üremesini etkin bir şekilde sınırlayan savunma mekanizmalarına sahip olduğunu göstermektedir.

Elde edilen bu sonuçlarla bakteri miktarının 3. günde zirve yapıp 5. günde bir miktar azalması, 3. günden sonra bitkinin savunma sistemlerinin (gecikmeli de olsa) daha aktif hale gelmesiyle veya lokal doku alanlarında besin tükenmesi gibi faktörlerle açıklanabilir. Ancak en dikkat çekici nokta, 'Kalınkara' çeşidindeki bakteri popülasyonunun her zaman diliminde 'Karafındık' çeşidine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olmasıdır.

Bu doğrultuda *gyrB* genini hedef alan qPCR analizi ve yeni tasarlanan primerlerin fındık bitkisinde hastalığa neden olan bakteri popülasyonunu bitki içinde hassas, özgül ve kantitatif bir şekilde izlemek için güvenilir olduğunu kanıtlamıştır. Erime piki analizi ile doğrulanan reaksiyon spesifisitesi, sonuçların güvenilirliğini pekiştirmiştir.

Bu çalışmada izlenen sistematik primer tasarım ve kapsamlı doğrulama stratejisinin, gelecekte *Xac* veya *X. arboricola* tür kompleksindeki diğer önemli patovarylar için daha da geliştirilmiş, belki multipleks analizlere olanak tanıyan veya farklı problemlerin çözümüne yönelik ileri teknolojileri entegre eden yeni nesil tanıtsal testlerin geliştirilmesine öncülük edebileceği düşünülmektedir.

Fındık bakteriyel yanıklığı gibi önemli bir hastalıkla mücadelede en arzu edilen ve uzun vadede sürdürülebilirliği en yüksek olan yaklaşımlardan birisi, hiç şüphesiz, hastalığa karşı doğal bir genetik dayanıklılık veya en azından yüksek düzeyde dayanıklılık gösteren fındık çeşitlerinin yetiştirilmesinin yaygınlaştırılmasıdır. Bu hedefe ulaşabilmek için, öncelikle mevcut ticari öneme sahip ve yerel olarak yaygın yetiştirilen fındık çeşitlerinin *Xac*'a karşı gösterdikleri reaksiyon profillerinin doğru bir şekilde bilinmesi, hem üreticilerin daha bilinçli çeşit seçimi yapabilmeleri hem de bitki ıslahçıların yeni çeşit geliştirme programlarını daha etkin bir şekilde yönlendirebilmeleri açısından kritik bir veri setidir. Bu kapsamda yürütülen çalışmada, Türkiye'de geniş yetiştirme alanlarına sahip bazı yerel fındık çeşitleri ile uluslararası ticarete önemli yer tutan bazı İtalyan çeşitlerinin de aralarında bulunduğu toplam 10 farklı fındık çeşidi, yüksek hastalık yapma kabiliyetine sahip olduğu belirlenen yerel bir *Xac* izolatına karşı kontrollü koşullar altında test edilerek hastalığa tepkileri incelenmiştir. Elde edilen bilimsel veriler, test edilen bu çeşitler arasında *Xac*'a karşı gösterilen hassasiyet düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı ve dikkate değer farklılıklar bulunduğunu net bir şekilde ortaya koymuştur. 'Kalınkara', 'Tonda Romana' ve 'Tonda di Giffoni' gibi bazı çeşitlerin, kullanılan bu yerel ve agresif *Xac* izolatına karşı oldukça hassas

reaksiyonlar sergilediği ve yüksek hastalık şiddeti değerleri gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, söz konusu çeşitlerin Xac salgın riski yüksek olan bölgelerde yetiştirilmesi durumunda, hastalığın olumsuz etkilerini en aza indirebilmek için daha dikkatli bir hastalık yönetimi stratejisinin benimsenmesi ve muhtemelen ek koruyucu kültürel veya kimyasal önlemlerin alınması gerekliliğine işaret etmektedir. Diğer yandan, 'Yomra' ile 'Karafındık' gibi çeşitlerin, test edilen diğer fındık çeşitlerine kıyasla anlamlı derecede daha düşük hastalık şiddeti değerleri sergileyerek, Xac'a karşı daha az hassas veya göreceli olarak daha dayanıklılık gösteren bir reaksiyon profili çizdiği belirlenmiştir. Bu önemli bulgu, 'Karafındık' çeşidinin, fındık bakteriyel yanıklığına karşı potansiyel bir genetik kaynak olarak değerlendirilebileceğini ve hastalığın yoğun olarak sorun teşkil ettiği alanlarda yetiştiricilik için umut vadeden bir alternatif olabileceğini akla getirmektedir.

