

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAN BAKTERİYEL KANSER VE SOLGUNLUK
(*Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis*) HASTALIĞINA SPESİFİK
BAKTERİYOFAJLARIN İZOLASYONU, BİYOFORMÜLASYONU VE
BİYOKONTROL AJANI OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

DUYGU BEKİRCAN ESKİ

TEZ DANIŐMANI
PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2024

10602533

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAN BAKTERİYEL KANSER VE SOLGUNLUK
(*Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis*) HASTALIĞINA SPESİFİK
BAKTERİYOFAJLARIN İZOLASYONU, BİYOFORMÜLASYONU VE
BİYOKONTROL AJANI OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI
DOKTORA TEZİ**

DUYGU BEKİRCAN ESKİ

TEZ DANIŐMANI
PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2024

10602533

BEYAN

“Domates Üretim Alanlarından Bakteriye Kanser ve Solgunluk (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*) Hastalığına Spesifik Bakteriyofajların İzolasyonu, Biyofarmülasyonu ve Biyokontrol Ajanı Olarak Kullanılabilme Potansiyelinin Araştırılması” adlı doktora tezi hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTE KALINMIŞTIR		DESTEK ALINMAMIŞTIR	X
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum;			
Desteğin Türü	Proje Numarası		
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer;			
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:			

Duygu BEKİRCAN ESKİ

Tarih

.....

İmza

.....

ÖN SÖZ

“Domates üretim alanlarından Bakteriyel Kanser ve Solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) hastalığına spesifik bakteriyofajların izolasyonu, biyoformülasyonu ve biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyelinin araştırılması” isimli bu çalışma, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, bana katmış olduğu bilimsel bakış açısı ve desteği için danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cihan DARCAN’ a, ayrıca tez çalışmam süresince Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bölüm Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca, varlıklarını ve desteklerini benden esirgemeyen başta Doç. Dr. Sema LEBLEBİCİ, Öğr. Gör. Dr. Gülçin ÇETİN KILIÇASLAN, Arş. Gör. Fırat Yavuz ÖZTÜRK, Zeynep Feyza TETİK, Muhammet KOÇ ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma tek tek sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan sevgili annem Gülen BEKİRCAN, babam Zeki BEKİRCAN ve ablam Tuğba BEKİRCAN ERGEN’ e her koşulda yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca maddi manevi her koşulda yanımda olan, akademik tecrübeleri ile desteğini benden esirgemeyen en büyük destekçim sevgili eşim Doç. Dr. Ardahan ESKİ’ ye ve biricik kızımız Ada’ya sonsuz minnet ve şükranlarımla teşekkür ederim.

Duygu BEKİRCAN ESKİ

2024

ÖZET

DOMATES ÜRETİM ALANLARINDAN BAKTERİYEL KANSER VE SOLGUNLUK (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) HASTALIĞINA SPESİFİK BAKTERİYOFAJLARIN İZOLASYONU, BİYOFORMÜLASYONU VE BİYOKONTROL AJANI OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) domates yetiştiriciliğinde verim kayıplarına neden olan bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığı etmenidir. Patojen ile mücadelede mevcut mücadele yöntemlerin yetersizliği fajlar ile mücadeleye olan ilgiyi artırmıştır. Bu amaçla Çanakkale, İzmir ve Bilecik illerinde hastalık belirtisi görülen domates ekim alanlarından toprak ve bitki örnekleri toplandı. Toplanan örneklerden biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile *Cmm* izolasyonu ve faj izolasyonu gerçekleştirildi. Abiyotik faktörlere toleransı yüksek olan fajlar belirlenerek sinerjistik-antagonistik özellikleri belirlendi. Etkinliği belirlenen fajın moleküler ve morfolojik karakterizasyonu yapılarak biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli araştırıldı. Fajın su içinde yağ formülasyonu Taguchi metodu ile optimize edildi. Belirlenen optimum şartlar ile su içinde yağ formülasyonu hazırlandı ve *Cmm*-DB3 üzerindeki inhibe etme oranı *in-vitro*'da belirlendi. Formülasyonun etkinliği saksı denemeleri ile gösterildi. Gerçekleştirilen çalışma ile, 8 *Cmm* izolatu ve *Cmm*-DB3 üzerinde etkinliği belirlenen 22 adet litik faj elde edildi. Abiyotik faktörlere toleransı yüksek Phage33'ün komple genom analizi yapılarak NCBI veri tabanındaki fajlarla karşılaştırıldı ve tür bazında eşleşme olmadığı belirlenerek faj literatürüne yeni bir faj kazandırıldı. Phage33'ün optimum koşullar ile emülsiyon formülasyonu hazırlandı ve emülsiyonun *Cmm*-DB3 üzerindeki inhibe etme oranı *in-vitro*'da %80,7 olarak belirlendi. Emülsiyonun 6. ay sonunda oda ısısında *Cmm*-DB3'i inhibe etme oranı %78,12 iken 4 °C'de ise %79,23 olduğu belirlendi. Ayrıca damlacık boyut analizi sonucu emülsiyonun polidispers yapıda olduğu belirlendi. Hazırlanan emülsiyonun saksı denemeleri sonucu *Cmm* uygulanan saksılarda hastalık belirtileri %78 iken emülsiyon uygulanan saksılarda ise %17 olduğu belirlendi. Phage33'ün abiyotik faktörlere olan toleransını artırmak amacıyla emülsiyon formülasyonu ilk kez Taguchi metodu ile optimize edilmiş ve patojenin mücadelesinde kullanılabilir bir prototip ürün ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Bakteriyofaj, Fitopatojen, Biyokontrol

ABSTRACT

ISOLATION, BIOFORMULATION OF BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO BACTERIAL CANCER AND WILTH (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) DISEASE FROM TOMATO PRODUCTION AREAS AND INVESTIGATION OF THEIR POTENTIAL TO USE AS BIOCONTROL AGENT

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) is a bacterial wilt and canker pathogen that causes yield losses in tomato cultivation. The inadequacy of existing methods to control the pathogen has increased interest in phage control. For this purpose, soil and plant samples were collected from tomato growing areas with symptoms of the disease in the provinces of Canakkale, Izmir and Bilecik. *Cmm* isolations and phage isolations were performed from the collected samples using biochemical and molecular methods. Phages with high tolerance to abiotic factors were identified and their synergistic-antagonistic properties were determined. Molecular and morphological characterisation of the phages whose activity was determined was performed and their potential for use as biocontrol agents was investigated. The oil-in-water formulation of the phage was optimised using the Taguchi method. An oil-in-water formulation was prepared with the optimal conditions determined and the inhibition rate on *Cmm*-DB3 was determined in vitro. The efficacy of the formulation was verified by pot experiments. With the study performed, 22 lytic phages were obtained and their activity on 8 *Cmm* isolates and *Cmm*-DB3 was determined. The complete genome analysis of phage33, which has a high tolerance to abiotic factors, was compared with the phages in the NCBI database and it was found that there was no match on a species basis. An emulsion formulation of Phage33 was prepared under optimal conditions, and the inhibition rate of the emulsion on *Cmm*-DB3 was determined to be 80.7% in vitro. At the end of the 6th month, the *Cmm*-DB3 inhibition rate of the emulsion was determined to be 78.12% at room temperature and 79.23% at 4 °C. Furthermore, when analysing the droplet size, it was found that the emulsion had a polydisperse structure. As a result of the pot trials with the prepared emulsion, it was found that the disease symptoms were 78% in the pots where *Cmm* was applied and 17% in the pots where the emulsion was applied. In order to increase the tolerance of Phage33 to abiotic factors, the emulsion formulation was optimised for the first time using the Taguchi method and a local prototype was introduced that can be used in against the pathogen.

Keywords: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Bacteriophage, Phytopathogen, Biocontrol

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖN SÖZ.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Domatesin Önemi	4
2.2. Türkiye’de Domates Üretimindeki Sorunlar	5
2.2.1. Patojen Mikroorganizmalar.....	5
2.3. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	7
2.3.1. Patojen ile Mücadele Yöntemleri.....	10
2.4. Bakteriyofajların Keşfi ve Tarihçesi	12
2.4.1.Faj Morfolojisi ve Sınıflandırması	13
2.4.2. Fajların Çoğalması.....	17
2.5. Fajların Kullanım Alanları.....	23
2.5.1.İnsan Sağlığında Fajların Kullanımı	23
2.5.2.Hayvan Sağlığında Fajların Kullanımı.....	24
2.5.3.Bitki Hastalıklarına Karşı Fajların Kullanımı	25
2.6. Bitki Hastalıklarına Karşı Faj Kullanımının Avantajları ve Dezavantajları.....	28
2.7. Enkapsülasyon Teknolojisi ve Fajlar	30
2.8. Enkapsülasyon Yöntemleri	31
2.8.1. Dondurarak kurutma (Freeze-drying).....	31

2.8.2. Püskürterek Kurutma (Spray-drying).....	31
2.8.3. Ekstrüzyon (Exrusion).....	32
2.8.4. Emülsifikasyon	33
2.9. Taguchi Metodu	35
2.10. Çalışmanın Amacı.....	35
3. MATERYAL METOD.....	36
3.1. Arazi Çalışmaları.....	36
3.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> İzolasyonu	36
3.3. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyonu	37
3.3.1. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	37
3.3.2. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	37
3.4. Bakteri İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu	38
3.4.1. Genomik DNA İzolasyonu	38
3.4.2. <i>pat-1</i> Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması ...	38
3.5. Patojenite Testi.....	39
3.6. Faj İzolasyonu ve Zenginleştirme	39
3.7. Spot Assay ve Saflaştırma	40
3.8. Fajların Konak Spektrumunun Belirlenmesi	40
3.9. Fajların Sıcaklık ve pH Stabilesinin Belirlenmesi.....	40
3.10. Fajların İnhibisyon Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	41
3.11. Phage33'ün Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu	41
3.11.1. Morfolojik Karakterizasyon.....	41
3.11.2. Moleküler Karakterizasyon	42
3.12. Emülsiyon Formülasyonunun Geliştirilmesi.....	44
3.12.1. Deney Tasarımı.....	44
3.12.2. Emülsiyonunun İnhibisyon Yeteneğinin Ölçülmesi	46

3.12.4. Emülsiyon Formülasyonun Karakterizasyonu	46
3.13. Emülsiyon Formülasyonun Etkinliğinin Belirlenmesi	47
4. BULGULAR	48
4.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> İzolasyonu	48
4.2. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlaması.....	48
4.3. Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanımlaması	49
4.4. Patojenite Testi.....	50
4.5. Faj İzolasyonu ve Konak Spektrumunun Belirlenmesi	51
4.6. Fajların Sıcaklık ve pH Stabilitesinin Belirlenmesi.....	53
4.7. Fajların <i>Cmm-DB3</i> İzolatı Üzerindeki İnhibisyon Yeteneklerinin Belirlenmesi ...	54
4.8. Phage33'ün Morfolojik Karakterizasyonu	59
4.9. Phage33'ün Nükleik Asit İzolasyonu	59
4.10. Genom Dizilenmenin Kalite Kontrolü	60
4.11. Phage33 Genomunun Özellikleri.....	60
4.12. Genom İçeriği.....	67
4.13. Filogenetik Analiz	68
4.14. Emülsiyon Formülasyonunun Geliştirilmesi.....	71
4.15. Emülsiyonun Karakterizasyonu.....	74
4.16. Emülsiyonun Yeşil Aksam Üzerindeki Etkinliğinin Belirlenmesi	76
5. TARTIŞMA	78
6. ÖNERİLER.....	89
KAYNAKÇA	90

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. Dünya domates üretiminde üretici ülkeler (bin ton).....	4
Tablo 2. 2. Türkiye domates üretiminin illere göre dağılımı (bin ton)	5
Tablo 2. 3. <i>Cmm</i> tanımlanmasında kullanılan bazı primerler	8
Tablo 2. 4. Bradley sınıflandırılmasına göre faj tipleri ve nükleik asit özellikleri	15
Tablo 2. 4. Ackermann'ın faj sınıflandırması	16
Tablo 2. 5. Gram pozitif bazı bakterilerin hücre duvarındaki reseptörleri	19
Tablo 2. 6. Gram negatif bazı bakterilerin hücre duvar reseptörleri.....	19
Tablo 2. 7. Domates bakteriyel hastalıklarına karşı faj uygulamaları	27
Tablo 3. 1. PZR reaksiyonu ve programı	39
Tablo 3.2. Phred kalite kontrol puanlarının hata oranları	43
Tablo 3.3. Optimizasyonda kullanılan faktörler ve seviyeleri	44
Tablo 3.4. Taguchi L ₁₆ Tasarımı	45
Tablo 3.5. Emülsiyonda kullanılan yağ çeşidi, emülgatörler ve karışımlarının HLB değerleri.....	45
Tablo 4. 1. Bakteriyel izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	49
Tablo 4.3. Phage33 ve benzerlik gösterdiği fajların açık okuma çerçevelerinin karşılaştırılması	62
Tablo 4.4. Phage33, Xylella phage Sano, Stenotrophomas phage Suzuki, Xylella phage Salvo, Xylella phage Bacata ve Xantohomonas phage Seregon'nun genom özelliklerinin karşılaştırılması	66
Tablo 4.5. Phage33 genomunda bulunan genler ve fonksiyonları.....	68
Tablo 4.6. Taguchi L16 ortogonal düzlemine göre bakteri inhibisyonu	72
Tablo 4.7. Emülsiyon koşullarına etki eden faktörlerin varyans analizi.....	73
Tablo 4.8. Optimum tasarım için tahmin edilen ve belirlenen değerler	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. <i>Cmm</i> 'nin hastalık belirtileri.	9
Şekil 2. 2. Tipik bir faj şekli.....	14
Şekil 4. 2. Patojenite testlerinde kullanılan bitkilerin 10. gündeki görüntüleri	50
Şekil 4. 3. Patojenite testlerinde kullanılan bitkilerin 15. gündeki görüntüleri	51
Şekil 4.4. Geniş konak aralığına sahip fajların plak görüntüsü	53
Şekil 4. 5. <i>Cmm</i> 'ye özgü fajların sıcaklık toleransı.....	54
Şekil 4. 6. <i>Cmm</i> 'ye özgü fajların pH toleransı.....	54
Şekil 4. 7. Faj24 tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen <i>Cmm</i> -DB3'ün büyüme eğrisi.....	55
Şekil 4. 8. Faj33 tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen <i>Cmm</i> -DB3'ün büyüme eğrisi.....	56
Şekil 4. 9. Faj41 tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen <i>Cmm</i> -DB3'ün büyüme eğrisi.....	56
Şekil 4. 10. Kokteyl D1 (Faj24 ve Faj33) tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen <i>Cmm</i> -DB3'ün büyüme eğrisi.....	57
Şekil 4. 11. Kokteyl D2 (Phage24 ve Phage41) tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen <i>Cmm</i> -DB3'ün büyüme eğrisi	57
Şekil 4. 12. Kokteyl D3 (Faj33 ve Faj41) tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen <i>Cmm</i> -DB3'ün büyüme eğrisi.....	58
Şekil 4. 13. Kokteyl D4 (Phage24, Phage33 ve Phage41) tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen <i>Cmm</i> -DB3'ün büyüme eğrisi.....	58
Şekil 4.14. Phage33'ün geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) görüntüsü.	59
Şekil 4. 15. İzole edilen DNA'nın agaroz jel görüntüsü	59
Şekil 4.16. Phage33 genom haritası.	61
Şekil 4.17. Phage33 genomunun benzer genomlar ile karşılaştırmalı gen dağılım analizi	67
Şekil 4.18. Phage33 tüm genom nükleotit dizisinin yakından ilişkili fajlar ve <i>Clavibacter</i> CMP1 ile filogenetik analizi	69
Şekil 4.19. Phage33, yakından ilişkili fajlar ve <i>Clavibacter</i> CMP1'in majör kapsid proteinine göre filogenetik analizi.....	70

Şekil 4.20. Phage33, yakından ilişkili fajlar ve <i>Clavibacter</i> CMP1'in portal proteine göre filogenetik analizi	70
Şekil 4.21. Phage33, yakından ilişkili fajlar ve <i>Clavibacter</i> CMP1'in terminaz büyük alt birim proteinine göre filogenetik analizi	71
Şekil 4.22. Emülsiyona etki eden faktörlerin sinyal gürültü oranı.....	73
Şekil 4.23. Emülsiyonu etkileyen faktörlerin etki oranı	74
Şekil 4.24. Emülsiyonun damlacık boyut dağılımı ve yüzdesi	75
Şekil 4.25. Emülsiyon faj formülasyonunun mikroskopik görüntüleri.....	76
Şekil 4.26. Emülsiyon formülasyonunun saksı denemeleri	77

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
VIRIDIC	: Virus Intergenomic Distance Calculator
VICTOR	: Virus Classification and Tree building Online Resource
MOI	: Hücre Başına Düşen Enfeksiyon Ünitesi (Multiplicity of Infection)
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
U	: Ünite
RNaz	: RNA'yı Kesen Enzim
DNaz	: DNA'yı Kesen Enzim
dNTP	: Deoksi Nükleotit Trifosfat
GC	: Guanin ve Sitozin
OD	: Optik Yoğunluk
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELİSA	: Enzim-bağlı immunosorbent test
ICTV	: Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
DLA	: Çift Katmanlı Agar
CRISPR-Cas	: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EPS	: Eksopolisakkarit
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
RNA	: Ribo nükleik asit

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artması, tarım ürünlerine olan ihtiyacı her geçen gün arttırmaktadır. İhtiyaçların karşılanması için tarım ürünlerindeki verim ve kalitenin artırılması gerekmektedir. Domates, dünyada olduğu gibi ülkemizde de yetiştiriciliği yapılan ekonomik değere sahip önemli bir tarım ürünüdür. Ülkemizde, Akdeniz ve Ege Bölgesi başta olmak üzere hemen hemen tüm bölgelerde domates üretimi yapılmaktadır. Üretim alanlarındaki verim ve kalite, çeşitli mikroorganizmaların (bakteri, virüs, fungus ve nematod) ve zararlıların (böcekler) olumsuz etkileri ile azalmaktadır.

Clavibacter cinsi, tarımsal öneme sahip ürünlerde hastalık oluşturan patojenleri içerir. Geleneksel fenotipik ve filogenetik sınıflandırmaya göre *Clavibacter michiganensis*'in cinse ait tek tür olduğu X. Li vd. (2018) tarafından belirtilmiştir. *Clavibacter michiganensis* konakçı özgüllüğü ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak alt türlere ayrılmıştır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (domateste) (Davis vd., 1984); *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (patateste) (Manzer ve Genereux 1981); *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (mısırdada) (Schuster 1975); *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* (buğdayda) (Carlson ve Vidaver, 1982) ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (yoncada) (McCulloch 1925) hastalık yapan alt türleridir. Son teknolojik gelişmeler, *Clavibacter michiganensis*'in yeni alt türlerinin izolasyonuna ve tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Fasulyelerde bakteriyel yaprak sararmasına neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* (González ve Trapiello, 2014) ve biberde bakteriyel kansere neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* tanımlanmıştır. Tian vd., (2021) tarafından yapılan çalışmada elde edilen DM1 izolatının biyokimyasal, fizyolojik, yağ asitleri ve genetik özellikleri incelendiğinde DM1 izolatının *Clavibacter* cinsinin bilinen diğer tür ve alt türlerinden farklı olduğu ortaya konmuştur. *Clavibacter zhangzhuyongii* şeklinde adlandırılarak, cinse ait yeni bir tür literatüre kazandırılmıştır.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ülkemizde domates yetiştiriciliğinde bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığına neden olarak önemli verim kayıplarına neden olan bir patojendir. Patojen, özellikle açıkta ve örtü altı yetiştiricilikte ciddi verim kaybına sebep olmaktadır. *Cmm* ile enfekte olan bitkiler, konukçu bitkinin yaşına, domates çeşidinin duyarlılığına, patojenin virülansına, sıcaklık ve nem dahil olmak üzere belirli çevresel koşullara bağlı olarak çeşitli semptomlar gösterir ve hastalığın ilerleyen dönemlerde bitkinin ölümüne neden olur (Peritore-Galve vd., 2020). Hastalıkla mücadelede kültürel, fiziksel ve kimyasal olarak önlemler alınmaktadır. Kimyasal önlemler kapsamında

bakırlı preparatların kullanımı, kalıntı problemi ve mikroorganizmaların bu kimyasallara karşı geliştirdiği direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır (de León vd., 2008). Ayrıca bakır içerikli kimyasalların uygulanması sadece bakteride direnç gelişimine neden olmakla kalmayıp, aynı zamanda çevrede kalıntı sorununa da yol açarak faydalı mikroorganizmalara da zarar vermektedir. Mevcut mücadele yöntemlerinin yetersizliği ve dezavantajlarından dolayı hastalıkla mücadelede alternatif mücadele yöntemlerine duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Çevreye, insana ve diğer mikroorganizmalara zarar vermeyen ve sadece konak bakteriyi enfekte etme özelliğine sahip olan bakteriyofajlar, bakteriyel hastalıklarla mücadelede oldukça güçlü biyolojik mücadele etmenleridir.

Clavibacter cinsine ait türler ve alttürler incelendiğinde, bu türlere spesifik sınırlı sayıda fajın izole edildiği görülmektedir. Ayrıca konağına karşı mücadele ajanı olarak kullanımlarına dair çalışmalar da sınırlıdır. Patateste halka çürüklüğü hastalığına sebep olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicusis*'i enfekte etme yeteneğine sahip CN1A fajı izole edilmiş ve komple genom analizi yapıp NCBI kaydı yapılmıştır. Yapılan çalışma ile faj CN1A'nin sadece genom özellikleri aydınlatılmış patojene karşı mücadele etmeni olarak kullanılabilme potansiyeli araştırılmamıştır (Kongari vd., 2013). Mısır bakteriyel hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*)'i enfekte debilen CN77, CN8, CN11, CNX ve CNRH fajları 1969-1973 yılları arasında farklı lokasyonlardan izole edilip saflaştırılmıştır (Vidaver, 1981). Wittmann vd., (2010) tarafından yapılan çalışmada, CN77 endolizin geni *Escherichia coli*' ye klonlanıp eksprese edilmiştir. Enzimin bakteriyolojik aktivitesi incelenmiş ve *Clavibacter michiganensis* alt türleri arasında sınırlı konakçı aralığı göstermekle kalmayıp, *Clavibacter* ile yakından ilişkili bakteri türlerini de etkilemediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak CN77 endolizinlerinin biyokontrol ajanı olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir. Ayrıca CN77'nin endolizinlerini içeren 3625 bp'lık litik gen kaseti dizilerek NCBI kaydı yapılmıştır. *Cmn*'nin sebep olduğu hastalıktan mısır tohumlarının korunması için CN8 fajı kullanılmıştır. CN8 fajı farklı polimerler (polivinilalkol, polimetilvinileter ve polivinilprilidon) kullanılarak hazırlanan formülasyonların mısır tohumlarının depolama, çimlenme ve hastalık kontrolü üzerindeki etkileri belirlenmiş, en etkili koruma yönteminin polivinilprilidon ile oluşturulan formülasyon olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma ile biyolojik sistemlerle uyumlu olan bakteriyofaj-polimer kaplamalarının, tarımda geleneksel uygulamalara alternatif olabileceği vurgulanmıştır (Kimmelshue vd., 2019). *Clavibacter michiganensis* alt türlerinden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına sebep olan bir patojendir.

Patojeni enfekte etme yeteneğine sahip ilk faj olan *Clavibacter* CMP1 Echandi ve Sun, (1973) tarafından izole edilip saflaştırılmıştır. Daha sonra, Wittmann vd., (2010) tarafından fajın endolizinleri saflaştırılıp *in-vivo* koşullarda etkinliği ortaya konmuş ve biyokontrol ajanı olarak kullanılabilceği rapor edilmiştir. 2011 yılında ise fajın komple genom analizi yapılmıştır (Wittmann vd., 2011). Literatürde domateste patojen olan *Cmm*'ye karşı başka bir faja rastlanmamıştır. Dolayısı ile *Cmm* üzerinde etkili fajların tespiti ve tanımlanmasına yönelik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Fajların doğadan kolayca izole edilmesi, üretim kolaylığı ve +4 derecede uzun süre muhafaza edilebilmeleri önemli avantajlarıdır. Bu avantajlara rağmen pratikte kullanımları ile ilgili bazı kısıtlamalar mevcuttur. Abiyotik faktörler (ultraviyole ışınlar, pH ve sıcaklık) bakteriyofajların etkinliklerinin azalmasına veya yok olmasına neden olmaktadır (Louws vd., 2001). Bakteriyofajların enkapsülasyonu gerçekleştirilerek oluşturulan koruyucu formülasyonlar ile bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak veya azaltmak mümkündür (Sadat Sadatrasul vd., 2017).

Yapılan literatür incelemesi, *Clavibacter* cinsi içerisindeki bakterilerin önemli tarım zararlıları olduğunu açıkça göstermektedir. Bu patojenlerle mücadelede çevre dostu ajanlar olan fajların kullanımı oldukça kısıtlıdır. Ülkemiz için ekonomik değeri yüksek ürünlerden olan domates bitkisinde hastalık oluşturan *Cmm* ile mücadelede, patojen spesifik fajların tespiti ve kontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli noktasında çalışmalar yapılmalıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Domatesin Önemi

Domates (*Lycopersicon esculentum* L.) Solanaceae familyasına ait, Türkiye’de ve Dünya’da yetiştiriciliği en yaygın yapılan sebze türlerinden biridir (Cemen vd., 2018). Anavatanı Orta ve Güney Amerika kıtası olduğu bilinen domates, günümüzde dünyanın birçok ülkesinde yetiştirilen, ekonomik değere sahip bir üründür. 2020 verilerine göre dünyada 186,821 milyon ton domates üretimi yapılmaktadır. Dünya domates üretiminin yaklaşık %37’lik kısmını Çin karşılamaktadır. Çin 64,76 milyon tonluk domates üretimi ile dünyada ilk sırada, Hindistan 20,57 milyon ton ile ikinci, Türkiye ise 13,2 milyon ton üretim ile üçüncü sırada yer almaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Dünya domates üretiminde üretici ülkeler (bin ton) (FAO ,2022)

Ülkeler	2016	2017	2018	2019	2020
Çin	57.313	59.179	60.919	62.870	64.768
Hindistan	18.732	20.708	19.759	19.007	20.573
Türkiye	12.600	12.750	12.150	12.842	13.204
ABD	12.877	11.139	12.613	12.162	12.227
Mısır	7.321	6.729	6.778	6.814	6.731
İtalya	6.438	6.016	5.798	5.778	6.248
İran	5.829	4.895	4.930	5.458	5.787
İspanya	5.234	5.163	4.769	5.001	4.313
Meksika	4.047	4.243	4.559	4.272	4.137
Diğer	46.992	47.202	47.956	48.811	48.833

Domates, yetiştiriciliği yapılan bölgelerde çiftçilerimiz için önemli gelir kaynaklarından biridir. 2021 yılı TÜİK verilerine göre Türkiye’de 32 milyon ton sebze üretimi içinde 13,1 milyon ton ile üretimi yapılan sebze domatestir. Karadeniz Bölgesi yoğun yağış alması nedeni ile domates üretimi için çok uygun olmadığından bu bölge dışında Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinde yoğun bir şekilde domates üretimi yapılmaktadır (Vural vd., 2000). Domates üretiminde ilk sırada Akdeniz bölgesi gelirken (32,7%) sonrasında Ege bölgesi (24,4%) takip etmektedir. Bu bölgelere ek olarak Marmara bölgesinin doğu ve

batisında da büyük oranda üretim yapılmaktadır. İller bazında sıralandığında Antalya'nın ilk sırada olduğu görülmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Türkiye domates üretiminin illere göre dağılımı (bin ton) (TÜİK, 2022)

İller	2018	2019	2020	2021	2022
Antalya	2.509	2.529	2.751	2.800	2.549
Bursa	1.362	1.492	1.335	1.349	1.431
Manisa	856	922	1.124	1.099	985
İzmir	947	1.014	1.092	1.022	855
Mersin	924	1.039	930	886	854
Konya	249	303	552	542	850
Çanakkale	583	605	627	581	612
Muğla	676	701	660	628	553
Balıkesir	420	445	486	417	512
Bilecik	71	81	84	82	75
Diğer	3.178	3.325	3.370	3.410	3.472
Türkiye	12.150	12.842	13.204	13.095	13.000

2.2. Türkiye’de Domates Üretimindeki Sorunlar

Ülke nüfusumuzun hızla artması ve artan nüfusun tarımsal ürünlere olan ihtiyacının karşılanabilmesi için ekim alanlarında verim ve kalitenin artırılması, sürdürülebilir bir sistemin oluşturulması gerekmektedir. Bununla birlikte, domates üretim alanlarında verim ve kaliteyi önemli ölçüde etkileyen abiyotik ve biyotik faktörler bulunmaktadır. İklim değişiklikleri (sıcaklık, ışık, rüzgâr), toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri, çevre kirliliği (kirleticiler, asit yağmurları) gibi abiyotik faktörler bitkinin büyüme ve gelişimini etkilemektedir. Biyotik faktörler ise bitkinin farklı fenolojik dönemlerinde gelişimine etki eden zararlı böcekler [Domates güvesi (*Tuta absoluta*), Tütün beyazsineği (*Bemisia tabaci*), İki noktalı kırmızı örümcek (*Tetranychus urticae*)], yabancı otlar ve patojen mikroorganizmalardır (bakteriler, funguslar, virüsler, nematotlar) (Damicone ve Brandenberger, 2015).

2.2.1. Patojen Mikroorganizmalar

2.2.1.1. Funguslar

Domates üretim alanlarında fungal etmenlerin oluşturduğu hastalıklar üretimde ciddi kayıplara neden olmaktadır. Domates üretim alanlarında görülen önemli fungal hastalık

etmenleri arasında *Alternaria solani* (erken yanıklık etmeni), *Septoria lycopersici* (septoria yaprak lekesi), *Colletotrichum coccodes* (antrakoz), *Erysiphe taurica* (domateste külleme), *Fulvia fulva* (yaprak küfü), *Phytophthora infestans* (geç yanıklık), *Botrytis cinerea* (kurşun küfü) ve *Sclerotinia sclerotiorum* (gövde çürüklüğü) bulunmaktadır. Fungal hastalıklarla mücadelede çeşitli stratejiler bulunmaktadır. Temiz fide kullanımı ve ekim nöbeti öncelikli stratejiler arasındadır. Bunun yanında hastalık etmenine göre çeşitli kimyasallar ve bunların kombinasyonlarının (maneb, mancozeb, chlorothalonil, bakır oksiklorür, kükürtlü bileşikler, propinep) kullanımı da önerilmektedir (Nashwa ve Abo-Elyou, 2012).

2.2.1.2. Nematodlar

Nematodlar, domates bitkisinde önemli bir zararlı grubudur. Parazit bir nematod olan kök düğüm nematodları bunların en önemlilerindedir. Toprak altında yaşayan nematodlar bitkinin toprak altı organellerini etkilediği için tespit edilmesinde ve mücadelesinde zorluklar yaşanabilmektedir. Mücadelede dirençli domates türlerinin kullanılması önerilmektedir. Parazit nematodlar konukçuya ihtiyaç duyduğundan konukçusu olmayan bitkilerin ekilmesi zararlı popülasyonunu azaltmaktadır. Bunun yanında yeşil gübre kullanımı, kimyasal nematosit ve fumigantların (metam sodyum, 1,3-dikloropropen aktif bileşenlerini içeren) kullanımı önerilmektedir (B. M. Santos vd., 2006).

2.2.1.3. Virüsler

Viral hastalıklar domates bitkisini farklı oranlarda etkileyerek ürün kayıplarına sebep olur. Domates mozaik virüsü (Tomato mosaic tobamovirus), sarı yaprak kıvrıcılık virüsü (Tomato yellow leaf curl virüs), domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt tospovirus) domateste önemli viral etmenlerdir. Bu etmenlerin en önemlisi domates lekeli solgunluk virüsüdür. Etmen, vektör böcekler (trips) ile yabancı otlara taşındığından konukçu çevresi oldukça geniştir. Mücadele stratejileri arasında birçok yöntem bulunmaktadır. Yetiştiricilikte virüsten arı sertifikalı tohumlar kullanılması, dayanıklı veya tolerant domates fidelerinin kullanımı ve konukçu olan bitkilerin yan yana ekilmemesi ile hastalık gelişimi önlenebilir (Ali vd., 2016).

2.2.1.4. Bakteriler

Bakteriler, domates ekim alanlarında verimi ve kaliteyi düşüren en önemli patojen mikroorganizmalardır. Bakteriyel etmenler tarafından enfekte edilen domateste, çevresel koşullar hastalık gelişimine katkı sağladığında verim ve kalite kayıplarının önüne geçmek oldukça zorlaşmaktadır. *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas*

syringe pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* domateste hastalık oluşturarak ekonomik kayıplara neden olan en önemli fitopatojenlerdir (Griffin vd., 2017; Nandi vd., 2018). *Ralstonia solanacearum* domates bakteriyel solgunluk hastalığına, *Xanthomonas vesicatoria* bakteriyel leke hastalığına, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* bakteriyel benek hastalığına ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ise bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına neden olmaktadır.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, ilk kez ABD'de 1909'da bildirildikten sonra dünya çapında yaygın olduğu tespit edilmiş ve domates yetiştiricileri için önemli bir sorun haline gelmiştir (Peritore-galve vd., 2021). Mücadele edilmediği takdirde %99'a varan verim kayıplarına neden olabileceği bildirilmiştir (Francis vd., 2001). Türkiye'de domates üretiminin yaygın olduğu Ege, Akdeniz ve İç Anadolu bölgelerinde patojenin yaygın olduğu, özellikle Batı Akdeniz bölgesinde 2003 yılında *Cmm*'nin sebep olduğu hastalığın görülme sıklığının %26 ile %65 arasında olduğu rapor edilmiştir (Basim ve Basim, 2004). Hastalığın ilerleyen dönemlerinde, bitkilerin %46 ile %93'ünün tamamen solarak kuruduğu bildirilmiştir. Bununla beraber, meyvede %10 ile %80 arasında değişen küresel verim kayıplarına neden olmakla kalmayıp meyve ağırlığında da %50 azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (Peritore-Galve vd., 2021). Bu nedenlerden dolayı *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, EPPO (Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü) bölgesinde A2 listesinde yer alan, karantina zararlısı olarak bilinen ve mücadele edilmesi gereken bir patojendir.

