



**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIM BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**YOZGAT İLİNDE TOPLANAN BUĞDAY TOHUMLARINDA
BAKTERİYEL KAVUZ DİBİ ÇÜRÜKLÜĞÜNE NEDEN
OLAN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS*'İN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

EMİN AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Murat ÖZTÜRK

OCAK – 2025

YOZGAT

T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIM BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YOZGAT İLİNDE TOPLANAN BUĞDAY TOHUMLARINDA
BAKTERİYEL KAVUZ DİBİ ÇÜRÜKLÜĞÜNE NEDEN
OLAN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS*'İN
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

EMİN AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Murat ÖZTÜRK

OCAK – 2025

YOZGAT



YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ONAY FORMU

T.C.

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Enstitümüzün Tarım Bilimleri Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı 91119321025 numaralı öğrencisi Emin AYDIN'ın hazırladığı “**Yozgat İlinde Toplanan Buğday Tohumlarında Bakteriyel Kavuz Dibi Çürüklüğüne Neden Olan *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*'in İzolasyonu ve Karakterizasyonu**” başlıklı tezi ile ilgili tez savunma sınavı, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri gereğince 14/01/2025 Salı günü saat 10:30'da yapılmış, tezin onayına oy birliği ile karar verilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Soner SOYLU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat ÖZTÜRK

(Danışman)

Jüri Üyesi :Dr. Öğr. Üyesi Benian Pınar AKTEPE

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı Enstitü Yönetim Kurulu Kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Ümit BUDAK

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan eder, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğini beyan ederim.

Emin AYDIN
14/01/2025

ÖN SÖZ

Tez çalışmalarım esnasında her türlü desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini aktaran, gerekli çalışma ortamını sağlayan ve tüm çalışmalarımda yanımda bulunan değerli danışman hocam Doç. Dr. Murat Öztürk'e izolatların MALDİ-TOF analizinde yardımcı olan hocam Prof. Dr. Soner Soylu'ya teşekkür ederim.

Tüm tez çalışmam boyunca her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme teşekkür ederim.

Emin AYDIN

14/01/2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YOZGAT İLİNDE TOPLANAN BUĞDAY TOHUMLARINDA BAKTERİYEL KAVUZ DİBİ ÇÜRÜKLÜĞÜNE NEDEN OLAN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS*'İN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

EMİN AYDIN

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIM BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. MURAT ÖZTÜRK

Bu çalışma, Yozgat ilindeki buğday üretim alanlarından toplanan tohumlarda *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* etmeninin izolasyonu ve karakterizasyonunu amaçlamıştır. Tohum örneklerinden yapılan bakteriyel izolasyonlar, King B (KB) besiyerinde gerçekleştirilmiş ve floresans özellik sergileyen spp. kolonilerinin bitki patojeni olup olmadığını belirlemek amacıyla buğday fidelerine yapay inokulasyon yapılmıştır. 36-48 saat içerisinde buğday yapraklarında belirti gösteren izolatları LOPAT testleri sonuçlarına göre, LOPAT grup 1a *P. syringae* olarak sınıflandırılmıştır. 17 izolatın MALDI-TOF MS proteomik profili ve *rpoD* genine ait nükleotid dizileri *P. syringae* pv. *atrofaciens* CFBP2213^{PT} patotip kültürü ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir. Ayrıca, BOX-PCR parmak izi analizlerinde izolatların iki farklı bant profili oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların tamamının patojenik özellik gösterdiği ve biyokimyasal ile moleküler testlerde *P. syringae* pv. *atrofaciens*’e özgü özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma, Türkiye buğday üretim alanlarında *P. syringae* pv. *atrofaciens*’in varlığını ayrıntılı olarak ortaya koyan ilk çalışmadır.

2025, xii + 64 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Buğday, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, Kavuz dibi çürüklüğü

ABSTRACT

MASTER THESIS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* CAUSING BACTERIAL GLUME ROT IN WHEAT SEEDS COLLECTED IN YOZGAT PROVINCE

EMİN AYDIN

YOZGAT BOZOK UNIVERSITY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF AGRICULTURAL SCIENCES

SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. MURAT ÖZTÜRK

This study aimed to isolate and characterize *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* from seeds collected in wheat production areas of Yozgat province. Bacterial isolations from seed samples were performed on King B (KB) medium, and fluorescence-producing *Pseudomonas* spp. colonies were subjected to wheat seedling tests to determine their pathogenicity. Isolates causing symptoms on wheat leaves within 36–48 hours were classified as LOPAT group 1a (*P. syringae*) based on the results of LOPAT tests. The proteomic profiles of 17 isolates obtained using MALDI-TOF MS and the nucleotide sequences of the *rpoD* gene showed a high degree of similarity to the CFBP2213^{PT} pathotype culture. Additionally, BOX-PCR fingerprinting analysis revealed two distinct band profiles among the isolates. All isolates were confirmed to exhibit pathogenic characteristics and demonstrated high concordance in biochemical and molecular tests. This study represents the first detailed investigation confirming the presence of *P. syringae* pv. *atrofaciens* in wheat production areas of Turkey.

2025, xii + 64 Pages

Keywords: Wheat, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, Basal glume rot

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAY SAYFASI.....	ii
TEZ BEYANI.....	iii
ÖN SÖZ.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Dünya’da <i>P. Syringae</i> pv. <i>Atrofaciens</i> İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	19
2.2. Türkiye’de Buğday Bakteriyel Hastalıkları Üzerine Yapılan Çalışmalar	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Tohum Örneklerinin Toplanması.....	27
3.2. Bakteriyel İzolasyon	27
3.3. Koloni Gelişiminin İncelenmesi	28
3.4. Patojen İzolatların Seçimi	28
3.5. Patojen Bakteri İzolatlarının Tanılanması	28
3.5.1 Biyokimyasal Tanılama	28
3.5.1.1. KOH Testi	29
3.5.1.2 Katalaz Testi.....	29
3.5.1.3. Oksidatif-Fermantatif Testi	29
3.5.1.4. Levan Oluşumu Testi	30

3.5.1.5. Oksidaz Testi	30
3.5.1.6. Pektolitik Aktivite Testi	30
3.5.1.7. Arginin Dehidrolaz Aktivitesi	30
3.5.1.8. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)	31
3.5.2. Bakteri İzolatlarının Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) Yöntemiyle Tanısı.....	31
3.5.3. Total Genomik DNA İzolasyonu ve PCR Amplifikasyonu	32
3.5.4. BLASTN ve Filogenetik Analizler	33
3.6. rep-PCR Genomik Parmak İzi Analizleri	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Bakteri İzolasyonu	36
4.2. İzolatların Buğday Bitkilerinde Patojenisitesi	37
4.3. Patojen Bakterilerin Tanısı	38
4.3.1.Patojen Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Tanısı	38
4.3.1.1. KOH Testi	38
4.3.1.2. Katalaz Testi.....	39
4.3.1.3. Oksidatif-Fermantatif Testi	39
4.3.1.4. Levan Oluşumu Testi	40
4.3.1.5. Oksidaz Testi	40
4.3.1.6. Pektolitik Aktivite Testi	41
4.3.1.7. Arginin Dehidrolaz Aktivitesi	41
4.3.1.8. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)	42
4.3.2. Patojen İzolatlarının MALDI-TOF MS Yöntemiyle Tanısı	45
4.3.3. PCR, BLASTN ve Filogenetik Analizler.....	47
4.4. Patojen Bakteri İzolatlarının rep-PCR Genomik Parmak İzi Analizleri.....	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53

6. KAYNAKLAR.....	56
-------------------	----



TABLÖLAR LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. 1. Dünya genelinde 2012-2021 yıllar arası buğday ekim alanı, üretim ve verim değerleri.....	2
Tablo 1. 2. En önemli buğday üreticisi ülkelerin ekim alanları ve üretim miktarları.....	3
Tablo 1. 3. 2013-2022 yılları arasında Türkiye buğday ekim alanı, üretim ve verim değerleri.....	3
Tablo 3. 1. PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler.....	33
Tablo 3. 2. Genomik parmak izi çıkartılmasında kullanılan primer dizisi.....	34
Tablo 4. 1. Patojen bakteri izolatlarının biyokimyasal tanı sonuçları.....	44
Tablo 4. 2. MALDI-TOF tekniği ile tanısı yapılan izolatlar ve benzerlik indeks değerleri	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sekil

Sayfa

Şekil 3.1. Yozgat ilçelerinden toplanan buğday tohum örnekleri	27
Şekil 3.2. A) Bakteriyel süspansiyonların enjektör yardımıyla buğday yaprakları inokülasyonu B) İnokulasyon yapılmış buğday yaprağı	28
Şekil 4.1. Tohum örneklerinde hastalık belirtisi gösteren şüpheli buğday taneleri ...	36
Şekil 4.2. KB besi yerinde 5 Günlük <i>P. Syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> WBM 50.7 izolatı	38
Şekil 4.3. A) İnoküle edilmiş kontrol (su) B) Buğday bitkisinde 36-48 saat içerisinde, yaprak ayasın da incelme ve kıvrılma C) Buğday bitkisinde 48-72 saat sonra sarı klorotik alanların oluşması ve 72-96 saat içerisinde kuruma meydana gelmesi	38
Şekil 4.4. KOH testinde <i>P. Syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> izolatlarında ipliksi uzama görülmesi	39
Şekil 4.5. Katalaz testi sonucunda pozitif reaksiyon.....	39
Şekil 4.6. Oksidatif-fermantatif testinde aerobik gelişme	40
Şekil 4.7. Levan testinde kolini gelişimi	40
Şekil 4.8. Oksidaz testinde negatif reaksiyon	41
Şekil 4.9. Pektolitik aktivite testinde negatif reaksiyon	41
Şekil 4.10. Arjinin dehidrolaz testinde negatif reaksiyonu	42
Şekil 4.11. İzolatların tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturması.....	42
Şekil 4.12. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> WBM23.6 izolatının MALDI TOF sonucu	45
Şekil 4.13. İzolatların <i>rpoD</i> gen bölgesi PCR amplifikasyonu jel görüntüsü	47
Şekil 4.14. İzolatların <i>rpoD</i> gen bölgesi nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizi.....	49
Şekil 4.15. BOX-PCR'da oluşan bant profilleri (1: WBM17.2, 2: WBM31.6, 3: WBM26.6, 4: WBM27.6, 5: WBM33.7, 6: WBM38.9, 7: WBM39.6, 8: WBM49.6, 9: WBM50.7, 10: WBM60.7, 11: <i>P. poae</i> W21.4, 12: <i>P.</i> <i>marginalis</i> W25.9, 13: <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> Pss1)	50

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
-----------------	--------------------

µl	: Mikrolitre
rpm	: Revolutions per Minute
ml	: Mililitre
%	: Yüzde
°C	: Santigrat-derece

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

AB	: Avrupa Birliği
BDT	: Bağımsız Devletler Topluluğu
FAO	: Food and Agriculture Organization
kb	: Kilobaz
KB	: King B besi yeri
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method Algorithm
UV	: Ultraviyole

1.GİRİŞ

Tahıllar, dünyada stratejik olarak en önemli tarım ürünleri arasında yer almakta olup, insanlık tarihinin ilk dönemlerinden itibaren yetiştirilmektedir. Hem dünya genelinde hem de ülkemizde en geniş ekim alanına sahip bitkisel ürünler arasında bulunan hububat, beslenme açısından da büyük bir öneme sahiptir. Tahılların yeryüzünde bu denli yaygın olmasında, tarımın tarihsel gelişimi içinde eski kültür bitkileri olmalarının etkisi büyüktür. Orta Asya ve Ön Asya’da yapılan kazılar buğday ve arpa gibi tahılların buralarda çok eski bir geçmişleri olduğunu göstermiştir (Taşçı vd., 2020). Tahıl grubu içerisinde buğday, mısır, pirinç, arpa, yulaf, çavdar, darı ve diğeri hububat çeşitleri yer almaktadır (Keleş vd., 2012).

Dünyada, tarımı yapılan ürünlerin %41’ini tahıllar oluştururken, buğday (*Triticum aestivum* L.), tahıllar içinde %48’lik önemli bir kısmı oluşturmaktadır (Anonymous, 2020). Gramineae familyasında yer alan buğday, yüksek adaptasyon yeteneği ve insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olması nedeniyle ekim alanı bakımından dünya genelinde en yaygın olarak yetiştirilen üründür. Dünyadaki nüfusun yaklaşık %35’inin temel besin kaynağı olan buğday, gelişmekte olan 94 ülkedeki 4.5 milyar insandan daha fazlası için günlük kalorisinin %21’ini ve proteinin %20’sini sağlayan stratejik bir bitkidir (Rajaram, 2010; Büyükçekik, 2024). Buğday tanesinin %82’sinin endosperm, %15’inin kepek, %3’ünün ruşeynden teşekkül olduğu bildirilmiştir (Ertugay & Certel, 1992).

Buğday bitkisi ılıman iklime sahip bölgelerde hâkim olarak yetişmekte ve dünyada milyonlarca küçük ve orta ölçekli çiftçi için önemli bir gelir kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Buğday, kışlık veya baharlık olarak yetiştiriciliği yapılan bir bitkidir. Yetiştirme süresi kışlık çeşitlerde 6-8 aya kadar sürerken baharlık çeşitlerde biraz daha kısalabilmektedir.

Dünyanın farklı ülkelerinde 2020-2021 dönemi buğday üretiminde ilk sırayı %17’lik pay ile Çin almış olup bu ülkeyi %16 ile ABD ve %14 ile Hindistan takip etmiştir. Türkiye, dünya buğday üretiminin %3’ünü gerçekleştirmiş olup buğday üretiminde dünyada onuncu sıradadır. Hızla artan nüfus nedeniyle, 2050 yılına kadar buğday üretiminin %50 artırılması gerekmektedir ve bu büyüme, diğeri sektörlerin verimli tarım arazisi için güçlü bir rekabet oluşturması nedeniyle, büyük ölçüde verim artışlarına dayanacaktır.

Buğday bitkisi birçok ülkenin temel besin kaynağı olması, geniş coğrafyalarda ekilmesi, kuru tohum olarak depolanma koşullarının uygun olması nedeniyle yıllardır önemini

kaybetmeden ülke ekonomisine değer katmaktadır. Şu anda buğday üretimi 800 milyon ton seviyesindedir (Anonymous, 2023). Tarımsal alanların kısıtlı olması nedeniyle buğday üretim miktarının artırılması için birim alandan daha fazla ürün elde edilmesi gerekmektedir. Son 10 yıl buğdayın üretim alanı verilerine bakıldığında; 217-225 milyon hektar arasında değişim göstermiştir. Ancak buğday üretimi 2012 yılında 673.74 milyon ton iken, son 10 yılda kademeli olarak %12.60'lık artış ile 770.88 milyon ton seviyelerine yükselmiştir (Tablo 1.1).

Tablo 1. 1. Dünya genelinde 2012-2021 yılları arası buğday ekim alanı, üretim ve verim değerleri

Yıllar	Ekim Alanı (milyon ha)	Üretim (milyon ton)	Verim (kg-da)
2012	217.92	673.74	309.17
2013	218.70	710.17	324.72
2014	219.76	728.76	331.62
2015	223.34	741.85	332.17
2016	219.16	748.43	341.51
2017	218.29	772.31	353.80
2018	213.83	732.24	342.44
2019	215.69	764.06	354.24
2020	217.90	756.95	347.39
2021	220.76	770.88	349.19

(Kaynak: Anonymous,2021)

Ülkeler içinde buğday ekim alanı BDT, Hindistan ve Avustralya'da artarken, diğer ülkelerde düşüş göstermiştir. Ortalama verimin bir önceki yıla göre biraz daha düşük olduğu gözlenmiş olup, 2020-21 döneminde verim 3.45 ton/ha gerçekleşmiş olup küresel buğday üretimi, bir önceki döneme göre yaklaşık 12 milyon ton artarak 774 milyon ton olmuştur (Tablo 1.2).

Türkiye'de tarım yapılabilir alanlar içinde tahıllar %49'luk bir pay almakta olup, buğdayda toplam tahıl alanı içinde %24'lük pay almaktadır (Anonim, 2020). Ülkemiz için son 10 yıllık buğday üretim verileri incelendiğinde ortalama verim 239.92 kg'dan 297.95 kg/da verim artışı görülmektedir. Dünya buğday ekimi alanı 2020-21 döneminde 225 milyon hektarla bir önceki yılın %3 üzerinde gerçekleşmiştir (Tablo 1.3).

Tablo 1. 2. En önemli buğday üreticisi ülkelerin ekim alanları ve üretim miktarları

Ülkeler	2020-2021		2020-2021	
	Ekiliş	Toplam içindeki payı (%)	Üretim	Toplam içindeki payı (%)
BDT	52.3	23	140	18
Çin	23.8	11	134.3	17
AB	22.8	10	124.5	16
Hindistan	33.6	15	107.9	14
ABD	14.9	7	49.7	6
Kanada	10	4	35.2	5
Avustralya	13	6	33.3	4
Pakistan	8.8	4	25.2	3
Türkiye	6.9	3	20.5	3
Dünya	224.7	100	774.3	100

(Kaynak: Anonymous,2021)

Tablo 1. 3. 2013-2022 yılları arasında Türkiye buğday ekim alanı, üretim ve verim değerleri

Yıllar	Ekim Alanı (milyon ha)	Üretim (milyon ton)	Verim (kg/da)
2013	7.77	22.05	283.69
2014	7.92	19.00	239.92
2015	7.87	22.60	287.28
2016	7.67	20.60	268.51
2017	7.67	21.50	280.35
2018	7.30	20.00	274.00
2019	6.85	19.00	277.52
2020	6.92	20.50	296.15
2021	6.74	17.65	261.69
2022	6.63	19.75	297.95

(Kaynak: Anonim, 2022)

Buğday Türkiye'nin her bölgesinde yetiştirilebilmekle birlikte özellikle Orta Anadolu Bölgesi'nde yaygın olarak üretilmektedir. Buğdayın kullanım alanları ihtiyaca göre ekmeklik ve makarnalık olarak sınıflandırılır. Ekmeklik buğday üretiminde %33.5'lük, makarnalık buğday üretiminde %38.7'lik pay ile ilk sırada İç Anadolu Bölgesi yer almaktadır (Kamçılı, 2018).

Yozgat, İç Anadolu Bölgesi'nin Orta Kızılırmak bölümünde yer almaktadır. 613.286 ha tarım yapılan alanda 369.312 ha hububat ekilişi yapılmaktadır. Başlıca Merkez, Boğazlıyan, Sorgun, Sarıkaya, Yerköy ve Şefaattli ilçelerinde yoğun üretim yapılmaktadır (Anonim, 2004). Büyük oranda kurak alanlar da buğday üretimi yapılmaktadır. Yozgat makarnalık buğday üretiminde de uzun yıllardır önemini koruyan bir ildir.

Buğday üretimi, uygun tarım arazisinin eksikliği, iklim değişikliği ve abiyotik ve biyotik stres faktörleri gibi etmenlerle sürekli olarak tehdit altındadır. Gelecekteki talebin karşılanması, entegre hastalık ve zararlılarla mücadele, daha sıcak iklimlere ve abiyotik streslere uyum sağlama ve su ile diğer kaynakların dikkatli kullanımı gibi yöntemlerin bir araya getirilmesiyle mümkün olacaktır. Zararlılar ve hastalıklar, mevcut ürün kayıplarının %21,5'inden sorumludur (Savary vd. 2019). Buğdayın 200 hastalığı arasında 50 tanesi ekonomik kayıplara neden olmakta ve geniş bir alana yayılmaktadır. Her yıl, buğdayın yaklaşık %20'si hastalıklar nedeniyle kaybedebilmektedir (Eken & Demirci, 1998). Başlıca buğday hastalıklarından bazıları paslar, fusarium, başak yanıklığı, kök çürüklüğü, septoria yaprak lekesi, külleme, çeşitli viral, nematod ve bakteriyel hastalıklardır. Bu hastalıklar verimi ciddi şekilde etkilemekte ve bitkilerin ölümüne neden olabilmektedir (Singh vd., 2023).

Buğday üretiminde önemli düzeyde ekonomik kayıplara neden olan hastalık etmenleri arasında bakteriyel patojenler de bulunmaktadır. Fungal hastalıkların aksine bakteriyel hastalıklardan yalnızca birkaçı ekonomik anlamda önemli olup geniş bir konukçu yelpazesine sahiptir. Buğdayda bildirilen bakteriyel hastalıklar arasında yaprak çizgi lekesi (*Xanthomonas translucens*) (Denny & Gilbertson, 1989), bakteriyel mozaik (*Clavibacter michiganensis* subsp. *tesselarius*) (Carlson & Vidaver, 1982), beyaz leke (*Bacillus megaterium* pv. *cerealis*) (Bergey vd., 1923), pembe tohum hastalığı (*Erwinia rhapontici*) (Kuykendall & Schroth 1954), sap melanosisi (*Pseudomonas cichorii*) (Brenner vd., 1970), kılıf çürüklüğü (*Pseudomonas fascovaginae*) (Sequeira & Hutchinson 1973), kavuz dibi çürüklüğü (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*) (McCulloch, 1920) ve yaprak yanıklığı (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) (Van Hall & Buchanan 1902) yer almaktadır.

Hububat bitkilerinde, sorun bakteriyel hastalıklar üzerine ülkemizde yapılan çalışmalar sadece *X. translucens* (Sands vd., 1989; Demir & Üstün, 1992 ve Baştaş vd., 2011)' den ibarettir. Görüldüğü gibi ülkemizde tahıllardaki bakteriyel hastalıklarla ilgili çalışma yok denecek kadar azdır. Bu açıdan yürütülen çalışma ileriki çalışmalara temel oluşturması ve ıslah çalışmalarına yardımcı olabilmesi yönüyle önem arz etmektedir. Ülkemizde *X.*

translucens dışında başka bir patojenin varlığını moleküler çalışmalarla doğrulamış bir kaynak bulunmamaktadır. Altundağ vd. (2010) tarafından *in vitro* koşullarda *Satureja cuneifolia*'den bitki uçucu yağının buğday patojeni bakteriler üzerine antibakteriyel etkinliğinin araştırıldığı çalışmada *Rathayibacter tritici*, *R. iranicus*, *R. rathayi*, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* ve *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* gibi bakteriyel türler kullanılmış ancak patojenlerin izolasyon kaynağı ve tanısı hakkında bir bilgi sunulmamıştır. Bu çalışma dışında *P. syringae* pv. *atrofaciens* etmenini konu almış bir çalışmaya yapılan literatür taramasında rastlanılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, dünya literatüründe buğday ekim alanlarında enfeksiyon oluşturan kavuz dibi çürüklüğü etmeni *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in, Yozgat ilinde 2022-2023 yıllarında hasat edilen buğday tohumlarından izolasyonun yapılması, elde edilen izolatların biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, rep-PCR yöntemi kullanılarak genetik karakterizasyonları ve *rpoD* gen bölgesi nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizlerle taksanomik ilişkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Buğday verimi, çok sayıda abiyotik ve biyotik faktörden etkilenmektedir. Yaklaşık 40 fungal, bakteriyel ve viral hastalık buğdayda önemli kayıplara yol açabilir ve bunların çoğu tarladan tarlaya ve ülkeden ülkeye tohumlar aracılığıyla bulaşabilir. Küresel buğday üretiminde en sık bildirilen bakteriyel patojenler arasında *X. translucens* (bakteriyel yaprak çizgi hastalığı), *P. syringae* pv. *syringae* (bakteriyel kanser ve zamklanma) ve *P. syringae* pv. *atrofaciens* (buğday kavuz dibi çürüklüğü) yer almaktadır (Maraite vd., 2007; Baştaş vd., 2011).