Çeşit reaksiyonu çalışmalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda, fındık ıslahı programlarının, 'Karafındık' gibi Xac'a karşı daha az hassas bulunan çeşitlerde var olan bu arzu edilen dayanıklılık özelliklerini, yüksek verim, iyi meyve kalitesi, farklı ekolojik koşullara adaptasyon gibi diğer önemli agronomik karakterlerle birleştirmeye yönelik stratejiler geliştirmesi yönünde değerlendirmeler yapılabilir. Fındık bakteriyel yanıklığı ile etkin bir mücadele zeminini oluşturabilmek adına, bu çalışmada elde edilen bulguların ve geliştirilen araçların entegre bir yaklaşımla değerlendirilmesi, gelecekteki stratejiler için yol gösterici olabilir. Bu tür entegre mücadele programlarının (IPM) etkinliği, birbirini tamamlayan çeşitli yöntemlerin bir arada düşünülmesine bağlıdır. Bu bağlamda, hastalığa karşı daha dayanıklı olduğu saptanan 'Karafındık' gibi fındık çeşitlerinin, özellikle hastalığın yoğun olarak gözlemlendiği bölgelerde yetiştiricilik alternatifleri arasında dikkate alınması ve bu çeşitlerin fidan temini olanaklarının artırılması yönünde değerlendirmeler yapılabilir. Sertifikalı ve hastalıktan arı fidan kullanımının yaygınlaştırılması, hastalığın yayılımının kontrol altına alınmasında kritik bir faktör olarak öne çıkmaktadır; bu noktada, çalışmada geliştirilen qPCR yönteminin, fidanlıklar ve ilgili sertifikasyon kuruluşları tarafından Xac'ın tespiti amacıyla bir değerlendirme aracı olarak kullanılması, temiz üretim materyali tedarikinin güvence altına alınmasına ve böylece hastalığın başlangıç inokulumunun azaltılmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, üreticilerin uygun budama teknikleri ile yere dökülen hastalıklı yaprak ve zurufların

toplanarak bahçeden uzaklaştırılması gibi temel bahçe sanitasyonu uygulamaları konusunda farkındalığının artırılması ve bu uygulamaların teşvik edilmesi önem taşımaktadır. Kimyasal mücadelenin, entegre programlar içerisinde son bir seçenek olarak değerlendirilmesi ve eğer başvurulacaksa ruhsatlı, özellikle koruyucu etkili bakırlı preparatların, ilkbahar gibi enfeksiyon riskinin yüksek olduğu fenolojik dönemlerde, meteorolojik tahminler dikkate alınarak ve önerilen dozlarda kullanılması, aynı zamanda biyolojik mücadele ajanlarının Xac'a karşı potansiyelinin daha fazla araştırılarak IPM programlarına entegrasyon olanaklarının incelenmesi önemli bir husus olarak değerlendirilmelidir. Bu çeşitli unsurları içeren kapsamlı IPM stratejilerinin, ilgili kamu kurumları, araştırma enstitüleri ve üretici örgütleri iş birliğiyle oluşturularak üreticilere ulaştırılması ve benimsenmesinin teşvik edilmesi üzerinde durulması gereken bir konudur.

Bununla birlikte, küresel iklim değişikliğinin Xac epidemiyolojisi ve fındık-Xac arasındaki hassas etkileşimler üzerindeki muhtemel etkilerinin daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesi üzerinde durulması, gelecekte karşılaşılabilecek risk senaryolarına karşı daha proaktif ve adaptif stratejiler geliştirilmesine yönelik bir anlayış oluşturmaya yardımcı olabilir. Örneğin, sıcaklık rejimlerindeki değişimlerin veya yağış dağılımındaki farklılıkların, hastalığın coğrafi yayılımını, mevsimsel aktivitesini, şiddetini ya da patojenin kışlama ve yayılma dinamiklerini ne yönde etkileyebileceğine dair yapılacak modelleme çalışmaları ve uzun süreli, sistematik saha gözlemleri, bölgesel adaptasyon ve önlem stratejilerinin belirlenmesinde değerli birer yol gösterici olacaktır. Nihayetinde, Türkiye'deki Xac popülasyonlarının genetik yapısındaki ve virülens karakterlerindeki olası değişimlerin düzenli aralıklarla izlenmesi, üniversiteler ve konuyla ilgili araştırma enstitüleri tarafından koordineli bir şekilde yürütülecek, belirli örnekleme stratejilerine dayalı olarak toplanan izolatların laboratuvar koşullarında detaylı analizlere dayalı çalışmalarla sürdürülmelidir. Bu tür laboratuvar temelli izleme faaliyetleri, patojen popülasyonunda ortaya çıkabilecek yeni ve potansiyel olarak daha agresif genotiplerin erken dönemde saptanmasına veya mevcut genotiplerin bölgesel yayılım örüntülerindeki değişimlerin anlaşılmasına imkân sunabilir. Elde edilecek bu güncel bilgiler ışığında ise, hem fındık bakteriyel yanıklığına karşı geliştirilecek mücadele stratejilerinin hem de dayanıklılık ıslahı programlarının dinamik bir şekilde gözden geçirilmesine ve iyileştirilmesine zemin hazırlayabilir. Fındık gibi stratejik bir ürünün üretiminde sürdürülebilirliğin sağlanması ve

güvence altına alınması, ancak bu gibi multidisipliner yaklaşımları, sürekli gözlemi ve paydaşlar arası etkin bir iş birliğini içeren uzun vadeli çabalarla mümkün olabilecektir.