2.3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*), *Clavibacter* cinsine ait aerobik, spor oluşturmeyen gram-pozitif bitki patojeni bir aktinomisetidir (Gartemann vd., 2003). *Cmm*'nin tanımlanmasında gram reaksiyonu, katalaz aktivitesi, nişasta hidroliz testi, H₂S üretimi ve kazein hidrolizi gibi biyokimyasal testler, moleküler belirteçlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve enzim-bağlı immunosorbent test (ELISA) kullanılmaktadır (Kaneshiro vd., 2006). PZR ile tanımlamada kullanılan bazı primerler ve gen bölgeleri Tablo 2.3'te belirtilmiştir.

Tablo 2.3. *Cmm* tanımlanmasında kullanılan bazı primerler

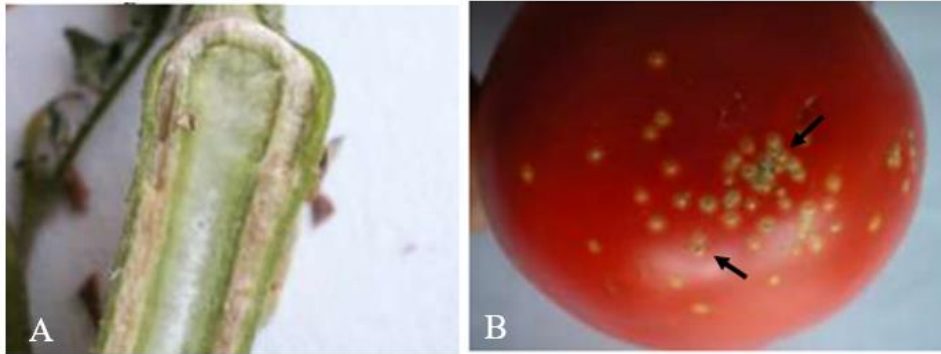
Primer	Sekans (5'→3')	Hedef Gen Bölgesi	Referans
<i>Cmm-5</i>	GCGAATAAGCCCATATCAA	<i>pat-1</i>	(Dreier vd., 1995)
<i>Cmm-6</i>	CGTCAGGAGGTCGCTAATA		
<i>Cmm-3</i>	CCTCGTGAGTGCCGGGAACGTATCC	<i>pCMI</i>	(Thapa vd., 2017)
<i>Cmm-4</i>	CCACGGTGGTTGATGCTCGCGAGAT		
cel-578up	ATGGCTTCCCTACGATCC	<i>celA</i>	(Jahr vd., 2000)
cel-2752low	ACAGGGTAGAAGCGGGAGG		

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı oluşturan önemli bir fitopatojendir (Gleason vd., 1993). Patojenin isimlendirilmesi yıllar içinde değişime uğramıştır. İlk başta *Bacterium michiganense* olarak adlandırılan patojen, daha sonra *Aplanobacter michiganense* olarak değiştirilmiştir. *Phytomonas michiganensis*, *Erwinia michiganensis*, *Pseudomonas michiganensis* ve *Mycobacterium michiganense* gibi adlandırmalar yapıldıktan sonra *Corynebacterium* cinsine dahil edilerek *Corynebacterium michiganense* olarak isimlendirilmiştir (Smith, 1910). Gleason vd., (1993) bakterinin hücre duvar yapısının aydınlatılması ile patojeni tekrardan sınıflandırmış ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak isimlendirilmiştir. Patojenin tespiti ilk olarak 1909 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Michigan eyaletindeki domates üretim alanlarında yapılmıştır (Gleason vd., 1993). O yıllardan günümüze kadar domates yetiştiriciliği yapılan pek çok alanda patojenin varlığı tespit edilmiştir. 1945'te Doğu Afrika'da, 1960'ta Kuzey Karolina'da, 1962 yılında ise Kenya'da ciddi ürün kayıplarına neden olmuştur (Sherf ve MacNab, 1986). Ülkemizde ise ilk kez Ankara'da (Bremer vd., 1952) tespit edilmiştir. Günümüzde başta Ege ve Marmara (Karahan, 1965) olmak üzere İç Anadolu (Tokgönül, 1998) ve Akdeniz bölgesinde (Louws vd., 2001; Basim ve Basim, 2004) domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda tespit edilmiştir.

Hastalık tohumla yayılırken tohum zarı ve kabuğunu geçerek tohumun iç kısımlarına ulaşabilir. Tohuma yüzeysel bulaşarak kotiledona, oradan yapraklara son olarak da vasküler sisteme ulaşabildiği belirtilmiştir (Özaktan ve Bora, 1991). Hastalık belirtileri, *Cmm*'nin domates bitkisine bulaş şekline göre farklılık göstermektedir. Patojenin enfeksiyon şekli sistemik ve lokal olmaktadır. Sistemik enfeksiyonlar tohum veya bitki bünyesinde açılan yaralardan bitkiye girerek gerçekleşir. Lokal enfeksiyonlar ise stoma gibi doğal açıklıklardan bitkiye girerek gerçekleşir. Hastalık belirtileri, tohumdan başlayıp iletim demetine geçer. İlk belirtiler solgunluk olarak ortaya çıkar ve sistemik enfeksiyonlarda bitki genç fide döneminde

ise hızlıca solar ve ölür, yaşlı ise solgunluk belirtileri genç fideye göre daha yavaş olur ve kademeli olarak ilerler. İletim demetlerinden boyuna bir kesik açıldığında iletim demetindeki değişimler gözle görülür. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde gövdede kahverengileşme ve çatlama meydana gelir (Gartemann vd., 2003). Gövde de meydana gelen bu kararma ve çatlama “Kanser” olarak adlandırılır (Şekil 2.1A) (Özaktan ve Bora, 1991). İletim demetinde meydana gelen hasar bitkinin yeteri kadar su ve besin alamamasına neden olarak bitkinin solmasına sebep olur. Lokal enfeksiyonlarda, yaprakta küçük lekeler ve nekrozlar oluşur. Hastalığın ilerlemesi ile yapraklardaki lekeler genişleyip tüm gövdeyi kaplayabilir (Çetinkaya Yıldız, 2007).

Patojen, meyve olgunlaşmasında farklılıklar oluşturmakla kalmayıp meyvenin olgunlaşmadan dökülmesine neden olur. Meyvelerde oluşturduğu hastalığın en tipik belirtisi 3-6 mm çaplı kabarık beyaz lekeler şeklinde başlayıp, ilerleyen dönemlerde açık kahverengi noktalar etrafında beyazımsı bir halkadır. Oluşan bu belirti “Kuş Gözü” lekesi olarak nitelendirilmektedir (Şekil 2.1B) (Yıldız ve Aysan, 2007).



Şekil 2.1. *Cmm*'nin hastalık belirtileri. A: *Cmm*'nin gövde de sebep olduğu hastalık belirtisi “Kanser”, B: *Cmm*'nin meyvede sebep olduğu hastalık belirtisi “Kuş Gözü”

Kaynak: (Yıldız ve Aysan, 2007)

Patojen, sistemik yayılan bir etmen olduğundan tohumla taşınmakla birlikte latent dönemde toprakta, toprak üzerine düşen bitki atıklarında yaklaşık iki yıl yaşayabilmektedir (Fatmi ve Schaad, 2002). Hastalığın taşınımı enfekte olmuş bitki atıkları, toprak, tohum ve yabancı otlar ile olmaktadır. Ayrıca etmen ile temas eden tohum ekme makinesi, budama makinesi ve aşılama makinesi gibi makineler ile de patojen taşınmaktadır (Gleason vd., 1991).

2.3.1. Patojen ile Mücadele Yöntemleri

Fitopatojenler ile mücadelede maksimum düzeyde verim ve kaliteli ürün elde edebilmenin yolu bitkilerdeki hastalık etmeninin belirlenmesi ve kontrol altına alınması için uygun mücadele yönteminin saptanmasıdır. Kullanılan mücadele yöntemi insan ve çevre sağlığı açısından değerlendirilmelidir. Bu anlamda patojen ile mücadele doğru zamanda ve uygun yöntemle yapılmalıdır.

Etkili bir mücadele yöntemi olmamasına rağmen, öncelikli olarak hastalıklı bitkilerin sökülüp imha edilmesi, hastalık semptomları gösteren seralarda konukçusu olmayan bitki türleri kullanılarak iki yıl ekim nöbeti uygulanması önerilen kültürel önlemlerdir. Ayrıca hastalık tohum ile bulaştığı için üretimde sertifikalı tohum ve fidelerin kullanılması da mücadelede önerilen yöntemler arasındadır.

Diğer bir mücadele yöntemi ise, bakırlı bileşikler kullanılarak yapılan kimyasal mücadeledir. Bakırlı bileşiklerin ve bazı antimikrobiyallerin (hidroksikinolin, streptomisin, tetrasiklin) hastalık insidansını azaltabildiği ancak bakteriler ile etkili bir şekilde mücadele sağlayamadığı bildirilmiştir (de León vd., 2008). Ayrıca, patojenin kullanılan bakırlı bileşiklere karşı doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemleri de dahil olmak üzere bir dizi direnç mekanizmasına sahip olduğu bilinmektedir (Sweere vd., 2019). Bakırlı bileşiklerin yoğun ve bilinçsizce kullanımı dirençli patojenlerin ortaya çıkmasına dolayısı ile kimyasal mücadele yönteminin etkinliğinin azalmasına yol açmıştır. de León vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, *Cmm* ile mücadelede 8-Hydroxy-quinoline ve bakır sülfatın birlikte kullanımı hastalık gelişimini kısa vadede önlediği ancak ilerleyen dönemlerde yapraktaki ve vasküler sistemdeki semptomlarda artış gözlemlendiği, patojenin direnç kazandığı ortaya konmuştur. Ayrıca 1980'ler ile karşılaştırıldığında yapılan çalışmalarda bitki patojeni bakterilerin bakır toleransının giderek arttığı açıkça belirtilmiştir (Raymaekers vd., 2020). Bakır bazlı antimikrobiyal pestisitlerin yaygın kullanımı, başta insan sağlığını etkilemekle birlikte bitkiler üzerinde de toksik etkileri mevcuttur. Bakırlı bileşiklerin ve bakır oksit nanopartiküllerinin aşırı uygulanması çeşitli tarımsal ürünlerde oksidatif strese, büyüme ve fotosentetik pigment bozulmasına neden olabileceği gibi çimlenmenin durmasına da neden olabilmektedir (Rajput vd., 2018; Tahjib-Ul-Arif vd., 2021). Ayrıca, bakırlı bileşiklerin kullanımının *Apis mellifera*'nın mortalite ve morbiditesini arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur (Abolaji vd., 2020).

Bakırlı bileşikler hastalıkla mücadelede kullanılmalarına rağmen, hastalığın mücadelesinde üreticinin etkili bir şekilde kullanabileceği ruhsatlı bir kimyasal bulunmamaktadır. Ticari önemi olan ürünlere yoğun bakır uygulamalarının yapılması toprakta bakır biriktirerek çevre üzerinde olumsuz etki göstermektedir (Ninot vd., 2002).

Kültürel önlemlerin yetersizliği, kimyasal mücadele yöntemlerinin dezavantajlarından dolayı tarımda kalitenin artırılması, çevrenin korunması ve sürdürülebilirliğin sağlanması için kimyasal mücadele yöntemlerine alternatif, çevre dostu, yeşil sentez ve biyolojik ajanları kapsayan mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bakteriyel Solgunluk ve Kanser hastalığının mücadelesinde son yıllarda önemli sonuçların alındığı biyolojik mücadele yöntemlerinin kullanılabilirliği çalışmalarda gösterilmiştir. Özaktan ve Bora (1991), domates meyvesinin etli kısımları, toprak ve çürük meyveleri karıştırarak bir fermentasyon ortamı elde etmiş ve buradan izole ettiği mikroorganizmaların *Cmm* üzerindeki antagonistik etkisini araştırmıştır. *Cmm* ile %100 kaplanmış tohumlara antagonistik bakteri uygulaması yapılmış ve bu oranın %6 ya düştüğü belirlenmiştir. Ek olarak yapılan tarla denemelerinde domates fidelerinde solgunluk belirtilerinin ise başlangıçla kıyaslandığında %75 engellendiği bildirilmiştir. *Streptomyces pulcher* ve *Streptomyces citrefluorescens*'in *Cmm* üzerindeki antagonistik etkisinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada, farklı dozlarda hazırlanan antagonistik bakteri filtratlarının *Cmm* gelişimini tamamen engellediği bildirilmiştir. Ayrıca, *Streptomyces pulcher*'in *Cmm* üzerindeki etkisinin belirlenmesinde tohum kaplama ve daldırma gibi farklı yöntemlerin tohum çimlenmesi ve hastalık şiddeti üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Tohum daldırma yönteminin çimlenme oranını kontrol grubuna göre artırdığı, hastalık şiddetini ise %57,1 oranında azalttığı belirlenmiştir (El-Abyad vd., 1993).

Boudyach vd., (2001) tarafından domates bitkisinin rizosferinden izole edilip saflaştırılan 178 bakteri izolatından 3 tanesinin öncelikle tohuma ardından fideye uygulaması yapılmış ve *Cmm* enfeksiyonlarını engellediği belirtilmiştir. Ayrıca *Pseudomonas* cinsi bakterilerin *Cmm* enfeksiyonları üzerinde etkili antagonistik ajanlar olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmaya benzer şekilde Umesha, (2006) yaptığı çalışmada antagonist *Pseudomonas fluorescens* uygulamasının tohum kalitesini iyileştirdiğini, tarlada bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı belirtilerinin azaldığını göstermiştir. Slusarski, (2005) yaptığı çalışmada 4 farklı antagonistik bakterinin, damlama suyuna verilerek *Cmm* üzerindeki etkisini test etmiş, sonuçta, hastalık şiddetinin düştüğü, ürün miktarının ise %7-17 oranında arttığını rapor etmiştir.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda hastalıkla mücadelede *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Aureobasidium*, *Pantoea*, *Bifidobacterium* ve *Saccharomyces* cinslerinin besin rekabeti, antibiyotik, siderefor üretimi ve bitkide dayanıklılığın uyarılması gibi farklı etki mekanizmaları ile bitki gelişiminde katkı sağlamakla kalmayıp aynı zamanda patojeni de baskıladığı belirtilmiştir (Abo-Elyousr ve Hassan, 2021; Jang vd., 2022). *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pantoea agglomerans* gibi toprak orijinli türleri içeren ürünlerin amino asit üretme özellikleri nedeniyle bitkinin kök bölgesine yerleşerek bitkinin klorofil ve karotenoid içeriğini artırmaya yardımcı olur. Bitki için faydalı olan mikroorganizma sayısının artması bitkinin sağlıklı büyümesine dolayısı ile hastalığa dayanıklı hale gelmesine neden olmaktadır (Shoda, 2000). Ancak uygulama alanlarında popülasyonlarının artması ve düşük spesifitesi nedeniyle uygulandıkları alanlarda faydalı mikroorganizmaların da büyümesini engelleyebildiği gözlenmiştir. Bu yüzden son yıllarda bakteriyel bitki hastalıklarıyla mevcut mücadele yöntemlerine alternatif olarak bakteriyofajların kullanımı önem kazanmıştır. Bakteriyofajların bakteri dışında hiçbir canlıyı enfekte etmemeleri ve sadece konak bakteriye spesifik olmaları bitki patojeni bakterilerin mücadelesinde kullanılabilme potansiyellerini artırmaktadır. Bununla birlikte, biyokontrol ajanı olarak kullanılacak bir fajın lizojeniden sorumlu integraz geni, antibiyotik direnç ve virülans genlerine sahip olup olmadığının ortaya konması gerekmektedir.

2.4. Bakteriyofajların Keşfi ve Tarihçesi

Bakteriyofajlar, bakterileri enfekte ederek hücre içinde çoğalabilen virüslerdir (Marks ve Sharp, 2000). "Bakteriyofaj" kelimesi Antik Yunanca'da bakterion 'bakteri' ve phagein, 'yemek' fiilinden türetilmiştir ve kısaca faj olarak adlandırılmaktadır.

Enfeksiyon sırasında bakterilere karşı yüksek bir özgüllük ile karakterize edilirler (Brüssow ve Hendrix, 2002). Fajlar, toprak, dışkı ve kanalizasyon gibi doğal ortamlarda çok yaygındır ve mevcut bakteri sayısı ile doğrudan ilişkilidir (Suttle, 2007). Sayıları yaklaşık 10^{32} olan fajlar Dünya'daki en bol "yaşam" formlarıdır (Buttimer vd., 2017).

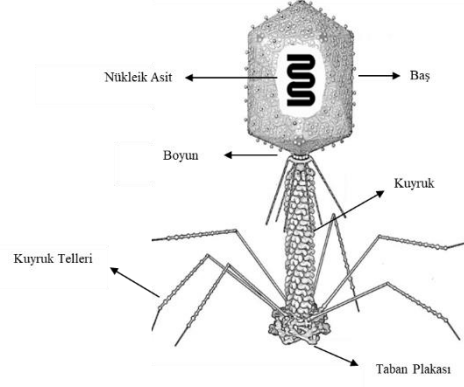
Fajlar 1915'te İngiliz patolog Frederick Twort ve Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Félix d'Hérelle tarafından keşfedilmiştir (Salmond ve Fineran, 2015). Ancak ilk gözlemlerin 1896'da Hankin'in, Hindistan'ın Jumna ve Ganges nehri sularında *Vibrio cholerae*'ya karşı antibakteriyel bir etkinin varlığını tespit etmesine dayanmaktadır. Nikolay Fyodorovich Gamaleya, yaptığı çalışmalarda benzer bir etkinin *Bacillus subtilis* üzerinde de olduğunu tespit etmiştir. Twort' da bu bilgileri dikkate alarak, fajların bakterileri enfekte etme

yeteneklerini ve bakteriyel enfeksiyona karşı terapötik potansiyellerini incelemeye başlamıştır. D'Herelle, fajların virüs olduğu konusunda ikna olsa da Bordet ve Gratia gibi dönemin önemli mikrobiyologları tarafından kabul görmemiştir. Fransız askerleri arasında salgın haline gelen dizanteri hastalığı fajların varlığının tespitinde başlangıç olmuştur. Bu hastalardan elde edilen dışkı filtratlarında dizanteri mikrobunun olmamasıyla fajların bilinmez yönleri keşfedilmeye başlanmış ve “görünmez mikrop” olarak adlandırılmışlardır. 1919’larda dizanteri tedavisinde fajların kullanıldığı belirtilmektedir (Ul Haq vd., 2012). Bu çalışmalar ile d’Herelle fajları ilk izole eden ve karakterize eden kişi olmuştur. Dizanteriden sonra tifo hastalığına karşı da faj tedavisi geliştirilmiştir (Atterbury, 2009). 1920’li ve 1930’lu yıllarda Gürcistan, ABD ve Fransa’da faj araştırma merkezleri kurularak faj tedavisinin geliştirilmesine odaklanılmış ve şirketler farklı hastalıklara karşı faj preparatlarını pazarlamaya başlamıştır. 1940’lı yılların başlarında Helmut Ruska tarafından fajların ilk kez elektron mikroskobu ile görüntülenmesi bilim dünyasına büyük katkı sağlamıştır (Letarov, 2020).

Antibiyotiklerin İkinci Dünya Savaşından sonra keşfi fajların kullanımına olan ilgiyi azaltsa da eski Sovyetler Birliği ve diğer Doğu Avrupa ülkelerinde yapılan araştırmalar devam etmiştir (Loc-Carrillo ve Abedon, 2011). 1976’da Walter Fiers grubu tek sarmallı RNA (ssRNA) genomuna sahip faj MS2’nin genom dizilemesini gerçekleştirmiştir (Fiers, 1976). Aynı yıllarda, Fred Sanger ve ekibi tarafından, ilk kez tek sarmallı DNA (ssDNA) genomu olan faj Φ X174 genomunu dizilenmiştir (Sanger vd., 1978). 1982’de ise faj λ 24’ün genom dizilemesi yapılarak ilk çift sarmallı DNA (dsDNA) genomu dizilenmiştir (Sanger vd., 1982). Bu çalışmalar geleceğe ışık tutmuş ve *E. coli*’den insana kadar birçok genom projesinin gerçekleşmesine temel oluşturmuştur. Bu nedenle, faj biyolojisinin yıllar içerisinde anlaşılması bilim dünyasındaki ilerlemelere ışık tutmuştur.

2.4.1. Faj Morfolojisi ve Sınıflandırması

Fajların uzunluğu 24-400 nm arasında ve genom büyüklükleri 18-400 kb arasında farklılık gösteren, elektron mikroskopisi ile yapıları incelenebilen organizmalardır. Fajlar genel olarak, genetik materyalin içinde bulunduğu kapsit (baş), boyun, kuyruk, kuyruğa birleşik halde taban plakası ve kuyruk liflerinden meydana gelmesine rağmen bazı fajlar farklı morfolojik özelliklere sahip olabilirler (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Tipik bir faj şekli

Kaynak: (Harada vd., 2018)

Kapsit, kapsomer adı verilen protein alt birimlerinin birleşerek bir araya gelmesiyle oluşur. Faj kapsitleri genellikle bir veya birkaç farklı proteinin kopyasından oluşan oldukça kararlı yapılardır. Genellikle ikosahedral simetriye sahiptirler. Nükleik asit ve onu çevreleyen kapsitin oluşturduğu yapı ‘nükleokapsit’ olarak adlandırılmaktadır. Fajın enfektif hale gelebilmesi için tam bir virüs partikülü oluşması gerekmektedir. Oluşan bu tam virüs parçacığı da ‘virion’ olarak adlandırılmaktadır. Virionun ana işlevi, genomun konak hücre tarafından ifade edilebilmesi için DNA veya RNA genomunu konakçı hücreye ileterek enfeksiyon döngüsünün başlamasıdır. Faj kuyruğu ve kapsit, adaptör görevi gören bağlayıcı (konnektör) ile birbirine bağlanmaktadır. Bağlayıcılar, birkaç proteinden oluşan hetero oligomerlerdir ve fajın yaşam döngüsü boyunca bazı görevleri vardır (Orlova vd., 2003). Bir tıpa görevi görerek faj genomunun kapsitten çıkışını engeller ve yüksek basınç altında genomun kapsit içerisinden sızmasını önler. Kuyruk içi boş bir tüptür ve fajın konak hücreye bağlandığını gösteren sinyal alındıktan sonra konnektör açılır ve genetik materyalin konağa salınmasına izin verilir (Plisson vd., 2007).







Kuyruk ve kuyruk fibrilleri, enfeksiyon işlemi sırasında viral nükleik asidin konak bakteriye girişini sağlayan vazgeçilmez faj elemanlarıdır. Kuyruk hem bir sinyal verici hem de enfeksiyon sırasında nükleik asidin konakçı hücreye iletildiği bir boru hattı görevi görür. Kuyruk yapıları kısa veya uzun olabilirken, kontraktil ve kontraktil olmayan kuyruklarda mevcuttur. Uzun kuyruklar tipik olarak sarmal simetri ile düzenlenmiş sadece birkaç proteinin birden fazla kopyasından oluşmaktadır. Tüm kuyruk türleri, kuyruğun uç kısmına eklenmiş dış uzantılara sahiptir ve genellikle birkaç lif ve bir uç içeren bir taban plakası veya bakterinin zar reseptörlerine özgüllüğü olan bir iğne içerir (Leiman vd., 2010). Taban plakası ve kuyruk lifleri, fajı bakteri dış zarına bağlar ve bağlanmayı geri döndürülemez hale getirir. Faj, konak

hücre reseptörüne kenetlendiğinde (geri dönüşümsüz bağlanması) faj konektörü açılır ve genom kuyruk tüpünden bakteri hücre sine salınır (Plisson vd., 2007).

Bazı fajlar kuyruk ve kuyruk fibrillerine sahip olmadıklarından bu tür fajlarda kapsit üzerindeki reseptörler konak hücreye tutunmadan sorumludurlar.

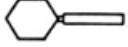
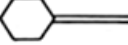








Fajların elektron mikroskobu ile incelenmeleri ve preparat hazırlama tekniklerinin gelişmesi sayesinde Bradley, (1967) tarafından 6 gruba ayrılmış ve ‘Bradley Sınıflandırması’ olarak adlandırılmıştır (Tablo 2.4) (Soykut ve Tunail, 2009).

Tablo 2.4. Bradley sınıflandırılmasına göre faj tipleri ve nükleik asit özellikler

Tip	Şekil	Nükleik Asit	Özellik	Örnek
A		dsDNA (Lineer)	Polihedral baş, kasılabilen kuyruk	T2, T4, T6
B		dsDNA (Lineer)	Polihedral baş, uzun ve kasılmayan kuyruk	T1, T5, λ T3
C		dsDNA (Lineer)	Polihedral baş, kısa kuyruk	T3, T7, P22
D		ssDNA(Sirküler)	İkozahedral baş, kuyuksuz, büyük kapsomer	ΦX174, S13
E		ssRNA (Lineer)	İkozahedral baş, kuyuksuz, küçük kapsomer	F2R17, Fr, MS2
F		ssRNA (Lineer)	Flamentöz	FE, fd, M13

Ackermann, (2007) tarafından fajların nükleik asit tipleri ve morfolojileri dikkate alınarak “Ackermann Sınıflaması” olarak adlandırılan sınıflama modeli geliştirilmiştir (Soykut ve Tunail, 2009). Bu sınıflandırmaya göre, *Caudovirales* takımı altında on familya yer almaktadır (Tablo 2.5).

Tablo 2.4. Ackermann'ın faj sınıflandırması

Şekil	Aile	Özellik
	<i>Myoviridae</i>	dsDNA,L ,Kasılabilen Kuyruk,
	<i>Siphoviridae</i>	dsDNA,L, Uzun ve kasılmayan kuyruk
	<i>Podoviridae</i>	dsDNA,L, Kısa kuyruk
	<i>Microviridae</i>	ssDNA,C, Polihedral kapsit
	<i>Corticoviridae</i>	dsDNA, C, Polihedral kapsit
	<i>Tectiviridae</i>	dsDNA,L,Polihedral kapsit
	<i>Leviviridae</i>	ssRNA,L,Polihedral kapsit
	<i>Cystoviridae</i>	dsRNA, L,S, Lipid zarf
	<i>Inoviridae</i>	ssDNA,C, Filamentöz
	<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA, C,T, Pleomorfik, Kapsit yok, Lipid zarf

ds:çift sarmal, ss: tek sarmal, L:Lineer ,C: Sirküler, S:Segmentli, T:süper helikal

Kaynak: (Ackermann, 2011)

Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV)'nin 2023'te yayınladığı rapora göre, morfoloji temelli sınıflandırmada ciddi değişiklik yaparak Myoviridae, Siphoviridae ve Podoviridae aileleri kaldırılmıştır. Yapılan revizyon ile bakteriyel virüslerin sınıflandırmasında genom özellikleri dikkate alınarak önemli değişiklikleri içeren bir kılavuz yayınlandı. İkosahedral kapsit ve dsDNA genomuna sahip kuyruklu fajlar ve arkeal virüsler *Caudovirales* yerine *Caudoviricetes* sınıfına dahil edilmiştir. *Caudoviricetes* (*Crassvirales*, *Kirjokansivirales*, *Thumleimavirales*, *Methanobavirales*) sınıfı artık dört takıma ayrılan 47 aile, 98 alt aile ve 1199 cins içermektedir.

Bu familyalardan *Peduviridae*; önceki sınıflandırmada *Myoviridae* familyasına ait kuyruklu zarfsız P2 benzeri fajları içermektedir. *Mesyanzhinovviridae* ise *Bordetella*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* cinslerinin suşlarını enfekte eden litik ve lizojenik Siphovirüsleri kapsar. Straboviridae familyası ise, T4 benzeri faj gruplarını içermektedir.

Virüslerin evrimsel ilişkilerini doğru bir şekilde yansıtan yeni taksonların oluşturulması ve faj taksonomisinin anlaşılması için daha duyarlı yaklaşımlar ve faj dizi analizi çalışmalarının artması ile gerçekleşecektir (Turner vd., 2023).

2.4.2. Fajların Çoğalması

Fajlar; hücre ve zar gibi yarı geçirgen yapılara, ribozom ve mitokondri gibi organellere, aktif bir metabolizmaya sahip değildirler. Bu nedenle, canlı bir hücrenin yokluğunda gelişemeyip çoğalamadıklarından hayatlarını konakçı varlığında devam ettirirler. Basit yapıları canlılardır ve sadece gerekli proteinlerin sentezinde ihtiyaç duyulan genetik bilgiyi taşırlar. Bu genetik bilgi ile konak metabolizmasını kendi hücre bileşenlerini sentezlemek için değiştirirler (Kurtboke, 2012).

Fajlarda zorunlu hücre içi parazitler olduklarından yaşam döngülerini devam ettirebilmek için bakteri hücrelerine ihtiyaç duyarlar (Rakhuba vd., 2010). Hayat döngüleri litik (virülan) ve lizojenik (ılıman) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

Fajların hayat döngüleri; tutunma, içeri alınma, sentez, replikasyon, genom paketlenmesi ve salınma olmak üzere 6 basamakta olup bu basamakları tamamlaması ile olur.

2.4.2.1. Tutunma (Attachment)

Fajın konak hücre yüzeyine adsorpsiyonu enfeksiyon sürecini başlatır ve faj proteinleri ile bakteri hücre yüzeyindeki reseptörler arasındaki etkileşimler ile fajın konakçıyı tanıması sağlanır. Bu nedenle faj adsorpsiyonu sadece virüs ile konakçı arasındaki ilk temas noktası olmakla kalmayıp aynı zamanda enfeksiyon sürecinde önemli bir adımdır. Bu temas fajın konak özgüllüğünü de belirlemektedir. Tutunma; ilk temas, geri dönüşümlü bağlanma ve geri dönüşümsüz bağlanma olarak 3 farklı şekilde gerçekleşebilir. İlk temas, faj ile konak arasındaki rastgele çarpışmadır. Geri dönüşümlü bağlanma da ise faj bakteri yüzey bileşenlerine tam anlamıyla bağlanmaz ve faj konakçıdan ayrılabilir. Bu bağlanma tipi, faj spesifik bir reseptör ararken fajın hücre yüzeyine yakın teması şeklinde açıklanmıştır. Geri dönüşümsüz bağlanma ise, fajın bakterilerin hücre duvarlarında, kapsüllerinde veya flagellalarında bulunan reseptörlere reseptör bağlayıcı proteinler ile bağlanmasıdır (Shin vd., 2012).

Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabakanın kalın olması fajların reseptörleri tanımasında zorluklara neden olduğundan gram pozitif bakterileri enfekte eden fajlar genellikle hücre duvarındaki polisakkarit yapıları tanıma özelliğindedir. Gram pozitif bakteri hücre duvarında bulunan tilekoik asitler, fajların tutunması için uygun reseptörlere sahiptirler (Bertozi Silva vd., 2016) (Tablo 2.6).

Gram-negatif bakterilerin hücre zarfında bulunan flagella, pilli ve kapsül gibi yapılarda fajlar için reseptör görevi görmektedir (Tablo 2.7). Flagella reseptörünü tanıyan faj, flagellanın sarmal hareketi ile bakteri hücre duvarına ulaşana kadar yüzey boyunca hareket eder (Guerrero-Ferreira ve Wright, 2013). Fajların kapsüllere adsorpsiyonuna, ekzopolisakkaritlerin enzimatik olarak bölünerek fajın hücre duvarındaki reseptörlere bağlanmasıyla sağlanır (Rakhuba vd., 2010).

Kuyruklu ve kuyuksuz fajların konağa tutunma yolları farklıdır. Kuyruklu fajların aksine kuyuksuz fajlar kapsitlerinde yer alan proteinler ile konak hücreye penetrasyon gerçekleştirir. Xiang vd., (2009) tarafından yapılan çalışmada kuyruklu fajlar da kuyruk fibrillerinin (tail fiber) hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanmada rolü olduğu belirlenmiştir. Faj kuyruk fibrilleri, çeşitli bakteriyel konakçılar tarafından etkili bir şekilde tanınmayı sağlar, bu da fajların dünya üzerindeki en bol ve çeşitli biyolojik varlıklar haline gelmesine neden olmuştur (Taslem Mourosi vd., 2022).

Tablo 2.5. Gram pozitif bazı bakterilerin hücre duvarındaki reseptörleri

Faj	Aile	Konak	Reseptör	Referans
φLC3	<i>Siphoviridae</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Hücre duvarı polisakkaritleri	(Kongari vd., 2013)
φ812	<i>Myoviridae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Teikoik asit anyonik bölge	(Xia vd., 2011)
Φ 13	<i>Siphoviridae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Teikoik asit üzerindeki GlcNAc	(Xia vd., 2011)
φSLT	<i>Siphoviridae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Lipoteikoik asit gliserofosfat bölgesi	(Kaneko vd., 2009)
φ29	<i>Podoviridae</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Teikoik asit	(Xiang vd., 2009)
Bam35	<i>Tectiviridae</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	N-asetil-muramik asit	(Gaidelyte vd., 2006)
γ	<i>Siphoviridae</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	GamR	(Davison vd., 2005)

Tablo 2.6. Gram negatif bazı bakterilerin hücre duvar reseptörleri

Faj	Aile	Konak	Reseptör	Referans
vB -SenM-S16	<i>Myoviridae</i>	<i>Salmonella</i>	Protein OmpC	(Marti vd., 2013)
SPN1S	<i>Podoviridae</i>	<i>Salmonella</i>	Lipopolisakkarit O- antijeni	(Shin vd., 2012)
φ13	<i>Cystoviridae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Lipopolisakkarit kesik O-zinciri	(Gaidelyte vd., 2006)
ES18	<i>Siphoviridae</i>	<i>Salmonella</i>	Protein FhuA	(Killmann vd., 2001)
Gifsy-1	<i>Siphoviridae</i>	<i>Salmonella</i>	Protein OmpC	(Ho ve Slauch, 2001)
MPK7	<i>Podoviridae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tip IV pili	(H. W. Bae ve Cho, 2013)
SPN2T	<i>Siphoviridae</i>	<i>Salmonella</i>	FliC	(Shin vd., 2012)
Vi I	<i>Myoviridae</i>	<i>Salmonella</i>	Vi ekzopolisakkarit kapsül asetil grup	(Pickard, 2009)

2.4.2.2. İçeri alınma (Penetrasyon)

Fajlar, konak hücre yüzeyine tutunduktan sonra hücre duvarını enzimatik aktivite ile bozarlar ve yüksek i basınç oluşturarak genetik materyallerini konaki hücrenin sitoplazmasına enjekte eder (Plisson vd., 2007). Kuyruk tipine göre penetrasyon basamağı bazı farklılıklar gösterir.