Buğday geniş adaptasyon yeteneğine rağmen, aşırı sıcak ve nemden etkilenen bir serin iklim tahılıdır. Özellikle çimlenmeden kardeşlenmeye kadar erken gelişme aşamalarında, 8-10°C arasındaki sıcaklıklar ve %60'ın üzerinde bağıl nem yeterlidir. Ayrıca, kardeşlenme ile gövde uzaması arasındaki yüksek sıcaklıklara da tolerans gösterememektedir. İdeal koşullar arasında 10-15°C sıcaklık, %65 nem, düşük ışık ve kısmi gölge bulunur. Bitki gövde uzamasına geçiş yaptıkça, sıcaklık ve nem gereksinimleri artar. Başaklanmadan hemen önce yüksek bağıl nem, buğday verimini olumlu etkilerken, gübreleme sırasında düşük nem ve yüksek sıcaklıklar tahıl kalitesini artırır.

Maksimum verim için, büyüme dönemi boyunca 500 mm yağış yeterlidir; ancak, bazı buğday çeşitleri yalnızca 250 mm yağış alan bölgelerde de gelişebilir. Buğday, hem verimli alüvyonlu topraklara hem de daha az verimli kuru topraklara uygun birçok çeşitle çeşitli toprak tiplerinde yetiştirilebilir. Buğday için en iyi topraklar, iyi drenaja sahip, ideal olarak %25-30 su tutma kapasitesine sahip derin killi-tınlı topraklardır (Büyükdeveci, 2016).

Tarımsal üretimde tohumlar en önemli çoğaltım materyalidir ve tohumla taşınabilen etmenler için büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle, tohum patolojisi ve tohum kaynaklı bakteriyel hastalıklar birçok ülkede önemli araştırma konularıdır (Al-Sallami vd., 1997). Tahıllardaki tohum kaynaklı fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar dünya çapında önemli ekonomik kayıplara yol açar. Üreticiler dekar başına ortalama 20-22 kg tohum kullandığından, yılda yaklaşık 2,6 milyon ton tohum kullanılmaktadır. Hastalıklı tohumlar, hastalıkların yayılması, ortaya çıkması için birincil kaynak görevi gördükleri için kritik öneme sahiptir (Büyükdeveci, 2016).

Raporlar, dünya genelinde fungal hastalık etmenlerinin daha çok ortak araştırmacılar tarafından çalışıldığı, buğdaydaki bakteriyel hastalıkların ise genellikle patojenlerin izole

edilmesi veya uygun testlere dayalı tanımlama yapılmadan yalnızca semptomlara dayanarak tanımlanmadığını göstermiştir.

Modern sistematik çalışmalardaki beklenti, cins ve türlerin kesin bir şekilde tanımlanması ve izolatların bu gruplara atanması için geçerli yöntemlerin mevcut olmasıdır (Murray vd., 1990; Vandamme vd., 1996; Stackebrandt vd., 2002; Tindall vd., 2010).

Tambong (2022)'de rapor edildiği üzere, bakteriyel patojenler buğdayın önemli biyotik faktörleridir. Bu patojenlerin neden olduğu hastalıkların yıllık buğday üretimini yaklaşık %10 oranında, büyüme döneminin başlarında meydana gelen şiddetli enfeksiyonlarda ise %40'a varan oranlarda azaltabilmektedir.

P. syringae kompleksi, 1980 sonrasında, patojenik izolatlardan oluşan bir popülasyon olarak düşünülmüştür. Bu popülasyonun birçok alt popülasyonu, patovaryolar olarak, genellikle tek bir bitki cinsiyle sınırlı olabilen oldukça dar konukçu aralıklarına sahiptir.

Geleneksel olarak, patojenik türlerin en güvenilir tanımlama yöntemi, şüpheli bir konukçuya özgü patojeniklik kanıtlayarak ardından uygun ismi uygulamaktır. Ancak, bu yöntem de özellikle *P. syringae*'nin patovaryoları için başarısız olma durumu ortaya çıkmıştır. Çünkü *P. syringae* pv. *syringae*, birkaç patovaryanın semptomlarıyla aynı semptomlara neden olabilir.

Patojenlerin *P. syringae* üyesi olduğunu gösteren çalışmalar, LOPAT ve birkaç diğer test kullanılarak yapılan tanımlamalara göre yapılmıştır (Janse vd., 1997). Önceki konvasiyonel sınıflandırmalar, morfoloji, metabolik reaksiyonlar, besin kullanımı, pigment üretimi gibi verilere dayanmaktadır. Kemotaksonomik testlerin geliştirilmesi, hücre duvarı bileşimi, yağ asidi ve protein profillemesi, izoprenoid kinon ve poliamin karşılaştırmaları gibi fenotipin büyük bileşenlerini karşılaştırarak sınıflandırmada önemli bir avantaj sağlamıştır. Bu tür yöntemler, bitki patojenik bakteriler dahil olmak üzere belirli bakteriyel grupların sınırlarını belirlemede önemli bir rol oynamıştır (Vandamme vd. 1996; Gillis vd. 2005).

P. syringae, *Gammaproteobacteria* sınıfına ait olan ve monokotiledon, otsu ve odunsu dikotiledon bitki türlerinde dünya çapında hastalıklara neden olan kompleks bir fitopatojenik bakteri türüdür. *P. syringae* tür kompleksinin üyeleri, bitki fillosferindeki en bol bulunan bakteriyel bitki patojenleri olan, farklı bitki konukçularında var olma ve onları enfekte etme ve tarımsal ekosistemlerin içinde/dışında hayatta kalma yeteneklerine sahip heterojen bakterilerdir. *P. syringae* pv. *syringae* hariç her bir patovaryo spesifik bir konukçuyu enfekte eden dar bir konukçu aralığına sahiptir (Bull vd., 2010). DNA

homologisine dayalı olarak 9 farklı "genomospecies" belirlenmiştir (Gardan vd., 1992; Gardan vd., 1999). DNA homolojisi ve multi lokus sekans analizlerine göre daha tutarlı bir sınıflandırmaya imkan sağlamıştır. Patojenik özelliklerine göre *P. syringae* türlerinde 62 patovar belirlenmiştir. Öte yandan, multi lokus sekans analizlerine göre 13 filogenetik grup (filogrup) tanımlanmıştır. Gomila vd. (2017), 139 genomun karşılaştırılmasına dayanarak 6 filogenomik dalda dağılmış izolatlar için 19 filogenomik tür sınıflandırması yapmışlardır. Buna göre *P. syringae* filogenomik türü içerisinde; *aptata*, *avellanae*, *coryli*, *japonica*, *panici*, *pisi* ve *syringae* patovaları yer almıştır.

Buğday kavuz dibi çürüklüğü hastalığına neden olan izolatları *P. syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) (Young vd., 1978) olarak sınıflandırılırken, yaprak yanıklığı hastalığına neden olan izolatlar *P. syringae* pv. *syringae* altında gruplandırılmaktadır. Arjantin, Avustralya, Yeni Zelanda, İtalya, ABD, Kanada, Güney Afrika ve Pakistan gibi birçok ülkede *P. syringae* pv. *atrofaciens* veya pv. *syringae*'nin yalnızca bir kez rapor edildiği bildirilmiştir (Kietzell vd., 1997; Kazempour vd., 2010; Valencia-Botín & Cisneros-López 2012; Xin & He 2013). Diğer etmenler olarak, *P. syringae* pv. *japonica* (McCulloch 1920), her kavuzun altında tahılı kaplayan donuk, kahverengi-siyah renkte lekeler oluşturabilir boğumlarda kuruma veya çizgili alanlar meydana getirebilir. Son olarak, *P. cichorii*, sap melanozuna neden olurken, *P. fuscovaginae* buğday da kahverengi çürüklüğe yol açar.

P. syringae pv. *syringae*, buğdayda yaprak yanıklığı hastalığına neden olur. Genişleyen yapraklarda su birikintisi benzeri lekeler oluşturarak gri-yeşilden kahverengi-beyaza dönüşerek nekrotik hale gelir. *P. syringae* pv. *syringae* genellikle dağınık bir şekilde görülür ve coğrafi dağılımı sınırlıdır. (Little vd., 1998; Valencia-Botín & Cisneros-López 2012). Yüksek nem, yoğun yağış ve ılıman sıcaklık gibi elverişli çevresel koşullar altında, *P. syringae* duyarlı bir konukçu bitkide çok agresif bir şekilde çoğalabilmektedir. Patogenez aşamasında, konukçu hücreleri ölür ve enfekteli dokular geniş nekrozlara dönüşür (Xin & He 2013).

Wilkie (1973), Ocak ve Şubat 1967'de Canterbury'den hastalıklı buğday (*Triticum aestivum* L.) başakları alınmıştır. Saplar ve kavuzlarda, *P. syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch, 1920) tarafından oluşturulduğu belirtilen koyu kahverengiden siyaha kadar değişen, düzensiz lezyonlar gözlenmiştir. Aralık 1968'de ise Auckland'da dağınık kahverengi lezyonlarla kaplı buğday yaprakları toplanmıştır. Hastalığının simptomlarını; buğday başağının hemen altında, saplarda koyu yeşil ve suyla ıslanmış çizgiler oluştuğunu, bu çizgilerin büyüyerek, kahverengiye dönüşmesi ve lateral olarak genişleyerek genellikle

sapı tamamen sardığını gözlemlemiştir. Olgunlaşmamış buğday başaklarında koyu yeşilden kahverengiye kadar değişen, suyla ıslanmış lezyonlar geliştiğini, büyüyerek kavuzun tüm yüzeyini kaplayabildiğini, bu lezyonların daha çok kavuzun alt yarısında yaygın olduğunu ve renk değişikliğinin iç yüzeyden ziyade dış yüzeyde daha belirgin görüldüğünü bildirmiştir. Benzer renkte lezyonlar tanenin tabanında oluşmuş ve yavaşça yukarı doğru yayıldığını gözlemlemiştir. Yaprak yüzeyinde, 2-5 mm uzunluğunda, koyu yeşilden kahverengiye kadar değişen ve suyla ıslanmış küçük lezyonların düzensiz olarak geliştiğini, bu lezyonların yaklaşık 5-10 mm, dokunun kurumasiyla önce sarıya, ardından kahverengiye dönüştüğünü bildirmiştir.

Wilkie (1973), izole edilen bakterileri fizyolojik ve biyokimyasal testlerle *P. syringae* pv. *atrofaciens* ve *P. syringae* pv. *syringae* kültürleriyle karşılaştırılmıştır. Hastalık belirtileri, patojenisite, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçlarına dayanarak, hastalıklı buğdaydan izole edilen beş kültürün *P. syringae* pv. *atrofaciens* olarak tanımlandığı ve burada tanımlanan hastalığın buğdayın kavuz dibi çürüklüğü olduğunu belirlemiştir. Yapılan bu tanı çalışmasının Yeni Zelanda'da ilk kayıt olarak bildirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçları önceki çalışmalarla karşılaştırarak *P. syringae* pv. *atrofaciens* için elde edilen sonuçlarla Bergey (1957) tarafından rapor edilen sonuçlar arasında bazı küçük farklılıklar bulunmaktadır. Bergey (1957), H₂ S'in hafif bir üretimini izolatlarda az miktarda ve bunun McCulloch tarafından yapılan orjinal kayıttan kaynaklandığı düşünülmektedir. McCulloch (1920), et buillonu, et agarı ve süt üzerinde büyüyen kültürlerin küçük miktarlarda H₂ S ürettiğini belirtmiş, ancak tanımlı besiyerleri kullanmamış, bu yüzden bu sonuçlar burada tekrar edilememiştir. Bergey (1957), Burkholder ve Starr (1948) tarafından *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in nitrati nitrite indirgediğine dair bir rapora atıfta bulunmuştur, ancak McCulloch (1920), patojenin orijinal tanımında indirgeme olmadığını belirtmiştir. Bu sonuç burada elde edilenle de uyumludur. Bergey (1957), patates nişastasının hafif hidrolizini ve hafif indol üretimini de rapor etmiştir; bunların da büyük olasılıkla McCulloch'un (1920) bulgularından geldiği düşünülmektedir. McCulloch (1920), %1'lik patates nişastasının 10 gün sonra hafif hidrolizini kaydetmiştir. Bu çalışmada *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in yedi kültüründen ikisi, 3 gün sonra zayıf bir pozitif reaksiyon vermiştir. Bu durum, nişasta hidrolizinin tanısal bir özellik olarak zayıf ve değişken bir reaksiyon olduğunu göstermektedir. McCulloch (1920), distile su içinde %1 pepton, %0.5 disodyum fosfat ve %0.1 magnezyum sülfat içeren bir besiyerinde küçük ama belirgin bir indol üretimi kaydetmiştir. Ancak, %1 ve %2 pepton Dunham çözeltisi ve Uschinsky

besiyerlerinde kültürlerin belirgin miktarda indol oluşturmadığını da not etmiştir. Bu tutarsızlık, burada rapor edilen kültürlerde indol tespit edilememesinin önemini azaltmaktadır.

P. syringae pv. *syringae* kültürünün özelliklerinin *P. syringae* pv. *atrofaciens* ile karşılaştırılması, her ikisinin de çok benzer olduğunu ve bu iki patovarin esas olarak buğdaya olan patojenisiteleri ile ayırt edildiğini göstermektedir. Tüm biyokimyasal ve fizyolojik testlerde *P. syringae* pv. *atrofaciens* ile ayırt edilemeyen *P. syringae* pv. *syringae* kültürlerinden biri yapay inokülasyon sonrası buğday yaprak ve kavuzlarında da patojenik etki göstermiştir. Bu durum, bu kültürün yanlışlıkla *P. syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanmış olabileceğini ve *P. syringae* pv. *atrofaciens* olarak sınıflandırılmasının daha uygun olabileceğini ileri sürmüştür.

Tahılların kavuz dibi çürüklüğü, *P. syringae* pv. *atrofaciens* tarafından neden olunan, birçok tahıl yetiştirme alanında görülen bir bakteriyel hastalıktır (Bradbury, 1986). Orta ve Doğu Avrupa'da tahıl bitkilerinin başlıca bakteriyel hastalığı olarak kabul edilmektedir (Karov & Vassilev, 1990; Pasichnick & Koroleva, 1991; Toben vd., 1989). Hastalık belirtileri, kavuzdaki tanelerin tabanlarının renk değiştirmesi ve yapraklar ile saplarda nekrotik çizgiler ve şeritlerle karakterize edilir.

Maraite vd. (2007) bildirdiğine göre, *P. syringae* grubuna ait olan ve heterojen bir yapı gösteren izolatlar, otsu ve ağaçsı bitkilerde çok çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu gruba ait 57'ye kadar patovar tanımlanmış olup, grubun taksonomisi hala tartışılmaktadır. Buğdayda *P. syringae* pv. *atrofaciens*, kavuz dibi çürüklüğü ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastalık, kavuzların alt üçte birlik kısmında, özellikle iç yüzeyinde daha belirgin olan donuk, kahverengimsi siyah lekeler ile karakterize edilir. Etmenin, kavuzlarda ve saptaki kolonizasyonu tahıla yayılır ve tohumun embriyo kısmında kahverengi ile kömür siyahı arasında renk değişimine neden olur (Toben vd., 1989). Bu belirti, *Bipolaris sorokiniana* enfeksiyonu veya siyah nokta ile karıştırılabilir. *P. syringae* pv. *atrofaciens* ayrıca, boğumun hemen üstündeki sapın üst kısmında görülen koyu kahverengi veya siyah uzunlamasına çizgilerden izole edilmiştir. Bununla birlikte, bu belirti ve kavuzun tamamında görülen koyu çizgiler, bazı çeşitler üzerinde abiyotik stresin neden olduğu melanizmden de kaynaklanabilir.

Japonya'da, *P. syringae* pv. *japonica*, buğday ve arpada boğumlarda koyu kahverengi lezyonlar ve internodlarda çizgilerle ilişkilendirilmiştir (Fukuda vd., 1990). Bu nedenle,

sap ve kavuzlardaki koyu kahverengi lekelerin nedeninin belirlenmesinde dikkatli olunması gerekmektedir. *P. syringae* pv. *japonica*, Young (1992) tarafından *P. syringae* pv. *syringae* ile sinonim olarak değerlendirilmiştir; *P. syringae* pv. *syringae* ise farklı bitkilerde geniş bir hastalık yelpazesi ile ilişkilendirilmiş bir patovardır. Buğdayda *P. syringae* pv. *syringae*'nin neden olduğu yaprak belirtileri genellikle bakteriyel yaprak yanıklığı veya yaprak nekrozu olarak isimlendirilir. İlk belirtiler, başaklanma veya erken başak çıkışı döneminde fark edilen, hızla genişleyip birleşen ve üst yapraklarda gri-yeşil renkte kuruma alanlarına dönüşen, küçük ve gözle zor fark edilen suyla ıslanmış lekeler şeklinde ortaya çıkar. Bu bölgeler nekrotik hale gelir ve açık kahverengi veya beyaz renge döner (Otta, 1974; Sellam & Wilcoxson, 1976). *P. syringae* pv. *syringae* ayrıca, daha genç bitkilerde benzer lezyonlardan izole edilmiştir.

P. syringae pv. *syringae*'nin neden olduğu yaprak yanıklığının dünya genelinde yaygın olduğu belirtilmiştir. Yerel olarak yapraklardaki tahribatın %50'yi aşabildiği, ancak verim kayıpları tam olarak değerlendirilmemiştir (Diekmann & Putter, 1995).

Sultanov vd. (2016), Gardan ve diğerlerinin DNA-DNA hibridizasyon sonuçlarına dayanarak *Pseudomonas syringae* türünü dokuz genotipe (genomospecies) ayırdığını belirtmiştir. Çok lokuslu dizi tipleme (MLST) ile yapılan taksonomik çalışmalar, *P. syringae* türünün 7 ila 12 filogenetik gruba sınıflandırılabileceğini ortaya koymuş; bazı araştırmacılar ise *P. cichorii* ve *P. viridiflava*'yı *P. syringae* türü ile birleştirmiştir. Bu filogenetik gruplar, daha önce DNA-DNA hibridizasyon ile belirlenen genomospecieslere genel olarak uyum göstermekte olup, bu sınıflandırma türün temsilcilerinin tüm genom analizleri ile doğrulanmıştır.

Farklı *P. syringae* izolatları, belirli bitkilere karşı virülanslarını belirleyen geniş bir biyokimyasal mekanizma yelpazesine sahiptir. Bu mekanizmalar arasında fitotoksinler, buz-nükleasyon proteinleri ve patojenin spesifik virülansını belirleyen tip III ve tip IV salgı sistemlerinin efektörleri bulunur. Farklı *P. syringae* patovarlara dört ana fitotoksin (koronatin, phaseolotoksin, syringomisin ve tabtoksin) üretir; ancak, bu toksinlerin hiçbirisi tek başına hastalığa neden olacak kadar etkili değildir. *P. syringae* popülasyonunun genetik çeşitliliği Rusya Federasyonu'nda hâlâ yeterince araştırılmamıştır. *P. syringae* ve *P. fluorescens*'in 16S-23S rRNA intergenik spacer bölgelerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesine ve tahıl ürünlerinden izole edilen sınırlı sayıda *Pseudomonas* izolatlarının rep-PCR analizine dair bazı çalışmalar yapılmıştır. MLST kullanarak Ignatov ve arkadaşları, farklı bitkilerden izole edilen *P. syringae* izolatlarının koleksiyonunu

incelemiş ve Rusya'da filogrup 2'nin baskın olduğunu göstermiştir (incelenen tüm izolatların %56'sından fazlası baklagiller, ayçiçeği, tahıl ürünleri, brassica bitkileri, kabakgiller ve üzümlerden izole edilmiştir). *P. syringae*'nin filogrup 2'sinin farklı habitatlardan izole edilen türlerin büyük bir kısmını kapsadığını belirtmiştir. Bu grup, *P. syringae* pv. *aceris*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. syringae* pv. *avellanae*, *P. syringae* pv. *coryli*, *P. syringae* pv. *dysoxyli*, *P. syringae* pv. *japonica*, *P. syringae* pv. *lapsa*, *P. syringae* pv. *papulans*, *P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *solidagae* ve *P. syringae* pv. *syringae* patovaryantlarını içerir; ayrıca daha önce tanımlanmış olan üç genetik alt grubu 2a, 2b ve 2c'yi de kapsar. Alt grup 2b, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *aptata* ve *P. syringae* pv. *atrofaciens* gibi yaygın bitki patojenlerinin tipik izolatlarını içerirken, *P. viridiflava*'ya fenotipik olarak benzer ancak patojenik olmayan *P. syringae* türleri alt grup 2c'ye dahildir. Genel olarak, filogrup 2'nin türleri bütün bitkilerinde yüksek sıklıkla hipersensitiv reaksiyonları (HR), buğday ve ayçiçeği filizlerinde hastalık oluşturma yeteneği ve syringotoksin sentezi ile karakterize edilir.

Maraite vd. (2007), *P. syringae* pv. *syringae* ve *P. syringae* pv. *atrofaciens*'nin buğday ve arpa tohumlarında yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir. Her iki bakteri türünün, yalnızca tahıllarda değil (Shane & Baumer, 1987), aynı zamanda herhangi bir belirti göstermeyen çeşitli yıllık veya çok yıllık yabani otlarda da önemli epifitik dönemleri olduğu bildirilmiştir (Taghavi & Keshavarz, 2003). Hastalık salgınlarının yalnızca belirli çevresel koşullarda meydana geldiği ifade edilmiştir. Başak lekeleri, genellikle aşırı nemli ve serin havalarda ortaya çıkarken, yaprak yanıklığının bol nem, rüzgarla taşınan yağmur veya sulama ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, buğday yapraklarının yoğun bir yağıştan sonra hala ıslakken radyasyon nedeniyle hızla ısı kaybetmesi durumunda da gözlenmiştir.