KAYNAKLAR

- Ak, K., Saruhan, I., & Akyol, H. (2014). Xyleborus dispar (Fabricius, 1792) ve Xyleborinus saxesenii (Ratzeburg, 1837) (COLEOPTERA: CURCULIONOIDEA: SCOLYTIDAE)'YE KARŞI FARKLI TUZAK TİPLERİNİN PERFORMANSLARININ BELİRLENMESİ. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 29(1), Article 1. <https://doi.org/10.7161/anajas.2014.29.1.26>
- Akçin, Y., & Bostan, S. Z. (2023). Supplementary Irrigation During the Last Cluster Drop Period for Higher Yield and Quality in Conventional Rain-Fed Hazelnut Farming. *Erwerbs-Obstbau*, 65(1), 115-120. <https://doi.org/10.1007/s10341-022-00787-3>
- Akın, M. (2012). *Türk Fındık Çeşitlerinin (Corylus Avellana L.) Bakteriyel Yanıklık Hastalığına (Xanthomonas Arboricola pv. Corylina) Karşı Toleranslarının Belirlenmesi* [masterThesis, Fen Bilimleri Enstitüsü]. <http://earsiv.odu.edu.tr:8080/xmlui/handle/11489/1231>
- Akın, M., & Aygün, A. (2021). Determining the tolerance of the Turkish hazelnut cultivars (Coryllus avellana) against the pathovar Xanthomonas arboricola pv. Corylina (causing agent of fireblight). *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 58(2), Article 2. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.699904>
- Alay, K., Altinyay, N., Dünder, F., Hancıoğlu, Ö., & Ünal, A. (1973). *KARADENİZ BÖLGESİ FINDIKLARINDA DAL KURUMALARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR*. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/41182>
- AliNiazee, M. T. (1998). ECOLOGY AND MANAGEMENT OF HAZELNUT PESTS. *Annual Review of Entomology*, 43(Volume 43, 1998), 395-419. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.395>
- Alkan, M., Bayraktar, H., İmren, M., Özdemir, F., Lahlali, R., Mokrini, F., Paulitz, T., Dababat, A. A., & Özer, G. (2022). Monitoring of Host Suitability and Defense-Related Genes in Wheat to Bipolaris sorokiniana. *Journal of Fungi*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jof8020149>
- Arciuolo, R., Santos, C., Soares, C., Castello, G., Spigolon, N., Chiusa, G., Lima, N., & Battilani, P. (2020). Molecular Characterization of Diaporthe Species Associated With Hazelnut Defects. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.611655>
- Areas, M. S., Gonçalves, R. M., Soman, J. M., Souza Filho, R. C., Gioria, R., Silva Junior, T. a. F. D., & Maringoni, A. C. (2017). Resistance of Xanthomonas euvesicatoria strains from Brazilian pepper to copper and zinc sulfates. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 2375-2380. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160413>
- Avanzato, D., Vaccaro, A., & Bevilacqua, D. (2009). A SHORT REVIEW OF NUT INDUSTRY IN EU. *Acta Horticulturae*, 825, 41-48. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.825.3>
- Aydın, F., Özer, G., Alkan, M., & Çakır, İ. (2022). Start Codon Targeted (SCoT) markers for the assessment of genetic diversity in yeast isolated from Turkish sourdough. *Food Microbiology*, 107, 104081. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104081>
- Ayyanath, M.-M., Shukla, M. R., & Saxena, P. K. (2021). Role of water percolation in reproductive physiology of hazelnut (Corylus spp.). *Environmental and Experimental Botany*, 182, 104278. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104278>
- Ayyanath, M.-M., Shukla, M. R., & Saxena, P. K. (2023). Indoleamines Impart Abiotic Stress Tolerance and Improve Reproductive Traits in Hazelnuts. *Plants*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/plants12061233>
- Ayyıldız, S., & Sezgin, A. C. (2022). Giresun restoran mutfaklarında fındığın kullanım alanları. *Karadeniz İncelemeleri Dergisi*, 16(32), Article 32. <https://doi.org/10.18220/kid.1103476>
- Ballard, E. L., Dietzgen, R. G., Sly, L. I., Gouk, C., Horlock, C., & Fegan, M. (2011). Development of a Bio-PCR Protocol for the Detection of Xanthomonas arboricola pv. Pruni. *Plant Disease*, 95(9), 1109-1115. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0650>
- Bars, T., Uçum, İ., & Akbay, C. (2018). ARIMA modeli ile türkiye fındık üretim projeksiyonu. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 21, 154-160. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.21i41625.473029>
- Berberoglu, M., & Uzun, U. (2018). The relationship between hazelnut prices and financial performance of companies and the moderate effect of foreign exchange rate on this relationship. *Uluslararası Yönetim İktisat ve İşletme Dergisi*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.17130/ijmeb.2018445667>
- Bostan, S. (2005). *Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Fındık Üretimi ile Bazı Önemli İklim Değerleri Arasındaki İlişkiler*.
- Botta, R., Molnar, T. J., Erdogan, V., Valentini, N., Torello Marinoni, D., & Mehlenbacher, S. A. (2019). Hazelnut (Corylus spp.) Breeding. İçinde J. M. Al-Khayri, S. M. Jain, & D. V. Johnson (Ed.), *Advances in Plant*

- Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops: Volume 4* (ss. 157-219). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23112-5_6
- Bradbury, J. F. & UK, CAB International. (1987). *Xanthomonas campestris* pv. *Corylina*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. *Descriptions of Fungi and Bacteria*, Sheet 896. <https://doi.org/10.1079/DFB/20056400896>
- Chaudhry, A. H., Nayab, S., Hussain, S. B., Ali, M., & Pan, Z. (2021). Current Understandings on Magnesium Deficiency and Future Outlooks for Sustainable Agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms22041819>
- Collard, B. C. Y., & Mackill, D. J. (2009). Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(1), 86-93. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>
- Contarini, M., Masturzi, R., Iezzi, E., Petrović, M., Silvestri, C., Turco, S., Speranza, S., & Rossini, L. (2024). Can Pest Management and Cultivar Affect Phytophthora avellanae Infestations on Hazelnut? *Insects*, 15(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/insects15100740>
- Çelik, A., Çakar, D., Derviş, S., Morca, A. F., Akıllı Şimşek, S., Romon-Ochoa, P., & Özer, G. (2024). New Detection Methods for Cryphonectria Hypovirus 1 (CHV1) through SYBR Green-Based Real-Time PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Viruses*, 16(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/v16081203>
- Ecevit, O., Özman, S., Hatat, G., Okay, M., Kaya, A., & Mennan, S. (1996). Karadeniz bölgesinde önemli fındık çeşitlerinin zararlı ve hastalıklara karşı duyarlılıklarının belirlenmesi. *Fındık ve Diğer Sert Kabuklu Meyveler Sempozyumu, Ondokuz Mayıs Üniversitesi*, 10-11.
- EPPO. (2004). *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* (XANTCY) (OEPP/EPPO Bulletin No. 34; ss. 155-157). <https://gd.eppo.int/taxon/XANTCY/documents>
- Erper, İ., Kushiyeve, R., Yıldırım, E., Türkkan, M., & Tuncer, C. (2019). Determination of efficacy of some fungicides used in hazelnut orchards against Ambrosiella hartigii Batra symbiotically associated with Anisandrus dispar Fabricius (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) under laboratory conditions. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 34(2), Article 2. <https://doi.org/10.7161/omuanajas.470201>
- Erper, I., Saruhan, I., Akça, I., Aksoy, H., & Tuncer, C. (2016). Evaluation of some entomopathogenic fungi for controlling the green shield bug, Palomena prasina L. (Heteroptera: Pentatomidae). https://www.researchgate.net/publication/309486690_Evaluation_of_Some_Entomopathogenic_Fungi_for_Controlling_the_Green_Shield_Bug_Palomena_prasina_L_Heteroptera_Pentatomidae
- Erper, İ., Türkkan, M., Karaca, G. H., & Kılıç, G. (2012). New hosts for Phyllactinia guttata in the Black Sea Region of Turkey. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 27(5), 432-437. <https://doi.org/10.1080/02827581.2011.649300>
- Ertunç, F., Canik, D., Gospodaryk, A., Budzanivska, İ., & Polischuk, V. (2011). Elma Mozaik İlarvirusu Türkiye ve Ukrayna İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. *Journal of Agricultural Sciences*, 17(2), Article 2. https://doi.org/10.1501/Tarimbil_0000001161
- Essakhi, S., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Jacques, M.-A., & Manceau, C. (2015). Phylogenetic and Variable-Number Tandem-Repeat Analyses Identify Nonpathogenic Xanthomonas arboricola Lineages Lacking the Canonical Type III Secretion System. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5395-5410. <https://doi.org/10.1128/AEM.00835-15>
- FAOSTAT, D. (2025). (Food and Agriculture Organization of the United Nations). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Essakhi, S., Manceau, C., & Jacques, M.-A. (2015). Aggressive Emerging Pathovars of Xanthomonas arboricola Represent Widespread Epidemic Clones Distinct from Poorly Pathogenic Strains, as Revealed by Multilocus Sequence Typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4651-4668. <https://doi.org/10.1128/AEM.00050-15>
- Frutos, D. (2010). Bacterial Diseases of Walnut and Hazelnut and Genetic Resources. *Journal of Plant Pathology*, 92, S79-S85.
- Gardan, L., & Devaux, M. (1987). La bactériose du noisetier (Xanthomonas campestris pv. corylina): Biologie de la bactérie. *EPPO Bulletin*, 17(2), 241-250. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00034.x>
- Güney, İ. G., Tekin, F., Günen, T. U., Özer, G., & Derviş, S. (2023). Alternaria alternata causing inner black rot of lemon (Citrus limon) fruits in Turkey: Genetic diversity and characterisation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 125, 101998. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.101998>
- Hajri, A., Pothier, J. F., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Poussier, S., Boureau, T., Duffy, B., & Manceau, C. (2012). Type Three Effector Gene Distribution and Sequence Analysis Provide New Insights into the Pathogenicity of Plant-Pathogenic Xanthomonas arboricola. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 371-384. <https://doi.org/10.1128/AEM.06119-11>
- Haye, T., Gariepy, T., Hoelmer, K., Rossi, J.-P., Streito, J.-C., Tassus, X., & Desneux, N. (2015). Range expansion of the invasive brown marmorated stinkbug, Halyomorpha halys: An increasing threat to field, fruit and