Uzun kasılabilen bir kuyruğa sahip olan faj T4, *E. coli* hücrelerini enfekte eden bir fajdır. Kılıf proteinlerinden oluşan kuyruğun ucu taban plakasına bağlıdır (Leiman vd., 2010). Taban plakası hücre yüzey reseptörlerine bağlandıktan sonra, plaka altıgen şeklini alır ve kuyruk taban plakasından kılıfa bir kasılma sinyali aktararak kılıfın kasılmasını tetikler. Kılıf, orijinal uzunluğunun yaklaşık yarısına kadar büzülür ve üretilen mekanik kuvvet, i kuyruk tüpünü, konaki hücrenin dış zarına nüfuz etmeye zorlar. Kılıf daha fazla bzlrek genetik materyali bakteri sitoplazmasına aktarır (Leiman vd., 2004).

Uzun kasılmayan kuyruğa sahip fajlarda konaki özgüllüğünün önemli belirleyicisi faj kuyruk ucu kompleksi (TTC) veya taban plakası yapılarıdır. TTC, reseptör tanıma ve genom salınımı için temel unsurdur ve bir zar protein reseptörü ile arasındaki etkileşimler doğrudan genomun salınmasını tetikler (Plisson vd., 2007).

Kuyruksuz bir faj olan Φ X174, konak LPS (lipopolisakkarit) tabakasına spike proteini ile tutunduktan sonra kapsid F proteinlerindeki konformasyonel değişiklikler ve viral H proteinleri tarafından oluşturulan tüpler yoluyla genomunu kapsitten çıkarır ve konak sitoplazmasına aktarır (Sun vd., 2017).

2.4.2.3. Sentez (Eklips)

Faj genomunu konak hücre sitoplazmasına enjekte ettikten sonra sentez aşamasına geçilir. Genom tipi ve nükleik asit yapıları farklılık gösterdiğinden sentez aşamasında da farklılıklar mevcuttur. Siphoviridae ailesine ait fajların replikasyonu genomlarında DNA polimeraz bulundurup bulundurmamalarına göre farklılık gösterir. Siphoviridae familyasına ait ds lineer DNA genomu bulundurması ve litik/lizojenik yaşam döngüsüne sahip olması nedeniyle model sistem olarak kullanılan faj λ hakkında bilgi verilmiştir.

Hücreye doğrusal bir biçimde giren birçok faj da olduğu gibi λ fajı da genomu oğaltılmadan viral genom uçlarını endonkleazlardan korumak ve replikasyon döngüsünü başlatmak için dairesel bir forma dönüşür. Dairesel forma dönüşme tamamlandığında fajın litik veya lizojeni durumuna geçiş sağlanır.

Faj λ , litik/ lizojenik döngünün aydınlatılmasında düzenleyici proteinler (CI ve CRO), promotörler (pR, pL ve pRM) ve operatörlerin (oR1, oR2 ve oR3) rolü önemlidir. Bu yapıların tümü, bağışıklık bölgesi olarak adlandırılan faj kromozomunun 5.4 kb'lik bir DNA segmentinde kodlanır. Faj, konak bakteriyi enfekte ettikten hemen sonra CI ve CRO proteinleri arasındaki rekabet, fajın litik veya lizojenik yollardan hangisini seçeceğini belirler. CI ve CRO proteinlerinden hangisi operatördeki uygun bölgeye bağlanırsa kendi proteinin sentezini indüklerken diğer proteinin sentezini bloke eder. CI proteinin sentezi artarsa faj lizojenik döngüye (konak kromozomuna entegrasyon), CRO proteinin sentezi artar ise faj litik döngüye girer (Strauch vd., 2007). Ayrıca, CI kendi sentezini de otomatik olarak uyarabilir. CI, oR2 operatör bölgesine bağlandığında, RNA polimerazın pRM promotörüne bağlanmasını indükleyerek hücrel CI konsantrasyonunu artırır. Yüksek konsantrasyonlarda CI, oR3'e bağlanarak pRM'yi baskılar. Bu oto-düzenleyici mekanizma ile, lizojenik hücrede CI seviyesinin sabit kalması sağlanır (Rabiey vd., 2020a) Cro proteininin lizojenik durumdan litik duruma indüksiyon sırasında kritik bir rol oynadığı bilinir. CI'den farklı olarak, Cro'nun pR, pL ve pRM'yi yalnızca negatif olarak kontrol ettiği bilinmektedir (Robb ve Shahrezaei, 2014). Litik döngüye giren fajın replikasyonu her iki zincirde eş zamanlı ilerler.

2.4.2.4. Replikasyon

Lambda DNA replikasyonu tek bir kökende başlar ve bu noktadan itibaren, enfekte olmuş hücrede onlarca daire birikinceye kadar daireden daireye (circle to circle) replikasyon oluşturmak için çift yönlü olarak ilerler ve daha sonra ise dönen daire (rollin cycle) moduna geçer. Lambda genomunda daireden daireye replikasyon "ori" bölgesinde başlatılır. O proteini ori bölgesini bağlar ve P proteini, O'yu bağlamanın yanı sıra konakçı replikasyon merkezinin DnaB alt birimine bağlanır. DnaB helikaz etkisi tek sarmallı bölgeyi genişletir ve öncü iplikçik sentezi için konakçı DnaG primazını görevlendirir. DnaB. DnaG, öncü iplik sentezi için konakçı DNA Pol III'ü uyarır. İki replikasyon çatalı, birleştirilmiş öncü ve gecikmeli iplik sentezine katılır ve bu, orijinden uzakta çift yönlü replikasyonla sonuçlanır. RNA primerleri Poly A'nin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini uzaklaştırır. Boşluklar aynı anda PolA'nın DNA polimeraz aktivitesi tarafından doldurulduktan sonra DNA ligaz tarafından kapatılır (Weigel ve Seitz, 2006).

2.4.2.5. Genom Paketlenmesi

Genom paketlemesinin başlatılması viral DNA'nın nasıl kopyalandığına bağlıdır. Kapsit oluşumu portal protein (konnektör), scaffolding protein ve major kapsit proteinin polimerizasyonu ile başlar ve prokapsit (prohead) adı verilen kapsit öncüllerini oluşturur. Olgun kapsid ile karşılaştırıldığında, prokapsit daha küçük, yuvarlak içi boş ve kalın protein kabuğa sahiptir. Portal protein, DNA girişi ve salınımı için olduğu kadar boyun proteinlerinin başa bağlanması için de gereklidir.

Prokapsit oluşumundan sonra etkinleşen olgunlaşma proteazları (maturation protease) genomik DNA için kapsit içinde yer açar. Genom, ATP hidrolizi ile DNA translokasyon motoru tarafından portal tepe noktası yoluyla prokapsid içine paketlenir. DNA paketlenirken, kapsit olgun kapsid haline gelir ve faj olgunlaşmasının son aşamasında dekorasyon proteinleri dış yüzeye eklenir.

Fajın genom paketlenmesi, büyük ve küçük terminazlar (terminase large subunit, terminase small subunit) olarak adlandırılan proteinler ile gerçekleşir. ATPaz ve nükleaz içeren büyük terminazın alt birimi DNA bölünmesinden ve prokapsid içine translokasyondan sorumludur. Küçük terminaz ise paketlemenin başlatılmasında rol oynar ve büyük terminazın ATPaz aktivitesini uyarır. İlk genom paketleme döngüsü tipik olarak faj DNA'sını spesifik olarak tanıyan ve DNA konkatemeri ilk kesimi yapmak için büyük terminazı görevlendiren küçük terminaz tarafından başlatılır. Paketleme döngüsünün sonunda büyük terminaz, paketlenmiş faj kromozomunu DNA konkatemeri geri kalanından ayırmak için bir kesim yapar. Motor/DNA kompleksi dolu kafadan çıkar ve bir sonraki paketleme döngüsünü başlatmak için başka bir DNA içermeyen prokapside bağlanır. Portal protein, virüs oluşumu sırasında DNA'nın kapsid içerisine girdiği ve enfeksiyon süreci sırasında dışarı çıktığı bir kanal oluşturur. Ayrıca, DNA paketleme motoru ve daha sonra baş tamamlama proteinleri için bir bağlanma bölgesi haline gelir. Kapsit oluştuktan sonra Siphoviridae familyasına ait fajlarda kuyruk bileşenleri faj kapsitinden bağımsız şekilde kuyruğu oluşturur ve viriyon oluşumunun son aşamasında kapsit ile birleşir.

Siphoviridae familyasına ait fajların kuyrukları, konakçının tanınmasından ve enfeksiyon sürecinin başlatılmasından sorumlu olan kuyruk ucu kompleksinden, genomik DNA için bir kanal oluşturan kuyruk tüpünden ve kuyruk düzeneğini sonlandırıp yeni bir genom oluşturan terminatör proteinlerden oluşur. Siphoviridae kuyruklarında, önce kuyruk ucu kompleksi birleşir ve kuyruk tüpü protein alt birimlerinin polimerizasyonu için bir platform görevi görür.

Tape measure protein (TMP) tüm kuyruk tüpünü kapladığından sinyal iletiminde görevlidir. Kuyruk tüp proteini (tail tube protein) ile de sinyal iletilir. TPM enfeksiyon sırasında DNA salınmadan önce kuyruk tüpünden çıkar. Kuyruk sonlandırıcı proteinler (tail terminator protein), faj düzeneği için kritik bileşenlerdir. Sonlandırıcı proteinlerin bulunmadığı kuyruklar kafalara bağlanamaz (Fokine ve Rossmann, 2014).

Kuyruk montajı sırasında taban plakası, kuyruğun silindirik bölümünün polimerizasyonunu başlatır. Kuyruğun silindirik kısmının polimerizasyonundan sonra sonlandırıcı proteinlerin bağlanması kuyruk düzeneğini tamamlar. Terminatör proteinler ise başa bağlı boyun proteinleri ile etkileşime girerek kuyruğun kafa ile ilişkisine aracılık eder. Baş ve kuyruk birleşmesi kendiliğinden gerçekleşir (Aksyuk ve Rossmann, 2011).

2.4.2.6. Salınma

Endolizinler, holinler ve spaninler faj üreme döngüsünün son aşamasında bakteriyel hücre lizisini kontrol eden, faj tarafından kodlanan membran proteinleridir.

Endolizinler, litik döngünün sonunda peptidoglikan tabakasının büyük oranda parçalanmasından sorumludur. Faj, lizis sisteminde sitoplazmada çok sayıda birikir ve sitoplazmik membrandaki gözenek oluşturucu holinler ile periplazmik boşluğa salınır. Hücre içindeki yüksek ozmotik basıncın da yardımıyla peptidoglikanın ani bozulması, hücre lizisine ve bununla birlikte yeni olgunlaşmış faj parçacıklarının salınmasına neden olur (Catalão vd., 2013).

2.5. Fajların Kullanım Alanları

Fajlar sahip oldukları konak özgüllüğü, teşhis araçları (faj tipleme), faj görüntüleme sistemleri ve aşı olarak kullanım potansiyelleri, konak genomuna entegrasyonları gibi özellikleri ile moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarına önemli katkı sunmaktadırlar. Antibakteriyellerin dezavantajları nedeni ile günümüzde her zamankinden daha fazla ilgi görmektedirler. Faj terapi insan ve hayvan sağlığından tarımda bitki hastalıklarına kadar birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.5.1. İnsan Sağlığında Fajların Kullanımı

Fajların aşılarda taşıyıcı olarak kullanılmaları insan sağlığı açısından en önemli kullanım alanıdır. Büyük ölçekte üretim kolaylığı, genetik modifikasyonları gerçekleştirme kolaylığı, antijen stabilitesi ve immünojenliği, hücresel ve humoral bağışıklığı uyarma

yeteneği gibi özellikleri fajların aşu geliştirmede kullanılabilme potansiyellerini artırmaktadır (Adhya vd., 2014).

İnsan beslenmesi için gerekli gıdaları (et, süt ürünleri, işlenmiş ürünler, sebzeler, meyveler) kontamine eden bakterilere karşı faj uygulamaları, konak bakteri hücrelerini enfekte ederek onları parçalayabilen ve sonuç olarak gıdada bulunan bakteri popülasyonunu ortadan kaldıracı litik fajlarla yapılmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Clostridium* ve *Staphylococcus aureus* gibi gıda kaynaklı bakterilerin fajlar ile kontrol edilebileceğini göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından onaylanan ve *Salmonella* spp.'ye karşı etkili altı farklı faj içeren SalmoFREE® ürünü, taze meyve, salatalık, tavuk ve hindi etleri gibi ürünlerde etkilidir (Magnone vd., 2013). EcoShield® adı ile piyasada mevcut olan ürün *Escherichia coli* ve shiga toksin üreten *Escherichia coli*'ye (STEC) karşı etkili bir faj preparasyonudur (Vikram vd., 2020). Ayrıca, taze ürünlerde, süt ürünlerinde, balıklarda ve yemeye hazır gıdalarda bulunabilen *Listeria monocytogenes*'e karşı spesifik bir faj kokteyli formülasyonu olan ListShield® gibi *Listeria* hedefli faj formülasyonları da mevcuttur (Svircev vd., 2018).

2.5.2. Hayvan Sağlığında Fajların Kullanımı

Gıda güvenliği çiftliklerde ve hayvancılığın yapıldığı ortamlarda başlamaktadır. Bu ortamlarda çok sayıda hayvan kapalı tutularak sürüler halinde muhafaza edildiğinden bulaşıcı hastalıklarla ilgili ajanların çoğalması ve hızla yayılması beklenen bir durumdur. Bu durumda hayvanlar, farklı zoonotik bakteriyel patojenler için rezervuar görevi gördüğünden besin zincirine dahil olup insanlarda hastalıklara hatta ölümlere neden olurlar. Hayvanın mamasına ve suyuna inoküle edilen faj süspansiyonları veya hayvanın yakın çevresine faj süspansiyonlarının indirekt uygulanması ile fajların patojen biyokontrolü için uygun bir alternatif haline gelebildiği bildirilmiştir (Endersen vd., 2014). Clavijo vd., (2019) yaptığı bir çalışmada *Salmonella*'ya karşı etkili olan faj preparatı SalmoFREE®'nin etkinliğini değerlendirmiş ve kontrol grubuna kıyasla 34. günde bakterilerin tamamen inhibe olduğunu gözlemlemiştir. Ma vd., (2012), fajın midenin asidik ortamında hayatta kalarak etkinliğini gösterebilmesi için *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili faj K'yı kalsiyum karbonatlı aljinat ile kapsüllemiş, kapsüllenmeyen grup ile kıyaslandığında kapsüllenen fajın mide asidinde daha uzun süre canlı kalabildiğini göstermiştir. Yapılan çalışmalar, bununda ötesine geçerek faj uygulamalarının transdermal, epidermal, subkutan, epikutanöz ve kas içine uygulanarak konağın mide asidine maruz kalmadan ve titresinde bir düşüş yaşanmadan organizmaya

verilebildiğini göstermiştir (Clavijo vd., 2019). Sonuç olarak, yapılan bu çalışmalar hayvanlarda hastalık oluşturan bakterilere karşı fajların kullanılabilirliğini açıkça ortaya koymaktadır.

2.5.3. Bitki Hastalıklarına Karşı Fajların Kullanımı

Bitki hastalıklarına karşı fajlar, ilk kez Mallman ve Hemstreet (1924) tarafından *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'in lahanalarda oluşturduğu çürüklerden elde edilen filtratlarda tespit edilmiştir. Daha sonra, Moore (1926) fajların bitki hastalıklarında kontrol ajanları olarak kullanılabileceğini öne sürmüştü ve fajların *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'nin neden olduğu mısır solgunluğu hastalığının insidansını düşürebileceğini göstermiştir. Buna rağmen, faj terapisinin bitki hastalıklarının kontrolü için güvenilir ve etkili bir yöntem olduğu ispatlanamadığından gereken ilgiyi görmemiştir. Ayrıca, ilerleyen yıllarda, kimyasal kontrol ajanlarının ortaya çıkması ve bitki hastalıklarının mücadelesinde kullanılmaya başlaması fajlara olan ilgiyi azaltmıştır. Günümüzde ise kimyasal kontrol ajanlarının oluşturdukları yan etkiler fajlara olan ilgiyi yeniden gündeme getirmiştir. Ülkemiz için önemli gelir kaynağı olan domateste *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp. ve *Ralstonia* spp.'nin sebep olduğu bakteriyel hastalıklarla mücadelede fajların kullanımının temelleri 1990'lara dayanmaktadır. Günümüzde de domates bakteriyel hastalıklarına karşı faj çalışmaları hızla devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda, *Xanthomonas vesicatoria* ve *Xanthomonas euvesicatoria*'ya ile mücadelede spesifik fajların kullanımı sadece *in-vitro* denemelerde kalmıştır (Gašić vd., 2011a; Kizheva vd., 2021). Domateste hastalık oluşturan diğer bir zararlı olan *Ralstonia solanacearum*'a spesifik fajlar izole edilip saksı ve sera denemeleri yapılmıştır (Addy vd., 2012; Elhalag vd., 2018; Sahidin, 2018; Umrao vd., 2021) (Tablo 2.8). Bununla beraber domates bitkisinde hastalığa neden olan *Cmm*'nin mücadelesinde fajların kullanımı oldukça sınırlıdır. *Cmm*'yi enfekte etme yeteneğine sahip *Clavibacter* CMP1 fajı ilk olarak 1972'de Kuzey Karolina'da yaz aylarında *Cmm* ile yoğun şekilde enfekte olan tarlalarda kuru domates saplarından izole edilmiştir. Daha sonra Wittmann vd., (2011) tarafından *Clavibacter* CMP1 fajının genom özellikleri ortaya koyulmuş ve fajın endolizinleri saflaştırıldıktan sonra *in-vitro* denemeler ile sadece konağına karşı yüksek özgüllük gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak CMP1 fajına ait endolizinlerin *Cmm* ile mücadelede kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca 2018 yılında Kuzey Amerika'da OmniLytic firması tarafından *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı 'AgriPhages-Cmm' isimli ticari formülasyon ruhsatlandırılmıştır. Formülasyon 1×10^{12} pfu/L *Cmm* bakteriyofajı içeren sıvı bir formülasyondur. Aynı firma tarafından 2022 yılında ürün içeriğindeki faj miktarı $3,8 \times 10^{12}$ pfu/L olarak revize edilmiştir. *Cmm*'nin mücadelesinde AgriPhage dışında ortaya koyulmuş herhangi bir faj formülasyonu mevcut değildir. Hali hazırda ticari bir ürün bulunmasına rağmen, fajların suş spesifik olabileceği de düşünüldüğünde mevcut ticari ürünün ülkemizde hastalığa neden olan *Cmm* suşları üzerindeki etkinliğinin düşük olması muhtemeldir. Bu nedenle, ülkemizde hastalığa neden olan *Cmm* suşlarını enfekte etme yeteneğine sahip yerli faj izolatlarının tespiti ve biyopreperat olarak geliştirilmesi gerektiği açıkça görülmektedir.

Tablo 2.7. Domates bakteriyel hastalıklarına karşı faj uygulamaları

Patojen	Faj	Strateji	Sonuç	Referans
<i>Ralstonia solanacearum</i>	PE26	Plak assay	Farklı <i>R.solanacearum</i> türleri üzerinde yüksek etkinlik	OmniLytics 2006
	PE204	Domates üretim alanlarına rastgele uygulama	Hastalığın tamamen inhibisyonu	(Y. J. Bae vd., 2012)
	vRsoP-WF2, vRsoP-WM2 vRsoP-W	Sulama sistemleri ile uygulama	Hastalık semptomlarında ciddi düşüş	(Álvarez vd., 2022)
	φRSL1	Saksı uygulaması	Konak bakteri hücre yoğunluğunda hızlı azalma	(Yamada vd., 2007)
	φsp1	Tohum uygulaması	Biyofilm oluşumunu önleme	(Umrao vd., 2021)
	φRSM3	Saksı uygulaması	Konak hücrelerde fizyolojik değişiklikler ve virülans kaybı	(Addy vd., 2012)
	RsPod1EGY	Sera denemesi	Hastalık semptomlarında tamamen baskılanma	(Elhalag vd., 2018)
	J2	Toprak uygulaması	Topraktaki patojen miktarının azaltılması ve enfekteli domates bitkilerinin solmasının önlenmesi	(Bhunchoth vd., 2015)
	J2 + φRSB2			
	6 farklı faj	Sera koşullarında rizosfere uygulama	Solgunlukta % 20 azalma	(Kalpage ve De Costa, 2015)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Faj karışımı	Tarla ve sera uygulamaları (mısır unu, yağsız süt tozu ile formüle)	Sera denemelerinde hastalık şiddetinde %30-62'ye varan azalma. Tarla denemelerinde hastalık şiddetinde %12-43'e varan azalma	(Flaherty vd., 2000)
	Faj kokteyli	Tarla uygulaması (harpin, ASM kombine)	Hastalık ilerlemesinde azalma ve meyve veriminin iyileştirilmesi.	(Obradovic vd., 2004)
	Faj kokteyli	Tarla ve sera uygulaması	Tarla uygulamalarında hastalık şiddetini %17 oranında azaltma. Sera uygulamalarında hastalık insidansının azalması	(Flaherty vd., 2000)
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Kφ1, Kφ2, Kφ3, Kφ4, Kφ5, Kφ6,	Plak assay	59 <i>X. euvesicatoria</i> suşunda şeffaf plak oluşumu.	(K. Gašić vd., 2011a)
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	SfXv124t/1,S Xv124t/2, SfXv124t/3	Farklı <i>Xanthomonas vesicatoria</i> suşları üzerinde plak assay	Bazı suşlarda şeffaf plak	(Kizheva vd., 2021)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CMP1	<i>Cmm</i> üzerinde fajların endolizin aktivitesi	<i>Cmm</i> üzerinde endolizinlerin yüksek etkinliği	(Wittmann vd., 2010)

2.6. Bitki Hastalıklarına Karşı Faj Kullanımının Avantajları ve Dezavantajları

Fajların sadece konak bakteri varlığında çoğalabilmeleri, bakteri hücrelerini enfekte ettikçe popülasyonunu artırma yeteneğine sahip olmaları, toprak, su ve bitki materyallerinden kolayca izole edilebilmeleri, ökaryotik hücreler için toksik olmamaları, uygulama alanlarında floranın diğer üyeleri üzerinde zarar oluşturmamaları gibi özellikleri faj terapide kullanılabilme potansiyellerini artırmaktadır (Gill ve Abedon, 2003; Jones vd., 2008; Choińska-Pulit vd., 2015).

Bu avantajların yanında kontrol ajanı olarak kullanılmalarda karşılaşılabilecek iki önemli sorun mevcuttur. Bunlardan ilki, bakterilerin fajlara karşı direnç geliştirebilme durumudur (Jones vd., 2008). Enfeksiyon döngüsünün çeşitli noktalarında konak bakteri, fajın çoğalmasını önlemek için hücre yüzeyinde fajın tutunmasını önleyecek stratejiler geliştirebilir (Koskella vd., 2012). Örneğin, *Erwinia amylovora*'nın ürettiği ekzopolisakkaritler (EPS) hücre yüzey reseptörlerinden uzakta fiziksel bir bariyer oluşturarak fajın tutunmasını engeller (Hyman ve Abedon, 2010). Bakteriler tarafından geliştirilen diğer mekanizmalar; DNA replikasyonu ve transkripsiyonunun engellenmesi, CRISPR/Cas immün sistem ve restriksiyon-modifikasyon sistemleri, faj proteinlerinin sentezine müdahaledir. Fajlar ise bu direnç mekanizmaları ile baş edebilmek için bakteri hücre yüzeyindeki EPS'leri tanıyıp degradasyon sağlama ve bakteriyel restriksiyon modifikasyonlarından kaçınmak için bakteriyel metilazlar ile genom modifikasyonu gibi bazı stratejiler geliştirmektedir (Labrie vd., 2010). Ayrıca, bakteriyel direncin oluşmasını engellemenin bir diğer yolu fajların kokteyl şeklinde kullanımınıdır (Kering vd., 2019; Sabri vd., 2021). Tek bir faj tipinin uygulanması (monofaj tedavisi), bakterilerin o faja karşı direnç geliştirmesini kolaylaştırabildiğinden birden fazla faj tipinin aynı anda kullanılması (polifaj tedavisi veya faj kokteyli yöntemi) faja dirençli bakteriyel mutantların gelişimini engelleyebilmektedir (Deveau vd., 2002). Ayrıca, faj kokteyli içerisinde yer alan fajlar, sinerjistik etki göstererek yüksek patojen lizisine neden olmaktadır. Yapılan çeşitli tarla denemelerinde, bazı faj dirençli mutantların ortaya çıktığı, enfeksiyonun tam olarak yok edilmesi için faj kokteyllerinin kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Ramírez vd., 2020b; Molina vd., 2021). Wei vd., (2017) patateslerde bakteriyel solgunluk hastalığına neden olan *Ralstonia solanacearum*'a karşı faj ve faj kokteyli ile tedavinin etkisini incelemiş ve her biri farklı konak spektrumuna sahip altı fajın kombinasyonu, tek tip fajla karşılaştırıldığında hastalık şiddetinde yaklaşık %40 azalma sağlamıştır. Sonuç olarak, fitopatojenik bakteriler ile mücadelede fajların kullanımının önündeki bakteriyel direnç engeli faj kokteyllerinin kullanılması ile önlenebilmektedir.

Fajların, biyokontrol ajanı olarak kullanımındaki ikinci dezavantaj ise abiyotik faktörlerden olumsuz etkilenmeleridir. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar fajların ultraviyole ışınlar, yüksek sıcaklık ve toprak pH'sındaki değişiklikler gibi çevresel faktörler nedeniyle inaktive olabileceğini göstermiştir (Katarina Gašić vd., 2018). Bu nedenle fajların biyokontrolde başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için etkinliklerini koruması gerektiğinden çeşitli uygulama stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Balogh vd., 2003). Fajların bitki patojeni bakterilere karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılmalarında fajların çeşitli koruyucularla karışımı ile elde edilmiş kokteyllerin kullanıldığı yapılan bazı çalışmalar mevcuttur.

Balogh vd., (2003) tarafından *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*'nın mücadelesinde XYZ fajını tek başına ve casecrete (protein polimeri) ile karıştırarak arazi koşullarında ayrı ayrı denemiş ve tek başına faj uygulamasının %20, casecrete ile karıştırılan fajın ise hastalık gelişimini %43 önlediği belirlenmiştir. Tewfike ve Desoky, (2015) *Xanthomonas axonopodis*'e etkili fajları benzer şekilde mısır unu ve süt tozu ile karıştırarak etkinliklerini sera ve arazi koşullarında test etmiştir. Sera koşullarında en yüksek etkiyi mısır unu ile karıştırarak uyguladığı fajlarla (hastalık şiddetinde %20,5 azalma), arazi koşullarında ise en yüksek etkiyi süt tozu ile karıştırarak uyguladığı fajlarla (hastalık şiddetinde %32,2 azalma) elde etmiştir. Bunların dışında arazi koşullarında fajların etkinliğini artırmak içinde bazı çalışmalar yapılmıştır. Orynbayev vd., (2020) yaptığı *in vitro* çalışmada UV koruyucuların faj canlılığı üzerine olan etkisini incelemiştir. Yüksek koruyuculuk sağlayan süt tozu, askorbik asit ve riboflavinin etkinliği sera koşullarında test edilmiş, süt tozu ve riboflavinin faj canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Obradovic vd., (2004) bakırlı preparatlar ve direnç azaltıcılar (harpin protein, acibenzolar-S-methyl) ile fajların karıştırılarak birlikte kullanılabilmesini göstermiştir. Jagdale ve Kapadnis, (2021) gerçekleştirdiği çalışmada, 4°C ve 30°C sıcaklıklarda saklanan farklı sıvı formülasyonlardaki PRΦL2 ve SSΦL8 fajlarının raf ömrünü ortaya koymuştur. Karboksi metil selüloz (%0,5), çözünebilir nişasta (%0,5%), melas (%0,5) ve beyazlatıcı kil (%0,5) kullanarak ayrı ayrı sıvı formülasyonlar geliştirmiş, beyazlatıcı kil kullanılan formülasyonun raf ömrünü uzattığı ilk kez rapor edilmiştir. Faj uygulamalarında diğer önemli bir konu ise uygulama sıklığı ve zamanıdır. Katarina Gašić vd., (2018) biber yapraklarında meydana gelen bakteriyel leke hastalığı ile mücadelede KΦ1 fajı ve KΦ1+bakır hidroksit kombinasyonunu, ayrı ayrı uygulamış ve uygulamaların hastalık belirtilerini geriletmediğini bildirmiştir. Ayrıca, KΦ1+bakır hidroksit uygulamasının sadece faj kullanılan gruba göre bakteri üzerinde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Leverentz vd., (2004)

yaptığı çalışmada uygulanacak faj konsantrasyonu ve uygulama zamanının belirlenmesi için optimizasyon çalışması yapmış, uygulanacak faj titresinin en az 10^8 pfu/ml olduğu ve bakteri uygulamasından 1 saat önce faj uygulanmasının en etkili sonucu verdiğini göstermiştir. Iriarte vd., (2007) bitki hastalıkları ile mücadelede süt tozu ile karıştırılan fajın, tek başına kullanılan faja göre hastalık kontrolünde daha etkili olduğunu, ayrıca etkili sonuçlar alabilmek için uygulamaların sabah gerçekleştirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

2.7. Enkapsülasyon Teknolojisi ve Fajlar

Fajları abiyotik faktörlerden korumak ve stabilitesini artırarak raf ömrünü uzatmak amacıyla enkapsülasyon teknolojisi sıklıkla kullanılır (Obradovic vd., 2004). Enkapsülasyon bir maddenin kaplama materyali içine hapsedilmesi esasına dayanan bir teknolojidir. Hapsedilen kısım iç faz, aktif faz veya öz olarak, kaplama materyali ise dış faz, taşıyıcı veya kabuk olarak adlandırılır. Enkapsülasyon etkinliği ve depolama süresince stabilitesi büyük oranda kaplama materyalinin kompozisyonuna bağlıdır. İdeal bir kaplama materyali;

- Ürünün reolojisinde olumsuz bir etkiye neden olmamalı,
- Aktif madde ile kimyasal olarak reaktivitesi olmamalı,
- Aktif maddeyi olumsuz çevre şartlarına karşı korumalı,
- İstenilen solvent ile çözünebilir olmalı,
- Ucuz ve kullanımı kolay olmalıdır. (Desai ve Park, 2005; Madene vd., 2006)

Fajların enkapsülasyonunda, son ürünün istenen özelliklerine bağlı olarak aljinat, pektin, kitosan, maltodekstrin, akasya gamı, sükroz, trehaloz, mannitol, selüloz, kitosan, karragenan, peyniraltı suyu, jelatin, sükroz, riboflavin gibi biyopolimerler kullanılır (Jyothi vd., 2010; Gbassi ve Vandamme, 2012; Choińska-Pulit vd., 2015). Bununla birlikte kaplama materyalinin seçimi ve enkapsülasyon yöntemi birbirine bağımlı parametrelerdir. Enkapsülasyon yönteminin seçimi, fajın fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve kullanım alanına bağlı olarak değişebilmektedir. Fajlar protein yapıda olduklarından proteinleri denatüre ettiği bilinen organik çözücüler, yüksek sıcaklık, pH ve iyonik kuvvet gibi faktörlere karşı hassastırlar (Puapermpoonsiri vd., 2010). Ayrıca, karıştırma ve çalkalama sırasındaki kayma gerilimleri, püskürtme sırasındaki atomizasyon ve kurutma sırasında kuruma gerilimleri dahil olmak üzere kapsülleme sırasındaki mekanik gerilimlerin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir (Malik vd., 2017).

Enkapsülasyon yöntemi;

- Ürünün istenen partikül boyutu,
- Fajın fiziksel ve kimyasal özellikleri
- Kaplama materyalinin fiziksel ve kimyasal özellikleri
- Kapsüle edilen materyalin kullanım alanı
- Endüstriyel ölçekte uygulanabilirliği ve
- Üretim maliyetine göre farklılık gösterebilir (McClements ve Decker, 2000).