P. syringae pv. *syringae* ve *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in, epifitik bakterilerin bitki dokularına girişini kolaylaştırabilecek ve bitki hücre ölümüne yol açabilecek syringomisin ve diğer fitotoksik bileşikler ürettiği belirtilmiştir (Bultreys & Gheysen, 1999). Yakın zamanda, *P. syringae* pv. *syringae*'nin, konukçu olmayan bitkilerde savunma ile ilgili genleri aktive eden ve çeltik yanıklık mantarına karşı direnç oluşturan syringolinler adı verilen bir peptid ailesini salgıladığı tespit edilmiştir. Ancak buğdayda, syringolin A'nın, külleme tarafından kolonize edilen hücrelerde aşırı duyarlı hücre ölümünü tetiklediği ve böylece bitkinin savunma reaksiyonunu tekrar devreye sokarak uygun bir etkileşimi uyumsuz bir etkileşime dönüştürdüğü bildirilmiştir (Wäspi vd., 2001; Amrein vd.,

2004).Bu nedenle, *P. syringae* pv. *syringae*'nin epifitik popülasyonlarının diğer patosistemleri etkileyebileceği ifade edilmiştir.

Direnç ile ilgili olarak, buğday çeşitleri arasında kavuz dibi çürüklüğü ve yaprak yanıklığı şiddeti açısından farklar olduğu gözlenmiştir. Ancak, genotip direncinin sistematik değerlendirilmesinin zorluğu, belirli iklimsel gereksinimler ve büyüme sürecinde duyarlılığın değişmesi nedeniyle belirtilmiştir. Başaklanma döneminde başakların *P. syringae* pv. *atrofaciens*'ya dirençli olduğu, ancak bu aşamadan sonra hamur aşamasına kadar duyarlılığın sürekli arttığı ifade edilmiştir (Toben vd., 1989).

Cunfer (1987)'ye göre, *P. syringae* pv. *syringae* Van Hall tarafından neden olunan bakteriyel yaprak yanıklığı, 1970'lerin başında buğdayda önemli bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Bu bakteri toprakta geniş ölçüde yaygındır ve buğday yapraklarının doğal bakteri popülasyonunun bir parçası olarak yaşamaktadır. Yaprak yanıklığı, belirli çevresel koşullarda ortaya çıkmaktadır. Bakteriyel hastalıklar, mantar kaynaklı hastalıklara kıyasla buğdayda nispeten daha az kayba neden olmaktadır. Ancak bu hastalıklar mantar kaynaklı olanlar kadar detaylı incelenmemiştir ve bildirilenden daha büyük kayıplara neden olabilir. Bakteriyel yaprak çizgisi, *X. campestris*'in iki patovarı tarafından oluşturulmaktadır ve son yıllarda ABD'nin batısındaki bazı bölgelerde daha önemli hale gelmiştir. Kavuz dibi çürüklüğüne ise *P. syringae* pv. *atrofaciens* Young, Dye ve Wilkie neden olmaktadır ve genellikle buğday yetiştirilen çoğu bölgede önemsiz bir hastalık olarak görülmektedir.

Toben vd. (1991), *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in en dikkat çekici belirtisi, olgunlaşmakta olan buğday başaklarının kavuzlarının tabanında, nemli hava koşullarında artan koyu kahverengi renk değişimidir. Hastalık, kolayca *Leptosphaeria nodorum* kaynaklı enfeksiyonla karıştırılabilir. Patojenin hızlı tanımlanabilmesi için buğday fidelerinde bir biyotest geliştirilmiştir. Kışlık buğdaya yapılan yapay inokülasyonlar, büyüme aşamasından bağımsız olarak yapraklarda hastalık belirtilerine neden olmuştur.

Kavuzlarda tipik belirtiler, olgunlaşma döneminin başında veya sonrasında inokülasyon yapıldığında ortaya çıkmıştır. Dayanıklılık taraması için, süt olumu döneminde çeşitli buğday çeşitleri iki bakteri izolatu ile inoküle edilmiştir. Çoğu çeşit hastalığa karşı hafifçe duyarlı bulunmuştur. Baharlık buğday cv. Star çeşidinin, iki izolat arasında farklı direnç seviyeleri gösterdiği ve izolatların farklı ırklara ait olduğunu ortaya konmuştur. Bakterinin tohumla taşınabilir olduğu belirlenmiştir. Bu hastalığın yol açtığı ekonomik kayıpların düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Buğday ve *Aegilops* L. genotiplerinin *P. syringae* pv. *atrofaciens*'e karşı olgun bitki direncinin serada, her iki türün de duyarlı büyüme evresinde enjeksiyon yöntemi kullanılarak test etmişlerdir. İncelenen genotipler, *P. syringae* pv. *atrofaciens*'e karşı kısmi olgun bitki direnci göstermiştir. En yüksek konsantrasyon da *P. syringae* pv. *atrofaciens*'e duyarlı genotiplerin oranının buğdayda, *Aegilops*'tan daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Zaharieva & Vassilev, 1995) .

Vassilev vd. (1997) tarafından belirtildiği üzere, *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in virü lent izolatları, *Geotrichum candidum* mantarının büyümesini engelleyerek, syringomycin benzeri özelliklere sahip maddeler üretmiştir. Büyüme inhibisyonu zonlarının genişliği izolatlar arasında farklılık göstermiştir. İyon değişim kromatografisi kolonu kullanılarak yüksek virü lent bir izolatun biyolojik olarak aktif süpernatantının saflaştırılması sonucunda, *Rhodotorula pilimanae* ve *Bacillus megaterium*'un büyümesini engelleyen ve tütün ve buğday bitkilerinde fitotoksik etki gösteren bir ana fraksiyon elde edilmiştir. Ters faz HPLC ile yapılan ileri saflaştırmada, dört ana biyolojik aktif madde ayrılmış ve bunlar syringomycin E, syringomycin G, syringopeptin 25A ve syringopeptin 25B olarak tanımlanmıştır. Bu fitotoksinler, çoğu *P. syringae* pv. *syringae* izolatı tarafından üretilmektedir. Buğdayın gövdesine saf syringomycin E ve syringopeptin 25A enjekte edildiğinde, patojenin doğal olarak oluşturduğu belirtilere benzer semptomlar gözlenmiştir. Ancak, syringopeptin 25A, syringomycin E'den en az altı kat daha aktif bulunmuştur; bu durum, toksinlerin patogeneizde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Von Kietzell ve Rudolph (1997) tarafından yapılan çalışmada, 1992 ve 1993 yıllarında Almanya'da yürütülen bir araştırmada *P. syringae* pv. *atrofaciens* epifitik izolatlarının buğday ve arpa tohumları ve bitkileri üzerinde sıkça rastlandığı, ancak hastalık belirtisi göstermediği bildirilmiştir. Bu nedenle, *P. syringae* pv. *atrofaciens* geçmişte buğday ve arpa üzerinde “melanizm” gibi spesifik olmayan belirtilerden epifitik izolatlarının izole edilmesinin sıklıkla yanlış teşhislere yol açmış olabileceği öne sürülmektedir. Çavdar, tritikale ve yulaflarda ise bakteri yalnızca birkaç vakada tespit edilmiştir. Alan deneylerinde, Rifampisin ve streptomisin'e direnç “işareti” taşıyan bir *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatın yapay tohum inokülasyonu sonrasında buğday, arpa, çavdar ve yulaf yapraklarından izole edildiği; bakterinin üst yaprak ve başaklarda hastalık belirtisi göstermeksizin çoğaldığı ve güçlü bir epifitik büyüme kabiliyeti sergilediği bulunmuştur. *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının fizyolojik, serolojik ve konukçu spektrumu testlerinde oldukça homojen tepki verdiği ancak *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarının

ikisinden ayırt edilemediği kaydedilmiştir. Buna karşılık, *P. syringae* pv. *syringae* izolatları oldukça heterojen bir yanıt göstermiştir.

Maraite vd. (2007) diğer birçok ürün gibi buğday bitkisi de optimal yaprak gelişimini engelleyen, verimi düşüren ve uluslararası tahıl ticaretine kısıtlamalar getiren çeşitli bakteriyel hastalıklardan etkilenmektedir. Ancak, bakteriyel hastalıkların yıllık kontrolüne, pas hastalıkları veya *Helminthosporium* ve *Septoria* yaprak yanıklıklarına kıyasla çiftçiler tarafından nispeten az dikkat gösterilmektedir. Bu durum, semptomların bazen fizyolojik veya stres kaynaklı hasarlarla karıştırılmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bakteriyel hastalıkların salgın gelişimi, belirli iklim koşullarının bir araya gelmesini gerektirdiğinden, bir yıl ile diğer yıl ya da ülkeler ve kıtalar arasında düzensizdir. Çeşitlerin duyarlılığı veya tohum bulaşma derecesindeki farklılıklar da bu değişkenliğe katkıda bulunmaktadır. Kimyasal mücadelenin tek başına hastalık kontrolünde yeterli görülmediğinden dolayı ana kontrol stratejiler olarak çeşitlerin dirençli olması ve hastalıksız tohumluk üretiminin uygulanmasının çok faydalı olduğunu bildirmişlerdir.

Maraite vd. (2007)' ye göre, *P. syringae* pv. *atrofaciens* ve *P. syringae* pv. *syringae*'nin koloni morfolojisi, fizyolojik, serolojik ve temel genetik özellikler bakımından birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir. Tahıllar ve diğer bitkilerde oluşturulan belirtilerin değerlendirilmesi, bazı karakterizasyonların yapılmasına olanak tanısa da, kesin bir ayırım yapmak zor olmaktadır; çünkü bazı *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarının da başaklarda kavuz dibi çürüklüğüne neden olduğu bildirilmiştir (Von Kietzell, 1995).

Buletsa vd. (2016) çalışmasında, *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarını %85'inin buz çekirdekleşme aktivitesi gösterdiği, buna karşılık *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının çoğunluğunun (%69) buz çekirdekleşme negatif olduğu tespit edilmiştir. Bu iki izolat grubu arasındaki farklılıklar dikkat çekicidir, çünkü tahıllardan izole edilen *P. syringae* izolatlarının patovar düzeyinde tanımlanması her zaman net değildir (Von Kietzell & Rudolph, 1997) ve bazı araştırmacılar tüm izolatları pv. *syringae* grubunda toplamayı tercih etmektedir (Young & Triggs, 1994). Ancak çalışmada kullanılan pv. *atrofaciens* izolatlarının, lipopolisakkaridlere karşı monoklonal antikorlarla ve Biolog yöntemi ile daha homojen bir grup olduğu gösterilmiştir (Von Kietzell, 1995). İlginç bir şekilde, açıkça buz çekirdekleşme pozitifliği gösteren üç *atrofaciens* izolatının Güney Afrika (2067 ve 2074) ve Yeni Zelanda (1440) kökenli olduğu belirtilmiştir.

Butsenko vd. (2020) Kiev bölgesinde incelenen buğday tarlalarında, fitopatojenik bakterilere özgü belirtileri taşıyan yabancı otlar bulunmuştur. Özellikle, *Sonchus arvensis* bitkilerinde açık kahverengi lekeler, *Papaver argemone* yapraklarında beyazımsı lekeler saptanmıştır. 53 semptomatik bitkiden 25 bakteriyel izolat elde edilmiştir. Bunlar arasında yedi izolat (L8, L9, L11, L11a, L13, L15, L16) aerobik, spor oluşturmeyen, Gram-negatif hareketli çubuklar olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar, çapları 1.0–2.5 mm olan gri, saydam, pürüzsüz, yuvarlak koloniler oluşturmuş ve kenarları hafif dalgalı, merkezi ise kompakt ve bombeli bir yapıya sahip olmuştur. Bu izolatlar oksidaz negatif olup tütün yapraklarında hipersensitivite reaksiyonu (HR) indüklemiştir. LOPAT testlerinin (levan üretimi, oksidaz, patates üzerindeki protopektinaz aktivitesi, arginin dihidrolaz, tütün yapraklarında HR) sonuçlarına göre (L+, O–, P–, A–, T+), bu yedi izolat LOPAT grup 1a (*P. syringae*) olarak sınıflandırılmıştır. İzolatları sitrat, mannitol, ksiloza, arabitol, galaktoz, sakkarozu kullanırken, laktoz, trehaloz, malonat, maltoz ve selüloz kullanmamıştır. Bu izolatlar, β -glukozidaz, fosfataz ve aeskulin hidrolizi reaksiyonları gösterirken, üreaz, ornitin dekarboksilaz, lizin dekarboksilaz, N-asetil- β -D-glukozaminidaz, α -galaktozidaz ve γ -glutamil transferaz aktiviteleri göstermemiştir. RAPD-PCR sonuçlarına dayanarak, coğrafi izolasyon bölgesi, bakterilerin izole edildiği bitkiler, serolojik ve agresiflik özellikleri fark etmeksizin, tüm *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatları homojen ilişkili bir grup oluşturmuştur. Ayrıca, *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının bu türün diğer patovaryatlarından, özellikle *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. wieringae* ve *P. syringae* pv. *syringae*'den farklılık gösterdiği gösterilmiştir. Tüm *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatları için, OPA-13 primeri ile yapılan RAPD amplifikasyonunun baskın ürünü 700 kb'lik bir PCR fragmentidir. Bu parçanın varlığı, bu patovaryanın temsilcilerini diğer patovaryalardan ayırmaktadır. Bu yöntem, mango, tatlı kiraz çeşitleri ve diğer bitkileri enfekte eden *P. syringae* patovaryalarını ayırt etmek için de yararlı olmuştur.

Huliaieva vd. (2020), tohumların ekim öncesi %1 oranında Ag-Cu nanopartikül sitratları, Co; Cu; Zn; Fe; Mn; Mo; Mg içeren nanokompozit (Avatar-1) ve iyot-selenyum biyopreparatı ile işlenmesi sırasında *P. syringae* pv. *atrofaciens* hücrelerinin gelişiminin önemli ölçüde inhibe edildiği ve canlılıklarının azaldığı bulunmuştur. Transmissive elektron mikroskobu yöntemi ile yapılan gözlemler, Ag-Cu nanopartikül sitratları, Avatar-1 nanokompoziti ve iyot-selenyum biyopreparatının düşük konsantrasyon da dahi etkili bir

bakterisidal aktiviteye sahip olduğunu ve hücre duvarındaki hasarlar sonucu bakterilerin canlı formlarında azalma meydana geldiğini göstermiştir.

Kelpšienė vd. (2021) göre, *P. syringae* patovaları, hemen hemen tüm ılıman ve subtropikal tahıl yetiştirme bölgelerinde tahıllarda bakteriyel hastalıklara neden olmaktadır. Fungal hastalıklara kıyasla önemi düşük görüldüğünden, *P. syringae* Litvanya'daki tahıl bitkilerinde araştırılmamıştır. Bununla birlikte, fungal hastalıklara özgü olmayan yaprak yanıklığı ve kılçık renk değişimi belirtileri tarlalarda nispeten sık bulunmuştur. Bu nedenle, çalışmalarının amacı Litvanya'da yetiştirilen tahıllarda *P. syringae*'nin varlığını belirlemek olmuştur. 2013-2015 yılları arasında kışlık buğday, kışlık tritikale, yazlık buğday ve yazlık arpa bitkilerinden toplamda 452 semptomatik bitki örneği toplanmıştır. Yaprak yanıklığı ve kılçık leke semptomları, kışlık tritikale ve yazlık arpaya kıyasla daha sık kışlık ve yazlık buğday bitkilerinde tespit edilmiştir. Semptomatik yapraklar ve tahıllardan 113 *P. syringae* izolatu (51 yaprakdan ve 62 tahıldan) izole edilmiş, ancak yalnızca 13 izolatu (10 buğdaydan, 2 tritikaleden ve 1 arpadan) püskürtme yöntemiyle test edildiğinde konukçu bitkilerde patojenik bulunmuştur. Kışlık tritikale ve yazlık arpadan yaklaşık 10 kat daha sık olarak yazlık ve kışlık buğdayda tespit edilmiştir. Ülkenin farklı bölgelerinden toplanan yazlık buğday, kışlık buğday, kışlık tritikale ve yazlık arpa bitkilerinin tahıllarından (10 izolatu) ve yapraklarından (3 izolatu) izole edilmiştir. Bu sonuçlar, Litvanya'da yetiştirilen tahıllarda *P. syringae*'nin neden olduğu hastalıkların varlığını doğrulamaktadır. 16S rRNA gen dizisi analizine dayalı olarak, *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in tahıllarda, özellikle buğdayın kavuz dibi çürüklüğü hastalığının baskın etmeni olduğu belirlenmiştir.

Pasichnyk ve Butsenko'nun (2022) bildirdiğine göre, Pastushenko ve Symonovych (1979) tarafından *Pseudomonas* cinsine ait fitopatogenik bakterilerin serogrup sınıflandırılması için bir şema geliştirilmiş ve bu şema günümüzde de kullanılmaktadır. Ancak, bu serogrup şemasının uzun yıllar boyunca birikmiş tüm verilere ulaşmadaki eksiklikler nedeniyle kullanımı günümüzde karmaşık hale gelmiştir. Ayrıca, bu şema, *Pseudomonas* cinsi fitopatogenik bakterilerin modern taksonomisine uymamaktadır. Bu çalışmada, araştırmacılar kendi deneysel sonuçlarına ve literatür verilerine dayanarak *Pseudomonas* cinsine ait fitopatogenik bakterilerin serogrup sınıflandırma şemasını modernize etmeyi amaçlamıştır. Çalışmada, Ukrayna'nın farklı bölgelerindeki buğday, çavdar, yulaf, tütün ve çeşitli yabancı ot türlerinden izole edilen *P. syringae* patovalarının *atrofaciens*, *coronafaciens* ve *tabaci* izolatları incelenmiştir. Bakteri izolatlarının antijenik özellikleri,

dokuz serolojik gruba (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX) ait *P. syringae* izolatlarına karşı hazırlanan antiserumlarla aglütinasyon ve çift immünodifüzyon (Ouchterlony yöntemi) reaksiyonları kullanılarak araştırılmıştır. Kavuz dibi çürüklüğüne neden olan *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in buğdaydan izole edilen izolatlarının dört serolojik gruba (II, IV, V, VI), çavdardan izole edilenlerin ise beş serolojik gruba (I, II, IV, V, VI) ait olduğu belirlenmiştir. Yulaf bitkilerinde hale yanıklığına neden olan *P. syringae* pv. *coronafaciens* izolatlarının iki serolojik gruba (I, V) ait olduğu bulunmuştur. Bu şema, *Solanum lycopersicum* bitkisinde bakteriyel benek hastalığına neden olan *P. syringae* pv. *tomato*'nun serogroup IV'e ait olduğu bilgisiyle güncellenmiştir. Ayrıca, tütünlerde hastalığa neden olan *P. syringae* pv. *tabaci* izolatlarının üç serogruba (VII, VIII, IX) dahil olduğu bulunmuş ve bu durum 1979 şemasına göre güncellenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, Pastushenko ve Symonovych tarafından geliştirilen *Pseudomonas* cinsine ait fitopatojenik bakterilerin serogrup sınıflandırma şeması araştırma sonuçları ve literatür verileri ışığında modernize edilmiştir.

Abo Bakr vd. (2024)'de belirttiği üzere, buğday dünya genelinde yetiştirilen en önemli tahıl ürünlerinden biridir ve son on yılda belirgin hale gelen iklim değişiklikleriyle birlikte çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerinden etkilenmektedir. Bu stres faktörleri arasında, *P. syringae* pv. *syringae* tarafından neden olunan bakteriyel buğday yaprak yanıklığı hastalığı bulunmaktadır. Bu bakterinin önemi ve tehlikesi, tohum yoluyla bulaşabilmesinden kaynaklanmakta olup, hem dane kalitesini hem de bin dane ağırlığını olumsuz etkileyebilmektedir. Araştırmacılar tarafından 2022 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, *P. syringae* kaynaklı bakteriyel yaprak yanıklığı hastalığının ve patotiplerinin Suriye'nin ana buğday yetiştirme bölgelerinde (Halep, Hama, Humus, Tartus ve Lazkiye illerinde) yaygınlığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, incelenen 59 tarladan 42'sinde (%71,2) bakteriyel yaprak yanıklığı hastalığının görüldüğünü göstermiştir. En düşük hastalık oranı (%50) ve şiddeti 2'nin altında olmak üzere Lazkiye'de kaydedilirken, en yüksek oran (%77,8) ve şiddet 4 olmak üzere Halep ilinde gözlenmiştir. Hastalık belirtileri, tüm tarlalarda suyla dolmuş yaprak lekeleri şeklinde başlamış, ardından yeşilimsi-gri nekrozlara ve son olarak saman rengine dönüşmüştür. Siyahımsı kahverengi boğum belirtileri yalnızca Halep ve Tartus'taki dört tarlada görülmüş olup, bu belirtilerin muhtemelen *P. syringae* pv. *japonica* patotipinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, altı tarlada buğday başaklarında siyahımsı kahverengi sulu lekeler tespit edilmiş ve bu

belirtiler, Halep ve Tartus'ta *P. syringae* pv. *atrofaciens* patotipine özgü belirtilerle örtüşmüştür.

Abo Bakr (2024) tarafından bildirildiği üzere, pestisitlerin etkisiyle *Pseudomonas syringae* türüne ait fitopatojen bakterilerde morfolojik olarak farklı formların ortaya çıkma sıklığı artmakta, bu da patojenlerin izolasyonu ve fenotipik özelliklerine göre tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in kavuz dibi çürüklüğü etmeni olan S- ve R-formlarının biyolojik özelliklerini inceledikleri çalışmada *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1011 ve *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 izolatlarının R-dissosyantları, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından birbirlerinden ve bu izolatların orijinal S-formundan farklı bulunmamıştır. R-formları, S-formlarına kıyasla biyofilm oluşturma yeteneğini daha iyi geliştirmekte, bu da onlara filofserada popülasyon oluşturma sırasında rekabet avantajı sağlamaktadır. Ayrıca, R-formlarının *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in orijinal S-formuna özgü virülans özelliklerini kaybetmediği gösterilmiştir. *P. syringae* pv. *atrofaciens* popülasyonun da, biyofilm oluşturma kapasitesi yüksek bireylerin sayısındaki artış, virülans özelliklerin korunması durumunda bu patojenin neden olduğu epifitotiklerin riskini artırabilir.