- vegetable crops worldwide. *Journal of Pest Science*, 88(4), 665-673. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0670-2>
- Hugh, R., & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66(1), 24-26. <https://doi.org/10.1128/jb.66.1.24-26.1953>
- Ibarra, J., Snelling, J., Alexander, K., & Tisserat, N. (2012). Leaf Spotting of Turkish Filbert in Colorado Caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* and *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *Plant Health Progress*, 13(1), 43. <https://doi.org/10.1094/PHP-2012-0517-01-BR>
- İslam, A., & Çayan, M. (2019). Ordu ili Gürgentepe ilçesinde yetiştirilen Çakıldak fındık çeşidinde klon seleksiyonu. *Akademik Ziraat Dergisi*, 8(Özel Sayı), Article Özel Sayı. <https://doi.org/10.29278/azd.584541>
- Ivanović, Ž., Popović, T., Janse, J., Kojić, M., Stanković, S., Gavrilović, V., & Fira, D. (2015). Molecular assessment of genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* strains from Serbia by various DNA fingerprinting techniques. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1), 133-145. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0531-5>
- Kalındamar, Ş. (2021). Comparative genomics insight into phytopathogenic *Xanthomonas arboricola* pathovar *corylina* strains. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.35229/jaes.832315>
- Kaluzna, M. (2023). Specific and Sensitive Detection Tools for *Xanthomonas Arboricola* Pv. *Corylina*, the Causal Agent of Bacterial Blight of Hazelnut, Developed With Comparative Genomics. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1254107>
- Kaluzna, M., Fischer-Le Saux, M., Pothier, J. F., Jacques, M.-A., Obradovic, A., Tavares, F., & 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(12), 1481-1499. <https://doi.org/10.1111/mpp.13073>
- Kaluzna, M., Pulawska, J., Waleron, M., & Sobiczewski, P. (2014). The genetic characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis*, the causal agent of walnut blight in Poland. *Plant Pathology*, 63(6), 1404-1416. <https://doi.org/10.1111/ppa.12211>
- Karaca, G. H., & Erper, İ. (2001). First report of *Pestalotiopsis guepinii* causing twig blight on hazelnut and walnut in Turkey. *Plant Pathology*, 50(3), 415-415. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00580.x>
- Karahan, A., Altundağ, Ş., Duran, H., & Kılınç, A. (2013). Karadeniz Bölgesinde Fındık Bakteriyel Yanıklığı [*Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* (Miller et al.) Vauterin et al.] hastalığının yaygınlığı üzerine araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 53(3), 159-174.
- Karaosmanoğlu, H., & Üstün, N. Ş. (2017). Organik ve Konvansiyonel Fındıkların (*Corylus avellana* L.) Bazı Fiziksel Özellikleri. *Akademik Gıda*, 15(4), Article 4. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.370107>
- Kazempour, M., Ali, B., & Elahinia, S. (2006). First report of bacterial blight of hazelnut caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* in Iran.
- Kim, H. S., Cheon, W., Lee, Y., Kwon, H.-T., Seo, S.-T., Balaraju, K., & 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. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2020.0217>
- Kosenko, I., Balabak, A., Sonko, S., Balabak, O., Balabak, A., Opalko, A., Denysko, I., & Soroka, L. (2020). Tolerance of hazelnuts towards unfavorable environmental factors. 9, 117-125. https://doi.org/10.15421/2019_718
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>
- Lamichhane, J. R. (2014). *Xanthomonas arboricola* Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management. *Plant Disease*, 98(12), 1600-1610. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0831-FE>
- Lamichhane, J. R., Fabi, A., Ridolfi, R., & Varvaro, L. (2013). Epidemiological Study of Hazelnut Bacterial Blight in Central Italy by Using Laboratory Analysis and Geostatistics. *PLOS ONE*, 8(2), e56298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056298>
- Lamichhane, J. R., & Varvaro, L. (2014). *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: Current status and future perspectives for its management. *Plant Pathology*, 63(2), 243-254. <https://doi.org/10.1111/ppa.12152>
- Lee, Y.-A. (1992). Use of Quinate Metabolism as a Phenotypic Property to Identify Members of *Xanthomonas campestris* DNA Homology Group 6. *Phytopathology*, 82(9), 971. <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-971>
- Lelliott, R. A., & Stead, D. E. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19871333217>
- Linaldeddu, B. T., Deidda, A., Scanu, B., Franceschini, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., & Phillips, A. J. L. (2016). Phylogeny, morphology and pathogenicity of Botryosphaeriaceae, Diatrypaceae and