2.8. Enkapsülasyon Yöntemleri

İnsan sağlığında fajların kullanımı ve enkapsülasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Tablo 2.9). Bununla birlikte, bitki patojeni bakterilerin mücadelesinde kullanılabilecek fajlar tespit edilmesine rağmen enkapsülasyonları ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

2.8.1. Dondurarak kurutma (Freeze-drying)

Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemi düşük basınçta ve vakum altında suyun süblime edilerek uzaklaştırılmasına dayanan bir enkapsülasyon yöntemidir (Merivaara vd., 2021). Bu teknik birçok alanda olduğu gibi biyolojik materyaller ve virüsler içinde uygulanabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Puapermpoonsiri vd., 2009; Alfadhel vd., 2011). Imm ve Chang, (2023) tarafından yapılan çalışmada *Cronobacter sakazakii*'yi enfekte etme yeteneğine sahip SG01 fajı farklı oranlarda kollajen peptit/trehaloz karışımları kullanılarak liyofilize edilmiş, %5 kollajen peptidi ve %1 trehaloz karışımı kullanılan durumda faj stabilitesinin sağlandığı, titresinde önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. *Acinetobacter baumannii*'yi konak olarak kullanan AB2 fajının liyofilizasyonunda glikoz, sükroz, trehaloz, dekstran 500, manitol ve ksilitol kullanılarak kurutma işleminin etkinliği test edildi. Sükroz kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada faj stabilitesinin ve canlılığının en yüksek olduğu sonucuna varıldı (Zheng, 2023). Yapılan çalışmalar, faj ürünlerinin liyofilizasyonla enkapsülasyonlarının gerçekleştirilebildiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, düşük sıcaklık ve basınç, yüksek enerji tüketimi ve yüksek bakım/operasyon maliyetleri nedeniyle enkapsülasyon teknikleri arasında en pahalı proseslerden biridir (Duan vd., 2016).

2.8.2. Püskürterek Kurutma (Spray-drying)

Püskürterek kurutma, sıvı örneğin (çözelti, emülsiyon, süspansiyon) sıcak kuru gaz ile temas ederek ortama toz ürünlerin püskürtülmesine olanak veren bir teknolojidir. Kurutma

işleminde kuru gaz olarak hava tercih edilir. Püskürterek kurutma, ekonomik ve etkili teknolojisini nedeniyle tercih edilen mikro kapsülleme işlemidir. Bu yöntemin dezavantajı suyun buharlaşması için gereken yüksek sıcaklığın fajlar için uygun olmayışıdır (Gbassi ve Vandamme, 2012). Müller-Merbach vd., (2005) tarafından yapılan çalışmada fajların termal strese duyarlı olduğundan standart püskürtmeli kurutma işleminin fajları etkisizleştirdiği rapor edilmiştir. Matinkhoo vd., (2012) tarafından yapılan çalışmada ise düşük sıcaklıkta sprey kurutma işlemi gerçekleştirilerek *Burkholderia cepacia*'ya spesifik (KS4- M, KS14, ΦKZ/D3 ve ΦKZ/D3/KS4-M) fajların toz formülasyonları elde edilmiş, düşük sıcaklıkta püskürterek kurutma yönteminin kabul edilebilir olan 1 log pfu/mL'den daha düşük bir titre kaybına yol açtığı belirlenmiştir.

2.8.3. Ekstrüzyon (Exrusion)

Ekstrüzyon yöntemi mikroorganizmaların hidrokolloid kapsül içerisine enkapsülasyonunu sağlayan basit, ucuz, biyouyumlu ve yaygın yöntemdir. Yöntemde mikroorganizma bariyer özellikteki hidrokolloidler içine yavaş bir şekilde difüze edilerek süspansiyon haline getirilir. Daha sonra bir şırınga yardımı ile kalsiyum klorür gibi sertleştirme çözeltisi içerisine damlatılması sonucu elde edilir (Heidebach vd., 2009). Tang vd., (2013) tarafından yapılan çalışmada fajları kapsüllemek için ekstrüzyon yöntemi kullanılmış ve Felix O1 fajı aljinat peynir altı suyu proteini mikrokürelerinin (AWM) in vitro koruma ve salım özelliklerini araştırmıştır. Elde edilen sonuçlar, Felix O1 fajının AWM'de mikrokapsüllemesinin, fajın simüle edilmiş mide sıvısındaki (SGF) hayatta kalma şansını, yalnızca aljinat içeren mikrokürelere kıyasla önemli ölçüde iyileştirdiğini gösterdi. Serbest faj, SGF'de dakikalar içinde tamamen etkisiz hale getirilirken, AWM'de kapsüllenen faj, çoğunlukla 2 saatlik inkübasyondan sonra canlılığını korumuştur. Ayrıca aljinat matrisine peynir altı suyu proteininin eklenmesi, kapsüllemiş fajın simüle edilmiş bağırsak sıvısında salınmasını önemli ölçüde hızlandırmıştır.

Bu yöntemde kullanılan mikro boncukların yavaş oluşması nedeniyle büyük ölçekli üretim için uygun bir enkapsülasyon tekniği olmadığı düşünülmektedir (Mortazavian vd., 2007). Büyük ölçekli üretim için, ekstrüzyon proseslerinde farklı teknik modifikasyonlar geliştirilmiştir (çoklu nozul, döner diskli atomizer). Ancak prosesi optimize etmek için, ekstrüzyon yöntemleri kapsüllerin yavaş oluşumu sınırlamasının üstesinden gelmeli ve emülsifikasyona benzer şekilde partikül boyutu azaltılmalıdır (Mortazavian vd., 2007).

2.8.4. Emülsifikasyon

Emülsiyon, birbiri içerisinde çözünmeyen iki sıvıdan birinin diğer sıvı içinde küçük küresel damlacıklar halinde dağıldığı heterojen sistemlerdir. Termodinamik olarak kararsız yapıya sahip olduklarından zamanla parçalanma eğilimindedirler. Emülsiyonlar; damlacıklar (dispers faz), sürekli faz ve ara yüzey bölgesi olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Ara yüzey her bir emülsiyon damlasını çevreleyen aktif moleküllerdir ve bu moleküller mevcut molekülün türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak farklılık göstermektedir. Yüzey aktif maddelerin bir kısmı iki fazı birbirine bağlarken, bazıları ise sulu faz içerisinde miseller halindedir. Ara yüzey esasen yüzey aktif moleküllerden oluşan her bir emülsiyon damlasını çevreleyen dar bir alandır. Ara yüzey özellikleri mevcut moleküllerin türüne ve konsantrasyonuna bağlı olarak farklılaşmaktadır. Yüzey aktif maddelerin bir kısmı sürekli faz ve kesikli fazı birbirine bağlayan yüzeyde bulunurken kalan kısmı sulu faz içinde miseller halinde bulunmaktadır (McClements ve Decker, 2000).

Yağ ve suyun konumuna göre emülsiyonlar su içinde yağ (oil in water) ve yağ içinde su (water in oil) olarak ayrılmaktadır. Su içinde yağ emülsiyonlar sürekli fazın su olduğu ve yağ damlacıklarının sürekli faz içinde dağıldığı emülsiyonlarken, sürekli fazın yağ olduğu ve su damlacıklarının bu faz içerisinde dağıldığı sistemler ise yağ içinde su emülsiyonlarıdır. Yağların oksijen ile temasının kesildiği su içinde yağ formülasyonlarda yağlar oksidasyondan korunduklarından su içinde yağ emülsiyonlar daha çok tercih edilmektedir.

Yağ fazı, su fazı ve sürfaktan (emülgatör, yüzey aktif madde) bir emülsiyonda bulunması gereken temel bileşenlerdir. Katı ya da sıvı yağlar, mumlar, hidrokarbonlar, yağ asitleri yağ fazını oluştururken, su ve su ile karışabilen hidrofil yapıdaki bileşenler ise su fazını oluşturmaktadır.

Su içinde yağ emülsiyonların stabilitesinden, yağların bileşimi, emülgatör türü ve emülgatör karışımının hidrofilik-lipofilik dengesi (HLB), homojenizasyonun hızı ve süresi gibi farklı değişkenler sorumludur. Sürfaktan, yağ ile etkileşime girdiğinde, sürfaktan yağ-su arayüzey üzerinde kendiliğinden toplanarak arayüzey gerilimini azaltır ve emülsiyon stabilitesini artırır. Emülsifikasyon sisteminin HLB değeri kullanılan yağın HLB değerine yakın olduğunda, yüzey aktif madde molekülleri yağ-su arayüzeyinde daha yakın düzenlenir ve bu da daha büyük arayüzey film mukavemetini oluşturur. Bu nedenle, emülsifikasyon sisteminin HLB değeri yağınkine ne kadar yakın ise emülsiyon o kadar stabil olur (Q. Wang vd., 2023).

Doymamış emülgatörler ve yüksek oranda doymamış bitkisel yağlarla (esas olarak oleik ve linoleik asit içeren) hazırlanan emülsiyonların, bazı doymamış emülgatörler ve daha az doymamış yağ asitlerinden oluşan bitkisel yağlarla hazırlananlara göre daha stabil olduğu belirlenmiştir (Dnil vd., 2019).

Yağ içinde su emülsiyonunun karıştırılarak homojenleştirilmesi, oluşan damlacıkları uygun boyut ve şeklini elde etmek için kritik adımdır. Daha yüksek homojenleştirme hızlarında, çözelti üzerine daha yüksek enerji yoğunluğu uygulanır ve bu da emülsiyon damlacık boyutunu doğrudan azaltır (Mulia vd., 2019). Dağınık fazın damlacık boyutuna ve termostabilitelerine göre emülsiyonlar sınıflandırılabilirler. Geleneksel emülsiyonlarda damlacık çapı 100 nm ile 100 µm arasındadır ve termodinamik olarak kararsızken, mikro emülsiyonlar ise çap 2-50 nm aralığında ve termodinamik olarak stabildirler. Nano emülsiyonlar, çapı 100 nm ve altında olan, termodinamik olarak stabil olmayan damlacıklar olarak (bunun yerine kinetik olarak stabildirler) karakterize edilirler. Emülsiyon bazlı formülasyonlar, damlacık boyutunu değiştirerek, yumuşatıcıyı ve/veya emülgatörü değiştirerek ve karışıma parçacıklı bileşenler ekleyerek perkütanöz emilimi teşvik edecek şekilde değiştirilebilir (Jyothi vd., 2010).

Fajların emülsiyonlar içinde kapsüllenmesinin, biyoaktivitelerini kolaylaştırırken stabiliteğini arttırdığı gösterilmiştir. Esteban vd., (2014) *Staphylococcus aureus* spesifik faj K lizatlarını nano emülsiyon ile kapsüllenmiştir. Soya fasulyesi yağı-SM tampon karışımından nano-emülsiyonlar hazırlamış ve ortaya çıkan damlacıkların çapının 17 nm olduğunu bildirmiştir. Dini vd., (2012) %2 sodyum aljinat ve %3 düşük metoksilenmiş pektinden hazırlanan sulu fazların, %10 (h/h) oleik asit yağ fazı içeren mikroemülsiyonlardaki iki *E. coli* 0157:H7 fajını stabilize etme yeteneğini karşılaştırmış ve emülsiyonlar hazırlamıştır. İki sulu faz arasında düşük metoksilenmiş pektin-oleik asit kullanımının emülsiyon başarısını artırdığı belirlenmiştir.

Emülsiyon, büyük miktarda bitkisel yağa (kanola, ayçiçeği ve mısır yağı) eklenen mikroorganizma, polimer ve emülgatör karışımından oluşur (Çevik vd., 2021). İçerdikleri emülgatörler sayesinde su ile kolaylıkla karıştırılarak uygulanabilir. Emülsifiye edici maddeler doğal olarak oluşan yüzey aktif maddeler (proteinler, polisakkaritler, hidrokolloidler vb.) ve sentetik yüzey aktif maddeler (gliserol esterler, selüloz esterler) olarak iki gruba ayrılırlar (Varzakas vd., 2014).

Enkapsülasyon çeşitleri içerisinde üretim maliyeti, dayanıklılık ve uygulama kolaylığı dikkate alındığında yağ formülasyonları dikkat çekmektedir.

2.9. Taguchi Metodu

Bir ürünün kalitesinin artırılması kaliteyi etkileyen faktörlerin ve düzeylerinin belirlenmesi ile olmaktadır. Uygun şartlar belirlenirken birçok verinin analizi, bunların tek ve kombinasyonlar halinde kullanılan durumunda verdikleri sonuçlar dikkate alınmalıdır. Faktör ve düzeylerinin artması analizlerde karışıklık yaratmaktadır. Bilim insanları klasik yöntemlerin dışında araştırmalarında en fazla bilgiyi en kısa sürede, en düşük maliyet ve işgücüyle elde edebilecekleri pratik çözümlere yönelmektedir. Bu pratik yöntemlerden birisini Japon istatistikçiler Profesör Genichi Taguchi tarafından hayata geçirilen Taguchi Metodu'dur. Taguchi metodu farklı faktörlerin düzeylerinin uygun kombinasyonunu oluşturarak deneme sayısını en aza indirerek en iyi kombinasyonu belirlemek için kullanılan deneysel bir optimizasyon metodudur. Taguchi yönteminde sisteme ait varyasyonu ölçmek için, sinyal-gürültü oranı (Sinyal/Noise ratio) kullanılır. Hedeflenen değere bağlı olarak 3 farklı S/N oranı vardır.

Chang vd., (2017) tarafından yapılan çalışmada püskürterek kurutma sırasında faj stabilitesini artırmak için eklenen yardımcı maddeleri belirlemek için Taguchi deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır. Trehaloz veya laktoz içeren formülasyonlar için toplam 4 faktör mannitol içerenler için 5 faktör dikkate alınmış ve tüm faktörler üç seviyede değerlendirmiştir. Yapılan optimizasyon çalışması sonucu laktozun faj stabilizasyonu sağlamada en uygun madde olduğu sonucuna varılmıştır.

2.10. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı ülkemiz ve dünya domates üretim alanlarında kalite ve verim kaybına neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e spesifik fajların izolasyonu, karakterizasyonu, biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyelinin araştırılmasıdır. Ayrıca, biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli yüksek olan fajın emülsiyon formülasyonunun Taguchi metodu ile optimize edilerek üretilmesidir. Böylece literatüre yeni bir faj kazandırılarak bu fajın biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli araştırılacaktır.

3. MATERYAL METOD

3.1. Arazi Çalışmaları

Çalışma materyalleri 2021 yılı haziran-ağustos ayları arasında İzmir (Menderes, Bergama, Menemen, Torbalı ve Foça), Çanakkale (Biga, Bayramiç, Gelibolu, Merkez, Eceabat) ve Bilecik (Osmaneli, Gölpazarı, Söğüt, Merkez, Pazaryeri) illerinden toplandı. Domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı ilçelerde, üç farklı alandan hastalık etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ve fajların izolasyonu için toprak ve hastalık belirtisi gösteren bitkiler toplandı. Her il için toplamda 15 toprak ve 15 hastalıklı bitki materyali (yaprak, meyve ve gövde) olmak üzere toplam 30 örnek toplandı. Tüm arazi çalışmaları sonucunda 45 adet toprak örneği ve 45 adet hastalıklı bitki materyali laboratuvara getirildi. Toprak örnekleri, hastalık belirtilerinin görüldüğü ekim alanlarında bitkilerin 30 cm kök derinliğinden alındı (Akbaba ve Ozaktan, 2021). Hastalık semptomu gösteren domates bitkilerinin ise gövde, yaprak ve meyve kısımlarından örnekler alınarak kurutma kağıtları arasında muhafaza edildi. Örnekler buz kutusu içerisinde laboratuvara getirildi.

3.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* İzolasyonu

Toplanan bitki materyalleri (gövde, yaprak ve meyve), yüzeyinde bulunan mikroorganizmaları uzaklaştırmak için %70 etanol ile 2 dakika (dk) yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldı. Sterilizasyon sonrası alkolü uzaklaştırmak için steril distile sudan geçirildi. Tüm örnekler, 2 ml steril su içeren havanlarda ayrı ayrı ezilerek süspansiyon hale getirildi. Elde edilen süspansiyondan bir öze dolusu alınarak, maya özü dekstroz kalsiyum karbonat agar (YDCA, 10 g maya ekstraktı/L, 20 g glukoz/L, 20 g CaCO₃/L, 20 g agar/L) besiyerine inoküle edilip 30°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Milijašević-Marcic vd., 2012).

Toprak örneklerinden *Cmm* izolasyonu için, 20 g toprak numunesi, 100 ml steril fosfat tuz tamponu (PBS) içeren bir Erlenmeyer içerisine aktararak oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda 3 saat inkübe edildi. Örnekler inkübasyon sonrası steril gazlı bez yardımı ile süzildikten sonra elde edilen süzüntü 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan pellet PBS ile süspansiyon edilerek seri dilüsyon ile 10⁻⁸'e kadar seyreltilti. Her seyreltikten 100 µL alınarak YDCA besiyerine yayma ekim yapıldı ve 30°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. YDCA besiyerinde, sarı koloni oluşturan *Cmm* olabileceği düşünülen koloniler saflaştırıldı (Schaad vd., 2001). Saflaştırılan bakteri izolatları daha sonra -80°C'de %50 gliserol içeren YDC besiyerinde saklandı.

3.3. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.3.1. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Cmm olduğu düşünülen izolatlar koloni şekli ve boyutu gibi morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için stereomikroskopta incelendi. Lam-lamel arası preparasyon ile izolatların hücre şekli 1000× büyütme ışık mikroskobu kullanılarak belirlendi.

Gram boyama için her izolat King's B (20 g/L proteaz pepton, 1,5 g/L K₂HPO₄, 1,5 g/mL MgSO₄·7H₂O, 10 mL/L gliserol) sıvı besiyerine inoküle edildi ve 30°C'de sallayıcıda gece boyu inkübe edildi. Daha sonra kültürlerden bakteriyal smear hazırlandı. Lamalar alevden geçirilerek fikse edildi. Hazırlanan preparat, 1 dk kristal viyole ile muamele sonrası dH₂O ile yıkandı ve lügol eklenerek 1 dk beklendi. Lügol, dH₂O ile ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra aseton ile renksizleştirme işlemi gerçekleştirildi. Preparatlar dH₂O ile yıkandıktan sonra 1 dk safranin ile muamele edildi ve tekrar dH₂O ile yıkandı. Kurutulan preparatlar mikroskop altında incelendi (Claus, 1992).

3.3.2. İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.3.2.1. Katalaz Testi

İzolatların katalaz enzimi üretim durumlarının belirlenmesi için King's B sıvı besiyerine ekimleri yapıldı ve 16-24 saat orbital sallayıcıda 30°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra lama sıvı kültürden 10 µL damlatıldı ve %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi ilave edildi. Oluşan gaz kabarcıkları gözlemlendi (X. Li vd., 2018).

3.3.2.2. Nişasta Hidroliz Testleri

İzolatların nişastayı hidroliz edebilme yeteneklerini belirlemek için nutrient agar besiyerine %0,2 çözünebilir nişasta eklenerek hazırlanan nişasta agar besiyerine izolatların inokülasyonu gerçekleştirdi ve 3 gün boyunca 30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petrilere lügol damlatıldı ve renk değişimi gözlemlendi (Benson, 1985).

3.3.2.3. Jelatin Hidroliz Testi

İzolatların jelatinaz enzimi üretme durumlarını belirlemek için %10 jelatin içeren besiyeri tüplerde hazırlandı ve iğne uçlu öze ile izolatların ekimi yapıldı. Tüpler 30°C de 7 gün kadar inkübe edildi. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buz dolabında 1-2 saat bekletildi. İzolatların jelatini hidrolize edebilme durumları, buzdolabından çıkarıldığında jelatinli besiyerinin sıvılaşması veya katı halde kalması ile belirlendi (dela Cruz ve Torres, 2012).

3.3.2.4. İzolatların %5 NaCl İçeren Besiyerinde Gelişme Durumları

Tian vd., (2021) tarafından yapılan çalışmada *Clavibacter michigenensis*'in %5 NaCl içeren besiyerinde büyüebildiği rapor edilmiştir. İzolatlarımızın tuz içeren besiyerinde büyüebilme durumlarını belirlemek için %5 NaCl içeren nutrient agar besiyeri hazırlandı ve izolatların besiyerine inokülasyonu gerçekleştirildi. Petriler 30°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.4. Bakteri İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

3.4.1. Genomik DNA İzolasyonu

Morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyon sonucu *Cmm* olabileceği düşünülen izolatların genomik DNA izolasyonu ZYMO ZR Mantar/Bakteri DNA Miniprep Kiti kullanılarak üretici protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Kuru ağırlığı 50-100 mg olan bakteri hücreleri 200 µL PBS içinde süspanse edilerek lizis tüpüne alındı ve üzerine 750 µL lizis solüsyonu eklendi. Lizis tüpleri yaklaşık 10 dk vorteksledikten sonra 10.000×g de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant (400 µL) "Zymo-Spin™ III-F" kolona alınarak 7000×g de 1 dk santrifüj edildi. Daha sonra toplama tüpündeki filtrat üzerine 1200 µL "binding buffer" eklendi ve "Zymo-Spin™ IICR" kolona alınarak 10000×g de 1 dk santrifüj edildi. Kolona 200 µL yıkama tamponu eklendi 10000×g de 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama işlemi 500 µL yıkama tamponu ile tekrar edildi. Kolona 70 µL elüsyon tamponu eklenip 10.000×g de 30 saniye (sn) santrifüj edilerek DNA elde edildi. DNA konsantrasyonu ve saflığı, Nanodrop (Shimadzu, Tokyo, Japonya) kullanılarak kontrol edildi ve DNA'lar -20°C'de saklandı.

3.4.2. *pat-1* Gen Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

Cmm'nin plazmid üzerinde bulunan virülans geni *pat-1*'in (614bp) varlığı, CMM-5F (5'-GCGAATAAGCCATATCAA-3') ve CMM-6R (5'-CGTCAGGAGGTCGCTAATA-3') primer çifti kullanılarak PZR ile belirlendi (Dreier vd., 1995). PZR işleminde GoTaq DNA Polymerase (Promega) enzimi kullanıldı. Enzim koşullarına göre reaksiyon ve program Tablo 3.1'deki gibi oluşturuldu. Amplifikasyon 200 µL'lik tüplerde "Thermo Thermal Cycler" da gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic; 212 Pro) ile görüntülendi

Tablo 3.1. PZR reaksiyonu ve programı

PZR Döngüsü	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	94°C	5 dk	1
Denatürasyon	94°C	1 dk	
Bağlanma	56°C	0,5 dk	35
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	5 dk	1

3.5. Patojenite Testi

Cmm izolatları King's B besiyerinde 30°C'de 24 saat büyütüldü ve bakteriyel süspansiyon 4.500 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Pellet, üç kez PBS ile yıkandı ve son olarak, OD₆₀₀=0,1 (yaklaşık 10⁸ cfu/ml) olacak şekilde ayarlandı. Patojenite testi için 2-3 gerçek yapraklı domates bitkileri kullanıldı ve saksı başına üç bitki kullanılarak deney üç tekrarlı gerçekleştirildi. 100 µL bakteri, steril bir şırınga kullanılarak yaprak nodülünden enjekte edildi. Pozitif kontrol olarak *Cmm*-DB3 (Acc. No: OP534745) ve negatif kontrol olarak saf su kullanıldı. Uygulamadan sonra saksılar, %85 bağıl nemde ve 25°C'de 16/8 saat gündüz/gece foto periyodunda iklim odasına transfer edildi. Hastalık semptomları üç hafta boyunca izlendi ve *Cmm* enfeksiyonunu doğrulamak için enfeksiyon belirtisi gösteren bitkilerden patojen izolasyonu tekrar yapıldı (Milijašević-Marcic vd., 2012; Valenzuela vd., 2018).

3.6. Faj İzolasyonu ve Zenginleştirme

Gerçekleştirilen arazi çalışması ile toplanan numunelerden 10 g tartılarak (toprak/bitki materyali), 40 ml Ringer solüsyonu içeren steril 250 ml'lik bir Erlenmeyer'de 250 rpm'de 30°C'de gece boyunca inkübe edildi. Numuneler, 10.000×g'de 15 dk 4°C'de santrifüjlendi ve elde edilen süpernatant steril şırınga filtresi (0,22 µm) kullanılarak filtre edildi.

Faj zenginleştirilmesi için 10 ml filtrat, 5 ml *Cmm*-DB3 suşu ve 10 ml King's B besiyeri Erlenmeyer'de karıştırılarak 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kültür, 5000×g'de 4°C'de 20 dk santrifüjlendi. Süpernatant steril 0,22 µm'lik filtreden geçirildi.

3.7. Spot Assay ve Saflaştırma

Cmm-DB3'ü enfekte edebilme yeteneğine sahip fajlar spot-assay ile belirlendi. 100µL ön bakteri kültürü, 4 ml soft agar (10 g/L tripton, 5 g/L maya ekstraktı, 6 g/mL KCl, 7g/L agar) ile karıştırılarak ve King' B besiyeri içeren petri üzerine dökülüp yaklaşık 5 dk katılaşması beklendi. Sonrasında zenginleştirilmiş faj filtratından 10 µL alınarak soft agar içeren petrilere damlatıldı. Petriler 30°C'de gece boyu inkübe edildi (Rahimi-Midani ve Choi, 2020; K. Wang vd., 2022).

İnkübasyon sonrası oluşan plakalar 500 µL SM tamponu (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄.7H₂O, 1 M Tris-HCl, pH 7,5) içinde steril bir pipet yardımı ile toplandı. SM tamponu içerisinde homojen hale getirilen örnekler 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant 0,22 µm'lik steril filtreden geçirildi. Daha sonra, seri dilüsyon yöntemi ile seyreltikler hazırlanarak çift katmanlı agar (DLA) plak assay yapıldı (Kropinski ve Martha, 2009). 100 µL *Cmm*-DB3 ve 100 µL faj (her bir dilüsyon için ayrı ayrı) 4 ml soft agar ile karıştırıldı ve King' B besiyeri içeren petriye döküldü. Daha sonra gece boyunca 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Oluşan tek bir plak alınarak bu işlem en az üç kez tekrarlandı (Yin vd., 2019; Pekkle Lam vd., 2022). Saflaştırılan fajların titresi DLA plak assay yapılarak Baer ve Kehn-Hall (2014) göre hesaplandı.

3.8. Fajların Konak Spektrumunun Belirlenmesi

Cmm-DB3 suşu üzerinde etkinliği tespit edilen ve saflaştırılan fajların konakçı aralığı, bu çalışmada izole edilen sekiz *Cmm* suşunda test edildi. Negatif kontrol olarak yerel *Acidovorax citrulli* ve *Pantoea agglomerans* suşları kullanıldı. King's B besiyerinde büyütülen bakteri kültüründen 100µL alınarak, 48°C'ye soğutulmuş soft agara (4 mL) ilave edildi ve King's B agar içeren petrilere yayıldı. Saflaştırılan fajların konsantrasyonu (10⁸ pfu/mL) eşitlendikten sonra her bir örnekten 10 µL katılan yumuşak agara damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Petriler, plak oluşumunu gözlemlemek için bir gece 30°C'de inkübe edildi (Ranjani vd., 2018).

3.9. Fajların Sıcaklık ve pH Stabilitésinin Belirlenmesi

Fajların (10⁸ pfu/mL) 15°C, 25°C, 30°C, 37°C ve 45°C sıcaklıklardaki stabilitesi değerlendirildi. Hazırlanan faj süspansiyonları belirlenen sıcaklıklara 1 saat maruz bırakıldı (Lim vd., 2013). Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi. Benzer şekilde, fajların (10⁸ pfu/mL) farklı pH değerlerinde (5, 6, 7, 8 ve 9) stabilitesi, 30°C'de bir saat inkübasyondan sonra

değerlendirildi (Czajkowski vd., 2014). Deneyler sonrası faj titreleri DLA plak assay ile belirlendi (Baer ve Kehn-Hall 2014).

3.10. Fajların İnhibisyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Üç fajın tekli, ikili ve üçlü kombinasyonlarının *Cmm-DB3* bakterisi büyümesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 96 gözlü düz tabanlı bir mikro plaka, 40 µL bir *Cmm-DB3* kültürü (10^8 cfu/mL) ve 40 µL taze King's B besiyeri ile aşılandı. Daha sonra bakterisi, hücre başına düşen virüs sayısı (MOI) 1, 10, 100, 1000 olacak şekilde 40 µL faj ile enfekte edildi ve mikro plaka orbital çalkalayıcıda 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Fajların ikili ve üçlü kullanıldıkları durumda, her bir fajdan eşit miktarda eklenerek deney kuruldu (Rabiey vd., 2020b). Kültürün optik yoğunluğu 600 nm'de 12 saat boyunca her saat ölçüldü ve her ölçümden önce mikro plaka 5 sn çalkalandı (Elisa-Reader, Thermo Scientific) (Álvarez vd., 2019). Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

3.11. Phage33'ün Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu

Saflaştırılan fajların konak spektrumu, sıcaklık, pH toleransları ve birbirleri üzerindeki antagonistik-sinerjistik etkileri dikkate alındığında Phage33'ün ön plana çıktığı görüldü. Ancak, biyolojik kontrol etmeni olarak kullanılacak fajın morfolojik ve moleküler bazı özelliklerinin (nükleik asit tipi, litik/lizojeni durumları, integras genleri) belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle, Phage33'ün geçirimli elektron mikroskobu ile morfolojik, komple genom analizi ile moleküler özellikleri belirlendi.

3.11.1. Morfolojik Karakterizasyon

Phage33'ün morfolojik karakterizasyonu geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile gerçekleştirildi. TEM için örnek hazırlama ve görüntüleme işlemi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Phage33 süspansiyonundan 5 µL alınarak karbon kaplı "formvar" film gridine damlatılarak 2 dk bekletildi ve iki defa 5 µL su ile 1 dk yıkandı. Daha sonra 3 dakika %2'lik uranil asetat (10 µL) (pH 4-4,5) ile muamele edildi ve kuramaya bırakıldı. Hazırlanan örnek 100kv 150.000× büyütme kullanılarak JEOL 1220 JEM geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) görüntülendi.

3.11.2. Moleküler Karakterizasyon

3.11.2.1. Nükleik Asit İzolasyonu

Nükleik asit izolasyonu öncesi yüksek titrede (yaklaşık 10^{12} pfu/mL) faj elde edebilmek için 5 µL King's B besiyeri, 5 µL *Cmm*-DB3 ve 2,5 µL faj filtratı karıştırılarak 30°C de 48 saat orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 4500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant 0,22 µm'lik steril şırınga filtreden geçirilerek faj stoğu hazırlandı. DLA plak assay ile faj stoğunun titresi hesaplandı. Yüksek titrede hazırlanan 500 µL faj süspansiyonu üzerine 1,25 µL DNase ve RNase (20 mg/ml) eklenerek 37°C de 1 saat inkübe edildi. Ardından 1,25 µL proteinaz K (20 mg/mL), 25 µL %10 SDS (%0,5 final konsantrasyon) ve 0,5 M EDTA pH 8,0 (20 mM final konsantrasyon) eklenerek 60°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra iki kez fenol:kloroform (1:1) muamelesi yapılarak santrifüj edildi. Süpernatant bir ependorfa toplandı ve hacmin 1/10'u kadar 3 M (pH 7,5) sodyum asetat ve hacmin 2,5 katı kadar soğuk etanol eklenerek bir gece -20°C' de bekletildi. Son aşamada %70 etanol ile yıkama işlemi yapıldı ve pellet TE (Tris-ETDA) tamponunda çözdürüldü.

Phage33'ün genom çeşidini belirlemek için elde edilen nükleik asit ayrı ayrı DNaz ve RNaz ile muamele edildi. 1 µg nükleik asit, 1 µL 10× reaksiyon tamponu ve 1µL (1U) DNase ile karıştırılarak son hacim DEPC su ile 10 µL'ye tamamlandı. 37°C de 30 dk inkübasyon sonrası 1 µL EDTA eklenerek 65°C'de 10 dk bekletildi. RNaz uygulaması için 1 µg nükleik asit, 15u RNase I eklendi ve 37°C de 30 dk inkübe edildi. Tüm örnekler 0,5 µg/mL etidyum bromür içeren %1 'lik agaroz jelde görüntülendi.

3.11.2.2. Komple Genom Dizileme

Dizileme öncesi, izole edilen DNA'nın saflığı NanoPhotometer® spektrofotometre, (IMPLEN, CA, ABD) konsantrasyonu ise Qubit® 2.0 Fluometre ile (Life Technologies, CA, ABD) Qubit® DNA Test Kiti kullanılarak belirlendi. NEBNext® DNA Library Prep Kit kullanılarak dizileme kütüphaneleri oluşturuldu. Genomik DNA, rastgele 150 bç boyutunda fragmentlere ayrılarak uçlarına A kuyruk eklendikten sonra Illumina dizileme için NEBNext adaptörüyle (TGAAGCGTTG+CATCGCTTAC) birleştirildi. Oluşturulan kütüphane, boyut dağılımı açısından Agilent 2100 Bioanalyzer ile analiz edildi ve gerçek zamanlı PZR ile miktarları belirlendi. Dizileme işlemi Illumina Novaseq 6000 platformu ile gerçekleştirildi. Elde edilen ham verilerin FastQC_v012.1 yazılımı ile Phred kalite puanı belirlenerek kalite

kontrolü gerçekleştirildi (Tablo 3.2). Dizilerin *de-novo* birleştirilmesi SOAP denovo2 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. Phred kalite kontrol puanlarının hata oranları

Phred skor kalitesi	Hata ihtimalleri	Doğruluk oranı	Karakterler
10	10'da 1	%90	!"#\$%&'()*+,-./123456789:;h=i?@ABCDEFGHIJ
20	100'da 1	% 99	,-./12345
30	1000'da 1	% 99.9	6789:;h=i?
40	10.000'da 1	% 99.99	@ABCDEFGHIJ

3.11.2.3. Biyoinformatik Analiz

Phage33'ün tam nükleotid dizisi ve %G+C içeriği VectorBuilder yazılımı ile belirlendi. Genomda bulunan tRNA genlerinin tespiti ARAGON yazılımı (<http://www.ansikte.se/ARAGORN/>) kullanılarak belirlendi (Laslett ve Canback, 2004).