2.1. Dünya'da *P. Syringae* pv. *Atrofaciens* İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Kavuz dibi çürüklüğü hastalığının zayıf dane dolumuna yol açtığı ve Rusya'da tahıllar için önemli bir patojen olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Matveeva vd., 2003). Ukrayna'da (Pasichnyk, 2000) ve Bulgaristan'da (Vassilev vd., 1995) *P. syringae* pv. *atrofaciens* üzerine önemli araştırmalar yapılmıştır. Almanya'da ekonomik kayıpların düşük olduğu ifade edilmiştir (Toben vd., 1991). Belçika'da *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in, yalnızca Fidel çeşidinde zaman zaman belirgin belirtiler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, durum buğdayı, arpa ve yulaf üzerinde de rapor edilmiştir (Alexandrova vd., 1995).

Taghavi ve Keshavarz (2003) 1997-1998 yılları arasında Fars ve Kohgiluyeh ve Boyer-Ahmad bölgelerindeki çeşitli buğday tarlalarından buğday yaprağı örnekleri toplayarak buğday yaprak yanıklığına neden olan etmeni belirlemeyi amaçlamıştır. LOPAT testleri ve KB ortamında floresan pigment üretimi temel alınarak yapılan incelemede, örneklerden 181 bakteri izolatu elde edilmiştir. Biyokimyasal, fizyolojik ve patojenisite testlerine göre izolatlar beş grupta sınıflandırılmış; bir grubun *P. fluorescens*, diğer grupların ise *P. syringae* pv. *syringae* olduğu belirlenmiştir. Patojenisite testi, *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarının Fars, Kohgiluyeh ve Boyer-Ahmad illerinde buğday yaprak yanıklığının etmeni

olduğunu göstermiştir. *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarının tüm protein elektroforetik desenleri benzerlik gösterirken, bazı alt bantlarda küçük farklılıklar gözlemlenmiştir. *P. syringae* pv. *syringae* patojenik izolatları aynı zamanda S.Shahr ve Marvdasht gibi bölgelerdeki yıllık ve çok yıllık yabancı otlardan tilki kuyruğu, kıl yulafı, yulaf otu, arpa otu ve *Cynodon dactylon* izole edilmiştir. Test edilen buğday çeşitleri arasında Tajan çeşidinin patojene duyarlı olduğu, diğer çeşitlerin ise dayanıklılık, orta dayanıklılık veya orta hassasiyet gösterdiği saptanmıştır. Sonuçlar, *P. syringae* pv. *syringae*'nin buğday tanelerinde, muhtemelen tohumlarda bir endofit olarak bulunan bir tohum kaynaklı patojen olduğunu ortaya koymuştur.

Butsenko ve Pasichnyk (2018) OPA-13 primeri ile yapılan RAPD profili analizine göre Ukrayna'nın 11 bölgesindeki farklı bitki konukçularından izole edilen *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının genetik olarak homojen bir grup olduğunu belirlemiştir.

Patojenik varyasyon ve patojenite ile ilgili olarak, Rusya'da arpa, çavdar ve buğdaydan izole edilen izolatlarının 13 buğday ve arpa çeşidindeki virülensinin değerlendirildiği ve arpa ile çavdar izolatlarının iki ayrı gruba ayrıldığı, buğday izolatlarının ise her iki grupta da bulunduğu bildirilmiştir (Matveeva vd., 2003). Bulgaristan'da buğdaya patojen olan *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatları arasında geniş bir virülens farkı olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, Sadovo 1 ve Trakia gibi kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinin kullanımıyla dört ırkın ayrımının yapıldığı bildirilmiştir (Vasilev vd., 1988). Almanya'da Star çeşidindeki reaksiyon farkı, *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatları arasında ırkların varlığını göstermiştir (Toben vd., 1991). Bu durum, buğday genotiplerinin direnç testlerinde önemli sonuçlar doğurmuştur.

P. syringae pv. *atrofaciens*'e karşı sahada büyük çaplı direnç taraması raporlarının sınırlı olduğu, çoğu çalışmanın büyüme odalarında veya seralarda farklı büyüme aşamalarındaki bitkiler üzerinde yapıldığı belirtilmiştir. Virülenslikteki nicel ve nitel farklılıklar nedeniyle izolatların, bitki aşamalarının ve çevresel koşulların dikkatle seçilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Zaharieva ve Vassilev (1995) tarafından, başaklanma aşamasındaki çeşitli buğday ve *Aegilops* genotiplerinin *P. syringae* pv. *atrofaciens* 'e karşı direnci, serada başak içine bakteriyel süspansiyon enjekte edilerek değerlendirilmiştir. Vassilev vd. (1995) ise üçüncü yaprak aşamasındaki bitkilere, çeşitli inokulum konsantrasyonlarıyla enjeksiyon yöntemi kullanarak direnç testi yapmıştır. *Aegilops* genotiplerinde, buğday çeşitlerine kıyasla daha yüksek bir direnç seviyesi gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, Kotlyarov (1991) tarafından yapılan ve Rus *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarına karşı *Erythrospermum*

19-16, Sadovo 1 ve Katya buğday çeşitlerinde direnç gözlemlendiğini bildiren önceki raporları doğrulamaktadır. Direncin ayrıca diğer Rus kışlık ve yazlık buğday çeşitlerinde, Cooperacion Calquin, Punjab 96, Prointa Superior, Prointa Imperial, Lhanaa, Bedhao ve Rhabour-15 gibi çeşitlerde de tespit edildiği bildirilmiştir (Matveeva vd., 2003).

1987 ve 1988 yıllarında, *P. syringae* pv. *atrofaciens* tarafından neden olunan kavuz dibi çürüklüğünün Batı Almanya'da neredeyse her yerde görüldüğü tespit edilmiştir. Hastalığın belirtileri genellikle olgunlaşmamış buğday başaklarının kavuzlarının tabanında, koyu yeşilden kahverengiye kadar değişen ve suyla ıslanmış lezyonlar şeklinde ve zamanla bu lekelerin koyu kahverengiye dönüştüğü belirlenmiştir. Buğday ve arpadan toplam 46 *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatu elde edilmiştir. Petri kaplarında ıslak filtre kağıdı üzerinde yetiştirilen 4-5 günlük buğday fideleri, bakterilerle kontamine edilmiş bir diseksiyon iğnesi ile iki-üç noktadan delinmiştir. 2-3 gün sonra patojenik izolatlar, fidelerde kahverengiden siyaha dönen lekeler oluşturmuştur. Buğdaydan elde edilen bakteri izolatlarının, patates dekstroz agar üzerinde yetiştirilen bazı mantarların büyümesini engellediği gözlenirken, buğdaydan izole edilen bir *P.syringae* pv. *syringae* referans izolatının ise böyle bir engelleyici etki göstermediği belirlenmiştir. Dayanıklılık taraması sırasında, çeşitli ilkbahar ve kışlık buğday çeşitleri sera veya saha denemelerinde test edilmiş ve farklı çeşitlerin hastalığa karşı duyarlılıklarında belirgin farklılıklar tespit edilmiştir (Toben vd., 1989).

Alexandrova vd. (1995) tarafından, İtalya'da durum buğdayı çeşitlerinde tekrarlayan kavuz dibi çürüklüğü ve yaprak lekesi enfeksiyonları gözlemlenmiştir. İtalya'nın farklı bölgelerinde üretilen ticari tahıl tohum partileri ve sahadan toplanan simptomatik bitki örneklerinden *P.syringae* pv. *atrofaciens* izole edilmiştir. Bu izolasyon, konvansiyonel tanımlama testleri ve SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen hücre proteinlerinin elektroforetik desenlerinin bilgisayarlı yoğunluk analizi kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *P.syringae* pv. *atrofaciens*, kuzey ve orta İtalya'da yetiştirilen arpa, buğday ve durum buğdayı tohum örneklerinde ve simptomatik durum buğdayı bitkilerinde tespit edilmiştir.

Iacobellis vd. (1997) tarafından, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatları, patojenik ve moleküler özellikler açısından değerlendirilmiştir. *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının çoğunun syringomisinler ve syringopeptinler ürettiği ve *P. syringae* pv. *syringae*'de syringomisinlerin sentezinde ve taşınmasında rol oynayan syrB ve syrD genlerine homolog DNA dizileri içerdiği bildirilmiştir. Ayrıca, *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının neredeyse tamamının, *P. syringae* pv. *syringae*'nin tipik konukçu

bitkisi olan leylak üzerinde patojenik olduğu tespit edilmiştir. Her iki patovarin yağ asitleri ve tüm hücre proteinlerinin oldukça benzer olduğu ve bu verilerin küme analizinde iki patovarin benzerliğini doğruladığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, *P. syringae* pv. *syringae* ile *P. syringae* pv. *atrofaciens*'nin yakın akraba patovarlar olduğu sonucuna varılmıştır.

Al-Sallami vd. (1997) Bulgaristan'da toplanan buğday tohumlarında fungal etmenler kaynaklı siyah nekrotik leke belirtileri gösteren örneklerde, tohum tanelerinde renk değişimi ve embriyoların etrafında siyah noktalar gözlemlenmiştir. Bu örneklerden bakteriyel etmen *P. syringae* pv. *atrofaciens* ile fungal etmenlerden *Alternaria*, *Fusarium* ve *Drechslera* spp.'ye ait saf kültürler izole edilmiştir. *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in, orta ve doğu Avrupa'da tahılların en önemli bakteriyel hastalığı olarak son yıllarda ortaya çıktığı belirtilmiştir (Karov & Vassilev, 1981; Toben vd., 1989; Pasichnik & Koroleva, 1991). Başaklarda kılçıkların ve tanelerin tabanında renk değişikliği gibi tipik belirtilerin nadiren gözlemlendiği, bu nedenle buğdayların görsel incelemelerinin birçok durumda yanlış sonuçlar verebildiği rapor edilmiştir. Siyah nekrotik lekelenmeler görüldüğünde enfeksiyonun birden fazla patojen tarafından tetiklenebileceği vurgulanmıştır.

Kotlyarov, (1997) 1993-1995 yılları arasında 27 yazlık buğday çeşidi ve 43 kışlık buğday çeşidi, *P. syringae* pv. *syringae*'ye karşı direnç açısından seralarda ve tarlalarda incelenmiştir. Bakteriyel yaprak yanıklığı enfeksiyonu ile külleme hastalığı arasında pozitif bir ilişki bulunmuş, ancak *P. syringae* ile *Fusarium* kulak çürüklüğü (*Fusarium graminearum*) arasında bir ilişki tespit edilmemiştir. Bakteriyel yanıklık direncinin baskın genler tarafından kontrol edildiği ortaya konmuştur. "Volnitsa" ve "Diplomat" adlı iki kışlık buğday çeşidi ile "Nobeokabozu" çeşidinden türetilen bazı hatlar, yukarıda belirtilen patojenlere karşı zayıf duyarlılık gösterdiği için seçilmiştir.

Matveeva vd. (2003) kavuz dibi çürüklüğüne neden olan *P. syringae* pv. *atrofaciens* etmeni, Rusya'da tahıllar için önemli bir patojen olarak rapor edilmektedir. Rusya Federasyonu'nun farklı bölgelerinden 1998-2001 yılları arasında toplanan buğday, çavdar ve arpa bitkilerinin enfekte olmuş tohumlarından izole edilen 23 izolatin virülensinin, 13 buğday ve arpa çeşidi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Virülens farklılıklarına ve UPGMA küme analizine dayalı olarak, arpa ve çavdar izolatlarının iki ayrı grupta kümelenildiği, buğday izolatlarının ise her iki kümede de yer aldığı tespit etmişlerdir. *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in Rusya'daki tahıl türleri ve genotiplerine karşı yüksek bir virülens çeşitliliğine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, 60'tan fazla buğday çeşidinin,

çeşitli *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarına karşı farklı inokülasyon teknikleriyle duyarlılığını değerlendirmişlerdir. Rus kışlık buğday çeşitlerinden 'Moskovskaya nizkostebel'naya', 'Mironovskaya 61', 'Pamyat Fedina', 'Zhneya' ve melez PPG-93 ile yazlık buğday çeşitlerinden 'Bezenchukskaya', 'Isheevskaya', 'Kinelskaya', ayrıca yabancı çeşitlerden 'Cooperacion Calquin', 'Pinjab 96', 'Prointa Superior', 'Prointa Imperial', 'Lhanaa', 'Bedhao' ve 'Rhabour-15' gibi birçok dirençli hat belirlemişlerdir.

Kazempour vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, İran'da buğdayda görülen bakteriyel hastalıklardan olan, sırasıyla *P. syringae* pv. *atrofaciens* ve *P. syringae* pv. *syringae*'nin neden olduğu başak kavuz leke hastalığı ve yaprak yanıklığı incelenmiştir. Bu hastalıklar, buğdayda önemli ürün kayıplarına yol açmaktadır. 2005-2006 yıllarında ilkbahar ve yaz aylarında Guilan eyaletindeki (Roodsar, Langrud, Rostamabad, Loshan ve Roodbar) çeşitli buğday tarlaları incelenmiş ve kavuz leke ile yaprak yanıklığı belirtileri gösteren enfekte buğdaylardan örnekler toplanmıştır. Morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikler, patojenisite testleri ve spesifik primerlerle yapılan PCR analizlerine dayanarak, izolatlar iki gruba ayrılmıştır. İlk grup, yaprak yanıklığına neden olan ve *P. syringae* pv. *syringae* olarak tanımlanan 20 izolatı içerirken; ikinci grup, kavuz dibi cürüklüğü hastalığına yol açan ve *P. syringae* pv. *atrofaciens* olarak tanımlanan 18 izolattan oluşmaktadır. Bu çalışma, İran'da buğdayda *P. syringae* pv. *atrofaciens* varlığını ilk kez rapor etmiştir.

Buletsa vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, kavuz bakteriyoz etmeni olan *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in büyümesi ve hücrelerde pestisitlerin etkisiyle meydana gelen fizyolojik değişiklikler incelenmiştir. Çalışmada, klasik mikrobiyolojik yöntemler, mikroaglütinasyon reaksiyonu, elektronik mikroskopi ve sodyum dodesil sülfat-PAAJ elektroforezi gibi yöntemler kullanılmıştır. Sonuçlar, Twix ve Alfa Super preparatlarının üreticinin önerdiği dozlarda uygulandığında *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1011'in hayatta kalma oranını düşürdüğünü göstermiştir. Ayrıca, piretroid insektisitler Alfa, Super Twix ve herbisit Granstar Gold 75'in, *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1011 kolonilerinde R-formlarının ortaya çıkmasıyla morfolojik disosiyasyona yol açtığı gözlemlenmiştir. R-disosiyantlarının fizyolojik-biyokimyasal özellikleri arasında fark görülmezken, orijinal S-formundan ise sadece küçük farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak, sentetik pestisitler Alfa Super, Twix ve Granstar Gold 75'in, *P. syringae* pv. *atrofaciens* UKM B-1011'de disosiyasyona neden olarak popülasyonun heterojenliğini artırdığı, dayanıklılık sınırlarını genişlettiği tespit edilmiştir.

Butsenko vd. (2020)'de belirttiği üzere, son yıllarda yaprak yanıklığı ve kavuz dibi çürüklüğüne neden olan patojen bakteri *P. syringae*'nin Litvanya'da yayıldığını göstermiştir. *P. syringae* kaynaklı hastalıkların buğday veriminde %5 ile %50 arasında kayba neden olabileceği belirtilmiştir. Litvanya'da *P. syringae*'nin farklı izolatlarının ve enfeksiyonlarının kışlık buğday verimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla çalışmada, beş farklı kışlık buğday çeşidinin (Dagmar, Janne, Edvins, Skagen ve Artist) in vitro koşullarda, sekiz farklı *P. syringae* izolatlarının hücre süspansiyonları (1.0×10^6 KSVml⁻¹) ile farklı büyüme evrelerinde enfekte edilmiştir. Buğday tam olgunluğa ulaştığında tane ağırlığı farklılıkları değerlendirilmiştir. *P. syringae* enfeksiyon zamanının tane ağırlığı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı, ancak çeşitlerin ve *P. syringae* izolatlarının etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Enfeksiyon zamanı ve çeşitler, enfeksiyon zamanı ve *P. syringae* pv. *syringae* izolatları ile *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının birbirleriyle etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Referans bakteriler *P. syringae* pv. *syringae* (izolat No. CFBP 4108 Van Hall 1902) ve *P. syringae* pv. *atrofaciens* (izolat No. CFBP 3587 Mac Culloch 1920) tane ağırlığında sırasıyla %10,2 ve %9,1 oranında düşüşe neden olarak en fazla etkiyi göstermiştir.

Butsenko vd. (2020) belirtmiştir ki, *P. syringae* pv. *syringae* Van Hall tarafından neden olunan bakteriyel yaprak yanıklığı, 1970'lerin başında buğdayda önemli bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Bu bakteri toprakta geniş ölçüde yaygındır ve buğday yapraklarının doğal bakteri popülasyonunun bir parçası olarak yaşamaktadır. Yaprak yanıklığı, belirli çevresel koşullarda ortaya çıkmaktadır. Bakteriyel hastalıklar, mantar kaynaklı hastalıklara kıyasla buğdayda nispeten daha az kayba neden olmaktadır. Ancak bu hastalıklar mantar kaynaklı olanlar kadar detaylı incelenmemiştir ve bildirilenden daha büyük kayıplara neden olabilir. Bakteriyel yaprak çizgisi, *X. campestris*'in iki patovarı tarafından oluşturulmaktadır ve son yıllarda ABD'nin batısındaki bazı bölgelerde daha önemli hale gelmiştir. Tabanda kılçık çürüklüğüne ise *P. syringae* pv. *atrofaciens* Young, Dye ve Wilkie neden olmaktadır ve genellikle buğday yetiştirilen çoğu bölgede önemsiz bir hastalık olarak görülmektedir. Sarı leke hastalığı ise *L. nodorum* veya *L. avenaria* f. sp. *Triticea* ile birlikte karma olarak sıkça ortaya çıkmaktadır.

Slovareva (2020) buğdayın kavuz dibi çürüklüğüne *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in neden olduğunu belirlemiştir. Hastalık etmeninin buğdayın yanı sıra çavdar, arpa ve yulaf bitkilerini de etkilediği, Rusya Federasyonu'nda yayılımına dair veri bulunmadığı

bildirilmiştir. Bu etmenin ayrıca Meksika ve Mısır'da karantina türleri arasında yer aldığı belirtilmiştir.

Slovareva (2020) tarafından Rusya'da yapılan çalışmada, buğday ve arpa örnekleri 2019 yılı Mayıs ayında hastalık belirtisi gösteren (leke, çizgi ve şeritler) bitkiler toplanmıştır. Bakteriyel izolatları incelemiştir PCR testleri ve tanımlama çalışmaları için 116 koloni seçilmiş incelenen buğday ve arpa örneklerde belirlenen tek fitopatojenik bakterilerin, tahıl ithalatı yapan ülkelerin karantina zararlıları listesine dahil olan *P. syringae* pv. *atrofaciens* ve *P. syringae* pv. *syringae* olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada kullanılan tanımlama yöntemleri, *P. cichorii* ve *P. fuscovaginae* gibi bazı pseudomonas türlerinin belirlenmesi için yetersiz olabilir, çünkü elde edilen nükleotid dizileri GenBank'taki dizilerle karşılaştırıldığında, bazı *Pseudomonas* türlerinin tanımlanamadığı görülmüştür. Yine de bu çalışma, *Pectobacterium rhapontici*, *R. tritici*, *R. rathayi*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* ve *X. translucens* gibi bakterilerin seçilen örneklerde bulunmadığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada elde edilen buğday ve arpa mikrobiyota bileşimi verileri, Rusya'dan tahıl ithal eden ülkelerin fitosaniter gerekliliklerine uygunluğun belirlenmesinde kullanılabilir.

2.2. Türkiye'de Buğday Bakteriyel Hastalıkları Üzerine Yapılan Çalışmalar

Postnikova vd. (2009), 2003 yılında, Türkiye'nin İç Anadolu Bölgesi'ndeki altı ilde 799 çiftçiden alınan buğday tohumlarında *Rathayibacter* spp. için bir tarama yapılmıştır. Konya'dan TRS2, Hisarkikaya'dan TRS10 ve Ankara'dan TRS25 izolatları ileri tanımlama çalışmaları için kullanılmıştır. Üç izolat, D-mannoz, inülin, galaktoz ve mannitolden asit üretirken *R. iranicus*'e özgü özellik olarak asetat kullanımı, kazein hidrolizi ve %1'den fazla NaCl içeren ortamlarda büyüme yeteneği göstermemiştir. Yeni izolatlar, *R. iranicus* için tipik yağ asitleri olan iso-14:0, anteiso-15:0, 15:1 ve 17:0 ile 16:0 içermiştir. 16S rDNA dizilim analizi, *R. iranicus* ve *R. tritici* ile %100 ve %99.3 oranında benzerlik göstermiş, AFLP analizde izolatlar, *R. iranicus* 'ye %90, *R. tritici*'ye ise %46 benzerlik göstermiştir. Bu çalışma, *R. iranicus*'n İran dışında tespit edildiği ilk vakayı bildirmektedir.

Baştaş vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, *X. translucens*'in neden olduğu bakteriyel yaprak çizgi hastalığının buğdayda uygun koşullar altında önemli verim kayıplarına yol açabildiği belirtilmiştir. Bu patojenin varlığını belirlemek amacıyla Konya'da yaygın olarak ekilen 36 farklı buğday çeşidi incelenmiştir. Patojenin izolasyonu ve teşhisinde NA

besiyerlerinde gelişim, 35 °C'de büyüme, esculin hidrolizi, sisteinden hidrojen sülfür üretimi, litmus süt testi, üreaz aktivitesi, arginin dihidrolaz, oksidaz ve arabinozdan asit oluşumu testleri kullanılmıştır. Patojenisite testlerinde hassas çeşit olarak Gerek 79 tercih edilmiş ve tipik yaprak belirtileri elde edilmiştir. PCR yöntemi ile tanı için, spesifik 139 bp'lik bir fragmentin amplifikasyonunda T1 ve T2 primerleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, 265 buğday tohumu örneğinin 72'sinin *X. translucens* ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Buğday çeşitleri arasında *X. translucens* en fazla Gerek 79 (%63.63) ve en az Yıldız 98 (%6,25) çeşitlerinde izole edilmiş olup, genel bulaşıklık oranı %27.16 olarak saptanmıştır.

Öz (2014)'e göre, Samsun ilinde buğday yetiştirilen alanlardan yaprak örnekleri toplanmış ve bu örneklerden bakteriyel izolatlar izole edilmiştir. İzolatlar, morfolojik özellikleri ile biyokimyasal ve moleküler testler kullanılarak tanımlanmıştır. Hastalıklı yapraklardan toplamda 36 bakteriyel izolat elde edilmiş olup, bunların %42'si (15 izolat) *R. tritici*, %33'ü (12 izolat) *R. iranicus* ve %25'i (9 izolat) *X. translucens* pv. *undulosa* olarak belirlenmiştir.