- Gnomoniaceae associated with branch diseases of hazelnut in Sardinia (Italy). *European Journal of Plant Pathology*, 146(2), 259-279. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0912-z>
- Lopez-Soriano, P., Noguera, P., Gorris, M. T., Puchades, R., Maquieira, A., Marco-Noales, E., & Lopez, M. M. (2017). Lateral flow immunoassay for on-site detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni* in symptomatic field samples. *PLOS ONE*, 12(4), e0176201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176201>
- Maes, M. (1993). Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. *FEMS Microbiology Letters*, 113(2), 161-165. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06508.x>
- Matić, S., Caruso, A. G., D'Errico, C., Botto, C. S., Noris, E., Trkulja, V., Panno, S., Davino, S., & Moizio, M. (2024). Powdery mildew caused by *Erysiphe corylacearum*: An emerging problem on hazelnut in Italy. *PLOS ONE*, 19(5), e0301941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0301941>
- Miller, P., Bollen, W., Simmons, J., Gross, H., & Barss, H. (1940). *The pathogen of filbert bacteriosis compared with Phytomonas juglandis, the cause of walnut blight*.
- Mir, M. M., Parveze, M. U., Iqbal, U., Munib Ur Rehman, Kumar, A., Simnani, S. A., Ganai, N. A., Mehdi, Z., Nazir, N., Khalil, A., Rather, B. A., Bhat, Z. A., & Bhat, M. A. (2023). Development and Selection of Rootstocks. İçinde M. M. Mir, M. U. Rehman, U. Iqbal, & S. A. Mir (Ed.), *Temperate Nuts* (ss. 45-78). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9497-5_3
- Moine, A., Chitarra, W., Nerva, L., Agliassa, C., Gambino, G., Secchi, F., Pagliarani, C., & Boccacci, P. (2024). Grafting with non-suckering rootstock increases drought tolerance in *Corylus avellana* L. through physiological and biochemical adjustments. *Physiologia Plantarum*, 176(6), e70003. <https://doi.org/10.1111/ppl.70003>
- Moore, L. W., Lagerstedt, H. B., & Hartmann, N. (1974). Stress Predisposes Young Filbert Trees to Bacterial Blight. *Phytopathology*, 64(12), 1537. <https://doi.org/10.1094/phyto-64-1537>
- Nunez, P., Muster, C., Lisperguer, M. J., Vargas, E., & Bustos, S. (2022). Complete Genome of *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* Strain A7 Isolated from Southern Chile. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 35(1), 94-95. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-20-0363-A>
- Ochi-Ardabili, M., Nourafcan, H., Naghdi Badi, H., Mohebalipour, N., & Qaderi, A. (2024). Detection of genetic diversity and population structure in Iranian hazelnut (*Corylus avellana* L.) using Start Codon Targeted markers and phytochemical characteristics. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 71(5), 2255-2266. <https://doi.org/10.1007/s10722-023-01790-7>
- Osdaghi, E. (2022). *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* (bacterial blight of hazelnut). *CABI Compendium*, CABI Compendium, 56930. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.56930>
- Ozman-Sullivan, S. K., & Akça, I. (2005). EFFICIENCY OF PESTICIDES AGAINST BIG BUD MITES [PHYTOPTUS AVELLANAE NAL. AND CECIDOPHYOPSIS VERMIFORMIS NAL. (ACARINA: ERIOPHYOIDEA)] ON HAZELNUT. *Acta Horticulturae*, 686, 393-400. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.686.54>
- Özdemir, İ. O., Karakaya, O., Ateş, U., Öztürk, B., Uluca, M., & Tuncer, C. (2023). Characterization of hazelnut kernel responses to brown marmorated stink bug [*Halyomorpha halys* Stal (Hemiptera: Pentatomidae)] infestations: Changes in bioactive compounds and fatty acid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 124, 105696. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105696>
- Özdemir, İ. O., Tuncer, C., Tortorici, F., & Özer, G. (2023). Egg parasitoids of green shield bug, *Palomena prasina* L. (Hemiptera: Pentatomidae) in hazelnut orchards of Turkey. *Biocontrol Science and Technology*, 33(1), 61-75. <https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2158308>
- Özer, G., Palacioğlu, G., Aydoğan, A., & Bayraktar, H. (2023). Evaluation of *Ascochyta* resistance in chickpea genotypes with quantitative polymerase chain reaction assay. *Journal of Phytopathology*, 171(11-12), 620-626. <https://doi.org/10.1111/jph.13221>
- Öztürk, M. (2023). Population characteristics of *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* strains from hazelnut orchards in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130(2), 337-349. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00709-9>
- Pagani, M. C. (2004). *An ABC Transporter Protein and Molecular Diagnoses of Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni* Causing Bacterial Spot of Stone Fruits [Dissertations & Theses, North Carolina State University]. <http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.16/4540>
- Palacioğlu, G., Alkan, M., Derviş, S., Bayraktar, H., & Özer, G. (2023). Molecular phylogeny of plant pathogenic fungi based on start codon targeted (SCoT) polymorphism. *Molecular Biology Reports*, 50(10), 8271-8279. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08735-4>
- Palacio-Bielsa, A., Cubero, J., Cambra, M. A., Collados, R., Berruete, I. M., & López, M. M. (2011). Development of an Efficient Real-Time Quantitative PCR Protocol for Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni* in *Prunus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), 89-97. <https://doi.org/10.1128/AEM.01593-10>