Açık okuma çerçeveleri (ORF), minimum uzunluğu 100 nükleotit olmak kaydıyla NCBI ORF bulucusu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gORF/gORF.html>) kullanılarak tespit edildi. Bölgelerin belirlenmesinin ardından ORF'ler genomda buldukları lokasyona göre genomun 5' ucundan başlayarak 3' ucuna göre numaralandırıldı. Belirlenen ORF'ler NCBI BlastN veritabanındaki diziler ile karşılaştırılarak Phage33'e ait ORF'ler sınıflandırıldı. Ayrıca, her bir ORF'nin yakın ilişki gösterdiği genom ORF'leri ile olan nükleotit benzerlik yüzdeleri belirlendi. Bununla beraber, Phage33 ve en yüksek benzerlik gösteren beş fajın (*Xylella* phage Sano, *Xylella* phage Salvo, *Xylella* phage Bacata, *Stenotrophomonas* phage Suzuki, *Xanthomonas* phage Seregon) ORF'leri "Gene parity-plot" analizi ile karşılaştırılarak benzerliklerini gösteren haritalar çizildi. Analiz sırasında x eksenini Phage33 gen sırasını y eksenini karşılaştırılan fajın gen sırasını ifade edecek şekilde oluşturuldu.

Phage33'ün genom bazlı filogenisi, NCBI Blast analizi sonucu yüksek benzerlik gösteren fajlar ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fajı (CMP1) kullanılarak VICTOR (<https://victor.dsmz.de>) yazılımı ile gerçekleştirildi (Meier-Kolthoff ve Göker, 2017). Genomlar arasındaki ilişkiler, iki genom arasındaki benzerlikleri ICTV veri tabanını kullanarak hesaplayan VIRIDIC (Virus Intergenomic Distance Calculator) web sunucusu kullanılarak analiz edildi (Moraru vd., 2020a).

Ayrıca, cins ve tür düzeyinde filogeniyi doğrulamak için bazı korunmuş proteinlerin (terminaz büyük alt birim, majör kapsit protein ve portal protein) nükleik asit dizisine dayanan ağaçlar çizildi. Çoklu dizi hizalamaları ClustalW ile gerçekleştirildi. Filogenetik ağaçlar Kimura 2 parametresi Neighbor Joining yöntemi kullanılarak 1000 tekrarlı olacak şekilde oluşturuldu. Boşluklar ve eksik veriler içeren tüm pozisyonlar elendi. Filogenetik ağaçlar MEGA 11.0 yazılımı kullanılarak çizildi. Bazı korunmuş genlerin nükleik asit dizileri kullanılarak iki gen arasında benzerlik VIRIDIC (Virus Intergenomic Distance Calculator) web sunucusu kullanılarak analiz edildi.

3.12. Emülsiyon Formülasyonunun Geliştirilmesi

3.12.1. Deney Tasarımı

Phage33'ün biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmesine rağmen arazi koşullarında etkinliğini koruyabilmesi için su içinde yağ emülsiyonları geliştirildi. Formülasyonun geliştirilme prosesi Taguchi yöntemi ile optimize edildi. Prosesi etkileyen faktörler ve seviyeleri belirlendi (Tablo 3.3). Dört faktörün dört farklı seviyesi için Taguchi L₁₆ ortogonal düzlemi kullanılarak (Tablo 3.4) emülsiyon formülasyonları hazırlandı.

Tablo 3.3. Optimizasyonda kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Seviye1	Seviye 2	Seviye 3	Seviye 4
Yağ çeşidi	Mısırözü yağı	Soya fasulyesi yağı	Ayçiçek yağ	Fındık yağı
Emülgatör oranı (Gliserol: Tween 80)	2:8	4:6	5:5	8:2
Emülsiyon süresi (dk)	5	10	15	20
Emülsiyon hızı (rpm)	2500	5000	7500	10000

Emülsiyonlar, içeriği %5 yağ, %15 emülgatör ve %80 SM (10⁹ pfu/mL faj içeren) tamponu olacak şekilde hazırlandı. Su içinde yağ formülasyonlarının hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değeri 8-18 arasında olması önerilir. Emülsiyonda kullanılan yağ çeşidi, emülgatörler ve karışımlarının HLB değerleri Tablo 3.5'te verildi. Kullanılacak emülgatörler ve yağ, filtre ile steril edildikten sonra aseptik şartlar altında bakteriyofaj içeren SM tamponuna eklendi. Homojen bir yapı oluşana kadar homojenizatör yardımıyla belirlenen süre ve hızlarda karıştırıldı.

Tablo 3.4. Taguchi L₁₆ Tasarımı

Deney	Yağ çeşidi	Emülgatör oranı	Emülsiyon süresi (dk)	Emülsiyon hızı (rpm)
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	1	4	4	4
5	2	1	3	2
6	2	2	4	1
7	2	3	1	4
8	2	4	2	3
9	3	1	4	3
10	3	2	3	4
11	3	3	2	1
12	3	4	1	2
13	4	1	2	4
14	4	2	1	3
15	4	3	4	2
16	4	4	3	1

Tablo 3.5. Emülsiyonda kullanılan yağ çeşidi, emülgatörler ve karışımlarının HLB değerleri

Yağ çeşidi	HLB değeri
Mısırözü yağı	9
Soya fasülyesi yağı	7
Ayçiçek yağı	7
Zeytin yağı	7
Emülgatörler ve karışımları	HLB değeri
Gliserol	3,8
Tween 80	15
Gliserol: Tween80 (2:8)	12,76
Gliserol: Tween80 (4:6)	10,52
Gliserol: Tween80 (5:5)	9,4
Gliserol: Tween80 (8:2)	6,04

3.12.2. Emülsiyonunun İnhibisyon Yeteneğinin Ölçülmesi

Klasik plak assay tekniği sadece tampondaki serbest faj titresinin belirlenmesi için kullanılabileceğinden hazırlanan emülsiyonlardaki faj titresini bu teknikle belirlenememektedir (Esteban vd., 2014). Fajın *Cmm-DB3* üzerindeki inhibe edici özelliği, bakteriyel süspansiyonların OD' sinde meydana getirdiği azalma ile değerlendirilmektedir.

Emülsiyonun, *Cmm-DB3* bakteri büyümesi üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 96 gözlü düz tabanlı bir mikro plaka, 40 µL bir *Cmm-DB3* kültürü (10^8 cfu/mL) ve 40 µL taze King's B besiyeri ile aşılandı. Daha sonra, 40 µL bir *Cmm-DB3* kültürü (10^8 cfu/mL) ve 40 µL taze King's B besiyeri ile aşılandıktan sonra 40 µL emülsiyon formülasyondan eklendi. Mikro plaka orbital çalkalayıcıda 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Kültürün optik yoğunluğu 600 nm'de 12 saat boyunca her saat ölçüldü ve ölçümlerden önce mikro plaka 5 sn çalkalandı (Elisa-Reader, Thermo Scientific) (Álvarez vd., 2019). İnkübasyon sonrası meydana gelen inhibisyon oranları belirlendi. Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Minitab yazılımı ile sinyal/gürültü oranı (büyük değer iyi yaklaşımı) ve varyans analizi kullanılarak değerlendirildi.

3.12.3. Doğrulama Deneyi

Yapılan optimizasyon çalışması sonucu sinyal gürültü oranına göre belirlenen optimum koşullar (mısırözü yağı, gliserol: tween80 (5:5), 10.000 rpm ve 15dk) kullanılarak bir doğrulama deneyi yapıldı. Hazırlanan emülsiyonun *Cmm-DB3*'ü inhibe etme oranı 3.12.2'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Deney sonuçları, Minitab yazılımı ile elde edilebilecek tahmini sonuç ile karşılaştırıldı.

3.12.4. Emülsiyon Formülasyonunun Karakterizasyonu

3.12.4.1. Damlacık Boyutu Dağılımı

Hazırlanan emülsiyonun karakterizasyonu için partikül boyut analizi Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (BARUM) gerçekleştirildi. damlacık boyut analizi lazer ışık saçınım prensibine göre çalışan Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK) ile gerçekleştirilerek ortalama boyutu belirlendi (Esteban vd., 2014).

3.12.4.2. Elektron Mikroskopisi

Emülsiyon formülasyonunun morfolojisini gözlemlemek için Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan taramalı elektron mikroskopu kullanıldı. Emülsiyondaki partiküllerin yüzey görüntüsünü ve

boyutunu belirlemek için 20 µL emülsiyon stub üzerine damlatıldı ve 37°C'de 24 saat boyunca kurumaya bırakıldı. Kurutulan stub, otomatik püskürtmeli kaplayıcı platin tozuyla kaplandı. Kaplanan örnek ZEISS/Supra 40VP taramalı elektron mikroskobu ile incelenerek fotoğraflandı.

3.12.4.3. Raf Ömrü

Emülsiyonun stabilitesinin belirlenmesi için emülsiyon oda ısısında ve +4°C bekletilerek 0., 1., 3., 6., 9. ve 12. aylarda emülsiyonun inhibisyon yeteneği 3.12.2'de belirtildiği gibi hesaplandı ve değerlendirildi.

3.13. Emülsiyon Formülasyonunun Etkinliğinin Belirlenmesi

Emülsiyon formülasyonunun yeşil aksamda hastalık gelişimini önleyici etkisi saksı denemeleriyle belirlendi. Bunun için, domates tohumları yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldıktan sonra viyollere ekimi yapılarak %85 bağıl nem ve 25°C'de 16/8 saat gündüz/gece foto periyodunda iklim odasında çimlendirildi. Oluşan fideler viyollerden saksılara alındı. Her saksıya 3 fide transfer edildi. Fidler 2-3 gerçek yapraklı domates bitkisi haline gelene kadar büyütüldü. Denemeler dört karakterli ve 3 tekerrürlü olarak sabah saatlerinde gerçekleştirildi.

1. Karakter: Kontrol (Bitkilere sulama dışında hiçbir uygulama yapılmadı.)
2. Karakter: Bakteri uygulaması ($OD_{600}=0,1$ olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonundan 100 µL ilk yaprak nodülünden şırınga ile inoküle edildi.)
3. Karakter: Emülsiyon formülasyonu + bakteri uygulaması (10^8 pfu/mL faj içeren 10 mL emülsiyon formülasyon püskürtüldükten 1 saat sonra $OD_{600}=0,1$ olarak ayarlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µL ilk yaprak nodülünden şırınga ile inoküle edildi.)
4. Karakter: Boş emülsiyon+bakteri uygulaması (Faj içermeyen 10 mL emülsiyon püskürtüldükten 1 saat sonra $OD_{600}=0,1$ olarak ayarlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µL ilk yaprak nodülünden şırınga ile inoküle edildi.)

Uygulamalardan sonra saksılar, %85 bağıl nemde ve 25°C'de 16/8 saat gündüz/gece foto periyodunda bir büyüme odasında tutuldu. Hastalık semptomları üç hafta boyunca izlendi ve fotoğraflandı.

4. BULGULAR

4.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* İzolasyonu

Toplanan örneklerden toprak ve bitki materyallerinden ayrı ayrı patojenin izolasyonu gerçekleştirildi. Toplanan 45 toprak örneğinden 42, 45 bitki örneklerinden ise 28 örneğin YDC agarda sarı pigment ürettiği belirlendi. Toplamda *Cmm* olabileceği düşünülen YDCA besiyerinde sarı koloni oluşturan 70 bakteri izole edildi ve saflaştırıldı. Saflaştırılan bakteri izolatları -80°C'de %50 gliserol içeren YDC besiyerinde saklandı.

4.2. İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Tanımlaması

Saflaştırılan 70 izolatın gram boyamaları yapıldı ve 14 izolatın basil hücre şekline sahip gram pozitif bakteri olduğu belirlendi. Daha sonra gram pozitif olduğu belirlenen izolatların katalaz testi, nişasta hidroliz testi, jelatin hidroliz testi ve 5% NaCl büyüme testi gerçekleştirildi ve sonuçlar Tablo 4.1'de gösterildi. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye (Brenner vd., 2005) göre değerlendirildi. Buna göre; DB11, DB12, DB13, DB18, DB23, DB24, DB35, DB38 ve DB42 izolatlarının *Cmm* benzeri biyokimyasal ve morfolojik özellikler gösterdiği belirlendi (Tablo 4.1). *Cmm* benzeri özellik gösteren izolatlardan DB11, DB12, DB13, DB18'in Bilecik, DB23, DB24'in Çanakkale, DB35, DB38 ve DB42'nin ise İzmir'den izole edildiği görüldü.

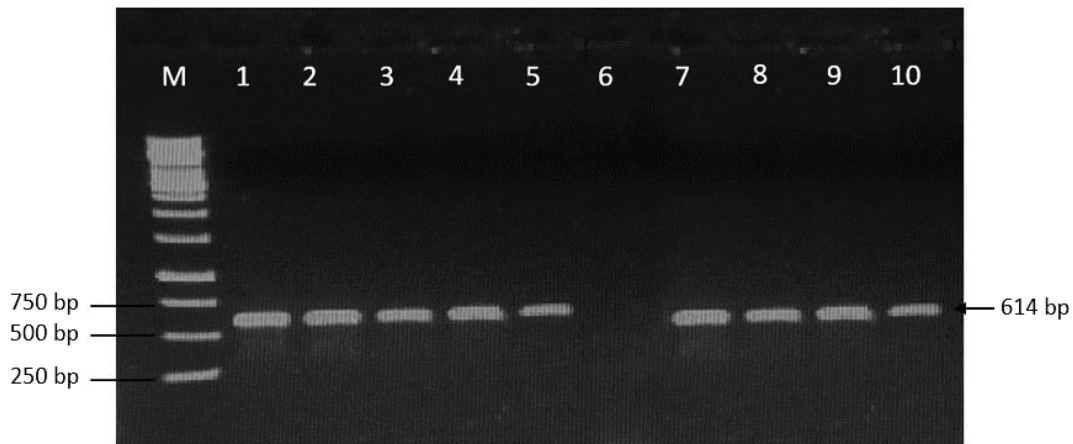
Tablo 4.1. Bakteriyeel izolatlarnn morfolojik ve biyokimyasal 6zellikleri

İzolatlarn	Lokasyon	Gram Boyama	Hücre Şekli	Jelatin Testi	Katalaz Testi	NaCl (%5)	Nişasta Hidroliz Testi
DB11	Bilecik	+	Basil	+	+	+	-
DB12	Bilecik	+	Basil	+	+	+	-
DB13	Bilecik	+	Basil	+	+	+	-
DB14	Bilecik	+	Basil	-	-	-	-
DB15	Bilecik	+	Basil	-	-	-	-
DB18	Bilecik	+	Basil	+	+	+	-
DB19	Çanakkale	+	Basil	-	-	-	-
DB22	Çanakkale	+	Basil	-	-	-	-
DB23	Çanakkale	+	Basil	+	+	+	-
DB24	İzmir	+	Basil	+	+	+	-
DB33	İzmir	+	Basil	-	-	-	-
DB35	İzmir	+	Basil	+	+	+	-
DB38	İzmir	+	Basil	+	+	+	-
DB42	İzmir	+	Basil	+	+	+	-
DB3*		+	Basil	+	+	+	-

*Kontrol izolatu

4.3. Bakteri İzolatlarnnn Moleküler Tanımlaması

Morfolojik ve biyokimyasal 6zellikleri *Cmm* ile benzer 9 izolatlann (DB11, DB12, DB13, DB18, DB23, DB24, DB35, DB38 ve DB42) DNA izolasyonu yapılp, *pat-1* virülans genine özgu primer ile amplifiye edildi. Agaroz jel elektroforezi sonrası, DB13 dışındaki tüm izolatlarda 614 bp boyutunda beklenen bantlarnn varlığı belirlendi (Şekil 4.1).

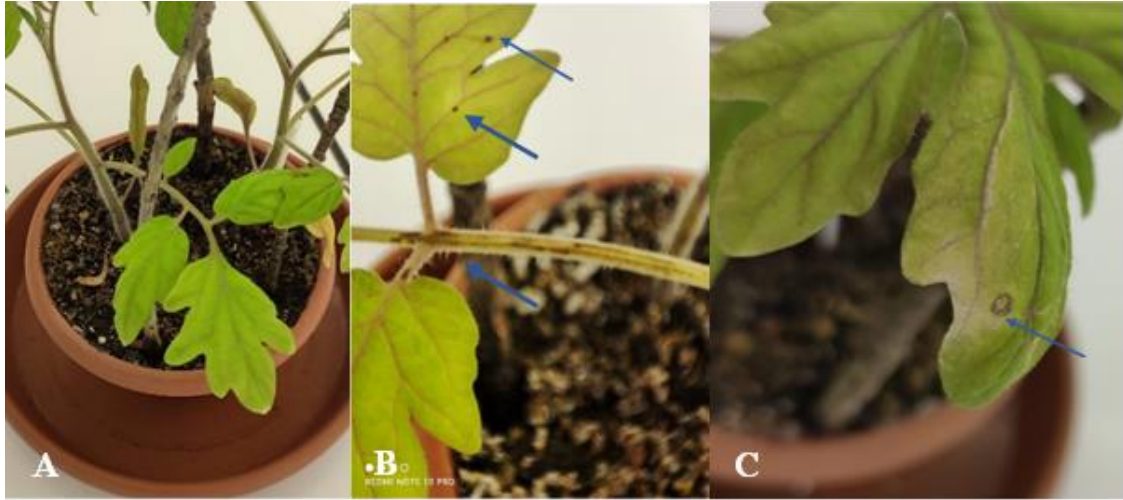


Şekil 4. 1. İzolatlarnn *pat-1* geninin agaroz jel elektroforezi. M: Marker, 1: DB3 (kontrol), 2: DB11, 3: DB12, 4: DB18, 5: DB23, 6: DB13, 7: DB24, 8: DB35, 9: DB38, 10: DB42

4.4. Patojenite Testi

Morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlama sonrası *Cmm* olabileceği düşünülen DB11, DB12, DB18, DB23, DB24, DB35, DB38 ve DB42'nin patojenite testi yapıldı. İlk belirtilerin aşılama yapıldıktan yaklaşık 10 gün sonra ortaya çıktığı belirlendi (Şekil 4.2). Yaklaşık 15 gün sonra, aşılama yerlerinde ve sapın uzunluğu boyunca uzunlamasına çatlaklar gözlemlendi (Şekil 4.3). Sapın her yerinde küçük merceksi kanserler de gözlemlendi. 25 gün sonra, bazı bitkilerin sadece yaprakları tamamen solarken, bazı bitkilerin tamamen solarak kuruduğu görüldü. Aynı zamanda, bitkilerin uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre daha küçük kaldığı gözlemlendi.

Bakteri izolatlarının virülansında da farklılıklar belirlendi. Hastalık belirtileri ilk olarak DB11, DB23 ve DB38 ile enfekte edilen bitkilerde gözlenirken, DB12 ve DB35 ile enfekte olmuş bitkilerde en son ortaya çıktı. Steril su uygulaması yapılan kontrol grubunda ise herhangi bir hastalık belirtisi gözlenmedi.



Şekil 4. 2. Patojenite testlerinde kullanılan bitkilerin 10. gündeki görüntüleri. A: Kontrol, B: *Cmm*-DB3, C: DB11 izolatları uygulanan bitkiler



Şekil 4. 3. Patojenite testlerinde kullanılan bitkilerin 15. gündeki görüntüleri. A: Kontrol, B: *Cmm*-DB3, C: DB11 izolatları uygulanan bitkiler

4.5. Faj İzolasyonu ve Konak Spektrumunun Belirlenmesi

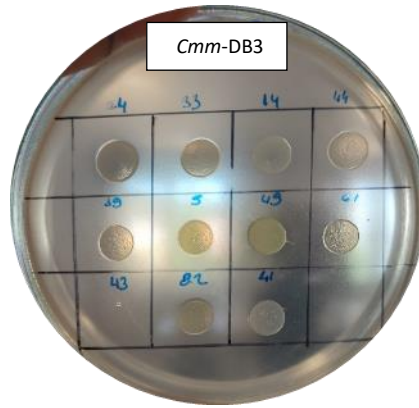
Toplanan 90 örnekten elde edilen filtratlardan *Cmm*-DB3 üzerinde litik etki gösteren 22 faj tespit edildi. Fajların 14'ü toprak örneklerinden 8'i ise hastalıklı bitki materyallerinden izole edildi.

Saflaştırılan fajların konak spektrumu, çalışmada tanımlanan 8 *Cmm* (DB11, DB12, DB18, DB23, DB24, DB35, DB38, DB42) izolatı üzerinde belirlendi. Faj5, Faj14, Faj24, Faj33, Faj39, Faj41, Faj44, Faj49, Faj61 ve Faj82'nin diğer fajlara göre daha geniş bir konakçı aralığına sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.4) (Tablo 4.2). Fajların, kontrol olarak kullanılan *Pantoea agglomerans* ve *Acidovorax citrulli*'de plak oluşturmadığı görüldü.

Tablo 4.2. *Cmm*-DB3 izolatlarında şeffaf plaklar oluşturan fajların konakçı aralığı

Faj	Bakteri İzolatları									Lokasyon	
	DB11	DB12	DB18	DB23	DB24	DB35	DB38	DB42	<i>P. agglomerans</i>		<i>A. citrulii</i>
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	İ-Foça
5	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	İ-Menemen
14	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	B-Osmaneli
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B-Gölpazarı
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	İ-Foça
24	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	İ-Foça
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B-Pazayeri
33	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	İ-Menderes
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B-Söğüt
39	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	Ç-Çan
41	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	Ç-Eceabat
44	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Ç-Kumkale
49	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	Ç-Çan
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ç-Kumkale
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ç-Kumkale
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ç-Eceabat
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B-Merkez
61	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	Ç-Bayramiç
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ç-Bayramiç
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ç-Çan
82	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	İ-Torbalı
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B-Osmaneli

B: Bilecik, Ç: Çanakkale, İ: İzmir

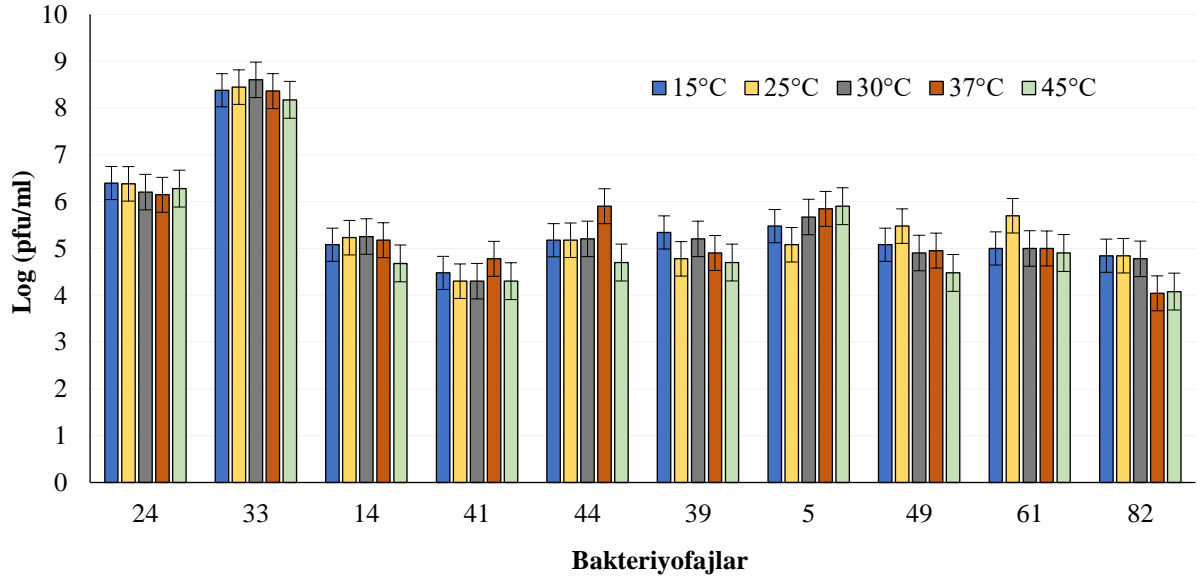


Şekil 4.4. Geniş konak aralığına sahip fajların plak görüntüsü

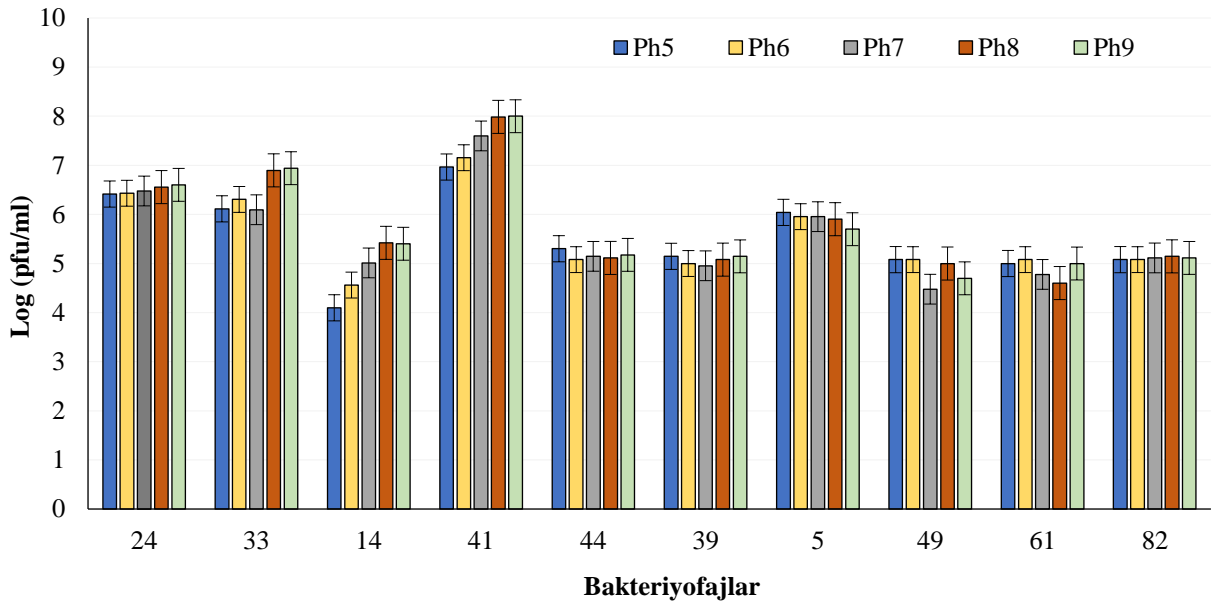
4.6. Fajların Sıcaklık ve pH Stabilitesinin Belirlenmesi

Konak spektrumu geniş olduğu belirlenen 10 fajın (Faj5, Faj14, Faj24, Faj33, Faj39, Faj41, Faj44, Faj49, Faj61 ve Faj82) farklı pH ve sıcaklıklarda stabilitesi değerlendirildi. Faj33'ün başlangıç titresine kıyasla test edilen tüm sıcaklıklarda 1 saatlik inkübasyonun ardından stabil kaldığı belirlendi ($P>0.05$). Faj24'ün titresinde başlangıca kıyasla $\sim 1,5$ logaritmik (log) birim azalma görülse de sıcaklık toleransının diğer fajlardan daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.5). Öte yandan, diğer fajların sıcaklık uygulaması sonrası titresinde başlangıca göre ~ 3 log azalma belirlendi.

pH stabilite testi sonrası, Faj41'in titresine pH8 ve pH9'da değişmezken ($P>0.05$) düşük pH'larda titresinde ~ 1 log azalma meydana geldi (Şekil 4.6). Faj24 ve Faj33'ün titresinde tüm pH'larda başlangıç titresine göre azalma görülmekle birlikte diğer fajlardan daha stabil oldukları görüldü.



Şekil 4.5. *Cmm'* ye özgü fajların sıcaklık toleransı. Çubuklar üç tekrarın ortalamasını gösterir. Hata çubukları standart sapmayı gösterir.

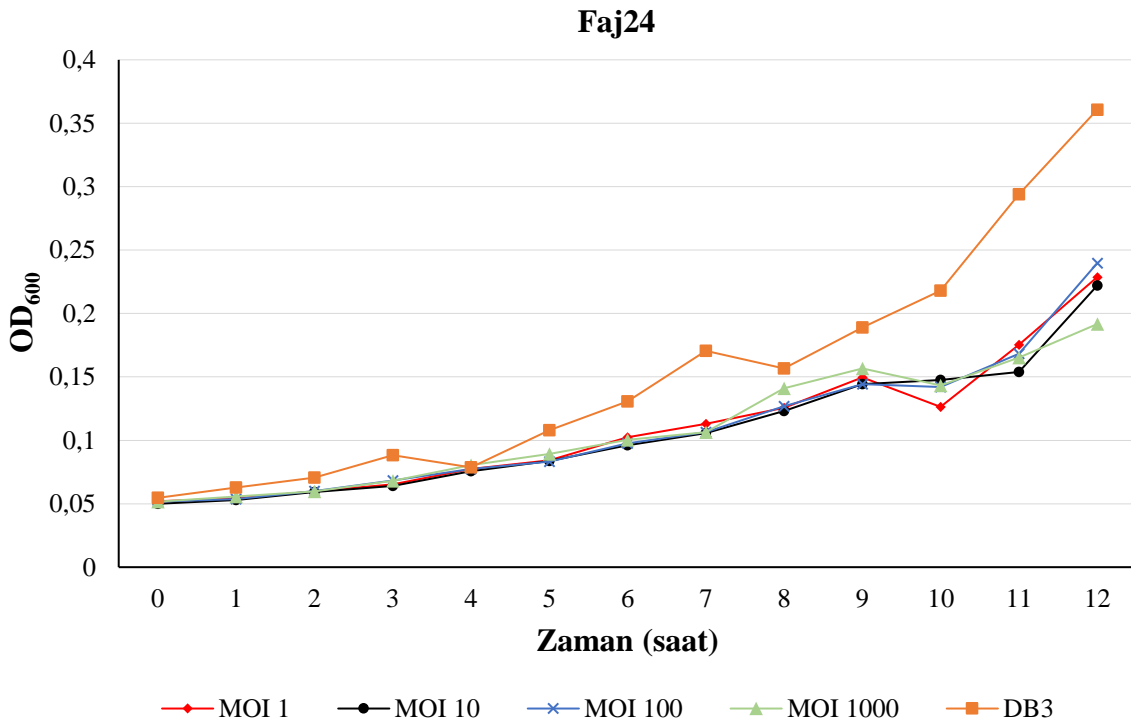


Şekil 4.6. *Cmm'* ye özgü fajların pH toleransı. Çubuklar üç tekrarın ortalamasını gösterir. Hata çubukları standart sapmayı gösterir.

4.7. Fajların *Cmm*-DB3 İzolatı Üzerindeki İnhibisyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

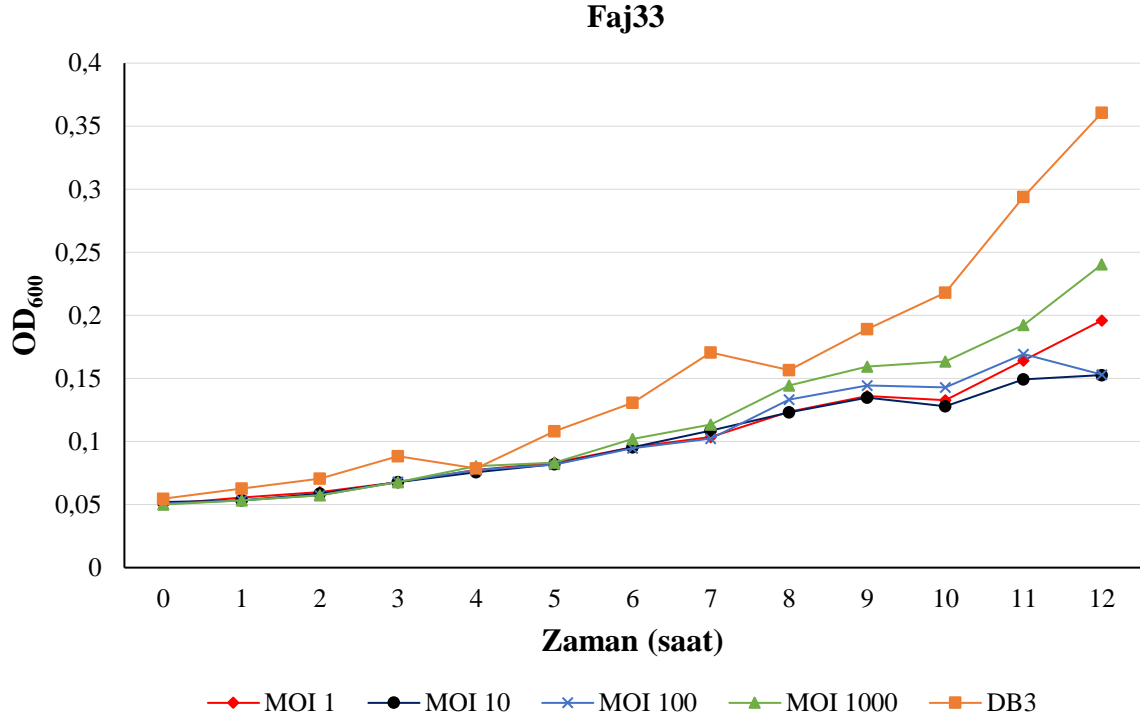
Konak spektrumu geniş, sıcaklık ve pH toleransı yüksek Faj24, Faj33, Faj41'in *Cmm*-DB3 üzerindeki inhibisyon yetenekleri belirlendi. Fajların tek başına ve kokteyl şeklinde uygulanmasının inhibe edici etkisi, *Cmm*-DB3'ün ($OD_{600}=0,1$) farklı MOI'lerde enfekte

edilmesi ile belirlendi. Faj24 ile enfekte edilmiş *Cmm-DB3*'ün büyümesi MOI=100'de minimum inhibisyon gösterirken MOI=1000'de bakteriyel büyümeyi %46,94 azalttığı tespit edildi (Şekil 4.7). Phage24'ün aksine Faj33, MOI=10 (%57,77) ve MOI=100'de (%57,50) maksimum inhibisyon gösterirken MOI=1000'de (%33,33) minimum inhibisyon gösterdi (Şekil 4.8). Faj41 ise en yüksek inhibisyon etkisini MOI=1'de (%48,33) gösterdi (Şekil 4.9). Ayrıca, D1 (33-41 fajlardan oluşan), D2 (24-33 fajlardan oluşan), D3 (24-41'den oluşan), D4 (24-33-41'den oluşan) faj kokteylinin bakteriyel inhibisyonu değerlendirildi ve MOI=1'de en etkili kokteylin %48,33 ile D2 olduğu belirlendi (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.12). Fajların kokteyl şeklinde kullanılmalarının sinerjistik bir etki göstermediği görüldü. Faj33'ün inhibisyon yeteneği diğer fajlardan daha fazla olduğu için sonraki çalışmalara Faj33 ile devam edildi.