Büyükdeveci (2016) tarafından yapılan çalışmada, buğday hastalıkları arasında önemli bir yere sahip olan ve tohum yoluyla taşınarak tohum kalitesi ve verimde ciddi kayıplara yol açan *X. translucens* isimli bakteriyel patojenin, moleküler yöntemlerle karakterize edilmesi ve bölge için öneminin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bölgedeki geleneksel tanı yöntemlerinin, bu patojenin patovaryelerini ayırt etmede yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Etkili mücadele stratejilerinin geliştirilebilmesi için, patojenin doğru bir şekilde tanımlanmasının gerekli olduğu vurgulanmıştır. Bu doğrultuda yürütülen çalışmada, *X. translucens*'in patovaryeleri, buğday, arpa, yulaf, çavdar, tritikale ve brom bitkilerinde yapılan patojenisite testleri ile klasik PCR, REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR ve IS-PCR yöntemleri kullanılarak moleküler düzeyde karakterize edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, 70 *X. translucens* izolatından 68'inin *X. translucens* pv. *translucens* ve 2'sinin *X. translucens* pv. *undulosa* olduğu saptanmıştır. *X. translucens*'in neden olduğu bakteriyel çizgi yanıklığı hastalığının hızlı ve doğru tanısı sayesinde, tahıllarda mücadele yöntemlerinin ve ıslah programlarının geliştirilmesi kolaylaşacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Tohum Örneklerinin Toplanması

İzolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere 2022 yılında 100 lot, 2023 yılında 100 lot olmak üzere toplam 200 lot (her biri en az 2 kg) buğday tohum örnekleri hasat sonrasında üreticilerden toplanmıştır. Toplam 200 adet tohum örneğinin; 25 adet Boğazlıyan, 20 adet Çekerek, 25 adet Merkez, 35 adet Sarıkaya, 35 adet Sorgun, 30 adet Şefaatli ve 30 adet Yerköy ilçelerinden toplanan tohum örnekleri polietilen torbalarda etiketlenerek Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Laboratuvarına getirilmiştir.

3.2. Bakteriyel İzolasyon

Tohum örnekleri hastalık belirtilerine göre incelenmiştir. Siyah, buruşuk ve cılız tanelerin bulunduğu örneklerden 10 gr tohum örneği olacak şekilde seçildikten sonra tohumlar yıkanarak ve %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Dezenfekte edilen tohum örnekleri steril saf sudan geçirildikten sonra 100 ml fizyolojik serum (%0.85 NaCl) bulunduran erlenmeyer içerisinde 4 saat oda sıcaklığında 140 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde bekletilmiştir. Elde edilen süspansiyonlardan seri dilüsyonlar hazırlanarak (10^{-2} - 10^{-6}) 100 µl alınarak King's medium (KB) besi yerine steril cam baget yardımıyla yayma şeklinde ekimleri yapılmıştır (López vd., 2018). Petriler, 26°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ultraviyole ışık altında mavi-yeşil floresan pigment üreten koloniler KB besi yerine saflaştırılarak %20 gliserol içerisinde stoklanmış ve -20 °C'de stoklanmıştır (Kelpšienė vd., 2021).



Şekil 3.1 Yozgat ilçelerinden toplanan buğday tohum örnekleri

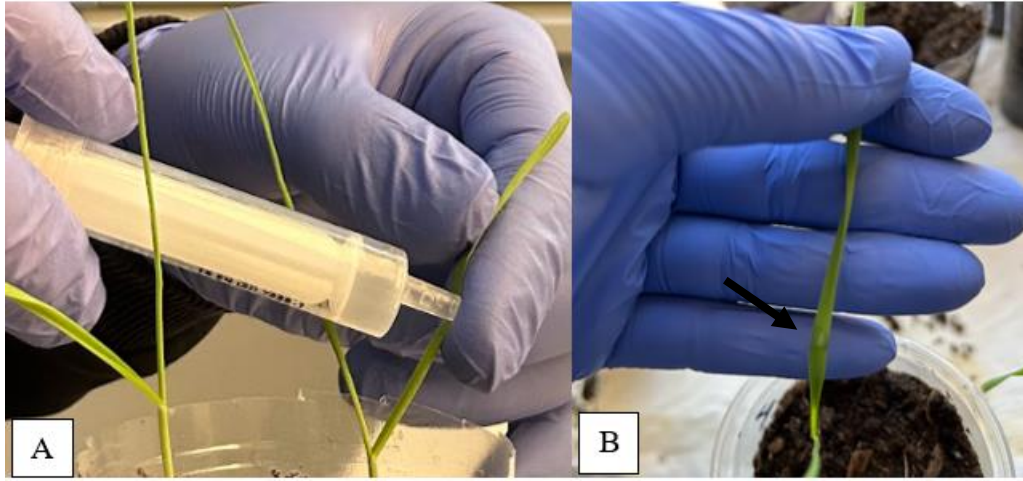
3.3. Koloni Gelişiminin İncelenmesi

Buğday tohumlarından elde edilen bakteriyel izolatların koloni morfolojisi KB besi yeri kullanılarak incelenmiştir (Lelliot & Stead, 1987). UV transliminatörde yeşil-mavi renk floresan parlama gösteren 17 izolatlar tanı çalışmaları için seçilmiştir.

3.4. Patojen İzolatların Seçimi

Bezostaja çeşidine ait buğday tohumları plastik bardaklara ekilerek gelişen bitkiler 26°C, 14 saat doğal ışık altında iklim odasında yetiştirilmiştir. İzolatların KB besi yerinde 24-48 saatlik kültürlerinden, 1×10^8 CFU/ml konsantrasyonun da bakteri süspansiyonları hazırlanmış ve buğday yapraklarına enjektör yardımıyla inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2) (Kelpšienė vd., 2021).

İnokule edilen bitkiler, stomadan bakteri girişini kolaylaştırmak için 24 saat boyunca şeffaf naylon torbalarla kapatılmış ve %90 ila %95 bağıl nem sağlanan bir iklim odasında tutulmuştur. Daha sonra, yukarıda açıklanan ortam koşullarına aktarılmıştır. Bitkiler, 1-7 gün boyunca simptom gelişimi açısından periyodik olarak izlenmiştir. Re-izolasyonlar yapılarak KB besi yerinde gelişen koloniler ile orijinal kültürler karşılaştırılmış ve tanı çalışmaları yapılmıştır (Kelpšienė vd., 2021).



Şekil 3.2 A) Bakteriyel süspansiyonların enjektör yardımıyla buğday yapraklarına inokülasyonu B) İnokülasyon yapılmış buğday yaprağı

3.5. Patojen Bakteri İzolatlarının Tanılanması

3.5.1 Biyokimyasal Tanılama

Hastalıklı bitki dokularından elde edilen izolatlarının klasik olarak tanılama çalışmaları kapsamında, %3'lük Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram reaksiyonu, Katalaz, Oksidatif-fermantatif, Levan, Oksidaz, Pektolitik aktivite testi, Arginin dehidrolaz aktivitesi ve

Tütünde aşırı duyarlılık oluşumu (HR) testleri yapılmıştır (Lelliot & Stead, 1987; Schaad vd., 2001).

3.5.1.1. KOH Testi

Taze hazırlanan % 3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra bakteriyel izolatların 24-48 saatlik kültüründen özeyle alınarak solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşmaması ile sonuç gram pozitif olarak kabul edilmiştir (Schaad vd., 2001).

3.5.1.2 Katalaz Testi

İzolatların katalaz aktivitesini belirlemek için, bir öze kullanılarak King B besi yerinde 24-48 saat boyunca büyütülen taze bir bakteri kültürü alınmıştır, bir lam üzerine yayılarak bir damla %3 hidrojen peroksit eklendikten sonra kabarcıklar üreten izolatlar katalaz pozitif kabul edilmiştir (Lelliot & Stead, 1987).

3.5.1.3. Oksidatif-Fermantatif Testi

Bu testte Ayers vd. (1919)'ın ortamı kullanılmıştır. Ortam içeriği:

- **I. Grup için (g/l):** $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1, KCl 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, Bromthymolblue 0.08 g, Saf su 900 ml, Agar 3 g, pH: 7.0 - 7.1.
- **II. Grup için:** Glucose 10 g, Saf su 100 ml, pH: 7.0 - 7.1.

I. Grup maddeler, agar dışında tartılmış, erlenmayer içerisinde çözelti haline getirilmiş ve çözeltinin pH'sı % 40'lık NaOH ile pH 7.0 - 7.1'e ayarlanmıştır. Bu durumda ortamın rengi zeytin yeşili olmuştur. Daha sonra ortama agar ilave edilmiş, 121 °C'de maddelerin homojenizasyonu sağlanmış ve 4.5 ml'lik miktarlarda deney tüplerine paylaştırılmıştır. Bu tüpler, 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

II. Grupta bulunan glukoz, saf suda eritilmiş ve tındalizasyon işlemi ile sterilize edilmiştir. Bu ortam, 0.5 ml'lik miktarlarda; daha önce hazırlanan 4.5 ml'lik I. Grup ortamının bulunduğu tüplere 45 - 50 °C'lik sıcaklıkta aseptik koşullarda paylaştırılmıştır.

Her bakteriyel izolat için iki tüp kullanılmıştır. Her iki tüpe bir öze dolusu aynı bakteriyel izolatın batırılmış, daha sonra bu tüplerden bir tanesinin üzeri % 3'lük agar ile örtülerek hava ile teması kesilmiştir. İzolatlar 24 - 26 °C'de inkübe edilmiştir.

Bakterilerin oksijenli veya oksijensiz koşullarda gelişme gösterdikleri tüplerde, glukozdan asit üretimi sonucunda ortamın rengi zeytin yeşilinden portakal sarısı rengine dönüşmüştür.

Deneme sonuçları 7-14 gün içerisinde kontrol edilmiş: aynı tipte izolat aşılannmış tüplerden, hava ile teması kesilmeyen tüpte renk değışikliğinin meydana geldiğı, buna karşın hava ile teması kesilen tüpte renk değışikliğinin görölmediğı izolatların oksidatif hava ile teması kesilmiş ve kesilmemiş olan her iki tüpte renk değışikliğinin görölldüğü izolatların ise fermentatif olduğı gözlemlenmiştir.

3.5.1.4. Levan Oluşumu Testi

%5 sakkaroz ilavesiyle hazırlanan Nutrient Agar, Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) olarak adlandırılmış ve besi yerine izolatlar çizilmiştir. Ardından, petriler 25°C’de 3-4 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, kalın, beyaz, konveks ve mukoid koloniler pozitif sonuç olarak değerdendirilmiştir (Lelliot & Stead, 1987; Schaad vd., 2001).

3.5.1.5. Oksidaz Testi

Taze hazırlanmış %1’lik N;N;N;N’-Tetramethyl-1.4 phenylene diammonium diçlorid eriğı, steril filtre kağıdına damlatılmıştır. Buğday izolatlarının 48 saatlik kültürü, platin öze ile ıslak kurutma kağıdına çizildiğinde, 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif olarak değerdendirilmiştir (Lelliott & Stead, 1987).

3.5.1.6. Pektolitik Aktivite Testi

Patates yumruları yüzeysel sterilizasyon için önce deterjanlı suda fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra %1’lik NaOCl’da 3 dakika bekletilmiştir. NaOCl’yi uzaklaştırmak için yumrular 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemden sonra, steril bir bisturi ile kabukları soyulmuştur. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petri içerisine kabuğı soyulmuş bir cm kalınlığındaki patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu lahana izolatlarının kültüründen alınarak patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25°C’de iki günlük inkübasyondan sonra değerdendirme yapılmış, inoküle edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliott & Stead, 1987). Pozitif kültür olarak *Pectobacterium betavascularum* P12 izolatı kullanılmıştır (Öztürk vd., 2019).

3.5.1.7. Arginin Dehidrolaz Aktivitesi

Thorney 2A (1 litre distile su, 1 g peptone, 5 g NaCl, 0.3 g K₂HPO₄, 3 g Agar, 0.01 g Phenol red, 10 g/l L-arginine) besi yerinde tüplere 3’er ml konulmuş ve otoklavda

121°C’de 15 dakika bekletilerek steril edilmiştir. Daha sonra tüplere King B besi yerinde 24 - 26 °C’de 24 - 48 saat süreyle geliştirilen izolat kültürleri inoküle edilmiştir ve üzerleri 2 ml sıvı parafinle kapatılmıştır. 7-10 gün 26°C’de inkübasyondan sonra, ortamın pembe-kırmızıya dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.5.1.8. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)

King B besi yerinde 26°C’de geliştirilmiş bakteriyel izolatlar, steril deiyonize su ile yıkanmış spektrofotometrede 1×10^8 hücre/ml konsantrasyonuna ayarlandıktan sonra tütün yapraklarına enjektör yardımıyla inoküle edilmiştir. Tütünler oda sıcaklığında bekletilmiş ve negatif kontrol için steril deiyonize su inokulasyonu yapılmıştır. İnokulasyondan 36 saat sonra inokulasyon bölgelerinde doku çökmelerinin ve nekrozlarının oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir (Klement vd., 1964).

3.5.2. Bakteri İzolatlarının Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) Yöntemiyle Tanısı

MALDI-TOF, 1980’lerin sonlarında Alman ve Japon bilim insanları tarafından ortaklaşa geliştirilen, proteinlerin peptit kütle parmak izi analizine dayanan bir tekniktir. Bakteri kolonileri saf halde elde edildikten sonra, bu örnekler özel matris solüsyonları eklenmiş metal veya plastikten yapılmış tek kullanımlık bir hedef plakaya yerleştirilmiştir. Cihaz çalıştırıldığında, protein moleküllerini iyonize etmek (etkinleştirmek) için lazer ışınları hedef plakaya ateşlenmiştir. Kütle-yük oranlarına göre hareket eden iyonların uçuş süreleri, TOF tüpü içindeki kinetik enerjilerine göre hesaplanmıştır. Düşük kütleli iyonlar önce dedektöre çarpar ve sinyal kaydedilir. Elde edilen veriler daha sonra tür tanımlamak için bilgisayarda depolanan kütüphane verileriyle karşılaştırılmıştır (Ahmad vd., 2012; Wang vd., 2012). Bu yöntemde, Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde 24-48 saat büyütülen saf bir bakteri kolonisinden bir örnek alınır ve bakteri kütlelerinin küçük bir miktarı bir çubuk kullanılarak toplanır ve metal bir plakanın kuyularına uygulanmıştır. Plaka, oda sıcaklığında 1-2 dakika kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra, örneklere 1 µl formik asit (%70) eklenir ve tekrar kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, her bir örneğe 1 µl HCCA Matrix (α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit) çözeltisi eklenir ve örnekler kurumaya bırakılır. Matris çözeltisi, %0,025 (h/h) trifloroasetik asit ve %50 (h/h) asetonitril içindeki doymuş bir α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (Bruker Daltonics) çözeltisinden oluşmuştur. Kullanılan kütle kalibrasyon standardı Bruker Bakteriyel Test Standardı’dır (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya). Numuneler daha sonra Flex Kontrol Yazılımı

(Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya) kullanılarak MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya) cihazına yüklenmiştir. Her spektrum, numunelerin iyonizasyonu için gereken minimum lazer gücü olan 500 lazer atışı ile otomatik modda elde edilir. Spektrum, 2-20 kDa m/z (kütle-yük) aralığında analiz edilir. Kullanılan mikroorganizma kütüphanesi BIOTYPER™ 1.1 yazılımıdır (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya) (Doksöz & Bozkurt, 2020). Çalışmanın bu kısmı Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Araştırma ve Uygulama Merkezinde Prof. Dr. Soner Soylu tarafınca yapılmıştır.

MALDI-TOF cihazı tarafından belirlenen teşhisler, üretici tarafından önerilen değerlere göre değerlendirilmiştir. Teşhisten elde edilen puan değerleri aşağıdaki şekilde yorumlanmıştır: 2.30 ile 3.0 arasındaki bir puan, tür düzeyinde çok güvenilir bir tanımlamayı gösterir. 2.00 ile 2.29 arasındaki puan cins düzeyinde güvenilir tanımlamayı, tür düzeyinde ise yüksek güvenilirliği gösterir; 1.70 ile 1.99 arasındaki puan cins düzeyinde güvenilir tanımlamayı, tür düzeyinde ise olası tanımlamayı gösterir; 1.7'nin altındaki puanlar güvenilir olmayan tanımlar olarak değerlendirilir (Öztürk, 2023).

3.5.3. Total Genomik DNA İzolasyonu ve PCR Amplifikasyonu

KB sıvı besiy ortamında 24-48 saatlik süreyle geliştirilmiş bakteriyel kolonilerden genomik DNA izolasyonu, Sambrook ve Russel (2001)'in standart DNA ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Tek koloniler, 200 µl nuclelease-free su içinde süspansiyon edilmiş ve 100 °C'de 10 dakika kaynatılmıştır. Örnekler, 1400 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiş, süspansiyonlar pelet haline getirilmiş ve DNA içeren süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Ekstrakte edilen genomik DNA'nın varlığı, %1'lik agaroz jelde 1 kb hyperladder (Bioline) referans markör kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra, DNA'nın saflığı ve miktarı nanodrop fotometri ile 260/280 nm'de ölçülmüş ve PCR için 10 ng/µl olacak şekilde hazırlanarak genomik DNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

BLASTN ve filogenetik analizlerde kullanılmak üzere *rpoD* geni (RNA polimerazın sigma alt birimi) amplifikasyonunda Tablo 3.1'de belirtilen primer çiftleri (Parkinson vd., 2011) kullanılmıştır.

Tablo 3.1. PCR amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri

Hedef gen	Primer adı	Sekans dizisi
<i>rpoD</i>	PsrpD-FNP1	5'-TGAAGGCGARATCGAAATCGCCAA-3'
	Psrp-Dnprpcr1	5'-YGCMGWCAGCTTYTGCTGGCA-3'

Her bir PCR amplifikasyonunda, bireysel primer çifti ile şüpheli koloni steril bir pipet ucu ile alınmış ve doğrudan, 50 µl nihai hacimde hazırlanmış olan PCR reaksiyon tüpüne yerleştirilmiştir. Tüp içeriği; 25 µl 2× master mix (MyTaq Mix, Bioline, İngiltere), 2 µl ileri primer, 2 µl ters primer, 2 µl DMSO ve 19 µl steril sudan oluşmaktadır. Amplifikasyonlar bir termal döngü cihazı (Bio-Rad, T100) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve dokunma-aşamalı (touchdown) PCR koşulları şu şekilde ayarlanmıştır: 95°C'de 4 dakika, ardından 10 döngü boyunca 94°C'de 30 saniye, 62-53°C arasında (her döngüde 1°C azalarak) 30 saniye, 72°C'de 1 dakika ve 72°C'de 5 dakika, ayrıca sabit 53°C'de 24 döngü aynı parametrelerle uygulanmıştır (Aksoy vd., 2017).

PCR ürünleri, 1× TAE tamponunda %1.5 agaroz jel üzerinde ayrılmış, etidyum bromür ile boyanmış ve UV transilluminatör kullanılarak görselleştirilmiştir. PCR ürünlerinin boyutlarının tahmini için DNA moleküler ağırlık belirteci (Hyperladder, 1 kb, Bioline, İngiltere) kullanılmıştır. PCR ürünlerinin sekans analizleri özel bir firmaya hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.5.4. BLASTN ve Filogenetik Analizler

rpoD genine ait konsensus dizileri, Chromas Pro (versiyon 1.7.6) kullanılarak oluşturulmuştur. Nükleotid dizileri, NCBI GenBank'ta BLASTN analizi için aranmıştır. *rpoD* genine ait diziler, NCBI GenBank'tan elde edilen farklı *P. syringae* patovarlarına ait referans dizilerle ClustalW yöntemi kullanılarak MEGA 6 programında çoklu hizalamaya tabi tutulmuştur (Tamura vd., 2013). Evrimsel mesafeler, Jukes ve Cantor modeli kullanılarak hesaplanmıştır (Jukes & Cantor, 1969).

3.6. rep-PCR Genomik Parmak İzi Analizleri

İzolatların saflaştırılmış DNA'ları, BOX PCR için kullanılmıştır. Her bir izolatın BOX ve PCR işlemi için 25 µl hacimde PCR karışımı hazırlanmıştır. BOX PCR primerleri Tablo 3.2'de verilmiştir. PCR karışımı ; 10.9 µl su, 2.5 µl 10x NH4 Buffer, 3.5 µl 25 mM MgCl₂,

2.5 µl dNTP, 0.1 µl Primer A, 0.1 µl Primer B, 0.4 µl Taq DNA Polimeraz (1 ünite) ve izolatlara ait 5 µl DNA ile son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR amplifikasyonu, Versalovic vd. (1991)'e göre gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, %1'lik TAE tamponunda %1'lik agaroz jel üzerinde 50 V'da 4 saat boyunca koşturulmuş ve jel görüntüleme cihazında oluşan ürünler analiz edilmiştir. PCR ürün boyutları, 1 kb hyperladder Bioline referans markör kullanılarak belirlenmiştir. Band profillerinden elde edilen parmak izleri görsel olarak incelenmiştir. Referans kültür olarak, Bakteriyojji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan *P. Poae* W21.4, *P. marginalis* W25.9 ve *P. syringae* pv. *syringae* Pss1 izolatları (Öztürk & Soylu, 2022), *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının bant profillerinin daha iyi karşılaştırılması amacıyla çalışmaya eklenmiştir.

Tablo 3. 2. Genomik parmak izi çıkartılmasında kullanılan primer dizisi

Primer adı	Nükleotid dizisi
BOX	5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G 3'

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Üreticilerden tohum örnekleri toplanırken üreticilerin tohumluk buğdaylarının toplanması hedeflenerek çalışmada kullanılan örneklerin tohumluk olarak üretici tarafından kullanılıp kullanılmayacağı sorularak çalışmada tohumluk özelliği bulunan materyaller toplanmıştır. Üreticilerin tohumları kademelerine göre tohumluk olarak bir sonraki üretim yılı için kullandıkları görüşüne varılmıştır.