- Pezzi, M., Bonelli, D., Carlomagno, F., Di Biase, E., Fumo, F., Mendicino, F., Munari, C., & Bonacci, T. (2024). Ground Beetle (Coleoptera: Carabidae) Assemblages in Hazelnut Groves in Calabria (Southern Italy). *Diversity*, 16(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/d16080491>
- Polat, Z., Gültekin, M. A., Palacioğlu, G., & Bayraktar, H. (2022). First report of *Botryosphaeria dothidea* causing stem canker of hazelnut in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 104(1), 467-467. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-01002-0>
- Popović, T., Adamović, J., Ivanović, M., Prokić, A., & Obradović, A. (2023). First Report of *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* Causing Bacterial Blight on Hazelnut Tree (*Corylus avellana*) in Montenegro. *Plant Disease*, 107(9), 2836. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-23-0138-PDN>
- Porghahreman, F., Fatahi, R., Zamani, Z., & Sallom, A. (2024). Morphological, Physiological and Molecular Responses of Four Hazelnut (*Corylus avellana*) Cultivars Under NaCl Salinity Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 43(10), 3878-3895. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11348-1>
- Portarena, S., Gavrichkova, O., Brugnoli, E., Battistelli, A., Proietti, S., Moscatello, S., Famiani, F., Tombesi, S., Zadra, C., & Farinelli, D. (2022). Carbon allocation strategies and water uptake in young grafted and own-rooted hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Tree Physiology*, 42(5), 939-957. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpab164>
- Pothier, J. F., Kałużna, M., Prokić, A., Obradović, A., & Rezzonico, F. (2022). Complete Genome and Plasmid Sequence Data of Three Strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina*, the Bacterium Responsible for Bacterial Blight of Hazelnut. *Phytopathology*, 112(4), 956-960. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-21-0356-A>
- Pothier, J. F., Pagani, M. C., Pelludat, C., Ritchie, D. F., & Duffy, B. (2011). A duplex-PCR method for species- and pathovar-level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni*. *Journal of Microbiological Methods*, 86(1), 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.019>
- Prokić, A., Gasic, K., Ivanovic, M., Kuzmanovic, N., Sevic, M., Puławska, J., & Obradovic, A. (2012). Detection and Identification Methods and New Tests as Developed and Used in the Framework of COST873 for Bacteria Pathogenic to Stone Fruits and Nuts *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina*. *JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY*, 94, S1.127-S1.133.
- Prokić, A., Ivanovic, M., Gasic, K., Zlatkovic, N., Kuzmanovic, N., & Obradovic, A. (2018, August 3). *STUDYING XANTHOMONAS ARBORICOLA PV. CORYLINA STRAINS FROM SERBIA FOR STREPTOMYCIN AND KASUGAMYCIN RESISTANCE AND COPPER COMPOUNDS SENSITIVITY IN VITRO*. International Congress of Plant Pathology in Boston. https://euroxanth.eu/wp-content/uploads/2019/12/2018_Prokić.pdf
- Pulawska, J., Kaluzna, M., Kolodziejska, A., & Sobiczewski, P. (2010). Identification and characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* causing bacterial blight of hazelnut: A new disease in Poland. *JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY*, 92, 803-806. <https://doi.org/10.4454/JPP.V92I3.331>
- Rabinovich, A., Di, R., Lindert, S., & Heckman, J. (2024). Nickel and Soil Fertility: Review of Benefits to Environment and Food Security. *Environments*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/environments11080177>
- Rahimi, M., & Ranjbaran, E. (2023). Investigating the geographical, phenotypic and genetic diversity of Sickweed populations by bioclimatic parameters, morphological traits and SCoT molecular markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 29(3), 421-433. <https://doi.org/10.1007/s12298-023-01296-7>
- Rius-Garcia, X., Videgain-Marco, M., Casanova-Gascón, J., Acuña-Rello, L., & Martín-Ramos, P. (2025). Comparative Evaluation of Salt Tolerance in Four Self-Rooted Hazelnut (*Corylus avellana* L. and *Corylus americana* Walter) Cultivars. *Agronomy*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/agronomy15010148>
- Rovira, M., Hermoso, J. F., Rufat, J., Cristofori, V., Silvestri, C., & Romero, A. (2022). Agronomical and Physiological Behavior of Spanish Hazelnut Selection “Negret-N9” Grafted on Non-suckering Rootstocks. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.813902>
- Saruhan, S., İslam, & Tuncer, C. (2000). *Population densities and seasonal fluctuations of hazelnut pests in Samsun, Turkey*. 495-502.
- Schaad, N. W., & Frederick, R. D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(3), 250-258. <https://doi.org/10.1080/07060660209507006>
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: A new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110(9), 893-908. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-4842-9>
- Schumann, P., & Maier, T. (2014). Chapter 13—MALDI-TOF Mass Spectrometry Applied to Classification and Identification of Bacteria. İçinde M. Goodfellow, I. Sutcliffe, & J. Chun (Ed.), *Methods in Microbiology* (C. 41, ss. 275-306). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.06.002>