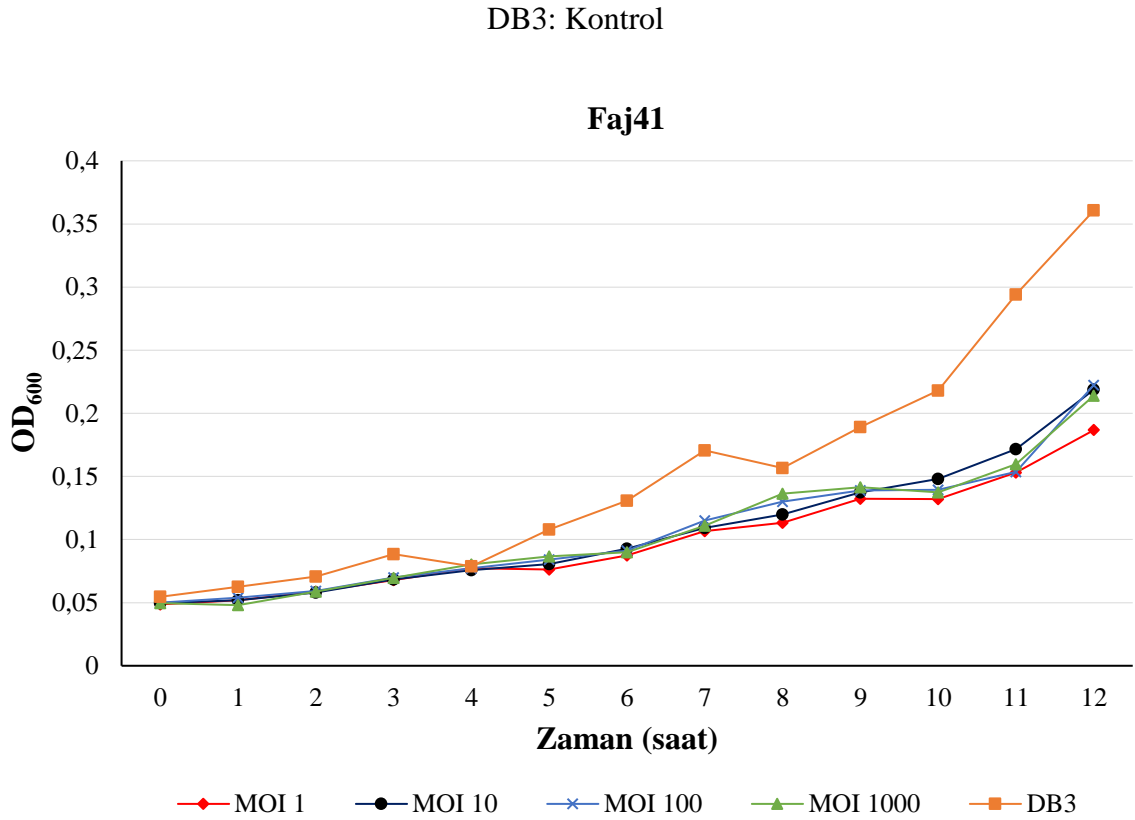


Şekil 4.7. Faj24 tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen *Cmm-DB3*'ün büyüme eğrileri.

DB3: Kontrol

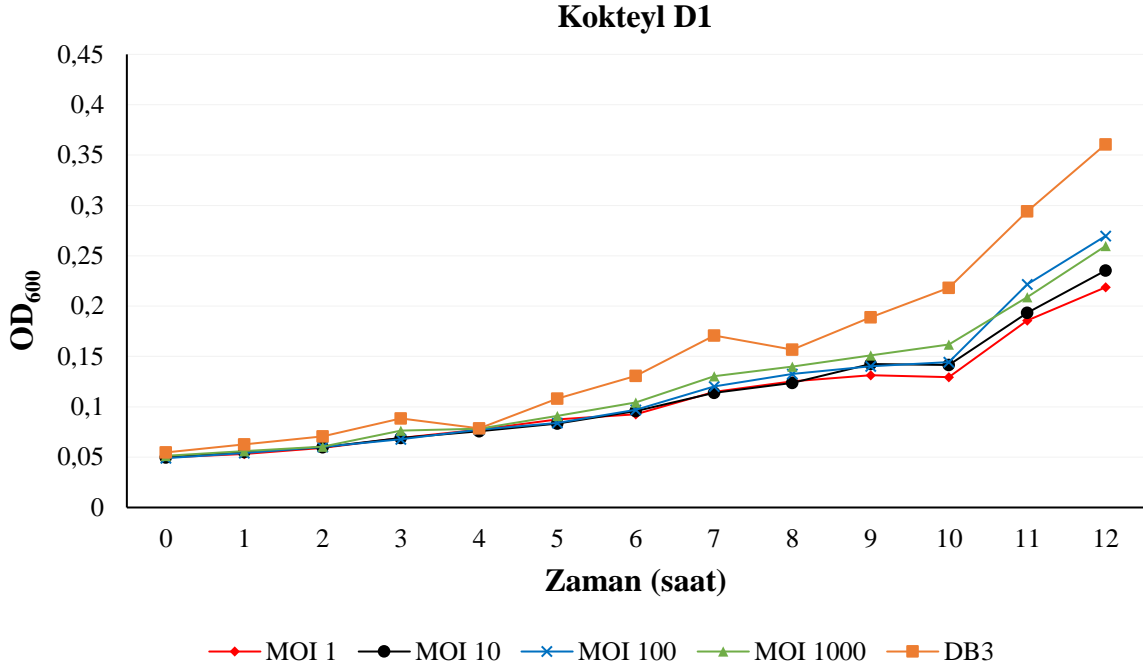


Şekil 4.8. Faj33 tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen *Cmm*-DB3'ün büyüme eğrileri.

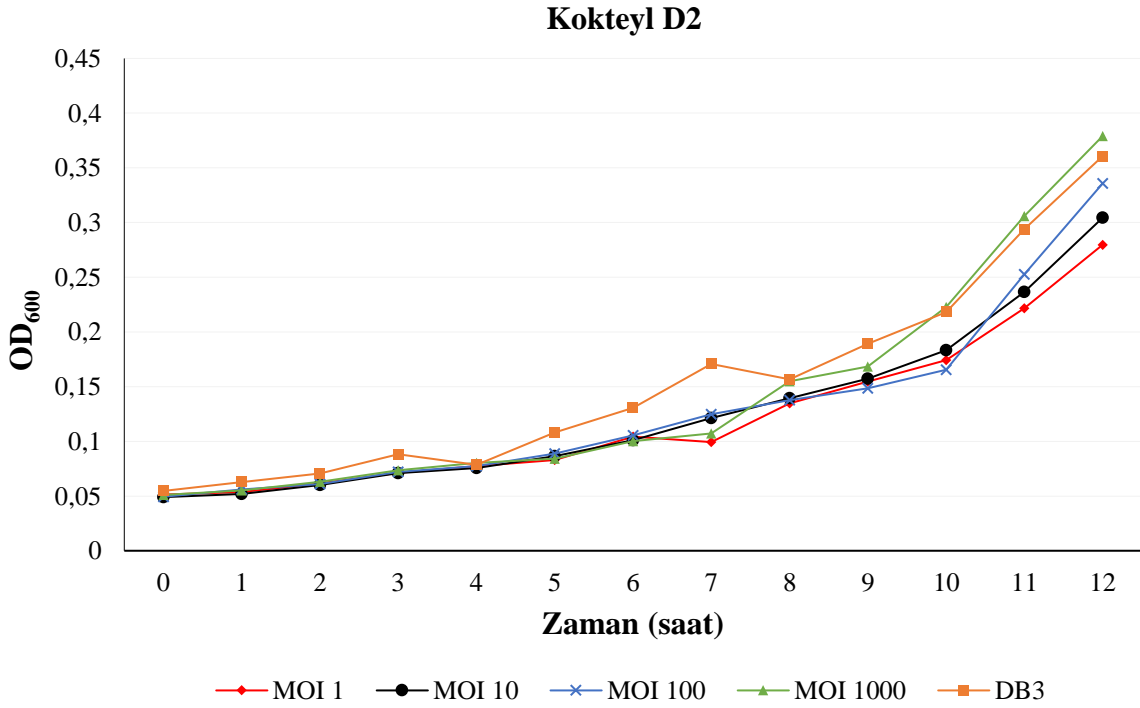


Şekil 4.9. Faj41 tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen *Cmm*-DB3'ün büyüme eğrileri.

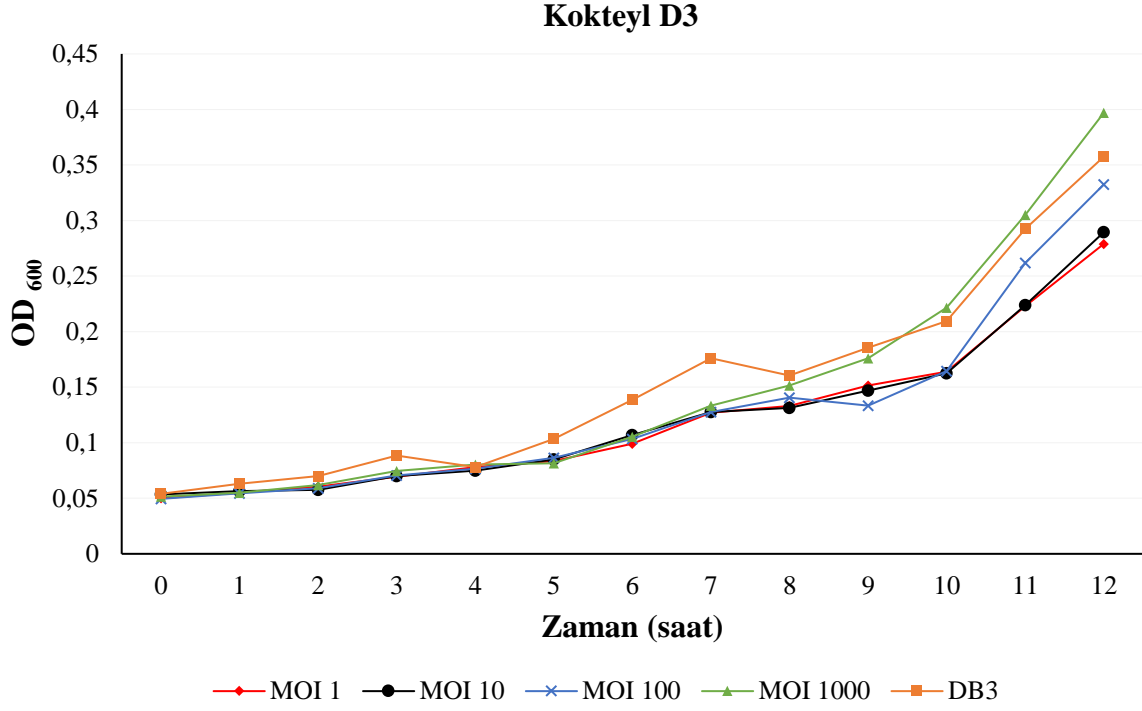
DB3: Kontrol



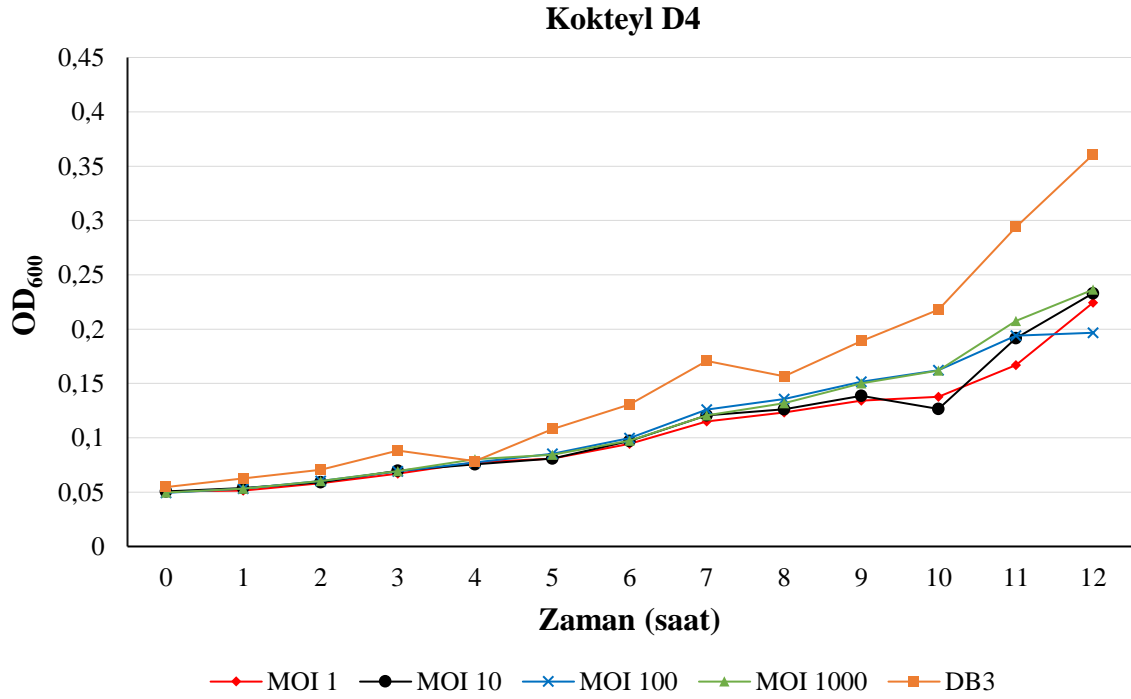
Şekil 4.10. Kokteyl D1 (Faj24 ve Faj33) tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen *Cmm*-DB3'ün büyüme eğrileri. DB3: Kontrol



Şekil 4.11. Kokteyl D2 (Faj24 ve Faj41) tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen *Cmm*-DB3'ün büyüme eğrileri. DB3: Kontrol



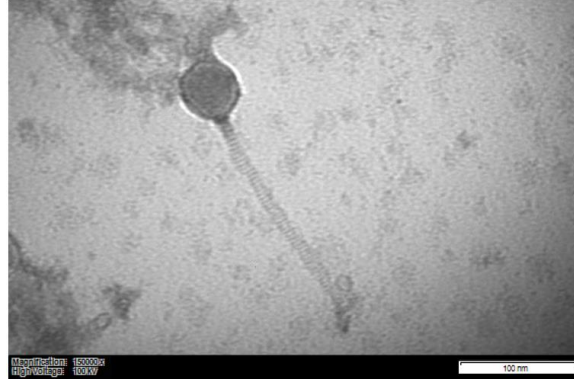
Şekil 4.12. Kokteyl D3 (Faj33 ve Faj41) tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen *Cmm-DB3*'ün büyüme eğrileri. DB3: Kontrol



Şekil 4.13. Kokteyl D4 (Faj24, Faj33 ve Faj41) tarafından farklı MOI'lerde enfekte edilen *Cmm-DB3*'ün büyüme eğrileri. DB3: Kontrol

4.8. Phage33'ün Morfolojik Karakterizasyonu

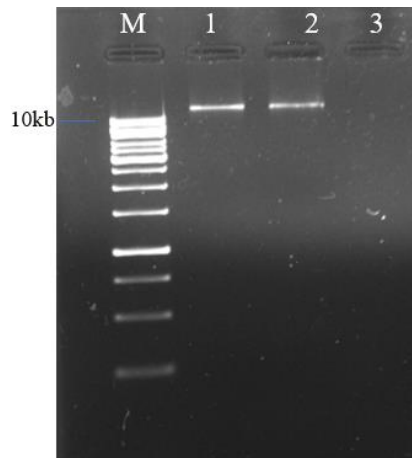
Phage33'ün elektron mikroskobu görüntüleri, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi'nin (ICTV) daha önceden belirlediği taksonomiye göre fajın Siphoviridae familyasına ait olduğunu gösterdi. Phage33'ün yaklaşık 55 ± 3 nm çapında bir ikosahedral başa ve yaklaşık 170 ± 5 nm uzunluğunda uzun, ince, kasılmayan bir kuyruğa sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Phage33'ün geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) görüntüsü.

4.9. Phage33'ün Nükleik Asit İzolasyonu

Hazırlanan faj süspansiyonunun konsantrasyonu DLA metodu ile hesaplandı ve $1,6\times 10^{12}$ pfu/mL olarak belirlendi. Nükleik asit izolasyonu yapıldıktan sonra DNaz ve RNaz uygulaması yapıldı. Yapılan uygulama sonucu Phage33'ün nükleik asit tipinin DNA olduğuna karar verildi (Şekil 4.15). Faj süspansiyonundan izole edilen DNA örneği ve kalitesi jele yüklenerek kontrol edildi (Şekil 4.15). İzole edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} oranı 1,89 konsantrasyonu da $56,80$ ng/ μ L olarak belirlendi.



Şekil 4.15. İzole edilen DNA'nın agaroz jel görüntüsü M: Marker, 1: Phage33 Nükleik asit, 2: RNase uygulanan örnek, 3: DNase uygulanan örnek

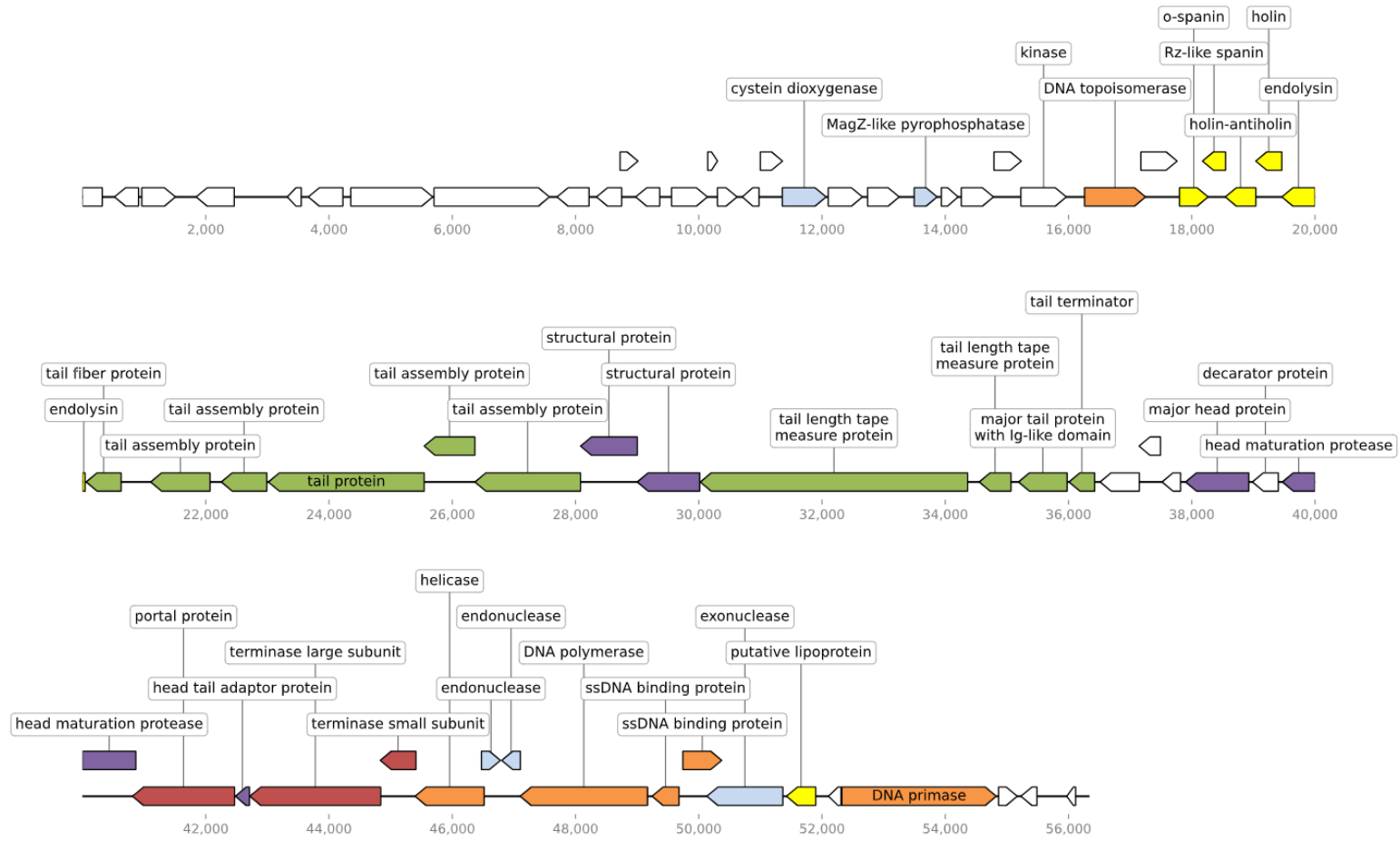
4.10. Genom Dizilenmenin Kalite Kontrolü

BMLabosis firmasına gönderilen DNA'nın dizilemeye uygun olduğu tespit edildikten sonra dizileme için oluşturulan kütüphanenin kalitesi Phred puanlamasına göre kontrol edildi. Phred kalite puanı her nükleotitin doğruluğunu sayısal olarak ifade eder. Yüksek Q değeri yüksek doğruluğu gösterir. Kütüphanemizin Phred Q değeri 37 olarak belirlendi. Buna göre doğruluk oranının %99,9'dan fazla olduğu tespit edildi.

4.11. Phage33 Genomunun Özellikleri

Okunan kısa dizilerin birleştirilmesi (assembly) sonucunda tek parça DNA (kontig) oluşturuldu. Genom büyüklüğünün 56,324 baz çifti, G+C içeriğinin ise %62,49 olduğu belirlendi. Dizinin NCBI (National Center for Biotechnology Information: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) veri tabanına kaydı yapıldı ve OR548257 erişim numarasıyla genom dizisi tescillendi. Birbiri ile çakışmayan ya da küçük çakışmaları olan 100 bç ve daha uzun gen bölgesini kodlayan kısımlar potansiyel açık okuma zincirleri (ORF) olarak atandı. Genomda uzunlukları 144 ile 4338 baz çifti arasında değişen ATG kodonuyla başlayan toplam 67 açık okuma çerçevesi (ORF) belirlendi. Genomun %90,96'sının, kodlayan bölge olduğu görüldü. Genomda tRNA kodlayan genlere rastlanmadı. ORF'lerden 23 tanesi ileri (forward) yönlü iken diğerlerinin geri (revers) yönlü olduğu belirlendi. Belirlenen ORF'lerden 37'sinin NCBI veri tabanındaki fonksiyonel olarak belirlenen faj ORF'lerine yüksek homoloji gösterdiği, geri kalan 30 ORF'nin ise işlevleri henüz tanımlanmayan hipotetik ORF'ler olduğu tespit edildi. Çalışmalar sonucu oluşturulan genom haritası Şekil 4.16'da gösterildi.

Phage33'ün ORF nükleotit dizilerinin Blast analizi sonucu benzerlik gösterdiği Xylella phage Sano (%92,37), Stenotrophomonas phage Suzuki (%88,0), Xylella phage Salvo (78,31), Xylella phage Bacata (78,26), Xanthomonas phage Seregon (78,25) ile karşılaştırması Tablo 4.3'te verildi. Ayrıca Phage33 ve diğer fajların karşılaştırmalı genomik özellikleri Tablo 4.4'de verildi (Ahern vd., 2014; Sullivan vd., 2022).



Şekil 4.16. Phage33 genom haritası. Renksiz olan ORF'ler hipotetik proteinleri ifade etmektedir.

Tablo 4.3. Phage33 ve benzerlik gösterdiği fajların açık okuma çerçevelerinin karşılaştırılması

ORF	Gen Adı	Pozisyon	Büyüklik (nt)	Büyüklik (aa)	Sano (NC_042344.1)	Suzuki (MZ326855.1)	Salvo (NC_042345.1)	Bacata (NC_052973.1)	Seregon (ON189048.1)
1	Hipotetik protein	1<321	321	107	-	-	-	-	-
2	Hipotetik protein	521<910	390	130	-	4 (94,36)	-	-	-
3	Hipotetik protein	964>1509	546	182	4 (91,78)	5 (78,51)	-	-	-
4	Hipotetik protein	1846<2463	618	203	8 (83,01)	-	-	-	-
5	Hipotetik protein	3326<3550	225	75	10 (90,67)	10 (87,50)	-	-	-
6	Hipotetik protein	3666<4226	561	187	12 (95,37)	12 (69,38)	-	-	-
7	Hipotetik protein	4356>5684	1329	442	13-14 (93,99)	13-14 -15(89,51)	-	52(69,96)	63(69,67)
8	Hipotetik protein	5706>7577	1872	623	-	16(68,64)	-	-	-
9	Hipotetik protein	7702<8220	519	173	17 (93,82)	18(76,92)	-	-	59(71,89)
10	Hipotetik protein	8342<8749	408	128	18 (96,25)	-	17(83,62)	46(83,62)	58(85,22)
11	Hipotetik protein	8725>9015	291	97	19 (97,94)	21(97,19)	18(86,22)	45(86,22)	57 (84,19)
12	Hipotetik protein	8978<9367	390	130	20-21 (81,54)	-	-	-	-
13	Hipotetik protein	9560>10141	582	193	23 (96,74)	24(89,18)	20(77,95)	43(79,46)	53(78,85)
14	Hipotetik protein	10147>10305	159	53	24 (96,86)	25(84,28)	-	-	-
15	Hipotetik protein	10305>10622	318	106	25 (98,43)	26(85,81)	21(76,92)	42(76,92)	52(75,11)
16	Hipotetik protein	10709<10978	270	90	26 (99,26)	27(87,55)	22(77,22)	41(77,22)	51(75,77)
17	Hipotetik protein	11001>11360	360	120	-	28(77,69)	-	-	-

Tablo 4.3'ün devamı,

18	Sistein dioksigenaz	11357>12067	711	237	28 (99,02)	29 (91,56)	24 (77,32)	39 (78,02)	49 (76,25)
19	Hipotetik protein	12103>12657	555	184	29 (99,62)	32 (76,51)	25 (76,85)	37 (78,34)	47 (77,27)
20	Hipotetik protein	12741>13253	513	171	30 (88,72)	33 (87,72)	26 (69,11)	36 (68,59)	46 (68,64)
21	MagZ pirofosfat	13498>13869	372	124	31 (94,61)	34 (94,34)	27 (73,64)	36 (73,37)	45 (72,28)
22	Hipotetik protein	13937>14209	273	91	32 (87,02)	35 (88,80)	-	-	-
23	Hipotetik protein	14262>14783	522	174	33 (81,57)	36 (91,19)	29 (72,54)	33 (72,76)	43 (73,00)
24	Hipotetik protein	14792>15235	444	148	34 (90,56)	37 (90,56)	30 (78,83)	32 (77,53)	42 (79,95)
25	Kinaz	15228>15965	738	246	35 (94,37)	38 (86,28)	32 (67,74)	31 (68,32)	41 (67,88)
26	DNA topoizomeraz	16262>17251	990	330	37 (86,31)	41 (93,91)	33 (81,54)	29 (81,54)	39 (81,17)
27	Hipotetik protein	17176>17763	588	196	38 (87,10)	42 (91,0)	-	28 (76,05)	-
28	o-spanin	17802>18266	465	155	39 (95,70)	44 (90,43)	-	-	-
29	Rz spanin	18175<18549	375	125	40 (94,13)	45 (91,20)	-	-	-
30	Holin-antiholin	18546<19040	495	165	41 (78,02)	46 (96,77)	-	-	-
31	Holin	19040<19462	432	141	42 (86,56)	47 (93,38)	-	-	-
32	Endolisin	19464<20042	579	193	43 (92,57)	48 (90,33)	-	-	-
33	Tail fiber protein	20061<20627	567	189	44 (81,50)	49 (85,33)	39 (76,31)	24 (77,47)	-
34	Tail assambly protein	21108<22070	963	321	45 (73,25)	50 (79,52)	40 (72,78)	22 (72,50)	32 (71,59)
35	Tail assambly protein	22254<22991	738	246	47 (83,11)	52 (85,23)	42 (78,41)	20 (79,14)	30 (78,41)

Tablo 4.3'ün devamı,

36	Tail protein	23018<25546	2529	843	48 (89,60)	53 (87,98)	43 (77,81)	19 (77,69)	29 (77,81)
37	Tail assembly protein	25546<26367	822	274	49 (87,10)	54 (87,59)	44 (80,35)	18 (80,47)	28 (80,22)
38	Tail assembly protein	26369<28081	1713	571	50 (87,69)	55 (86,94)	45 (77,47)	17 (77,66)	27 (77,47)
39	Yapısal protein	28083<29003	921	307	51 (88,33)	56 (85,11)	46 (74,62)	16 (74,65)	26 (74,86)
40	Yapısal protein	29003<30016	1014	338	52 (84,65)	57 (85,74)	47 (77,50)	15 (77,11)	25 (77,62)
41	Tail leght tape measure protein	30026<34363	4338	1446	53 (91,98)	58 (87,88)	48 (78,13)	14 (78,08)	24 (78,14)
42	Tail leght tape measure protein	34552<35067	516	172	54 (98,26)	60 (83,33)	50 (73,06)	12 (73,26)	22 (72,20)
43	Major tail protein with Ig-like domain	35190<35978	789	263	56 (92,27)	61 (90,87)	51 (80,79)	11 (80,92)	21 (80,23)
44	Tail terminator	36009<36425	417	139	57 (98,56)	62 (86,92)	52 (80,72)	10 (80,24)	20 (81,06)
45	Hipotetik protein	36514<37149	636	212	58 (97,17)	63 (92,28)	53 (79,28)	9 (79,35)	19 (79,74)
46	Hipotetik protein	37146<37493	348	116	59 (98,56)	64 (90,80)	-	-	-
47	Hipotetik protein	37520<37819	300	100	60 (92,33)	65 (79,62)	55 (74,89)	7 (74,89)	17 (74,36)
48	Major kapsit protein	37901<38926	1026	342	61 (96,49)	66 (88,63)	56 (88,22)	6 (88,12)	16 (88,01)
49	Decarator protein	38986<39405	420	140	62 (98,10)	67 (82,03)	57 (78,17)	5 (77,36)	15 (76,60)
50	Head maturation protease	39472<40866	1395	465	63 (96,35)	68 (90,76)	59 (77,95)	4 (77,68)	14 (79,06)
51	Portal protein	40811<42469	1659	553	65 (95,84)	69 (93,31)	60 (85,23)	3 (85,05)	13 (85,29)
52	Head tail adaptör protein Ad1R	42483<42710	228	76	66 (92,11)	70 (87,72)	61 (77,19)	2 (77,19)	12 (78,51)
53	Terminaz büyük alt	42717<44840	2124	708	67 (95,06)	71 (92,28)	62 (84,6)	1 (84,77)	11 (85,19)

Tablo 4.3'ün devamı,

54	Terminaz küçük alt ünite	44833<45411	579	193	68 (94,13)	72 (88,72)	63 (83,33)	-	10 (82,99)
55	Helikaz	45398<46519	1122	374	69 (95,54)	73 (89,57)	64 (77,88)	68 (76,77)	9 (77,52)
56	Endonükleaz	46475>46783	309	103	69 (97,73)	-	-	-	-
57	Endonükleaz	46804<47106	303	101	70 (96,37)	74 (86,87)	65 (82,27)	67 (82,08)	8 (83,28)
58	DNA polimeraz	47103<49169	2067	689	71 (95,21)	75 (89,99)	66 (81,41)	66 (79,67)	7 (81,26)
59	GP2.5 like ss DNA	49243<49680	438	146	72 (99,54)	76 (83,75)	67 (69,28)	65 (80,27)	-
60	GP2.5 like ss DNA	49744>50373	630	210	72 (96,66)	-	-	64 (70,36)	-
61	Ekzonükleaz	50133<51365	1233	411	73 (92,13)	77 (91,65)	68 (79,63)	64 (78,76)	5 (79,04)
63	Hipotetik protein	52106<52309	204	68	75 (89,71)	79 (91,18)	70 (90,69)	62 (80,39)	3 (89,22)
64	DNA primaz	52325>54829	2505	835	76 (94,66)	80 (92,06)	71 (81,25)	61 (80,27)	2 (81,17)
65	Hipotetik protein	54867>55169	303	101	77 (95,71)	81 (86,23)	72 (67,10)	-	1 (67,47)
66	Hipotetik protein	55229<55489	261	87	-	82 (78,54)	-	-	-
67	Hipotetik protein	55973<56116	144	48	-	83 (89,44)	-	-	-

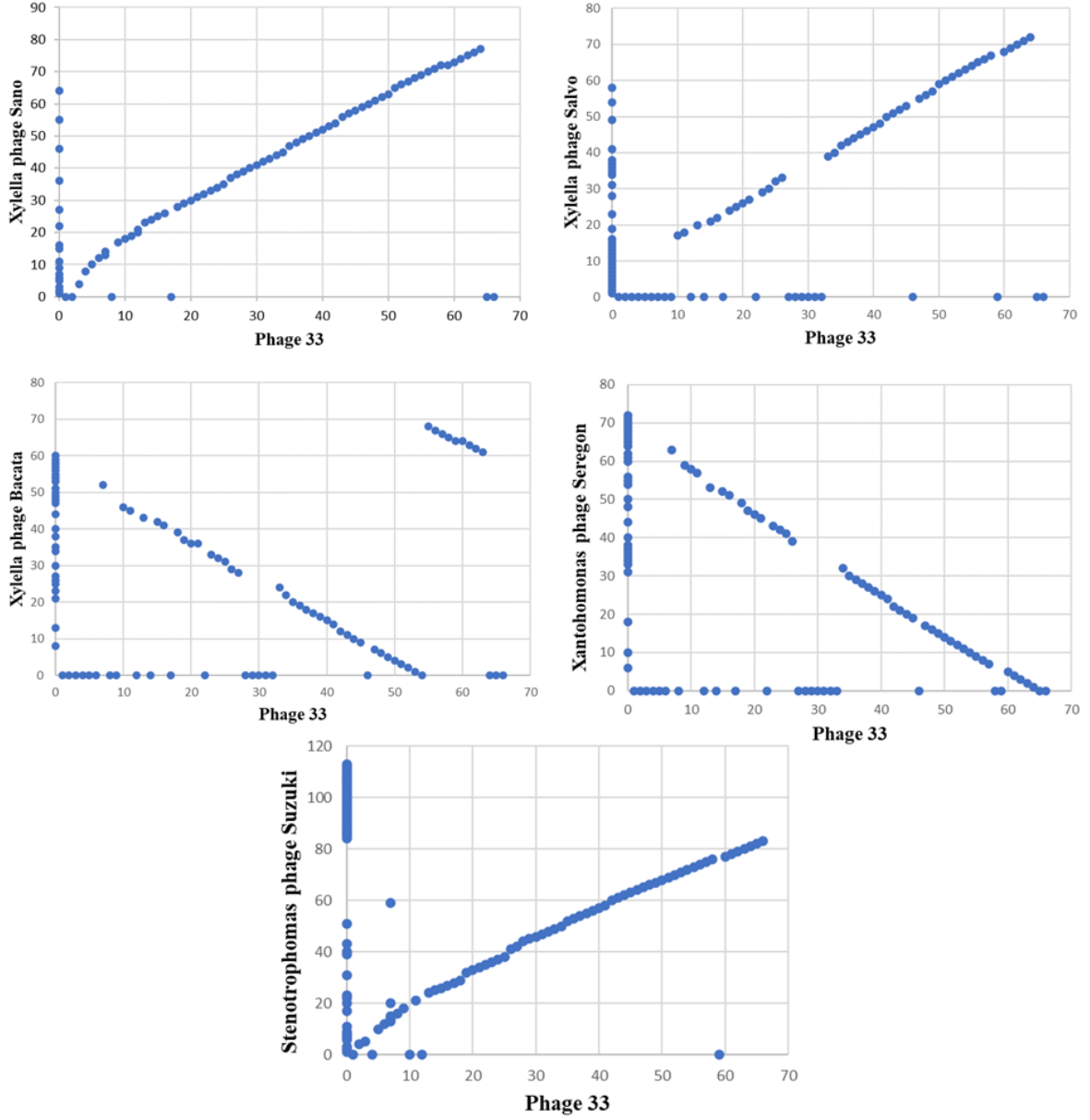
ORF uzunlukları nükleotitler (nt) ve aminoasitler (aa) olarak verilmektedir. Phage33 ORF'lerinin Xylella phage Sano, Xylella phage Salvo, Stenotrophomas phage Suzuki, Xantohomonas phage Seregon ve Xylella phage Bacata'da karşılık gelen ORF'lere benzerlikleri, ORF numaraları ve parantez içerisinde nükleotit benzerlik oranları ile gösterilmektedir. Pozisyonadaki oklar ORF'nin yönünü belirtmektedir.