Çalışmanın materyalini oluşturan 200 adet buğday tohum örnekleri 2022-2023 yıllarında Yozgat ilçelerinde bulunan buğday üreticilerinden hasat sonrasında toplanmıştır. Çalışma materyalini oluşturan tohum örnekleri hastalık belirtisi gösteren tane varlığı açısından laboratuvarında incelenmiştir. Tohum örneklerinde patojenin izolasyonu amacıyla ilk olarak kahverengi-siyah renkli nekrozları bulunduranlar ile birlikte buruşuk ve cılız görümlü taneler yönünden incelenmiştir (Wilkie, 1973). 200 tohum örneği arasından 125 adet tohum örneği ile izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Alexandrova vd. (1995), etmenin Avrupa ülkelerinden Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Almanya, İtalya ve Romanya'da yaygın olduğunu bildirmiştir. Enfekteli tohumların epidemiyolojik rolünün oldukça fazla olduğunu etmenin yaşayışı, kısa ve uzun mesafelere taşınmasında önemli rolünün bulunduğunu bildirmiştir. İspanya ve Polonya'da sporadik hastalık çıkışlarının Batı Avrupa ülkelerine potansiyel risk olduğunu önemini vurgulamıştır. 60 yıl kadar öncesinde İtalya'dan Amerika Birleşik Devletlerine gönderilen tohumlardan kaynaklı enfeksiyonların rapor edildiğini ve son 4-5 yılda patojen kaynaklı attackların İtalya'da sıklaştığı bildirmiştir. Hastalık belirtisi gösteren ticari tohumluk alanlarından elde edilen tohum örneklerinde etmenin izolasyonunu başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir. Patojenik izolatların tohumlardan izolasyonunun yetiştirme mevsiminde ortaya çıkan hastalıklarla ilişkilendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır.

P. syringae pv. *atrofaciens* etmeni tohumla taşınan bir hastalık etmenidir. Hastalıklı bitkilerin kavuzlarında koyu kahverengiden siyaha değişen belirtiler ortaya çıkmaktadır. Buğday tohumlarında canlılığını sürdürebildiğini ve bir sonraki üretim dönemine aktarılabilirdiğini farklı araştırmacılar bildirmiştir (Toben vd., 1991). Aynı şekilde Kelpšienė vd. (2021) tohumdan izolasyonlarda koyu kahverengi tohum örneklerinde patojenin varlığına yönelik izolasyon çalışmaları yapmışlardır.



Şekil 4.1 Tohum örneklerinde hastalık belirtisi gösteren şüpheli buğday taneleri

4.1. Bakteri İzolasyonu

Deveiller vd. (1997)'de belirtildiği üzere dip ucundaki hastalıklı koyu kahverengi lekelere sahip olan tohumların hastalık etmenin önemli rezervuarını oluştururlar. Şüpheli 125 tohum örneğinden KB besi yerinde gerçekleştirilen izolasyonlar neticesinde 37 tohum örneğinden Duveiller vd. (1997)'de belirtildiği üzere yeşil-mavi tip floresan parlama özelliğinde koloni gelişimi gözlemlenmiştir. *P. syringae* pv. *atrofaciens* tahıllar arasında en fazla buğdayda izole edilmiştir. Kelpšienė vd. (2021)' a göre yapraklarda bakteriyel yanıklık belirtilerinin ve tanelerin dip ucundaki koyu kahverengi lezyonların, tritikale ve arpaya kıyasla buğdayda yaklaşık 10 kat daha fazla tespit edildiğini göstermiştir.

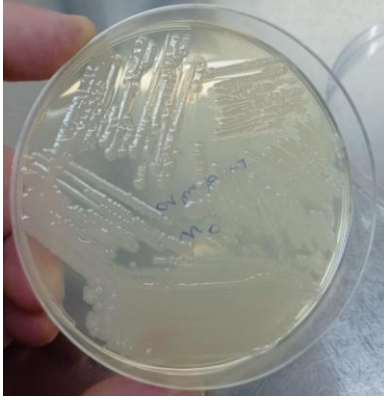
İzolasyonlar sonucu 5 tanesi Sorgun, 5 tanesi Sarıkaya, 3 tanesi Merkez, 2 tanesi Boğazlıyan, 1 tanesi Yerköy ve 1 tanesi Çekerek ilçelerinden toplam örneklerden izole edilen toplam 17 tutarlı izolat ile tanı testleri yapılmıştır.

4.2. İzolatların Buğday Bitkilerinde Patojenisitesi

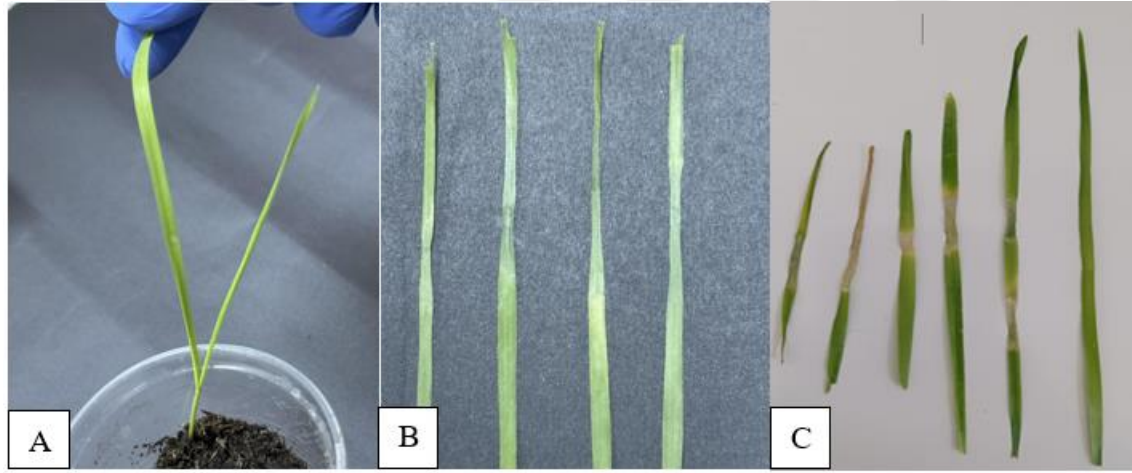
İzole edilen 55 adet *Pseudomonas* spp. izolatlarının patojen olup olmadıklarının anlaşılması için hazırlanan süspansiyonlar buğday yapraklarına inoküle edilmiştir. Yapılan birçok çalışmada patojenik izolatların seçiminde farklı yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca, *P. syringae* pv. *atrofaciens* ve *P. syringae* pv. *syringae* ayırımında Toben vd. (1989) biyoassay yöntemi geliştirmiştir. Söz konusu deneyde, petri içerisinde 4-5 günlük buğday fideleri geliştirilmiş ve bisturi yardımıyla inoküle edilecek bakteri izolatları yapraklara yara açılarak uygulanmıştır. 2-3 gün sonra patojenik izolatların kahverengi-siyah lekeler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu yöntem yine Matveeva vd. (2003) tarafından *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının patojensitesinde kullanılmıştır ve inokülasyon bölgesinde kahverengi-siyah lezyonlar oluşturduğunu bildirmiştir. Kelpšienė vd. (2021) 3 farklı inokülasyon yöntemini *P. syringae* pv. *atrofaciens* ve *P. syringae* pv. *syringae* ayırımında sprey metodu, yaprak enjeksiyonu metodu ve koparılmış yaprak metodu şeklinde uygulamıştır. İzolatların hastalık belirtilerinin yaprak enjeksiyonu metodunda daha şiddetli ortaya çıktığını yaprakların 2-4 gün sonra incelendiğinde klorotik alanla çevrili nekrotik lezyonlara neden olan izolatlar konukçu bitki için patojen olarak kabul edilmiştir. Yaprak enjeksiyon metodunda *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in inokülasyon noktalarının etrafında *P. syringae* pv. *atrofaciens* için tipik olan koyu kenarlara neden olabildiğini göstermiştir (Toben vd., 1989). Küçük koyu yeşil ile kahverengi, suyla ıslanmış düzensiz lezyonlar oluşturduğunu, 5 mm'ye kadar uzayan lezyonlar, doku sonunda kurduğunda sarı ve daha sonra kahverengi olduğunu bildirmiştir. Ancak Kelpšienė vd. (2021) iki patojenin ayırımında mevcut inokülasyon yöntemleri ve hastalık belirtilerinin çok uygun olmadığını ve moleküler araçlarla ayırımının daha güvenilir olacağını bildirmiştir.

Matveeva vd. (2008) tarafından belirtildiği üzere, *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının seçimi için en iyi yöntem, KB agarda floresans kolonilere dayalı ön tanımlama sonrası, her izolatın patojenisitesinin, buğday bitkisine inokülasyon yapılarak test edilmesidir. Kelpšienė vd. (2021) yaprak enjeksiyon metodu tarafımızca modifiye edilerek yaklaşık 5-7 günlük fidelerin yapraklarına enjektör yardımıyla izolatların bakteriyel süspansiyonları inoküle edilmiştir. 36-48 saat aralığında inoküle edilen bölgelerde 17 izolatın yapraklarda hastalık belirtisi gösterdiği gözlemlenmiştir. Hastalıklı kısımlardan re-izolasyon yapılmış ve izole edilen kolonilerin orjinal kültürlerle aynı koloni morfolojisine sahip olduğu belirlenmiştir. KB besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda, 1-2.5 mm çapında,

beyazımsı krem renkte, yarı saydam, hafif dalgalı kenarlara sahip yuvarlak koloniler oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 KB besi yerinde 5 günlük *P. syringae* pv. *atrofaciens* WBM 50.7 izolatı



Şekil 4.3 A) İnoküle edilmiş kontrol (su) B) Buğday bitkisinde 36-48 saat içerisinde, yaprak ayasın da incelme ve kıvrılma C) Buğday bitkisinde 48-72 saat sonra sarı klorotik alanların oluşması ve 72-96 saat içerisinde kuruma meydana gelmesi

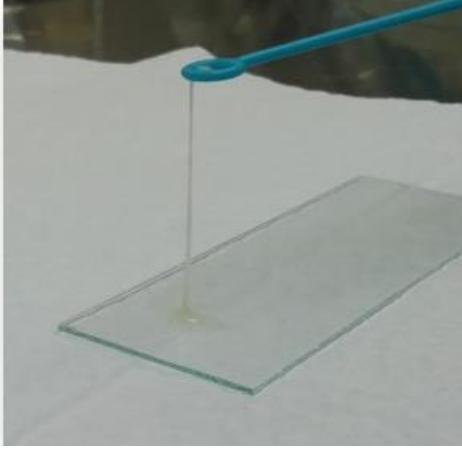
P. syringae pv. *atrofaciens* bulaşıklılığı tespit edilen örneklerin; 5'i Sorgun, 5'i Sarıkaya, 3'ü Merkez, 2'si Boğazlıyan, 1'i Yerköy ve 1'i Çekerek ilçelerinden alınan örneklerden saptanmıştır.

4.3. Patojen Bakterilerin Tanısı

4.3.1. Patojen Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Tanısı

4.3.1.1. KOH Testi

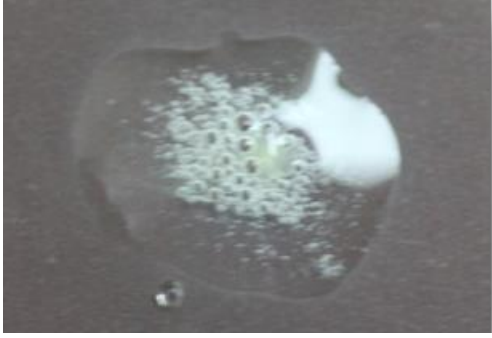
İzolatların kolonileri öze yardımıyla alınarak çözeltide dairesel hareketlerle karıştırılmış ve öze yukarı doğru kaldırıldığında ipliksi bir uzama olduğu tespit edilmiştir. Tüm izolatlarda bu uzamanın gözlenmesi, izolatların Gram (-) olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 KOH testinde *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarında ipliksi uzama görülmesi

4.3.1.2. Katalaz Testi

İzolatların kolonileri lam üzerinde bulunan % 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisine batırılması sonucunda hava kabarcıklarının çıkması, izolatın katalaz pozitif reaksiyon verdiğini göstermiştir. Tüm izolatlar pozitif reaksiyon göstermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Katalaz testi sonucunda pozitif olan izolatların kabarcık oluşumu

4.3.1.3. Oksidatif-Fermantatif Testi

Oksijenli ve oksijensiz ortamların sadece hava ile teması kesilmeyen oksijenli tüplere aşılanan izolatlar, 24-26°C'de bir haftalık inkübasyon sonucunda glukozdan asit üretimiyle zeytin yeşili renkten portakal-sarı renge dönüşüm göstermiştir. Bu sonuçlar, tüm izolatların aerobik solunum gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Oksidatif-fermantatif testinde aerobik gelişme

4.3.1.4. Levan Oluşumu Testi

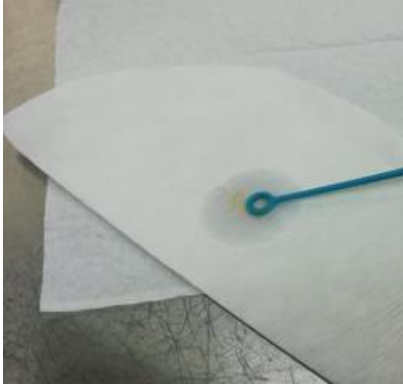
Levan testinde, SNA besiyeri ekimi yapılan izolatların 25°C'de 3-4 günlük inkübasyondan sonra beyaz, konveks, mukoid koloniler üreterek pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Levan testinde koloni gelişimi

4.3.1.5. Oksidaz Testi

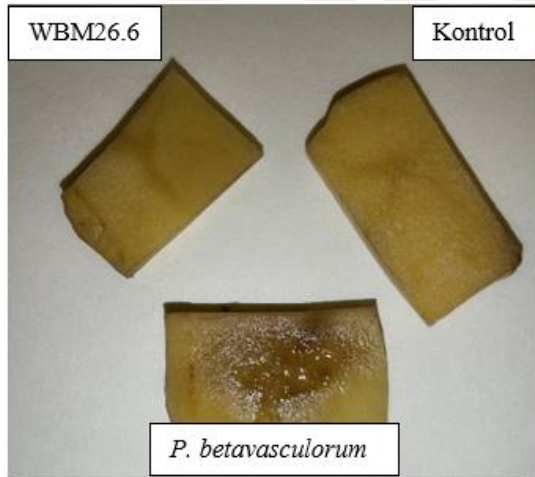
Steril filtre kağıdına damlatılan %1'lik N,N,N,N'-tetrametil-1,4-fenilen diamonyum diklorit çözeltisi üzerine, izolatların kolonileri plastik öze kullanılarak çizilmiştir. 10 saniye içinde koyu mor renk oluşmaması, tüm izolatların oksidaza negatif reaksiyon verdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Oksidaz testinde negatif reaksiyon

4.3.1.6. Pektolitik Aktivite Testi

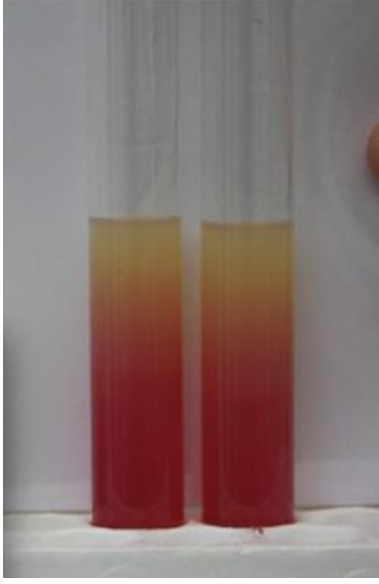
Elde edilen izolatların pektolitik özellikleri, patates yumru dilimlerine inokulasyon yapılan bölgelerde yumuşama oluşumu ile değerlendirilmiştir. Tüm izolatlar bu teste negatif reaksiyon vererek patates dilimleri üzerinde yumuşama gözlemlenmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Pektolitik aktivite testinde negatif reaksiyon

4.3.1.7. Arginin Dehidrolaz Aktivitesi

Ortamın açık pembe renginin, kırmızıya dönüşmesi; reaksiyonun pozitif olduğunu, ortamın renginde değişiklik olmaması ise reaksiyonun negatif olduğunu göstermiştir. Teste tüm izolatlar negatif reaksiyon vermiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Arjinin dehidrolaz testinde negatif reaksiyonu

4.3.1.8. Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)

İzolatların 10^8 cfu/ml konsantrasyonundaki süspansiyonları, tütün bitkisi (*Nicotiana tabacum*) cv. *bentamiana* yaprağının alt yüzeyindeki damar aralarına enjektörle inoküle edilmiş ve inokülasyondan 24-48 saat sonra tütün bitkilerinde aşırı duyarlılık reaksiyonu gözlemlenmiştir. Tüm izolatlar aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 İzolatların tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmaları

İzolatların gram negatif, katalaz pozitif, anerobik ve LOPAT (Lelliot & Stead, 1987) testlerine levam pozitif (+), oksidaz negatif (-), patateste pektolitik aktivite negatif (-), arginin testine negatif (-) ve tütünde aşırı duyarlılık testine pozitif (+) reaksiyon göstermiştir. Bitki bakteriyel hastalıklarına neden olan birçok patojen geniş bakteri

grubuna olarak bilinen *P. syringae* türünde aittir. *P. syringae* türü belirli bir konukçu bitkiyle ilişkili izolatların alt grubu olan patovar olarak sınıflandırılmaktadır. *P. syringae* pv. *atrofaciens* LOPAT gruplandırmasında LOPAT testlerinin sonuçlarına göre LOPAT 1a grup (*P. syringae*) içerisinde yer almaktadır. Bu çalışmada 17 izolat reaksiyonları L+, O-, P-, A-, T+ şeklinde olup LOPAT grup 1a'da yer almıştır (Tablo 4.1). Aynı sonuçlar Butsenko vd. (2020)'nin bildiridği üzere yabancı otlardan izole edilen *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatları için rapor edilmiştir. Matveeva vd. (2008) ve Butsenko vd. (2020)'nin çalışmalarında kullandığı referans *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarının LOPAT testlerine ilave yapılmış karbon kaynaklarına aynı sonuçları gösterdiği ve bu açıdan iki patovarin biyokimyasal ayrımlarının yapılamayacağını bildirmişlerdir.



Tablo 4.1. Patojen bakteri izolatlarının biyokimyasal tanı sonuçları

İzolat No	İzolat Kodu	Alındığı Yer	KOH	Katalaz	OF	L	O	P	A	T
1	WBM3.2	Sorgun	-	+	A*	+	-	-	-	+
2	WBM4.3	Sorgun	-	+	A*	+	-	-	-	+
3	WBM5.1	Sorgun	-	+	A*	+	-	-	-	+
4	WBM7.2	Sorgun	-	+	A*	+	-	-	-	+
5	WBM17.2	Sorgun	-	+	A*	+	-	-	-	+
6	WBM23.6	Çekerek	-	+	A*	+	-	-	-	+
7	WBM26.6	Merkez	-	+	A*	+	-	-	-	+
8	WBM27.6	Merkez	-	+	A*	+	-	-	-	+
9	WBM31.6	Merkez	-	+	A*	+	-	-	-	+
10	WBM33.7	Boğazlıyan	-	+	A*	+	-	-	-	+
11	WBM38.9	Boğazlıyan	-	+	A*	+	-	-	-	+
12	WBM39.6	Yerköy	-	+	A*	+	-	-	-	+
13	WBM40.9	Sarıkaya	-	+	A*	+	-	-	-	+
14	WBM49.6	Sarıkaya	-	+	A*	+	-	-	-	+
15	WBM50.7	Sarıkaya	-	+	A*	+	-	-	-	+
16	WBM55.6	Sarıkaya	-	+	A*	+	-	-	-	+
17	WBM60.7	Sarıkaya	-	+	A*	+	-	-	-	+

*(A) Aerobik gelişim, (-) negatif reaksiyon, (+) pozitif reaksiyon

4.3.2. Patojen İzolatlarının MALDI-TOF MS Yöntemiyle Tanısı

MALDI-TOF analizi, mikroorganizmaların hızlı bir şekilde tanımlanması için güçlü bir araçtır. Birçok çalışma, özellikle klinik açıdan önemli bakteriler için, bu tekniğin bakteri türlerini ve hatta izolat düzeyinde ayırt etme gücüyle başarılı bir şekilde uygulandığını bildirmiştir. Stets vd. (2013), buğdayla ilişkili bakteri izolatlarının çeşitliliğini değerlendirmek için matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) zaman uçuşlu (TOF) kütle spektrometrisi (MS) kullanmışlardır. MALDI-TOF tüm hücre kütle profillemesinin izolatlar arasında daha hassas bir ayırım yapılmasını sağladığını bildirmiş ve bu tekniğin bakteri izolatlarını izolat düzeyinde ayırt etme potansiyeline sahip olduğunu öne sürmüştür.

Patojen izolatlarının MALDI-TOF ile tanı sonucunda 17 izolat, 2 ve üzeri benzerlik indeksi ile *P. syringae* pv. *atrofaciens* olarak tanılanmıştır. İzolatların en düşük 2.018 en yüksek ise 2.409 skor seviyesi ile 1920 yılında Yeni Zellanda’da kavuz dibi çürüklüğü enfeksiyonları gösteren buğday bitkisinden izole edilen patotip *P. syringae* pv. *atrofaciens* CFBP2213^{PT} (Marques vd., 2008; Bophela vd., 2020) kültürüne benzerlik göstermişlerdir (Şekil 4.12). İzolatların MALDI-TOF tanı sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Matched Pattern	Score Value
CFBP-2213_Pseudomonas syringae pv.atrofaciens_20161010	2.399
CFBP-2105-Pseudomonas syringae pv. pisi_20170227	2.221
CFBP-1617-Pseudomonas syringae pv. aptata_20161010	2.215
CFBP-1392_Pseudomonas syringae pv. syringae_20160818	2.176
CFBP-3658_Pseudomonas savastanoi pv.phaseolicola race 8_20160825	2.161
CFBP-4220_Pseudomonas syringae pv. raphiolepidis_20160819	2.145
CFBP-3641_Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola race 4_2016082	2.142

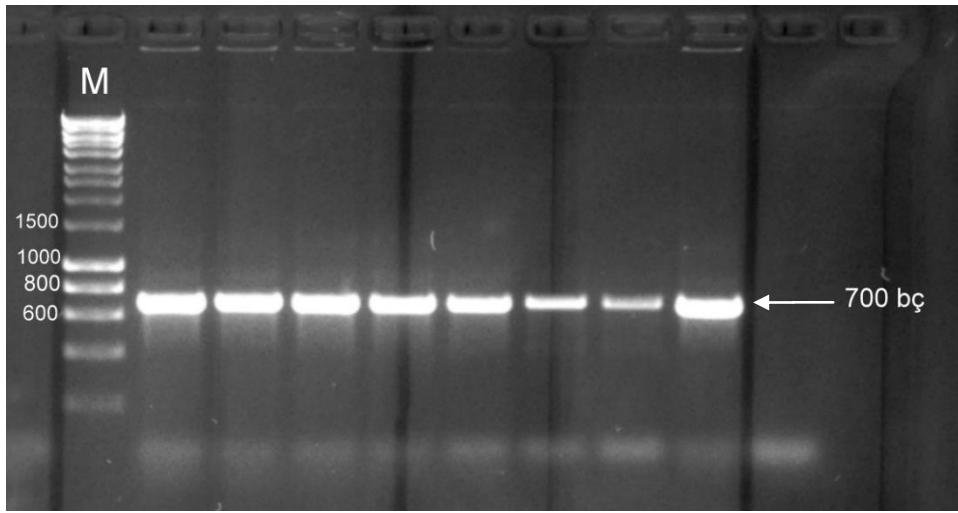
Şekil 4.12 *P. syringae* pv. *atrofaciens* WBM23.6 izolatının MALDI TOF sonucu

Tablo 4.2. MALDI-TOF tekniği ile tanısı yapılan izolatlar ve benzerlik indeks değerleri

İzolat No	İzolat Kodu	Bakteri Tür İsmi	MALDI-TOF Benzerlik İndeks
1	WBM3.2	CFBP-3638 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.281
2	WBM4.3	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.409
3	WBM5.1	CFBP-2105 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.301
4	WBM7.2	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.377
5	WBM17.2	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.316
6	WBM23.6	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.45
7	WBM26.6	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.018
8	WBM27.6	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.338
9	WBM31.6	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.339
10	WBM33.7	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.322
11	WBM38.9	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.310
12	WBM39.6	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.334
13	WBM40.9	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.301
14	WBM49.6	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.312
15	WBM50.7	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.342
16	WBM55.6	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.303
17	WBM60.7	CFBP-2213 <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	2.310

4.3.3. PCR, BLASTN ve Filogenetik Analizler

Pseudomonas spp. türlerinin filogenetik ve evrimsel ilişkilerinin araştırılmasında *rpoD* geni uygun bir korunmuş gen bölgesidir (Sarris vd., 2012). WBM27.6, WBM39.6, WBM49.6 ve WBM50.7 izolatlarının *rpoD* gen bölgesi PCR ile amplifiye edilmiştir. İzolatların genomik DNA'larının 700 bp büyüklüğünde PCR ürünlerinde aynı primerler kullanılarak nükleotid dizileme işleme yapılmıştır (Şekil 4.13). NCBI GenBank'ta elde edilen nükleotid dizileri, WBM26.6 izolatı için PQ839635, WBM27.6 izolatı için PQ839636, WBM39.6 izolatı için PQ839637 ve WBM49.6 izolatı için PQ839638 erişim numaraları ile deposit edilmiştir.