- Scortichini, M., Rossi, M. P., Loreti, S., Bosco, A., Fiori, M., Jackson, R. W., Stead, D. E., Aspin, A., Marchesi, U., Zini, M., & Janse, J. D. (2005). *Pseudomonas syringae* pv. *Coryli*, the Causal Agent of Bacterial Twig Dieback of *Corylus avellana*. *Phytopathology*, 95(11), 1316-1324. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1316>
- Scortichini, M., Rossi, M. P., & Marchesi, U. (2002). Genetic, phenotypic and pathogenic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina* strains question the representative nature of the type strain. *Plant Pathology*, 51(3), 374-381. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00691.x>
- Sezen, K., Muratoglu, H., Nalcacioglu, R., Mert, D., Demirbag, Z., & Kati, H. (2008). Highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Scolytidae). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 36(1), 77-84. <https://doi.org/10.1080/01140670809510223>
- Sezer, A., Dolar, F. S., Lucas, S. J., Köse, Ç., & Gümüş, E. (2017). First report of the recently introduced, destructive powdery mildew *Erysiphe corylacearum* on hazelnut in Turkey. *Phytoparasitica*, 45(4), 577-581. <https://doi.org/10.1007/s12600-017-0610-1>
- Shu, C.-H., & Yang, S.-T. (1990). Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(5), 454-468. <https://doi.org/10.1002/bit.260350503>
- Tajadini, M., Panjehpour, M., & Javanmard, S. H. (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research*, 3, 85. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998>
- Tekin, F., Altın, İ., Aydın, F., Alkan, M., Orel, D. C., Ardiç, M., Gašić, K., Kovács, T., Allen, C., & Özer, G. (2024). Unveiling Genetic Diversity Among Bacterial Isolates Using SCoT Markers. *Current Microbiology*, 81(12), 409. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03938-9>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tonkaz, T., & Bostan, S. Z. (2016). CLIMATIC TRENDS IN THE EASTERN BLACK SEA REGION, TURKEY. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(1), Article 1.
- Tuncer, C., Özdemir, İ. O., & Kushiye, R. (2020). TÜRKİYE FINDIK BAHÇELERİNDE YENİ ZARARLI TÜRLER: XYLOSANDRUS GERMANUS BLANDFORD (COL.: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE). *Black Sea Journal of Agriculture*, 3(1), Article 1.
- Tuncer, C., Saruhan, İ., & Akça, İ. (2002). Karadeniz Bölgesi fındık üretim alanlarındaki önemli zararlılar. *Samsun Ticaret Borsası Dergisi*, 2, 43-54.
- Turan, A. (2023). Alım noktalarına gelen fındık meyvelerinde bazı özelliklerin belirlenmesi: Giresun örneği. *Akademik Ziraat Dergisi*, 12(Özel Sayı), Article Özel Sayı. <https://doi.org/10.29278/azd.1355568>
- Turco, S., Brugnati, F., Giubilei, I., Silvestri, C., Petrović, M., Drajs, M. I., Cristofori, V., Speranza, S., Mazzaglia, A., Contarini, M., & Rossini, L. (2024). A bud's life: Metabarcoding analysis to characterise hazelnut big buds microbiome biodiversity. *Microbiological Research*, 287, 127851. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127851>
- Türkkan, M., Bozoğlu, T., Derviş, S., Erper, İ., & Özer, G. (2024). Armillaria Species Causing Kiwifruit Vine Decline and Root Rot in Northeastern Türkiye: A Growing Concern for Kiwifruit Health. *Journal of Phytopathology*, 172(5), e13409. <https://doi.org/10.1111/jph.13409>
- Türkkan, M., Erper, İ., Eser, Ü., & Baltacı, A. (2018). Evaluation of Inhibitory Effect of Some Bicarbonate Salts and Fungicides Against Hazelnut Powdery Mildew. *Gesunde Pflanzen*, 70(1), 39-44. <https://doi.org/10.1007/s10343-017-0411-y>
- Türkkan, M., Özer, G., & Derviş, S. (2024). Morphological, physiological, molecular, and pathogenic insights into the characterization of *Phytophthora polonica* from a novel host, hazelnut (*Corylus avellana*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 131, 102292. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102292>
- Uzundumlu, A. S., Bilgiç, A., & Ertek, N. (2019). Türkiye'nin fındık üretiminde önde gelen illerin 2019-2025 yılları arasındaki fındık üretimlerinin ARIMA modeliyle tahmin edilmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 8(Özel Sayı), Article Özel Sayı. <https://doi.org/10.29278/azd.591588>
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., & Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 472-489. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>
- Webb, K. M., Oña, I., Bai, J., Garrett, K. A., Mew, T., Vera Cruz, C. M., & Leach, J. E. (2010). A benefit of high temperature: Increased effectiveness of a rice bacterial blight disease resistance gene. *New Phytologist*, 185(2), 568-576. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03076.x>
- Webber, J. B., Putnam, M., Serdani, M., Pscheidt, J. W., Wiman, N. G., & Stockwell, V. O. (2020). Characterization of isolates of *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina*, the causal agent of bacterial blight, from Oregon hazelnut orchards. *Journal of Plant Pathology*, 102(3), 799-812. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00505-6>

- Webber, J. B., Wada, S., Stockwell, V. O., & Wiman, N. G. (2021). Susceptibility of Some *Corylus avellana* L. Cultivars to *Xanthomonas arboricola* pv. *Corylina*. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.800339>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wiman, N. G., Iii, J. B. W., Wiseman, M., & Merlet, L. (2019). Identity and pathogenicity of some fungi associated with hazelnut (*Corylus avellana* L.) trunk cankers in Oregon. *PLOS ONE*, 14(10), e0223500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223500>
- Yeken, M. Z., Emiralioğlu, O., Tekin, M., Çelik, A., Çiftçi, V., & Özer, G. (2024). Genetic diversity and population structure in Turkish barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars using start codon targeted (SCoT) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. <https://doi.org/10.1007/s10722-024-02297-5>
- Young, J. M., Park, D.-C., Shearman, H. M., & Fargier, E. (2008). A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5), 366-377. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.004>