Tablo 4.4. Phage33, Xylella phage Sano, Stenotrophomonas phage Suzuki, Xylella phage Salvo, Xylella phage Bacata ve Xanthomonas phage Seregon'nun genom özelliklerinin karşılaştırılması

Özellikler	Phage33	Sano	Suzuki	Salvo	Bacata	Seregon
Genom uzunluğu (bç)	56,324	56,147	56,042	55,601	56,232	55,527
GC içeriği (%)	%62,49	%62,3	%62,6	%63,0	%62,5	%63
ORF sayısı	68	77	113	72	68	72
Kodlama yüzdesi	90,69	95,4	94,6	96,9	88,8	96,36
tRNA	0	0	0	0	0	0

Sano: Xylella phage Sano, Suzuki: Stenotrophomonas phage Suzuki, Xylella phage Salvo, Bacata: Xylella phage Bacata, Seregon: Xanthomonas phage Seregon

Phage33 ve Blast sonucu benzerlik gösterdiği fajlar için “Gene parity-plot” analizi gerçekleştirilerek ORF’lerin dağılım grafikleri çizildi. Buna göre, Phage33’ün Xylella phage Sano ve Stenotrophomonas phage Suzuki ile ortak ORF sayısının daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Phage33 genomunun benzer genomlar ile karşılaştırmalı gen dağılım analizi.

Genlerin varlığı ve göreceli konumu (mavi noktalar) çift yönlü olarak karşılaştırıldı.

4.12. Genom İçeriği

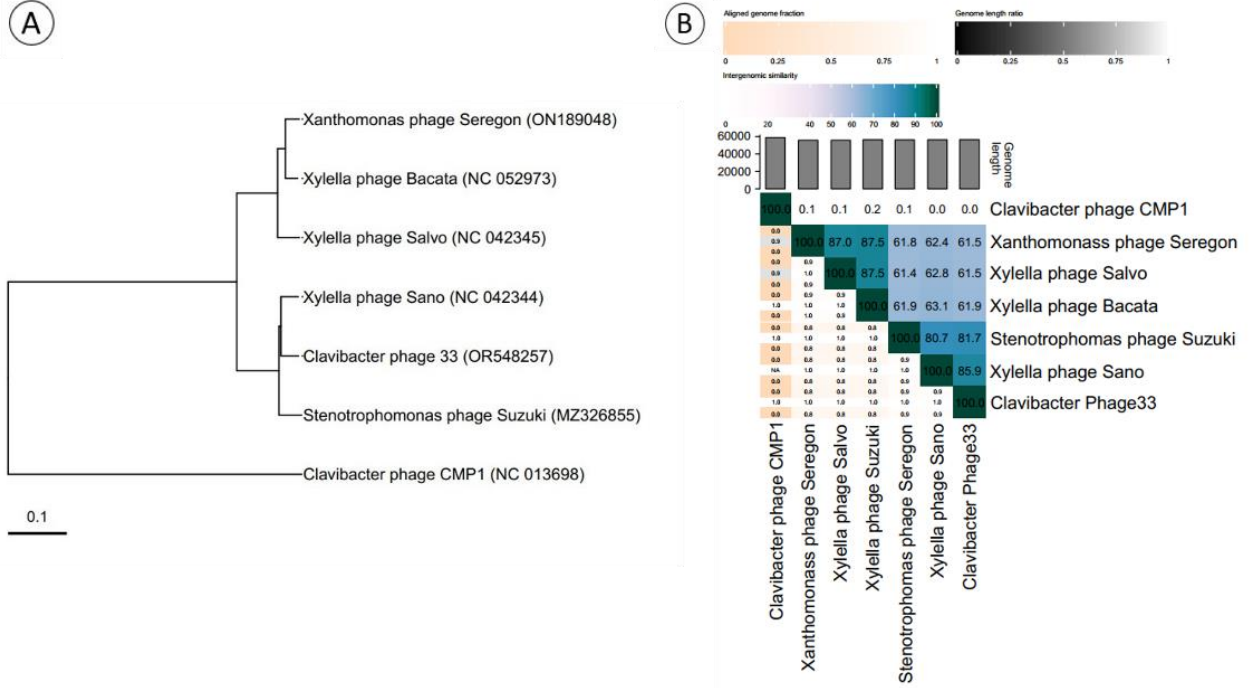
Phage33 genomunda yer alan genlerin diğer dsDNA fajlarında olduğu gibi replikasyon, kapsit oluşumu, kuyruk oluşumu, DNA paketlenmesi, regülasyon ve metabolizma, konak lizisi ve hipotetik gen gruplarını içerdiği belirlendi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Phage33 genomunda bulunan genler ve fonksiyonları

Gen Fonksiyonu	Phage33' de bulunan genler
Replikasyon	DNA topoizomeraz (ORF26), helikaz (ORF55), DNA polimeraz (ORF58), DNA primaz (ORF64), GP2.5 benzeri ss DNA(ORF59-60)
Kapsit Oluşumu	Major kapsit protein (ORF48), dekarator protein (ORF49), head maturation proteaz (ORF50), baş kuyruk adaptör protein Ad1R (ORF52), yapısal protein (ORF39-40)
Kuyruk Oluşumu	Kuruk fiber protein (ORF33), kuyruk birleşme protein (ORF34-35-37-38), tail protein (ORF36), tail length tape measure protein (ORF41-42), major tail protein with Ig-like domain (ORF43), tail terminatör (ORF44)
DNA paketlenmesi	Terminaz büyük alt ünite (ORF53), terminaz küçük alt ünite (ORF54), portal protein (ORF51)
Regülasyon ve modifikasyon	Ekzonükleaz, endonükleaz, kinaz, Mag Z benzeri pirofosfat, sistein dioksijenaz
Konak Lizisi	o-spanin (ORF28), Rz-benzeri spanin (ORF29), holin antiholin (ORF30), holin (ORF31), endolizin (ORF32), putative lipoprotein (ORF62)
Hipotetik	ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF7, ORF8, ORF9, ORF10, ORF11, ORF12, ORF13, ORF14, ORF15, ORF16, ORF17, ORF19, ORF20, ORF22, ORF23, ORF24, ORF27, ORF45, ORF46, ORF47, ORF63, ORF66, ORF67, ORF68

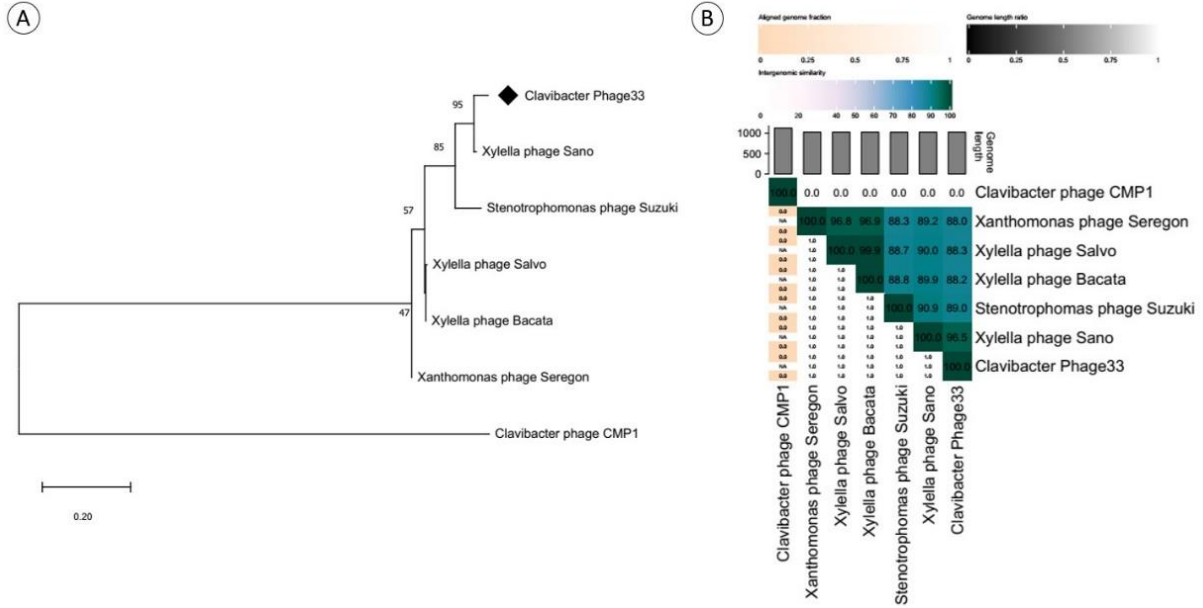
4.13. Filogenetik Analiz

NCBI Blast analizi sonucu Phage33 en yüksek benzerliği (%92,37) Xylella phage Sano ile gösterdi. VICTOR yazılımı kullanılarak çizilen filogenetik ağaçta da Phage33 ile Xylella phage Sano aynı kolda (cluster) yer aldı (Şekil 4.18A). VIRIDIC analizi ile virüslerin intergenomik benzerlikleri tespit edildi ve benzer şekilde Phage33 ile Xylella phage Sano arasında %85,9 benzerlik belirlendi. Öte yandan, VICTOR ile gerçekleştirilen analizler sonucu oluşturulan filogenetik ağaçta Clavibacter phage CMP1 fajının dış grup gibi yer aldığı görüldü. Ayrıca, Phage33 ile Clavibacter phage CMP1 arasında herhangi bir benzerlik olmadığı VIRIDIC analizi ile de tespit edildi (Şekil 4.18B).

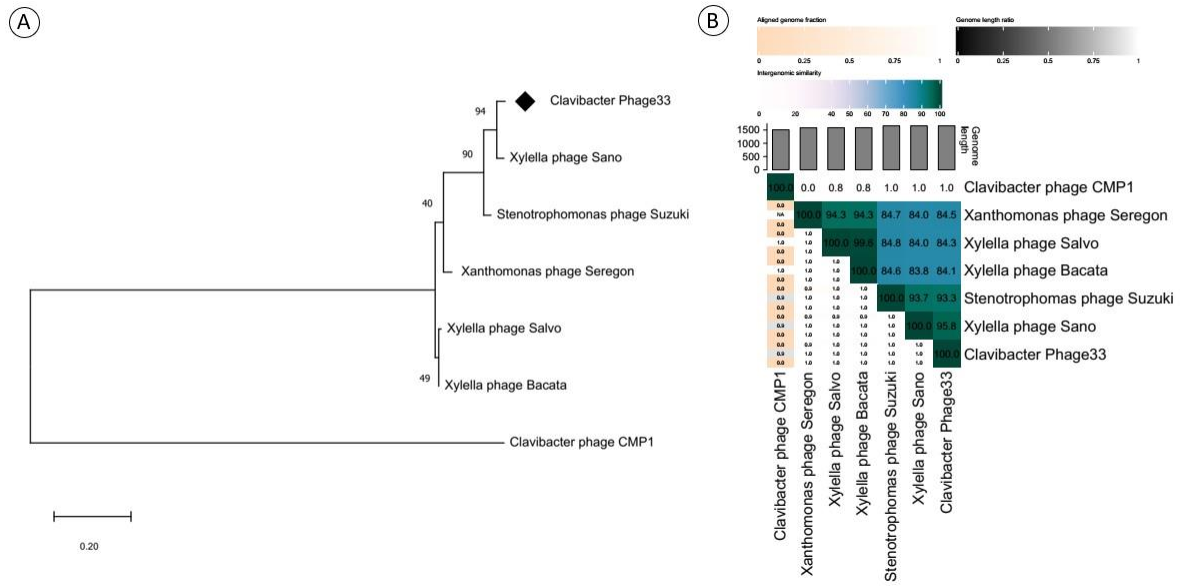


Şekil 4.18. Phage33 tüm genom nükleotit dizisinin yakından ilişkili fajlar ve Clavibacter CMP1 ile filogenetik analizi. (A) Tüm genom nükleotit dizisinin VICTOR ile filogenetik ağacı. (B) Fajların intergenomik benzerlikleri.

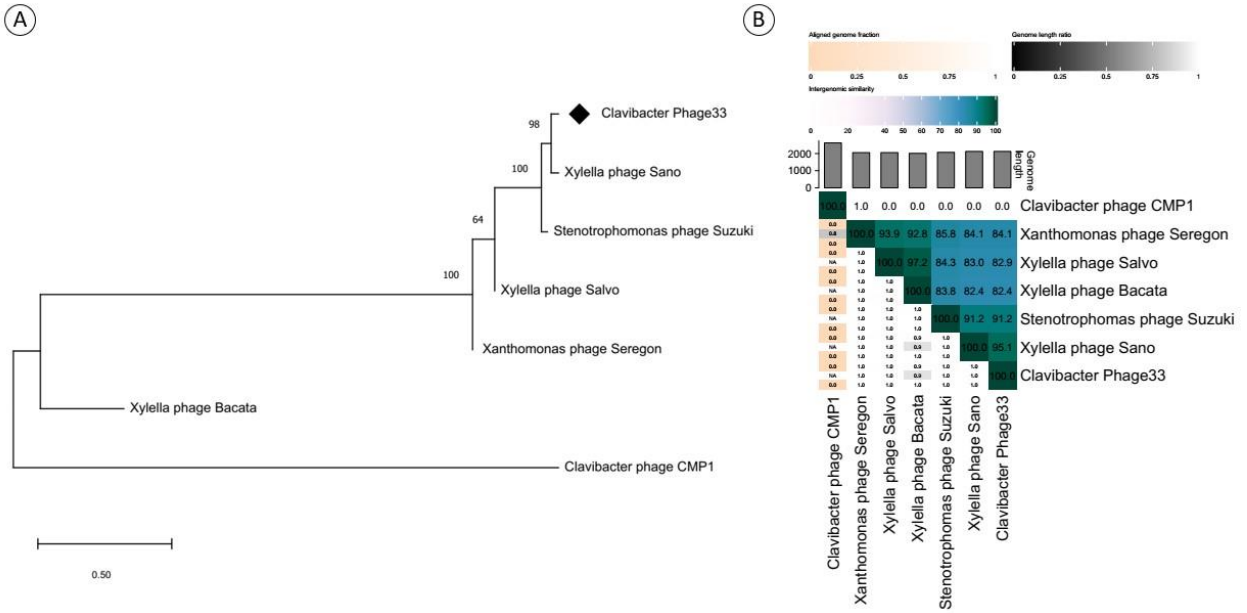
Phage 33'ün major kapsit proteini, portal protein ve terminaz büyük alt birim nükleik asit dizileri kullanılarak, yüksek benzerlik gösterdiği diğer genomlardaki bu genler ile karşılaştırıldı. Neighbor joining metodu ile gerçekleştirilen analizler sonucu oluşturulan filogenetik ağaçlarda Phage33'ün Xylella phage Sano ile aynı kolda (cluster) yer aldığı görüldü. Phage33, VIRIDIC analizlerinde de Xylella phage Sano'nun major kapsid protein, portal protein ve terminaz large subunit ile sırasıyla %96,5, %95,8 ve 95,1 benzerlik gösterdi (Şekil 4.19, 4.20, 4.21).



Şekil 4.19. Phage33, yakından ilişkili fajlar ve Clavibacter CMP1'in majör kapsid proteinine göre filogenetik analizi. (A) Majör kapsid proteininin Neighbor-joining metodu ile filogenetik ağacı (B) Fajlar arasındaki ikili genom arası benzerlikler.



Şekil 4.20. Phage33, yakından ilişkili fajlar ve Clavibacter CMP1'in portal proteinine göre filogenetik analizi. (A) Portal proteininin Neighbor-joining metodu ile filogenetik ağacı. (B) Fajlar arasındaki ikili genom arası benzerlikler.



Şekil 4.21. Phage33, yakından ilişkili fajlar ve Clavibacter CMP1'in terminaz büyük alt birim proteinine göre filogenetik analizi. (A) Terminaz büyük alt birimin Neighbor-joining metodu ile filogenetik ağacı (B) Fajlar arasındaki ikili genom arası benzerlikler.

Phage33'ün en yüksek benzerlik gösterdiği Xylella phage Sano ile benzerlik oranı %95 altı olduğundan tür bazında bir eşleşme olmadığı sonucuna varıldı. Phage33, Xylella phage Sano ile %70 üzeri benzerlik gösterdiğinden iki fajın da aynı cinse (Sanovirüs) ait farklı türler olduğu ortaya konmuş oldu.

4.14. Emülsiyon Formülasyonunun Geliştirilmesi

Taguchi metodu kullanılarak emülsiyon formülasyonunun optimizasyonu gerçekleştirildi. Yağ çeşidi, kullanılan emülsiyonların farklı oranları, homojenizasyon hızı ve süresinin optimizasyonu gerçekleştirildi. L₁₆ Taguchi ortogonal dizisi kullanılarak oluşturulan emülsiyonların *Cmm*-DB3 üzerindeki inhibisyon yeteneği belirlendi (Tablo 4.6).

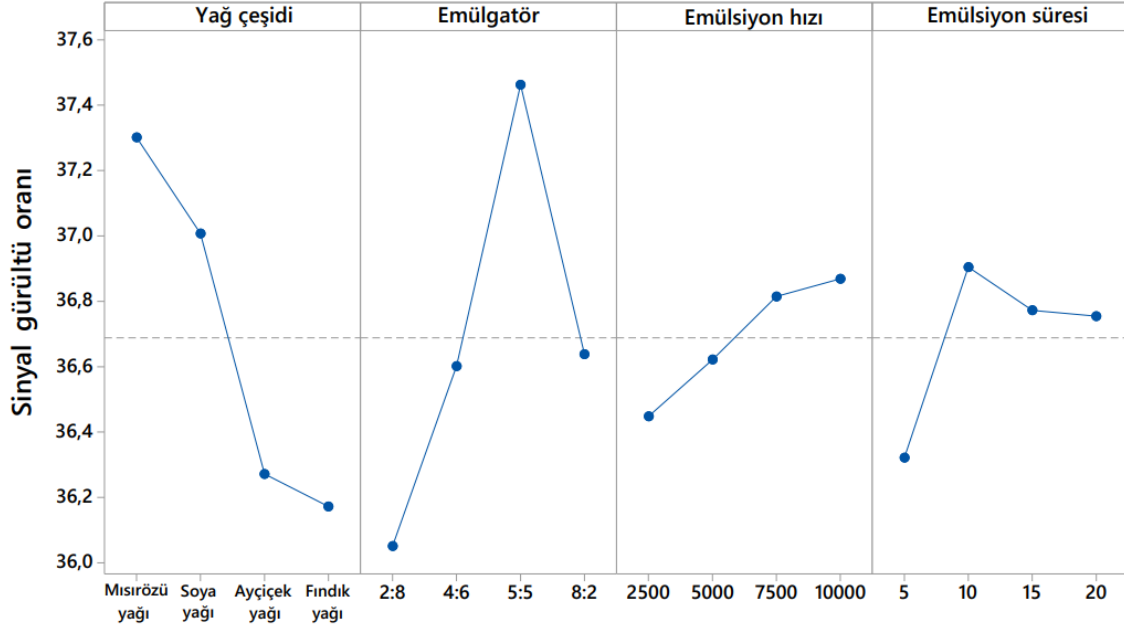
Tablo 4.6. Taguchi L16 ortogonal düzlemine göre bakteri inhibisyonu

Deney	Faktörler ve Seviyeleri				Cmm-DB3 inhibisyon oranı (%)
	Yağ Çeşidi	Emülgatör oranı	Emülsiyon süresi (dk)	Emülsiyon hızı (rpm)	
1	Mısırözü yağı	2:8	5	2500	65
2	Mısırözü yağı	4:6	10	5000	74
3	Mısırözü yağı	5:5	15	7500	80
4	Mısırözü yağı	8:2	20	10000	75
5	Soya yağı	2:8	15	5000	66
6	Soya yağı	4:6	20	2500	67
7	Soya yağı	5:5	5	10000	76
8	Soya yağı	8:2	10	7500	75
9	Ayçiçek yağı	2:8	20	7500	62
10	Ayçiçek yağı	4:6	15	10000	68
11	Ayçiçek yağı	5:5	10	2500	71
12	Ayçiçek yağı	8:2	5	5000	60
13	Fındık yağı	2:8	10	10000	61
14	Fındık yağı	4:6	5	7500	62
15	Fındık yağı	5:5	20	5000	72
16	Fındık yağı	8:2	15	2500	63

Elde edilen sonuçların, Minitab 17 yazılımı kullanılarak sinyal/gürültü ve varyans analizi gerçekleştirildi. Her faktör için belirlenen en büyük S/N değeri, faktörün seviyesi için belirlenen optimum değerdir (Şekil 4.22). Buna göre yağ çeşidi olarak mısırözü yağı, emülgatör olarak gliserol ve Tween80 (5:5) kullanılıp karışımının emülsiyon hızı 10.000 rpm ve süresinin 10 dk olduğu durumda elde edilen formülasyonun en ideal olduğu belirlendi.

Kullanılan faktörlerin bakteri inhibisyonuna etkisi, sonuçların varyans analizi ile değerlendirilmesi sonucu belirlendi (Tablo 4.7). Faktörlerin etki oranları Şekil 4.23'de gösterildi.

Sinyal/gürültü oranı ve varyans analizi sonuçları dikkate alınarak optimum şartlarda gerçekleştirilen doğrulama deneyi sonucunda edilen emülsiyon formülasyonunun *Cmm-DB3* üzerindeki inhibisyon oranı %80,7 olarak belirlendi. Elde edilen sonuç Taguchi yönteminde belirlenen tahmini sonuç ile karşılaştırıldığında doğruluk oranı %97,45 olarak belirlendi (Tablo 4.8).



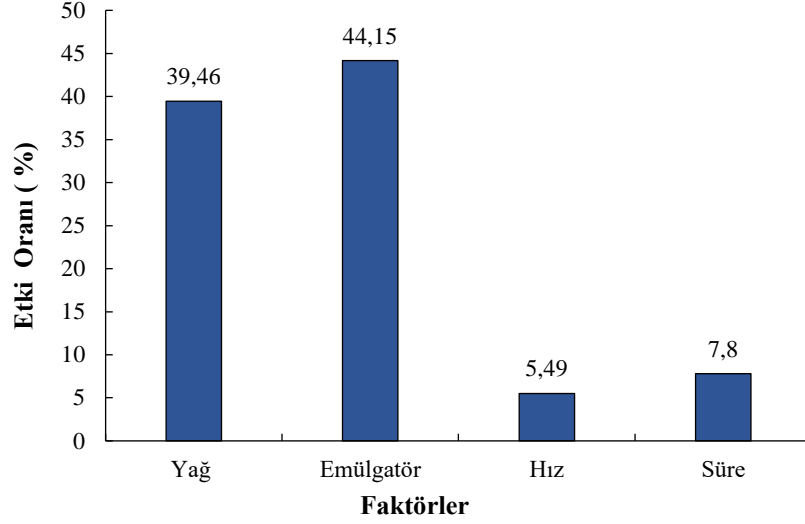
Sinyal gürültü oranı: Büyük değer iyi

Şekil 4.22. Emülsiyona etki eden faktörlerin sinyal gürültü oranı

Tablo 4.7. Emülsiyon koşullarına etki eden faktörlerin varyans analizi

Faktörler	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F-değeri	P değeri
Yağ	231,19	3	77,062	12,71	0,033*
Emülgatör	258,69	3	86,229	14,22	0,028*
Emülsiyon hızı	32,19	3	10,729	1,77	0,325
Emülsiyon süresi	45,69	3	15,229	2,51	0,235
Hata	18,19	3	6,063		
Toplam	585,94	15			

*Faktörün önemli olduğunu gösterir ($p < 0,05$)



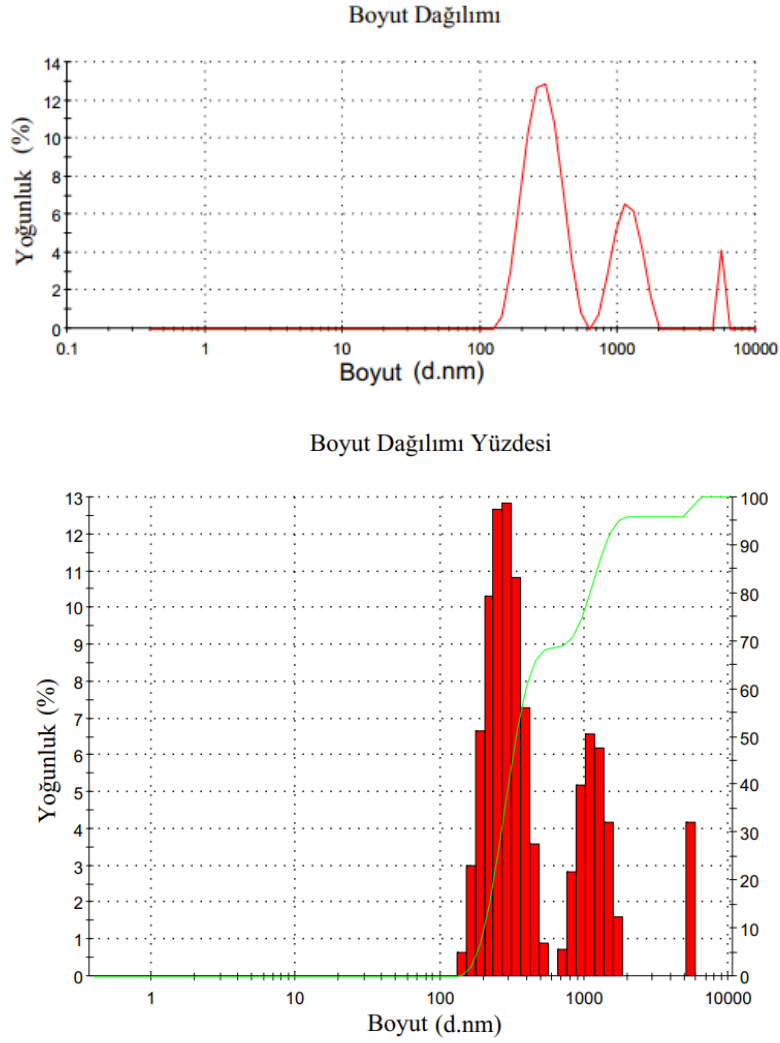
Şekil 4.23. Emülsiyonu etkileyen faktörlerin etki oranı

Tablo 4.8. Optimum tasarım için tahmin edilen ve belirlenen değerler

Tahmini inhibisyon (%)	Ortalamanın standart hatası	Güven aralığı (% 95)	Belirlenen inhibisyon oranı (%)	Doğruluk
82,82	2,21	75,74- 89,87	80,7	%97,45

4.15. Emülsiyonun Karakterizasyonu

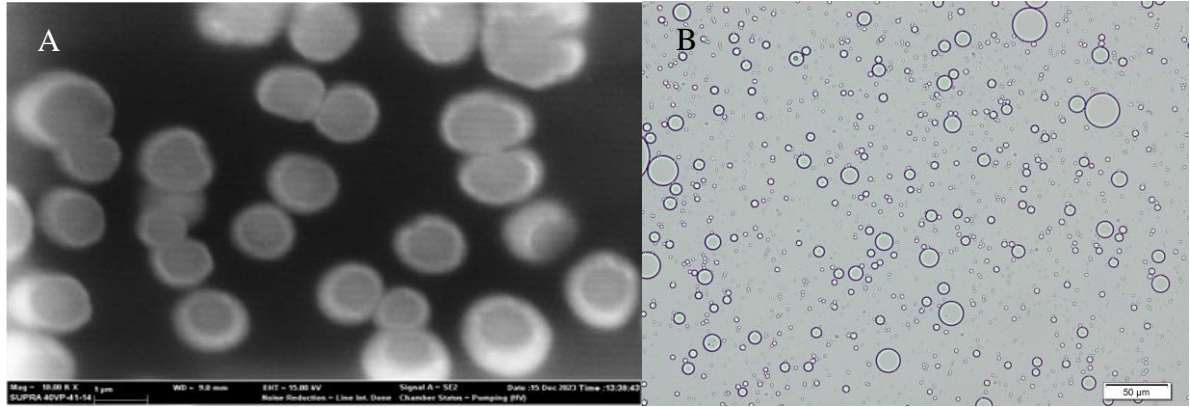
Hazırlanan emülsiyon farklı boyutlardaki damlacıklardan oluştuğundan polidispers bir yapıda olduğu belirlendi. Polidispers emülsiyonların boyutlarının belirlenmesinde partikül boyut dağılımı terimi kullanılmaktadır. Yapılan boyut ölçümü sonrası emülsiyondaki damlacıkların %68,6'sının 288,8nm, %27,2'sinin 1172nm ve %4,1'nin 5560nm olduğu belirlendi. Ayrıca polidispersite indeksinin'de (PdI) 0,785 olduğu belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Emülsiyonun damlacık boyut dağılımı ve yüzdesi

Oda sıcaklığında ve +4°C muhafaza edilen emülsiyon formülasyonun 1. ay sonunda *Cmm-DB3* üzerindeki inhibisyon oranları sırasıyla %79,56 ve %79,8 olarak belirlendi. Başlangıç inhibisyon yüzdesine oranla, oda sıcaklığında muhafaza edilen formülasyonun inhibisyon oranında %1,4 düşüş, +4°C muhafaza edilen formülasyonun inhibisyon oranında ise %1,1 düşüş meydana geldi. 3.ay sonunda ise emülsiyonun *Cmm-DB3* üzerindeki inhibisyon oranı sırası ile %78,93 ve %79,51 olarak belirlendi. 6. Ay sonundaki emülsiyonun inhibisyon oranlarına bakıldığında ise %78,12 ve %79,23 olarak belirlendi. Başlangıç inhibisyon oranları ile karşılaştırıldığında, 6 ay sonunda buzdolabında saklanan emülsiyonun inhibisyon oranında %1,82 düşüş meydana geldiği belirlendi. Raf ömrü takibi devam etmektedir.