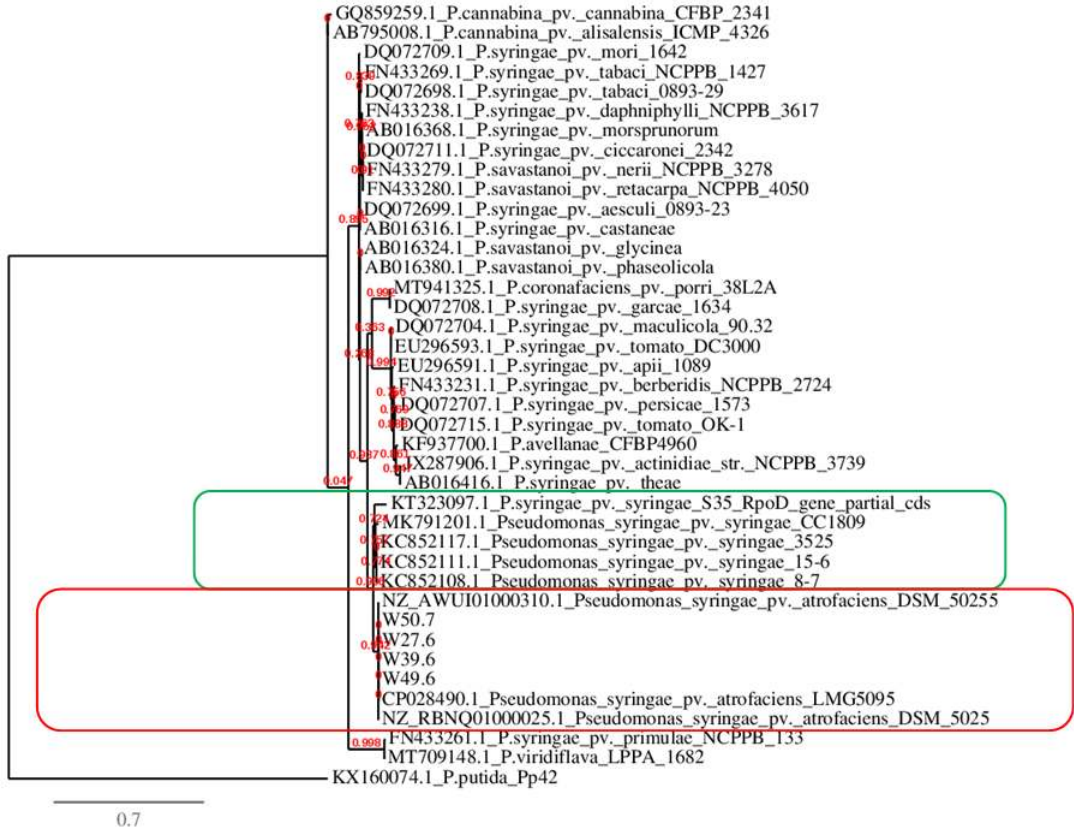


Şekil 4.13 İzolatların *rpoD* gen bölgesi PCR amplifikasyonu jel görüntüsü

P. syringae izolatlarının patovar düzeyinde tanımlanmasında birçok çalışmada ciddi pratik sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu sorunları aşmak için, patovaları tanımlamak amacıyla biyokimyasal veya genotipik belirteçler bulmaya yönelik büyük çabalar harcanmıştır. Ancak, bu belirteçlerin çoğunun oldukça yüksek ayırım kabiliyetinin olmadığı bildirilmiştir. Biyokimyasal testler, birkaç çok yakın ilişkili patovayı içeren kümeleri ayırt edemeyebilir. Örneğin, *P. syringae* pv. *aptata*, *atrofaciens*, *dysoxyli*, *japonica* ve *syringae* biyokimyasal testlere dayanarak kolayca ayrıştırılamaz. Patovaların yağ asidi profilleri incelenmiş ancak bu yöntem bazen yanlış sonuçlar verebilmektedir; bu yöntemle sadece *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının %33'ü ve *P. syringae* pv. *syringae* izolatlarının %12'si doğru şekilde tanımlanabilmiştir. Patovaların serotiplendirme yoluyla tanımlanması, monoklonal ve poliklonal antikorlarla gerçekleştirilmiştir. Ancak, bazı patovalar aynı serolojik profillere sahip olduğu belirlenmiştir. Biolog sistemi ile besin kullanım profillerine göre sınıflandırmada *P. syringae*'nin bazı patovaları için de güvenilir

olmadığı bilinmektedir. Tekrarlayıcı elementlerin PCR amplifikasyonuna dayalı genomik profillerin güvenilirliği, tanımlanacak patovara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Örneğin, *P. syringae* pv. *morsprunorum* izolatlarının aynı REP-, ERIC- ve BOX-PCR profillerine sahiptir. Benzer şekilde, *P. syringae* pv. *glycinea* izolatları oldukça benzer REP-, ERIC- ve IS50-PCR profilleri sergilemektedir. Ancak, aynı çalışmalarda, *P. syringae* pv. *aptata*, *atrofaciens*, *syringae* ve *tomato* izolatlarının uniform profillere sahip olmadığı gözlemlenmiştir. Spesifik dizilerin PCR amplifikasyonu için oligonükleotid primerlerin kullanılması, patovaların tanımlanmasında umut vaat etmektedir. Ancak, bu yaklaşım şu anda yalnızca birkaç patovarla sınırlıdır. Patovaları ayırt etmeye yönelik testlerin geliştirilmesi, bir patovanın fizyolojik ve genetik olarak homojen bir taksonomik birim olduğu varsayımına dayanmaktadır. Ancak, yukarıda belirtilen çeşitli fenotipik ve genotipik belirteçlerin sınırlılıkları ve patojenite ile ilişkili genetik faktörlerin yatay transfer olasılığı göz önüne alındığında, bu varsayımın evrensel olarak geçerli olmadığı muhtemeldir. Örneğin, Vauterin ve Swings (1997) çalışması, *Xanthomonas* spp. için konukçu aralığına dayalı sınıflandırmalar ile genotipe dayalı sınıflandırmaların uyumlaştırılmasındaki zorlukları ortaya koymaktadır.

Yapılan BlastN araştırma sonucunda izolatlardan elde edilen kısmi nükleotid (nt) dizileri (~628-673 nt), Yeni Zelanda'da enfekteli buğday bitkisinden izole edilmiş *P. syringae* pv. *atrofaciens* CFBP2213^{PT} (LMG 5095) patotip kültürü (Dye & Wilkie 1978) (CP028490.1) ve diğer *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının *rpoD* geni dizileriyle %100 benzerlik göstermiştir (GenBank erişim numaraları: NZ_RBNQ01000025.1, NZ_AWUI01000310.1). *rpoD* geni dizilerine dayalı olarak oluşturulan filogenetik ağaç, bu çalışmadaki izolatların referans *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarıyla (Genbank erişim numaraları: MK791201, KC852117, KC852111, KC852108) aynı grupta yer aldığını ortaya konmuştur (Şekil 4.14).



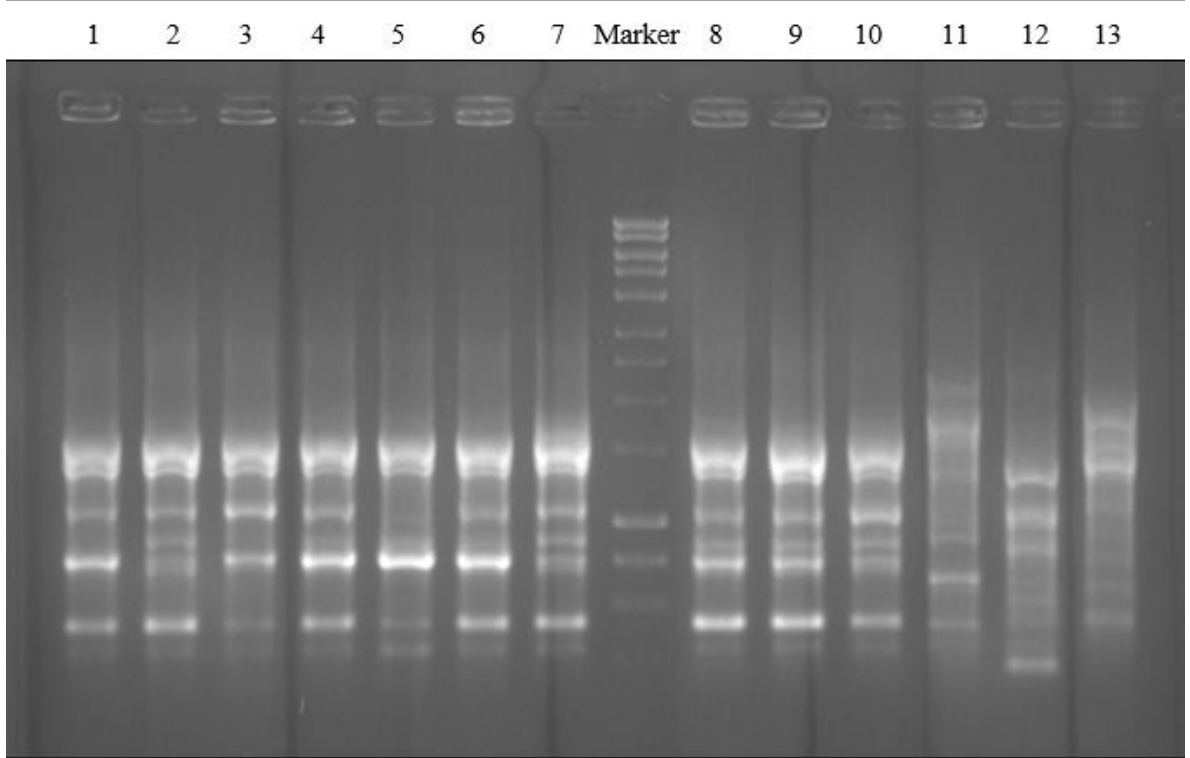
Şekil 4.14 İzolatların *rpoD* gen bölgesi nükleotid dizilerine dayalı filogenetik analizi

rpoD gen dizilerine dayalı gerçekleştirilen filogenetik ağaç analizinde *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarına en yakın patovarin *P. syringae* pv. *syringae* olduğu belirlenmiştir. Her iki patovara ait izolatlar aynı küme içinde yer almıştır ve farklı dallarda konumlanmıştır.

4.4. Patojen Bakteri İzolatlarının rep-PCR Genomik Parmak İzi Analizleri

Repetitive element-based PCR (rep-PCR), bakteriyel genomlarda bulunan tekrarlayan DNA elementlerinin PCR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen izolatlara özgü kalıpların incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. rep-PCR'nin diğer moleküler tiplendirme yöntemlerine göre avantajları, birbirine yakın derecede ilişkili bakteri izolatlarını ayırt edebilme yeteneğinin yanı sıra, basit, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir yüksek verimli genotiplendirme yöntemi olmasıdır. Moleküler tiplendirme için kullanılan tekrarlayan elementlerden birisi, BOX elementleri üç alt birim dizisinin farklı kombinasyonlarından oluşan mozaik yapıya sahip tekrarlayan elementlerdir. Farklı bakterilerin genetik akrabalık çalışmalarında BOX-PCR yönteminin etkinliği, birçok araştırmacı tarafından değerlendirilmiştir (Bilung vd., 2018).

BOX-PCR analizinde izolatların BOXA1R primerleri ile ~180-2500 bp arasında bantlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Seçilmiş 17 izolatın genetik farklılığı, PCR ile çoğaltılan bant profillerinin elektroforez sonrasında elde edilen jel görüntüleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının iki farklı parmak izi profili oluşturduğu belirlenmiştir. I. profilde; WBM17.2, WBM26.6, WBM27.6, WBM33.7 ve WBM38.9 izolatları, II. profilde ise WBM31.6, WBM39.6, WBM49.6, WBM50.7 ve WBM60.7 izolatları yer almıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 BOX-PCR’da oluşan bant profilleri (1: WBM17.2, 2: WBM31.6, 3: WBM26.6, 4: WBM27.6, 5: WBM33.7, 6: WBM38.9, 7: WBM39.6, 8: WBM49.6, 9: WBM50.7, 10: WBM60.7, 11: *P. poae* W21.4, 12: *P. marginalis* W25.9, 13: *P. syringae* pv. *syringae* Pss1)

Önceki araştırmalarda, *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının REP, ERIC ve BOX-PCR gibi rep-PCR temelli farklılaştırma yöntemleri kullanılarak incelendiği yöntemlerinin kullanıldığı sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır. Matveeva (2008), çalışmasında incelenen izolatlar arasında yüksek düzeyde polimorfizm gözlemlenmiştir. REP-PCR ve ERIC-PCR yöntemleri, anlamlı genomik parmak izleri oluşturacak yeterli sayıda ortak bant üretememiştir. Bununla birlikte, BOX-PCR yöntemi en net ve en ayırt edici genomik parmak izlerini sağlamış olmasına rağmen, ortak bant sayısının düşük olması, izolatların küme analizi yoluyla genetik ilişkilerinin belirlenmesini sınırlamıştır. Ancak, BOX-PCR parmak izlerinin görsel analizi, izolatların benzer genotip gruplarına ayrılabilceğini

göstermiştir. Fenotipik LOPAT grup 1a'ya ait izolatların büyük bir kısmı benzer BOX-PCR profili sergilemiştir.

Bitki bakteriyel hastalıklarına neden olan birçok patojen geniş bakteri grubuna olarak bilinen *P. syringae* türünde aittir. *P. syringae* türü belirli bir konukçu bitkiyle ilişkili izolatların alt grubu olan patovar olarak sınıflandırılmaktadır. *P. syringae*'nin LOPAT I taksonomisi, Lelliott vd. (1966) tarafından tanımlanmış, ancak dokuz genom türünün belirlenmesinden sonra (Gardan vd., 1999) yeniden değerlendirilmiştir. LOPAT I taksonomisinde bakterilerin tanımlanması geleneksel olarak fenotipik özellikler temelinde gerçekleştirilmiştir. Ancak, bu yaklaşımın çeşitli sınırlamaları bulunmaktadır. Örneğin, kantitatif DNA-DNA hibridizasyonu dışındaki teknikler tüm genom türlerini güvenilir şekilde ayırt edememektedir ve DNA-DNA hibridizasyon yöntemi de rutin tanı süreçleri için uygun değildir. Bu bağlamda, alternatif olarak rep-PCR (Rademaker & Bruijn, 1997) veya rastgele dizilerin amplifikasyonu için raslantılı primerler kullanılan RAPD (Williams vd., 1990) gibi özgül genomik parmak izi yöntemleri tanı aracı olarak önerilmiştir. Gardan vd. (1999) tarafından belirlenen genom türlerini ayırt edecek çeşitli testlerin eksikliği göz önüne alındığında, *P. syringae* ve *P. viridiflava* grubundaki tüm patovaların konukçu özelliklerini ve genomik parmak izlerini karşılaştırmıştır. Bu sayede, BOX-PCR'ın bu tür ayrımlarıyla ilişkilendirilebileceği hipotezini test etmek ve bu yöntemin bir taksonomik araç olarak kullanım potansiyelini değerlendirmek hedeflenmiştir.

Butsenko ve Pasichnyk (2018), OPA-13 primeri ile yapılan RAPD-PCR'a dayalı profillemeye sonucunda, Ukrayna'nın 11 farklı bölgesindeki farklı bitki konukçularından izole edilen *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının genetik olarak homojen bir grup oluşturduğu belirlenmiştir. OPA-13 primeri kullanılarak, *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in tüm izolatlarında yoğun amplifiye edilmiş fragment spektrumları elde edilmiştir. Polimorfik lokus aralığı 200 ile 700 kb arasında değişmiştir.

Butsenko vd. (2021), OPA-13 primeri ile yapılan RAPD-PCR analiz sonuçlarına göre, yabancı otlardan izole edilen izolatları, *P. syringae* pv. *atrofaciens* ile yüksek düzeyde benzerlik gösterdiğini, yabancı otlardan izole edilen *P. syringae* izolatlarının, *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1011, *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1014 ve *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9780 gibi üç referans izolat ile ortak bir kümeyi oluşturduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, *P. syringae* pv. *atrofaciens* UCM B-1027 ayrı bir kümede yer almıştır. OPA-13 (5'-CAGCASSCACC-3') primeri ile yapılan RAPD-PCR yöntemi, *P. syringae*'nin genetik analizinde ve Ukrayna'daki buğday patojen popülasyonunun genetik

heterojenliğinin incelenmesinde diğer araştırmacılar tarafından başarıyla kullanılmıştır. Morfolojik, biyokimyasal ve serolojik çalışmaların yanı sıra yağ asitleri ve RAPD-PCR profillerinin sonuçlarına göre, buğday tarlalarından izole edilen izolatlar *P. syringae* pv. *atrofaciens* olarak tanımlanmışlardır.

rep-PCR, türlerin (Onfroy vd., 1999), alt türlerin (Louws vd., 1998) ve patovaryaların (Louws vd., 1994) sınırlarını belirlemede etkili bir yöntem olarak öne çıkmıştır. Özellikle BOX-PCR, diğer rep-PCR tekniklerinden bağımsız olarak, *P. syringae* genom türlerini tanımlama potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Marques vd., 2000). Bu teknik ayrıca *Aeromonas* spp. izolatlarının tiplendirilmesi (Tacao vd., 2005), *Ralstonia solanacearum*'un ırk ve biyovaryalarının tanımlanması (Galal vd., 2003), bakteriyel inokulum kaynaklarının araştırılması (Greco vd., 2004), belirli bir patovara ait izolatların kesin tanımlanması (El Tassa vd., 1999) ve çok yönlü bir analiz yöntemi olarak yeni türlerin tanımlanması (Catara vd., 2002) gibi alanlarda da kullanılmıştır.

Polifazik yaklaşımlar, genotipik, fenotipik ve filogenetik verilere dayalı farklı analizleri birleştirerek güvenilir bir tanı yöntemi olarak önerilmektedir (Vandamme vd., 1996). Tüm genom analizine dayalı parmak izi oluşturma yöntemleri, polifazik tanının önemli bir tamamlayıcı parçası olarak değerlendirilmektedir (Rademaker & Bruijn, 1997).

P. syringae pv. *atrofaciens* izolatlarının izolat ayrımının yapılması, belirli bir coğrafi bölgede patojenin epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlar. Aynı bölgelerden ve kaynaklardan daha fazla izolatın karakterize edilmesi, patojen hakkında daha kapsamlı genetik ilişki verileri elde edilmesine katkı sağlayabilir. Gelecekte, yerel *P. syringae* pv. *atrofaciens* izolatlarının karakterizasyonunda kullanılan RAPD, PFGE ve MLST gibi farklı moleküler tiplendirme araçlarının etkinliği ve verimliliğini karşılaştıran çalışmalar yapılabilir. Bu çalışmada incelenen 10 izolatın 2 farklı BOX-PCR bant profili oluşturduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Epifitik özellik göstererek bitkilerde bulunan ve çevre koşullarının uygun olduğu dönemlerde tahıllarda ciddi ürün kayıplarına ve kalite düşüşlerine yol açan bitki patojeni bakteriyel hastalık etmenlerinden biride kavuz dibi çürüklüğüne neden olan *P. syringae* pv. *atrofaciens*'dir. Bu patojenin, gelişimi için elverişli meteorolojik koşullarda geniş bir yayılım gösterdiği ve enfeksiyonun bitkilerin %80'ine kadar ulaşabildiği bilinmektedir. Hastalık sonucunda tanelerin fiziksel, teknolojik ve biyokimyasal özellikleri ciddi şekilde bozulmakta; glutelin ve gliadin içeriklerinde azalma görülürken, düşük kaliteli gluten miktarında artış meydana gelmektedir. Bu etkiler, yalnızca verim kaybına değil, aynı zamanda ürün kalitesinin önemli ölçüde düşmesine de neden olmaktadır.

Bu çalışmada, buğday ekim alanlarında sorun oluşturan kavuz dibi çürüklüğüne neden olan *P. syringae* pv. *atrofaciens* etmeninin Yozgat ilindeki varlığı hasat edilen tohum örneklerinde incelenmiştir. İzole edilen bakteriyel koloniler arasından floresans *Pseudomonas* spp.'ye ait kolonilerin patojenisite testlerinde hastalığa neden oldukları belirlenmiştir. Patojenisite testlerine pozitif sonuç veren izolatların biyokimyasal, MALDI TOF ve PCR tabanlı moleküler tanı yöntemleri kullanılarak *P. syringae* pv. *atrofaciens*'e ait oldukları belirlenmiştir. *rpoD* primerlerine dayalı çoğaltılan PCR fragmentlerinden elde edilen nükleotid dizileri ile yapılan BLASTN ve filogenetik analizler doğrultusunda izolatların bakteriyel toksonomisindeki kesin yerleri belirlenmiştir.

İzolatların buğday yapraklarında 36-48 saat aralığında inoküle edilen bölgelerde patojenik izolatların belirti gösterdiği gözlemlenmiştir. Bazı floresans *Pseudomonas* spp. izolatlarının daha geç reaksiyonlar ve zayıf hastalık belirtileri ortaya çıkmıştır. LOPAT testlerine 17 patojenik izolatın L+, O-, P-, A-, T+ şeklinde reaksiyon gösterdiği ve LOPAT grup 1a'da yer aldığı belirlenmiştir. Literatürde belirtilen yöntemlere uygun olarak, izolatların PCR tabanlı moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiş tür ve patovar seviyesindeki tanıları öncelikle morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre yapılmış, daha sonra MALDI TOF MS ve *rpoD* gen bölgesi nükleotid dizilerinin BLASTN tarama ve filogenetik analizleri ile teyit edilmiştir.

Yapılan detaylı literatür tarama sonuçlarına göre, hastalık etmeni *P. syringae* pv. *atrofaciens*'in Türkiye'de yetiştirilen buğday bitkilerinde hastalığa neden olduğuna yönelik morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak teyit edilmiş ilk çalışmadır. Hastalık etmenine ait fonksiyonel genlerin nükleotid dizi verilerinin elde edilmesi ve veri

tabanlarında bulunması büyük önem taşımaktadır. Bu kapsamda, çalışmada elde edilen izolatlarının nükleotid dizileri, NCBI GenBank'ta kayıt altına alınan ilk veriler olma özelliği taşımaktadır.

Dünya nüfusunun hızla artması ve tarım arazilerinin azalması, güvenli gıda arzının sürdürülebilir bir şekilde sağlanmasını zorunlu hale getirmektedir. Bu kapsamda, öngörülebilir verimlilikle bitkisel üretim sistemlerinin sürdürülebilirliğini korumak, özellikle bakteriyel hastalıklara karşı etkili yönetim çözümlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Mevcut bakterisitlere karşı artan direnç, yenilikçi ve entegre yönetim stratejilerinin önemini daha da artırmaktadır. Kritik patojenlerin tanımlanması, bu patojenlere yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesi ve uygulanabilir yönetim stratejilerinin ortaya konması, bakteriyel hastalık yönetimine ilişkin temel bir araştırma odağı oluşturmakta ve bu çalışmalar gelecekte daha etkili mücadele yöntemleri için sağlam bir temel sunmaktadır.

Bu bağlamda, buğday üretiminde sık rastlanan bakteriyel hastalık etmenleri arasında *X. translucens* ve *P. syringae* yer almakta olup, bu patojenlerin tohum materyalleri aracılığıyla taşındığı bilinmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında, başta önemli buğday üretimi gerçekleştiren Rusya ve Ukrayna ile dünyanın farklı bölgelerinde ve Avrupa ülkelerinde tespit edilmediği bildirilen *P. syringae* pv. *atrofaciens* etmeninin Yozgat ilinde buğday tohumlarında varlığı, üreticilerin tohumluk materyallerinden izole edilmesi bakımından önemli bir üretim sorunu olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca bu çalışma; ülkemizde daha önce araştırma konusu olmayan etmen hakkında ülkemiz buğday ile arpa ve diğer tahılların üretiminde önemli bir risk unsuru olarak değerlendirilebileceğini ifade etmektedir. Bu nedenle üreticilerin tohum sağlığı ve hijyenine ilişkin bilgi eksiklikleri, düşük maliyetli olduğu gerekçesiyle kendi tohumluklarını kullanmalarına yol açmakta ve bu durum, patojenin sonraki üretim dönemlerinde yeniden ortaya çıkmasına ve hastalık döngüsünün devam etmesine neden olmaktadır. Bu bulgular, tohum hijyeninin sağlanması ve sürdürülebilir üretim için etkili yönetim stratejilerinin benimsenmesinin kritik önemde olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, son yıllarda birçok ithal buğday tohumunun ilimizde üretilerek üreticilerin satışına sunulduğu bilinmektedir. Tohumluk materyalinde bulaşıklılık miktarının seviyesi belirlenerek, kontaminasyonun fazla olduğu durumlarda tohumluk materyalinin ülkemize girişi ve böylece hastalık etmenlerinin enfekteli tanelerde hastalıkla bulaşık olmayan bölgelere taşınması önlenabilir. Sertifikalı ve hastalıktan arı tohumluk kullanımı tercih

edilmelidir. Patojenin başka bölgelere taşınmaması bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada etmenin Türkiye’de var olduğunu ispat eden araştırma verileri sayesinde buğday ve diğer tahıl grubu bitkilerde etmenin yaşayışını sınırlandıracak mücadele yöntemlerinin üreticiler tarafından benimsenmesi gerekmektedir. Patojen izolatlar ile sonraki çalışmalarda; birçok bölgede yetiştiriciliği yaygın olarak tercih edilen çeşitlerin hastalık etmenine karşı dayanıklılık durumlarının araştırılması, biyolojik mücadele ajanları ile mücadelesi, bakteri gelişimini azaltan veya durdurabildiğini bildiren kimyasallarla mücadelesi konularında çalışmalar yapılması başta buğday olmak üzere diğer tahıl üreticileri içinde faydalı olacaktır.



6. KAYNAKLAR

- Abo Bakr, A., Khatib, F., Kassem, M., Kumari, S. G., Husien, N., & Asaad, N. (2024). Investigation of the spread of bacterial wheat leaf blight caused by pathotypes of *Pseudomonas syringae* in some wheat growing areas in Syria. *Arab Journal of Plant Protection*, 42(3), 291–298. . <https://doi.org/10.22268/AJPP-001257>
- Alexandrova, M., Zaccardelli, M., Stefani, E., & Bazzi, C. (1995). Testing for *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* and *Xanthomonas campestris* pathovars on cereals in Italy. *EPPO Bulletin*, 25(3), 437–448.
- Altundağ, Ş., Karahan, A., Aksu, P., & Kılınç, A. O. (2010). İn vitro koşullarda *Satureja cuneifolia* ten uçucu yağının bazı buğday patojeni bakteriler üzerine antibakteriyel etkisinin araştırılması. *Bitki Koruma Bülteni*, 50(1), 25-33.
- Al-Sallami, F., Karov, S., Vassileva, P., Popova, R., & Vassilev, V. (1997). *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* associated with fungal black point of wheat (*Triticum aestivum*) grain. In Rudolph, K. Et al. (Eds.), *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens (pp. 505–508). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Amrein, H., Makart, S., Granado, J., Shakya, R., Schneider-Pokorny, J., & Dudler, R. (2004). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D-R tarafından syringolin A sentezinde yer alan genlerin fonksiyonel analizi, *Moleküler bitki-mikrop etkileşimleri*, 17(1), 90-97.
- Anonim. (2024). Tarım ve hayvancılık. <http://yozgat.gov.tr/tarim-ve-hayvancilik> (Erişim Tarihi: 09.10.2024).
- Anonymous. (2020). FAO Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü FAOSTAT. Erişim: <http://www.fao.org/faostat/en/data> [Erişim tarihi 07.05.2020].
- Anonymous.(2023a).<http://www.fao.org/giews/foodprices/tool/public/#/dataset/international>
- Baştaş, K. K., Altınparmak, S., & Boyraz, N. (2011). Researches on determination of *Xanthomonas translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak of wheat on widely sown seeds. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 25(1), 105–114.
- Bergey, D. H., et al. (1923). *Bacillus megaterium* and its varieties. *Journal of Bacteriology*, 8(6), 621–629.

- Bilung, L. M., Pui, C. F., Su'ut, L., & Apun, K. (2018). Evaluation of BOX- PCR and ERIC- PCR as molecular typing tools for pathogenic *Leptospira*. *Disease markers*, 2018(1), 1351634.
- Bophela, K. N., Petersen, Y., Bull, C. T., & Coutinho, T. A. (2020). Identification of *Pseudomonas* isolates associated with bacterial canker of stone fruit trees in the Western Cape, South Africa. *Plant Disease*, 104(3), 882–892.
- Bradbury, J. F. (1986). In Guide to Plant Pathogenic Bacteria, pp. 198– 260. Kew, UK: CAB International Mycological Institute.
- Brenner, D. J., et al. (1970). *Pseudomonas cichorii* sp. nov., a new species of the genus *pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(1), 18–25.
- Buletsa, N. M., Butsenko, L. M., Pasichnyk, L. A., & Patyka, V. P. (2016). Physiology of growth *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* under the effects of pesticides. *Mikrobiolohichni Zhurnal*, 78(3), 52–60.
- Bull, C. T., de Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., ... & Takikawa, Y. (2010). Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980–2007. *Journal of Plant Pathology*, 92, 551–592.
- Butsenko, L.M.; Pasichnyk, L.A. Genetic Heterogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* Strains Based on RAPD-PCR analyze. *Microbiolohichni Zhurnal* 2018, 80, 48–62.
- Butsenko, L. M., Pasichnyk, L. A., & Kolomiets, Y. V. (2020). Biological properties of morphological dissociants *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Biological Systems: Theory and Innovations*, 11(1), 28–37.
- Butsenko, L., Pasichnyk, L., Kolomiets, Y., Kalinichenko, A., Suszanowicz, D., Sporek, M., & Patyka, V. (2020). Characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* isolated from weeds in wheat fields. *Applied Sciences*, 11(1), 286.
- Büyükçekik, A. İ. (2024). Trakya Bölgesi'nde makarnalık buğday üretimi için yüksek verim kapasitesine sahip makarnalık buğday (*Triticum turgidum* L. Ssp. *Durum*) ümitvar ileri hatlarının belirlenmesi (Yayın No. 856499) [Yüksek lisans tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Tekirdağ]. Ulusal Tez Merkezi.

- Büyükdeveci, K. (2016). Buğdaydan İzole Edilen Bakteriyel izgi Yanıklığı Etmeni *Xanthomonas translucens*'in Moleküler Karakterizasyonu (Yayın No. 418860) [Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Konya]. Ulusal Tez Merkezi.
- Carlson, R. R., & Vidaver, A. K. (1982). Bacterial mosaic, a new corynebacterial disease of wheat. *Plant Disease*, 66(1), 76-79.
- Certel, M., & Ertugay, Z. (1992). Buğdayın bulgura işlenmesi sırasında nişastada meydana gelen fizikokimyasal değişmeler. *Gıda* 17(4), 227–234.
- Cunfer, B. M. (1987). Bacterial and fungal blights of the foliage and heads of wheat. In E. G. Heyne (Ed.), *Wheat and wheat improvement* (Vol. 13, 2nd ed., pp. 528–541). Madison, WI: American Society of Agronomy.
- Demir, G., & ştn, N. (1992). Studies on bacterial streak disease (*Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (Jones & Dye) *Of wheat and other Gramineae*.
- Denny, T. P., & Gilbertson, R. L. (1989). *Xanthomonas translucens*, the causal agent of wheat leaf streak. *Phytopathology*, 79(8), 1021–1027.
- Diekmann, M., & Putter, C. A. J. (1995). Small grain temperate cereals. *FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm* no. 14 (67 pp).
- Doksöz, S. F., & Bozkurt, İ. A. (2020). Hatay ili zeytin üretim alanlarında zeytin dal kanseri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) hastalığının belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(1), 96-103.
- Eken, C., & Demirci, E. (1998). Erzurum yöresinde buğday ve arpa ekim alanlarında *Drechslera sorokiniana*'nın yayılışı, kültürel özellikleri ve patojenitesi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22(2), 175-180.
- Fukuda, T., Azegami, K., & Tabei, H. (1990). Histological studies on bacterial black node of barley and wheat caused by *Pseudomonas syringae* pv. *japonica*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 56(2), 252-256.
- Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorrah, M., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (1992). DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(4), 606-612.

- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. Nov. And *Pseudomonas cannabina* sp. Nov. (ex Sutic and Dowson 1959).
- Gillis, M., Vandamme, P., De Vos, P., Swings, J., & Kersters, K. (2005). Polyphasic taxonomy. In *Bergey's Manual® of systematic bacteriology* (pp. 43-48). Springer, Boston, MA.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., & Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in microbiology*, 8, 2422.
- Gvozdyak, R. I., Pasichnyk, L. A., Yakovleva, L. M., et al. (2011). Phytopatogenni bakterii. Interservis, Kyiv.
- Huliaieva, H., Pasichnyk, L., Kharchuk, M., Kalinichenko, A., Patyka, V., Bohdan, M., & Maksin, V. (2020). Influence of citrate nanoparticles on morphological traits of bacterial cells *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Agriculture and Forestry*, 66(1).
- Iacobellis, N. S., Figliuolo, G., Janse, J., Scortichini, M., & Ciuffreda, G. (1997). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. In Rudolph, K., Burr, T. J., Mansfield, J. W., Stead, D. E., Vivian, A., & von Kietzell, J. (Eds.), *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens (pp. 500–504). Springer Science & Business Media.
- Kamçılı, N. (2018). Hatay ili buğday yetiştirme alanlarında zararlı buğday sülüğü, *Oulema melanopus* (L.)(Coleoptera: chrysomelidae'un popülasyon gelişimi, yayılış alanları ve konukçularının belirlenmesi (Yayın No. 499538) [Yüksek Lisans Tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay]. Ulusal Tez Merkezi.
- Karov, S., & Vassilev, V. (1990). Bacterial diseases of *Graminae* in Bulgaria. In Klement, Z. (Ed.), *Proceedings of 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* (pp. 311–316), Budapest, Hungary, June 11–16, 1989.
- Kazempour, M. N., Kheyrghoo, M., Pedramfar, H., & Rahimian, H. (2010). Isolation and identification of bacterial glume blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *African Journal of Biotechnology*, 9, 2866–2871.

- Keleş, G., Coşkun, B., & Işık, Ş. (2012). Tahıl hasıllarının farklı gelişme dönemlerindeki agronomik özellikleri, besleme değerleri ve kuzu performansı üzerine etkileri. TÜBİTAK 111O009 nolu proje sonuç raporu.
- Kelpšienė, J., Šneideris, D., Burokienė, D., & Supronienė, S. (2021). The presence of pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* in cereals in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture*, 108(4), 291–296.
- Kelpšienė, J., & Supronienė, S. (2022). *Pseudomonas syringae* influence on winter wheat yield. *Žemės ūkio mokslai*, 29(1).
- Kuykendall, L. D., & Schroth, M. N. (1954). *Erwinia rhapontici* sp. nov., a pathogen of wheat seed. *Phytopathology*, 44(8), 492–499.
- Little, EL, Bostock, RM ve Kirkpatrick, BC (1998). *Pseudomonas syringae* pv.'nin genetik karakterizasyonu. *Uygulamalı ve Çevresel Mikrobiyoloji*, 64(10)
- Maes, M., Garbeva, P., & Kamoen, O. (1996). Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rdna spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86, 63-69.
- Maraite, H., Bragard, C., & Duveiller, E. (2007). The status of resistance to bacterial diseases of wheat. In Buck, H. T. Et al. (Eds.), *Wheat Production in Stressed Environments: Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November–2 December 2005, Mar del Plata, Argentina* (pp. 37–49). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Marques, A. S., Marchaisson, A., Gardan, L., & Samson, R. (2008). BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*: *P. viridiflava* group. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 106–115.
- Matveeva, I. E. V., Pekhtereva, E. S., Polityko, V. A., Ignatov, A. N., Nikolaeva, E. V., & Schaad, N. W. (2003). Distribution and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, causal agent of basal glume rot, in Russia. In Rudolph, K. Et al. (Eds.), *Pseudomonas syringae and related pathogens: Biology and Genetic* (pp. 97–105). Springer Netherlands.
- Matveeva, E. V., Ignatov, A. N., Bobrova, V. K., Milyutina, I. A., Troitsky, A. V., Polityko, V. A., & Schaad, N. W. (2008). Genetic diversity among *Pseudomonad* strains associated with cereal diseases in Russian Federation. *Pseudomonas*

- syringae* Pathovars and Related Pathogens–Identification, Epidemiology and Genomics, 337-345.
- Mehta, Y. R. (2014). Spike diseases caused by bacteria. In *Wheat Diseases and Their Management* (pp. 41–57). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06465-9_4
- Mittelstädt, H., & Rudolph, K. (1998). Ice nucleation activity of strains from *Pseudomonas syringae* pathovars *atrofaciens* and *syringae*, mainly isolated from cereals. *Journal of Phytopathology*, 146(11–12), 581–586.
- Murray, B. E., Singh, K. V., Heath, J. D., Sharma, B. R., & Weinstock, G. M. (1990). Comparison of genomic dnas of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9), 2059-2063.
- Nyoni, N. T., Ncube, N. B., Kubheka, M. X., Mkhwanazi, N. P., Senzani, S., Singh, T., & Tukulula, M. (2023). Synthesis, characterization, in vitro antimycobacterial and cytotoxicity evaluation, DFT calculations, molecular docking and ADME studies of new isomeric benzimidazole-1, 2, 3-triazole-quinoline hybrid mixtures. *Bioorganic Chemistry*, 141, 106904.
- Öz, A.(2014) Samsun İli Buğday Üretim Alanlarında Enfeksiyon Oluşturan Bakteriyel Etmenlerin Belirlenmesi (Yayın No. 411864) [Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun]. Ulusal Tez Merkezi.
- Öztürk, M., Eroglu, Z., & Soylu, S. (2019). First report of *Pectobacterium betavascularum* associated with bacterial vascular necrosis and root rot disease of sugar beet in Turkey. *New Disease Reports*, 39(1), 20-20.
- Öztürk, M., & Soylu, S. (2022). Yozgat İli Beyaz Baş Lahana Üretim Alanlarında Bakteriyel Yumuşak Çürüklük Hastalığına Neden Olan *Pectobacterium* İzolatlarının Tanılanması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(3), 495-503.
- 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.

- Pasichnick, L. A., & Koroleva, L. B. (1991). *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, an agent of bacterial spot of rye in Ukraine. *Journal of Microbiology*, 53, 49–55.
- Pasichnyk, L. A. (2000). Properties of bacteria of pathovars of *Pseudomonas syringae* affecting cereals. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 62(5), 18-22.
- Pasichnyk, L., & Butsenko, L. (2022). Modernization of the *Pseudomonas syringae* pathovars serogrouping scheme. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 84 (3), 9–16.
- Rademaker, J. L., & de Bruijn, F. J. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (eds) *DNA markers: Protocols, Applications and Overviews*. pp. 151-171. J Wiley & Sons, Inc., New York.
- Sands, D. C., Fourest, E., & Rehms, L. D. (1989, June). Dry heat seed treatment for *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. In *Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Hungary* (pp. 11-16).
- Sarris, P. F., Trantas, E. A., Mpalantinaki, E., Ververidis, F., & Goumas, D. E. (2012). *Pseudomonas viridiflava*, a multi-host plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. *Plos One*, 7(4), e36090.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., mcroberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, 3(3), 430-439.
- Slovareva, O. Y. (2020). Detection and identification of wheat and barley phytopathogens in Russia. *Microbiology Independent Research Journal*, 7(1), 13–23.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W., *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, St Paul, MN: American Phytopathological Society. 3rd Edn., 2001.
- Sequeira, L., & Hutchinson, L. J. (1973). *Pseudomonas fascovaginae*, a new species associated with seedling blight of wheat. *Phytopathology*, 63(1), 53–57.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., & Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043-1047.

- Stets, M. I., Pinto Jr, A. S., Huergo, L. F., de Souza, E. M., Guimarães, V. F., Alves, A. C., & Cruz, L. M. (2013). Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high-resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Biotechnology*, 165(3–4), 167–174.
- Sultanov, R. I., Arapidi, G. P., Vinogradova, S. V., Govorun, V. M., Luster, D. G., & Ignatov, A. N. (2016). Comprehensive analysis of draft genomes of two closely related *Pseudomonas syringae* phylogroup 2b strains infecting mono- and dicotyledon host plants. *BMC Genomics*, 17, 1010.
- Sundin, G.W.; Castiblanco, L.F.; Yuan, X.; Zeng, Q.; Yang, C.H. Bacterial disease management: Challenges, experience, innovation and future prospects: *Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. Mol. Plant Pathol.* 2016, 17, 1506–1518.
- Taghavi, S. M., & Keshavarz, K. (2003). Identification of the causal agent of bacterial wheat blight in Fars and Kohgiluyeh Boyer-Ahmad provinces and the reaction of certain wheat cultivars to them. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 6, 171–180.
- Tambong, J. T. (2022). “Bacterial pathogens of wheat: symptoms, distribution, identification, and taxonomy” in Wheat. ed. M. R. Ansari (London, UK: IntechOpen). <http://doi: 10.5772/intechopen.102855>
- Taşcı, R., Özeran, B., Bolat, M., Arslan, S., Yazar, S., Karabak, S., & Bayramoğlu, Z. (2020). Yozgat ilinde makarnalık buğday üretim ve pazarlama yapısının incelenmesi. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 30(2), 207-220.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266.
- Toben, H., Mavridis, A., & Rudolph, K. (1989). Basal glume rot (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*) on wheat and barley in FRG and resistance screening of wheat. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 19, 119–125.
- Valencia-Botín, A. J., & Cisneros-López, M. E. (2012). A review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *International Journal of Agronomy*, 2012(1), 692350.

- Vandamme, L. M., & Roegiers, J. C. (1990). Poroelasticity in hydraulic fracturing simulators. *Journal of Petroleum Technology*, 42(09), 1199-1203.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407-438.
- Van Hall, E., & Buchanan, R. E. (1902). *Pseudomonas syringae*, the causal organism of bacterial blight in wheat. *Journal of Agricultural Research*, 3(3), 225–230.
- Vassilev, V., Lavermicocca, P., Digiorgio, D., & Iacobellis, N. (1997). Syringomycins and syringopeptins in the basal glume rot of wheat incited by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. In *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens (pp. 210–214). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Vauterin, L., & Swings, J. (1997). Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 77-82.
- Von Kietzell, J., & Rudolph, K. (1997). Epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* in *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens (pp. 29–34). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Wäspi, U., Schweizer, P., & Dudler, R. (2001). Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *The Plant Cell*, 13(1), 153-161.
- Wilkie, J. P. (1973). Basal glume rot of wheat in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16(1), 155–160.
- Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual review of phytopathology*, 51(1), 473-498.
- Zaharieva, M., & Vassilev, V. (1995). Study of the adult wheat and *Aegilops* resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Agronomie*, 15(1), 21–24.



**T.C.
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**