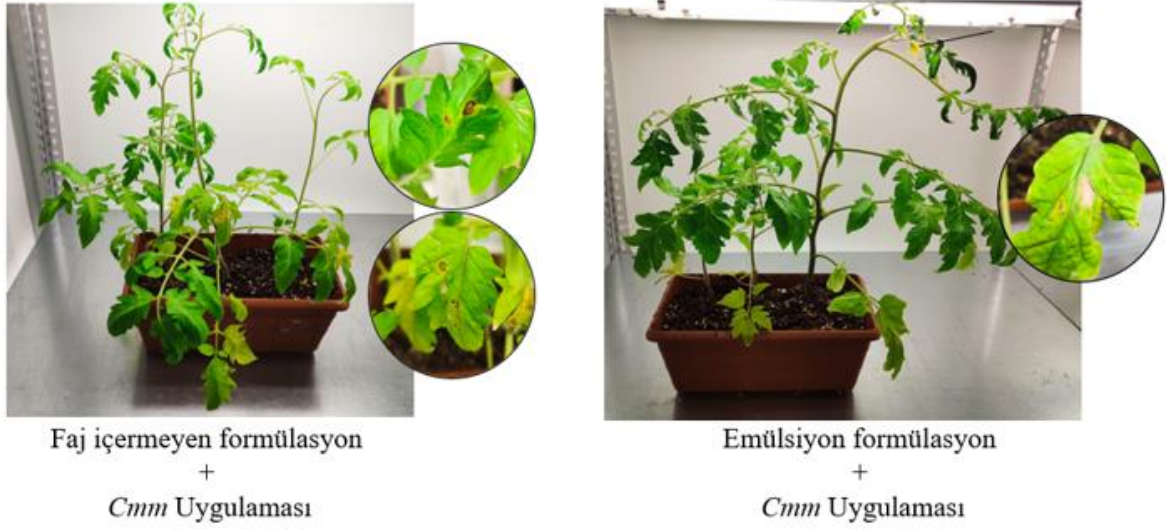
Damlacık boyut analizi sonucu polidispers yapıda olduğu belirlenen emülsiyonun elektron mikroskopisi görüntüleri de birbirinden farklı boyutta yapıların olduğunu göstermektedir (Şekil 4.25)



Şekil 4.25. Emülsiyon faj formülasyonunun mikroskobik görüntüleri. A: Taramalı elektron mikroskobu görüntüsü. B: Işık mikroskobu görüntüsü (400×)

4.16. Emülsiyonun Yeşil Aksam Üzerindeki Etkinliğinin Belirlenmesi

Yapılan saksı denemelerinde kontrol grubu olarak kullanılan su uygulanan bitkilerde hiçbir hastalık belirtisi görülmedi. *Cmm*-DB3 uygulanan bitkilerde gövdede kararmalar ve yapraklarda lezyonlar görüldü. Bitkinin yapraklarının %78'inde hastalık belirtisi görüldü. Emülsiyon uygulanan bitkilerde gövdede kararma görünmezken bitki yapraklarının %17'sinde hastalık belirtisi gözlemlendi. Bos formülasyon uygulanan bitkilerde ise gövde kararmalarına ek olarak yaprakların %61'inde lezyonlara rastlandı (Şekil 4.26). Emülsiyon formülasyonunun hastalık belirtilerini %78,2 oranında düşürdüğü saksı denemeleri ile belirlendi.



Şekil 4.26. Emülsiyon formülasyonun saksı denemeleri

5. TARTIŞMA

Son yıllarda fajların bakteriyel bitki hastalıkları ile mücadelede etkili bir biyokontrol ajanı olma potansiyeline sahip oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, domates bitkisinde bakteriyel solgunluk ve kansere neden olan önemli bir fitopatojendir. Bu çalışmada, rizosfer topraklarından ve domates bitkilerinin filosferlerinden fajlar izole edilmiş ve *Cmm*'ye karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyelleri değerlendirilmiştir. Toplanan (45 toprak ve 45 domates filosferi) 90 örnekten 22 faj izole edilmiştir. İzole edilen fajların 14'ü rizosfer toprağından, diğerleri filosfer tabakasından elde edilmiştir. Önceki çalışmalarda, fajlar genellikle enfekte bitkilerin yakınındaki toprak örneklerinden elde edilmiştir. Gašić vd., (2011b), biber ekim alanlarında toprak, yaprak, meyve ve kök örneklerinden elde ettiği 25 fajın 22'sini topraktan izole etmiştir. Bununla birlikte, James vd. (2020) kiraz tarlalarından 140 örnek (60 toprak, 60 yaprak ve 20 kabuk numunesi) toplamış ve filosfer tabakasından on farklı faj tespit etmiştir. Fajların, filosfer tabakasından nadiren izole edilmesi UV radyasyona ve sıcaklığa duyarlı olmaları ile ilişkilendirilmektedir.

Literatürde tanımlanan *Cmm* izolatlarının YDC agar üzerinde sarı renkli koloni oluşturmalarının karakteristik özellikleri olduğu bildirilmiştir (X. Li vd., 2018). Bununla birlikte, jelatinaz ve katalaz enzimi üretebilirken amilaz enzimi üretemediğı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Kesin tanımlama sağlamamakla, morfolojik ve biyokimyasal bu özelliklerin, tanımlamada yardımcı olabileceğı bildirilmiştir (J. R. Lamichhane vd., 2011). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, enfekte bitki materyallerinden elde edilen 90 bakteri izolatından 70'inin *Cmm* benzeri sarı pigment üreten koloniler oluşturduğu, bunlar içinde de sadece dokuz izolatın morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile *Cmm*'ye benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. DB13 izolatı hariç sekiz izolatın *Cmm* olduğu *pat-1* virülans geni varlığı ve patojenite testleri ile doğrulanmıştır. Geleneksel PZR ile *pat-1* geninin varlığı *Cmm* tanımlamasında Malliarakis vd. (2023) tarafından da kullanılmıştır. Ayrıca, *Cmm*'nin tanımlanması için geleneksel PZR' ye alternatif bir strateji olarak farklı moleküler yaklaşımlar da önerilmiştir. Morcia vd., (2023) tarafından *Cmm*'nin *pat-1* gen dizisine dayalı dijital çip PZR geliştirilmiş, farklı moleküler tekniklerle de moleküler tanımlama için *pat-1* geninin markör olarak kullanılabilceğı gösterilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen izolatlar ile yapılan konak spektrumu çalışmasında filosferden izole edilen sekiz fajdan dördü ile rizosferden izole edilen on dört fajdan altısının diğer fajlara göre daha geniş bir konak spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca,

beklendiği gibi, fajlarımız, *Acidovorax citrulli* ve *Pantoea agglomerans* üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Önceki çalışmalarda, fajların aynı türün yalnızca birkaç suşunu enfekte edebildiğini bildirmiştir (Gill ve Abedon, 2003). Bununla beraber, Ramírez vd. (2020a) izole ettiği sekiz fajdan beşinin, 65 *R. solanacearum* suşunun yarısından fazlasının büyümesini engellediğini göstermiştir. Nakayinga vd., (2021) tarafından 140 *Xanthomonas* fajından 52'sinin dar konak spektrumuna sahipken, 88 tanesinin geniş konak spektrumuna sahip olduğu belirtilmiştir. Dahası Khawaja vd., (2016) *Pseudomonas aeruginosa* JHP fajının farklı cinslerden (*S. enterica*, *A. baumannii*, *P. vulgaris* ve *E. coli*) bakterileri de enfekte edebildiğini göstermiştir. Biyolojik mücadele açısından bakıldığında, kullanılacak fajın bitkide hastalık yapan tür ve suşlar dışında etkili olması istenen bir durum değildir. Çünkü toprakta bitkinin büyüme ve gelişmesine önemli katkılar sunan bakteriler de mevcuttur.

Biyolojik mücadele açısından diğer önemli konu fajların abiyotik streslere toleransıdır. Bu nedenle, biyolojik mücadelede kullanılacak fajların sıcaklık ve pH gibi faktörlere direncinin belirlenmesi alan uygulamaları açısından önemlidir. Bu faktörler, adsorpsiyon ve çoğalmada temel rol oynadığı için fajın hayatta kalması ve stabilitesini sürdürmesi için kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda, en fazla izolatta etki gösterdiği belirlenen on fajın (iki faj filoferden ve sekiz faj rizosfer toprağından) farklı pH ve sıcaklıklara toleransı araştırılmıştır. Yalnızca topraktan izole edilen Phage33'ün, başlangıç titresine kıyasla uygulanan tüm sıcaklıklarda kararlı kaldığı belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, diğer fajlar için titrede önemli azalma gözlenmesine rağmen azalma genellikle her sıcaklıkta istatistiksel olarak aynıdır. Fajların sıcaklık toleranslarının oldukça değişken olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Fujiwara vd. (2011) *R. solanacearum*'un üç farklı fajının 28°C'nin altında stabil olduğunu, bunlardan biri olan RSL1'in test edilen en yüksek sıcaklıklarda (37 ve 50°C) diğer fajlardan daha fazla stabilite gösterdiğini bildirmiştir. Kazantseva vd. (2022) *Pseudomonas syringae*'yi enfekte eden Pf-10 fajının 30–60°C arasında %100 stabilite gösterdiğini ancak sıcaklık 70°C ve üzerine çıktığında canlılığının tamamen kaybolduğunu belirlemiştir. Sıcaklık toleransının faj morfolojisi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. H. Ackermann vd., (2004) kuyruklu ve kapsid çapı 100 nm'den büyük olan fajların yüksek sıcaklıklara daha dirençli olduğunu belirtmiştir. Fajların izole edildikleri ortam ile sıcaklık toleransları arasında da ilişki bulunmaktadır. Lin vd., (2010) kaplıcalardan izole edilen *Thermus* TSP4 fajının yüksek sıcaklıklarda stabil kalabildiğini ve bu durumun oldukça uzun ve esnek olan kuyruk yapısı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. M. Li vd., (2016) ise Mingyong buzullarından aldığı su

örneklerinden izole ettiği fajların düşük sıcaklıklarda etkinliğini koruduğunu, 40°C ve üzeri sıcaklıklarda ise faj titresinde önemli azalma meydana geldiğini göstermiştir.

Faj stabilitesini etkileyen bir diğer önemli faktör ortamın pH'sıdır. Önceki çalışmalar, fajların nötr veya hafif alkali koşullar altında stabil kalabildiğini, düşük ve yüksek pH'ların ise faj titrelerinde önemli azalmaya yol açtığını göstermiştir. *P. syringae* pv. *tomato*'nun fajları olan Eir4 ve Eisa9'ün pH 7 ve pH 9'da stabilitesini koruduğu, pH 4 ve pH 12'de faj titrelerinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Korniienko vd., 2022). Bilindiği üzere bakteriyofajların enfeksiyon sürecinde ilk basamak, konak hücre yüzeyindeki bir reseptöre ve bakteri hücre duvarını zayıflatmak için fajın lizoziminin kullanılmasıdır. Bu basamakta, ortamın pH'sı, lizozim veya diğer kapsid proteinlerini etkileyerek fajın konak hücre üzerindeki reseptör bölgelerine bağlanmasını önleyebilir (Leverentz vd., 2004). Bununla birlikte az sayıda da olsa düşük ve yüksek pH ortamlarında stabiliteyi koruyan fajlar mevcuttur. Kizheva vd. (2023) yaptığı bir çalışmada, *Xanthomonas euvesicatoria*'ya özgü fajların pH 2 ve pH 12'de bile etkili olduklarını bildirmiştir. Çalışmamızda izole edilen fajlardan Phage41, pH 8 ve pH 9'da tamamen stabil iken, pH düşüşü ile faj titresinin de önemli ölçüde azaldığı sonucuna varılmıştır.

Geniş bir konak aralığına, yüksek pH ve sıcaklık toleransına sahip fajların bitki patojenlerini kontrol etmede daha başarılı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, arazi koşullarında *Cmm*'yi kontrol etme potansiyeli daha yüksek olan Phage24, Phage33, Phage41 ve bunların kombinasyonları ile farklı MOI'lerde (1, 10, 100 ve 1000) enfeksiyon gerçekleştirilerek inhibisyon oranları karşılaştırılmıştır. Üç fajın da *Cmm* büyümesini kontrole kıyasla önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. Phage33 ile maksimum inhibisyon MOI=10'da gözlenirken minimum inhibisyon MOI=1'de gözlenmiştir. Phage33 ve Phage41'in birlikte kullanımı MOI=1'deki en yüksek inhibisyon etkisi gösterirken, Phage33'ün tek başına daha yüksek inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir. Bu da kombinasyonun sinerjistik etki göstermediğinin bir kanıtıdır. Önceki çalışmalarda, faj kokteyllerinin fajın tek başına kullanımından daha etkili olduğu gösterilmiştir. *R. solanacearum*'a karşı kullanılan altı faj içeren faj kokteyli P'nin fajların tek kullanımından daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Wei vd., 2017). Ramírez vd. (2020a) M5 ve M8 faj kokteyllinin, muz bitkisinde Moko hastalığına neden olan *R. solanacearum*'un şiddetini tek bir fajdan daha fazla azalttığını göstermiştir. Bu çalışmaların aksine fajların tek başına kullanımlarının faj kombinasyonlarından daha etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya spesifik fajların bireysel etkilerinin kombinasyonlarından daha yüksek

olduğu bildirilmiştir (Akbaba ve Ozaktan, 2021). Faj kokteyllerinde kullanılacak fajların tipi, konak bakterinin suşu, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve MOI faj-faj etkileşimini belirleyen önemli faktörlerdir (Chan vd., 2013; Nikolich ve Filippov, 2020). Niu vd., (2021) *E.coli* O157'yi enfekte eden dört fajın farklı kombinasyonlarının (T1+T5+ rV5; T1+T5; T1+T4+T5+rV5; T1+T4+T5 ve T4+T5) etkinliğini test ettiği çalışmada, kombinasyonların inhibisyon oranı ile T5 fajının tek başına meydana getirdiği inhibisyon oranının benzer olduğunu, T4+T5+rV5 ve T5+rV5 kombinasyonlarının MOI=0,01 olduğunda ve *E. coli* O157 3081 suşu kullanıldığında fajlar arasında antagonistik etkinin görüldüğünü bildirmiştir.

Yapılan çalışmalar, Phage33'ün *Cmm* enfeksiyonlarını önleme potansiyeline sahip olduğunu göstermesine rağmen morfolojik ve moleküler özelliklerinin (kapsid yapısı, kuyruk varlığı, lizojeni ve integraz genleri ile toksik genlere sahip olup olmaması) belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla Phage33'ün elektron mikroskopisi ile morfolojik, komple genom analizi ile de moleküler özellikleri ortaya konmuştur.

Elektron mikroskopisi, Ackermann (2007) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre Phage33'ün Siphoviridae familyasının karakteristik özellikleri olan ikosahedral baş ve uzun non-kontraktıl kuyruğa sahip olduğunu göstermiştir. Fajın kapsitinin ~55 nm çapında, kuyruğunun ~170 nm uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. ICTV tarafından 2023 yılında yayımlanan rapora göre faj taksonomisinde değişikliğe gidilmiş olup Siphoviridae familyası kaldırılıp familyaya ait fajlar Caudoviricetes takımına dahil edilmiştir. Bu nedenle Phage33'ün morfolojik özellikleri Caudoviricetes takımından olduğunu göstermektedir.

Komple genom analizi ile Phage33'ün genom boyutunun 56,324 bç ve G+C içeriğinin %62,49 olduğu belirlenmiştir. Fajın komple genom analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi NCBI veri tabanında benzerleri ile karşılaştırıldığında, Xylella phage Sano ile %92,37 benzerlik göstermiştir. Daha sonraki eşleşmeler ise Stenotrophomonas phage Suzuki (88.04%), Xylella phage Salvo (%78.31), Xylella phage Bacata (%78,26), Xanthomonas Phage Seregon (%78,25)'dur. Phage33'ün en yakın benzerlik gösterdiği beş türün de Caudoviricetes takımına ait olduğu belirlenmiştir (Ahern vd., 2014; Clavijo-Coppens vd., 2021; Erdrich vd., 2022; Sullivan vd., 2022). Bununla beraber, Phage33 ve BLASTn sonucu benzerlik gösterdiği fajlar VIRIDIC analizi ile değerlendirildiğinde, Phage33 en yüksek benzerliği, Xylella phage Sano (%85,9) ve Stenotrophomonas phage Suzuki (%81,7) ile göstermiştir. Diğer fajlar Xylella phage Salvo, Xylella phage Bacata ve Xanthomonas phage Seregon ile olan benzerliği ise sırasıyla, %61,5, %61,9 ve %61,5 olarak tespit edilmiştir. ICTV' ye göre BLASTn sonucunda tüm genom benzerliği %95 ve üzeri olan genomlar aynı

tür olarak değerlendirilirken, %70 ve üzeri benzerlik gösteren genomlar aynı cins olarak değerlendirilmektedir (Turner vd., 2021). Bu durumda, BLASTn ve VIRIDIC sonuçlarına göre Phage33, Xylella phage Sano ve Stenotrophomonas phage Suzuki ile Sanovirüs cinsi içerisinde yer almakta, Xylella phage Salvo, Xylella phage Bacata ve Xanthomonas phage Seregon ise bunlardan farklı olarak Salvovirüs cinsi içerisinde yer almaktadır. Bu iki biyoinformatik araçtan elde edilen benzerlik yüzdelерinin farklı olması kullandıkları algoritmalar kaynaklıdır. VIRIDIC, ICTV tarafından prokaryotik virüslerin taksonomisinde kullanılması önerilen bir araçtır. Çünkü, iki genom arasındaki hizalanmış bazların sayısını her iki genomun uzunluğuna göre normalleştirir. Bu sayede, uzak genomlar arasındaki benzerliği daha iyi tahmin eden bir veri tabanıdır (Moraru vd., 2020b). Bu nedenle, Phage33'ün Xylella phage Sano ve Stenotrophomonas phage Suzuki ile aynı cins içerisinde yer alan farklı türler oldukları düşünülmektedir. Öte yandan, Phage33'ün NCBI veritabanında yer alan Clavibacter CMP1 fajı ile herhangi benzerlik göstermediği BLASTn ve VIRIDIC analizi ile ortaya çıkmıştır. Clavibacter CMP1 fajının tüm genom verileri 2009 yılında NCBI'a yüklenmiştir. Kayıtlı ORF'ler incelendiğinde fajlar için zorunlu bir protein olan kapsit proteinine ait ORF kaydı bulunmamaktadır. Wittmann vd., (2011) tarafından genomda yer alan gp15 proteinin Mu-like major kapsit proteinine benzerlik gösterdiği için muhtemel kapsit proteini olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, belirlenen 74 ORF içerisinde 65 tanesi hipotetik protein olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle, Phage33, *Cmm* enfekte eden fajlar içerisinde genom özellikleri ayrıntılı bir şekilde ortaya konan ilk fajdır. Bununla birlikte, bitki hastalıklarına sebep olan *Clavibacter michiganensis* alt türleri içerisinde sadece *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* 'u enfekte etme yeteneğine sahip CN1A fajının komple genom analizi yapılmıştır (Kongari vd., 2013).

VICTOR yazılımı ile gerçekleştirilen filogenetik analiz sonucunda da bu veriler doğrulanmıştır. VICTOR ile oluşturulan filogenetik ağaçta Phage33, Xylella phage Sano ve Stenotrophomonas phage Suzuki aynı dalda yer alırken, Xylella phage Salvo, Xylella phage Bacata ve Xanthomonas phage Seregon da ayrı bir dalda yer almaktadır. BLASTn sonuçlarında benzerlik tespit edilemeyen Clavibacter CMP1 fajı ise ağaçta dış grup olarak yer almıştır.

Biyoinformatik araçlar kullanılarak Phage33 genomunda 67 ORF belirlenmiş olup 37 tanesinin işlevleri tanımlanarak kategorize edilmiştir. DNA bağlama proteini (Terminase small/large subunit), kapsit ve kuyruk morfogenezinden sorumlu genler tüm fajlarda korunmuş olarak bulunurlar (Stamereilers vd., 2016). Phage33 genomunda da bu genlerin

varlığı tespit edilmiş, *Siphoviridae* faj genomlarında olduğu gibi, bu genlerin Phage33'te de genomun ön ucunda bulunduğu belirlenmiştir (Casjens, 2005). DNA replikasyon, metabolizma ve regülasyon genleri ile konak ilişkili genler ise bazı fajlarda bulunurken bazılarında bulunmamaktadır. Bu genler korunmamış olarak nitelendirilmektedir. Bu durum, DNA replikasyonunda ve transkripsiyonel düzeyde çeşitlilik ve yeni gen düzenleme mekanizmalarına işaret etmektedir (Stamereilers vd., 2016). Phage33 genomunda bulunan korunmamış genler de *Siphoviridae* familyasına uygun olarak genomun son kısımlarında yer almaktadır. Replikasyon ve regülasyondan sorumlu genlerin bazıları Phage33 genomunda bulunurken, lizojeniden sorumlu integras ve virülans genleri genomda bulunmamaktadır. Bu da Phage33'ün litik bir faj olduğunu ve biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

Literatür araştırmalarında faj genomunda bulunan konak hücre lizisinden sorumlu enzimler olan spaninlerin genellikle gram negatif bakterileri konak olarak kullanan faj genomlarında bulunduğu belirtilmiştir (Ahern, Das, Bhowmick, vd., 2014; Abeysekera vd., 2022). Buna rağmen, Han vd., (2023) tarafından yapılan çalışmada gram pozitif bir bakteri olan *Arthrobacter* sp.'yi enfekte eden SWEP2 fajının genomunda da spanin genlerinin varlığını tespit etmiştir. Benzer şekilde, gram pozitif bir bakteri olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'i enfekte eden Phage33'ün genomunda spanin genleri bulunmaktadır. Bu genleri genomda bulunduran fajların gram negatif bakterileri de enfekte edebilme yeteneğinin olabileceği düşünülmektedir. o-spanin ve i-spanin genleri *Xylella phage Sano*'da ayrı ayrı bulunurken, *Xylella phage Salvo*'da overlap yapmıştır (Ahern vd., 2014). Phage33' de cins bazında benzerlik gösterdiği *Xylella phage Salvo* gibi spanin genleri overlap yapmıştır. Bu durumlar bize faj genomlarının düzenlenmesi ve genom özelliklerinin anlaşılması hakkında bilgi vermektedir. Phage33 genomunda tRNA kodlayan genlerin bulunmaması, protein sentezini tamamlamak için konak tRNA'sına tamamen bağlı olduğunu göstermektedir.

Fajların morfolojik ve moleküler yapılarının aydınlatılması biyokontrolde etkili bir ajan olarak kullanılabilme potansiyelleri hakkında da bilgi vermektedir. Faj stabilitesi değişkendir ve abiyotik faktörlerden etkilenme potansiyelleri yüksektir. Kuyruklu fajların sıcaklık, pH ve UV radyasyon gibi abiyotik faktörlere karşı dayanıklılığı kuyuksuz fajlara göre daha yüksektir (Pereira vd., 2022). Abiyotik faktörlerden olan UV radyasyonun, serbest faj parçacıklarının protein yapılarını bozarak, nükleik asit yapısını değiştirmesi sonucu faj enfektivitesini azaltarak serbest fajlara doğrudan zarar verdiği bilinmektedir (Luo vd., 2022).

RNA genomlu fajlar ile karşılaştırıldığında, DNA genomlu fajlar timin dimerlerinden dolayı UV radyasyonuna karşı daha duyarlıdır. Yüksek A+T içeriğine sahip faj genomları daha yüksek dimer (T-T) oluşturma potansiyeline sahip olduklarından UV toleransları düşüktür (Mojica ve Brussaard, 2014). Ayrıca çift zincirli faj genomlarının (dsDNA, dsRNA) tek zincirli (ssDNA, ssRNA) faj genomlarına göre UV radyasyona karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir.

Elektron mikroskopisi ve komple genom analizi Phage33'ün kuyruklu dsDNA fajı olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca G+C (%62,3) içeriğinin A+T içeriğinden fazla olduğu belirlenmiştir. Kuyruk yapısına sahip olması, çift zincirli genoma sahip olması ve A+T içeriğinin az olması Phage33'ün biyokontrol de kullanılabilme potansiyelini artırmaktadır. Fajların laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen çalışmalarda avantajları ortaya konmakla birlikte arazi koşullarında istenen sonucu vermediği görülmektedir. Bu nedenle, faj formülasyonlarının oluşturularak abiyotik faktörlerden korunması önerilmektedir (Jagdale ve Kapadnis, 2021; Singh vd., 2021; Bai vd., 2022)

Emülsiyon formülasyonlar uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti ile en çok tercih edilen formülasyon tiplerinden biridir. Bu amaçla, Phage33'ün emülsiyon (su içinde yağ) formülasyonu geliştirilmiştir. Formülasyon geliştirme sürecinde, kullanılan yağ ve emülgatörün çeşidi ile emülsifikasyon hızı ve süresi Taguchi yöntemi ile optimize edilmiştir. Bu yöntem biyolojik ortamlara daha önce uygulanmış olup başarılı sonuçlar alınmıştır (Kallel vd., 2002; Eski vd., 2018; Sahoo vd., 2023). Ayrıca, *E. coli* ve *S. enterica* bakteriyofajlarının üretim sürecine etki eden inkübasyon süresi ve sıcaklığı Taguchi yöntemi ile optimize edilerek faj titresi 100 kat artırılmıştır (Hari Narayana Kola vd., 2023). Ayrıca, *P. aeruginosa* fajlarının püskürterek kurutma sürecinde kullanılan koruyucu maddelerin oranları Taguchi yöntemiyle optimize edilmiştir (Chang vd., 2017). Tabare vd., (2021) ise *P. aeruginosa* fajlarının ıslanabilir toz formülasyonlarını geliştirdiği çalışmada sprey kurutucunun giriş sıcaklığı ile gaz akış hızı ve kaplama materyalinin oranını Taguchi yöntemiyle optimize etmiştir. Phage33'ün emülsiyon formülasyonunun optimizasyonu sonucu, mısırözü yağı ve Tween80:Gliserol (5:5) kullanılarak 10 dk. ve 10000 rpm karıştırma hızında oluşturulan formülasyonun en etkili formülasyon olduğu belirlenmiştir.

Formülasyonun etkinliği *in vitro* denemelerle belirlenmiş ve emülsiyon formülasyonunun bakteri üzerindeki inhibisyon etkisinin Phage33'ün tek başına kullanıldığı durumdan fazla olduğu ortaya konmuştur. Emülsiyon formülasyonların, fajları abiyotik faktörlerden koruduğu gibi enfeksiyon sürecine de katkı sunduğu düşünülmektedir. Faj ile

bakterinin bulunduğu ortamda, fajın kuyruk fiberleri ile bakteri hücre yüzeyindeki reseptörleri bir araya getiren biyokimyasal interaksyonlar ve ayıran elektrostatik itme kuvveti mevcuttur. Emülsiyon formülasyonlar, ortamdaki itme kuvvetini ortadan kaldırarak faj ile bakteri arasındaki etkileşimi artırmaktadır (Esteban vd., 2016).

Fajlar, formülasyonlarda kullanılan yağ ve yüzey aktif maddelerin emülsifikasyonu ile oluşan matriks yapının içine gömülü olduğundan UV radyasyondan korunurlar (Esteban vd., 2014; Choińska-Pulit vd., 2015). Emülsiyon formülasyonda kullanılan Tween80 ve mısır özü yağının UV koruyucu özelliği olduğu bilinmektedir (Nguyen vd., 2012). Tween 80, yüksek emülsifiye edici aktivitesi nedeniyle su içinde yağ emülsiyonlarda yaygın olarak kullanılan küçük moleküllü bir yüzey aktif maddedir (Udomrati vd., 2020). Born vd. (2015) UV absorblayıcı olarak Tween80 dahil olmak üzere toplam 8 madde kullanarak *Erwinia amylovora* Y2 fajını 254 nm dalga boyunda ışığa 30, 60, 120 ve 300 saniye maruz bıraktıktan sonra faj titresini belirlemiştir. Tween80, fajın enfektivitesinde negatif bir etki göstermemiş hatta koruyucu kullanılmayan faja oranla yarılanma ömründe önemli bir artış sağlamıştır. Bununla birlikte, UV koruyucu etkinin maruziyet süresine bağlı olduğu ve 300 saniyeden sonra yarılanma sürelerinde önemli azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Gorzynski vd., (2023) *Mycobacterium abscessus* spesifik 27 fajı Tween80 (%5) ile muamele edip etkinlik denemesi gerçekleştirdiğinde fajlardan 3 tanesinin litik aktivitesinde düşüş meydana geldiğini gözlemlemiştir. Bu durumun, Tween80'in bakteri yüzey glikolipitlerini geri dönüşümlü olarak uzaklaştırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmalar, formülasyonlarda kullanılan Tween80'in fajın UV toleransını artırdığını, bu durumun kullanılan konsantrasyonla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Formülasyonlarda emülsifiye edici ajan olarak kullanılan maddelerden biri de gliseroldür. Bu özelliğinin yanında Santos vd., (2009) tarafından yapılan çalışmada fajların etkinliğini artırdığı belirtilmiştir. Besiyerine farklı oranlarda (%5, %10 ve %20) eklenen gliserolün fajların etkinliğinde meydana getirdiği değişim oluşan plak çapları değerlendirilerek belirlenmiş, %5 gliserol kullanılması durumunda başlangıca göre plak çapının arttığı, %10 ve %20 gliserol kullanıldığında ise plak çapının azaldığı ortaya konmuştur. Bu durum, formülasyonlarda kullanılacak maddelerin konsantrasyonlarının da sonucu etkilediğini göstermektedir. Taguchi yöntemi ile gerçekleştirilen optimizasyon, formülasyonda %7,5 gliserol kullanılmasının emülsiyonun etkinliğini artırmada etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Bununla beraber, literatürde yer alan çalışmalar, gliserolün faj etkinliğini anlamlı bir şekilde artırmadığını göstermektedir (Becker vd., 2009; Abdelsattar vd., 2021).

Fajların formülasyonlarında kullanılan maddeler aynı zamanda depolama sürecinde fajların stabil kalmalarını ve etkinliklerini korumalarını sağlar. Genellikle nötr pH ve düşük iyon içeriği, faj formülasyonlarının +4°C’de stabil olmalarını sağlar. Ancak, bakteriyofajlar arasında bu durum farklılık gösterebilir. Gonzalez-Menendez vd., (2018) *Staphylococcus* fajlarını farklı sıcaklıklarda çeşitli stabilizörler kullanarak (%15 gliserol, %11 süt tozu) muhafaza etmiştir. phiIPLA-RODI faji gliserol içeren ortamda, -20°C’de 24 ay muhafaza edildikten sonra faj titresinde yaklaşık 1 log₁₀ azalma meydana gelirken aynı koşullarda phiIPLA-C1C fajının titresinde ~3,6 log₁₀ azalma meydana gelmiştir. Daha düşük sıcaklıklarda ise (-80°C ve -196°C) kullanılan stabilizör fark etmeksizin fajların titresinde bir değişiklik meydana gelmemiştir. 20°C’de süt tozu kullanılarak muhafaza edilen phiIPLA88 fajının titresinde altı ay boyunca bir değişiklik meydana gelmezken 12. ayda fajın etkinliğini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. Xiao vd., (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, %30 gliserol ve %10 DMSO’nun *Vibrio cholerae* VP3 fajını 4°C ve -20°C’de koruduğu, -80°C’de ise faj titresinde önemli bir düşüş meydana geldiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, kuyruklu 5 faj (JHP, RLP, RSP, SaPL ve IttPL) %15 gliserol içeren ortamda farklı sıcaklıklarda (37°C, 25°C, 4°C, -20°C ve -80°C) saklanmış ve 24 ay sonunda, 4°C hariç test edilen tüm sıcaklıklarda, faj titresinde ortalama ~10 log₁₀ azalma meydana gelmiştir. Oda sıcaklığında ve +4°C muhafaza edilen Phage33 emülsiyon formülasyonunun 1. ay sonunda *Cmm*-DB3 üzerindeki inhibisyon oranları ile başlangıç inhibisyonu arasında önemli farklılıklar olmadığı belirlenmiştir.

Emülsiyon formülasyonların stabilitesine etki eden faktörlerden biri de damlacık boyut dağılımıdır. Emülsiyonlar homojen görünümlü heterojen sistemlerdir. Genellikle, emülsiyonlar farklı boyutlardaki damlacıklardan meydana geldiğinden polidispers yapıdadır (Güngör vd., 2013). Polidispersite indeksi (PDI) 0 ile 1 arasında değişebilir ve PDI değeri 0,3’den düşük emülsiyonlar tek boyutta damlacıklar (monodispers) içerirken 0,3’den büyük değerler ise emülsiyonun farklı boyutta damlacıklar içerdiğini gösterir (Danaei vd., 2018). Phage33 emülsiyonunun polidispersite indeksinin 0,78 olduğu dolayısı ile hazırlanan emülsiyonun farklı boyutlarda damlacıklar içeren polidispers bir yapı olduğunu göstermiştir. Elektron mikroskopisi görüntüleri de emülsiyonun farklı boyutlarda damlacıklar içerdiğini göstermektedir.

In-vitro koşullarda kontrollü olarak gerçekleştirilen denemelerde başarılı sonuçlar alınmasına rağmen saksı, sera veya arazi koşullarında genellikle aynı sonuçlar elde edilememektedir. Bu nedenle geliştirilen emülsiyon faj formüasyonunun etkinliği saksı denemeleri ile gösterilmiştir. İklım odasında 16/8 saat foto periyotta gerçekleştirilen denemelerde Phage33 formüasyonunun *Cmm-DB3* uygulanan saksılarla karşılaştırıldığında hastalık belirtilerini %78,2 azalttığı ortaya konmuştur. Tewfike ve Desoky (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *X. axonopodis* izolatlarının biber bitkisinde meydana getirdiği hastalığı önlemede süt tozu ve mısır unu ile formüle edilmiş faj kokteyllerinin hastalık belirtilerini sırasıyla %70 ve %65 azalttığını bildirmiştir. Orynbayev vd. (2020) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'in lahanalarda neden olduğu siyah damar ürüklüėü hastalığının kontrolünde %0,75 yağsız süt tozu ile formüle edilmiş DB1 fajını kullanmıştır. Bitkilerdeki enfeksiyon oranı uygulama yapılmayan kontrol grubunda %13,6, formüle faj uygulanan grupta ise %2,9 olarak rapor edilmiştir. Formüasyonlar, fajları UV radyasyondan koruyarak filozferdeki kalıcılıklarını artırır ve dolaylı olarak yüksek etkinlik sağlarlar. Ancak, formüle edilmemiş fajların da uzun süre etkinlik gösterebildiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Katarina Gařić vd., (2018) sera koşullarında biber bakteriyel leke hastalığı etmeni *X. euvesicatoria*'nın kontrolü için formüle edilmemiş KΦ1 fajını kullanmış ve herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubuna oranla, faj uygulanan bitkilerde hastalık belirtilerinde %50 azalma rapor edilmiştir. Ayrıca, çalışmada bakteri inokülasyonundan önce ve sonra gerçekleştirilmiş faj uygulamasının sonuçları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Ancak, bazı çalışmalar faj uygulamalarının gerçekleştirilme zamanının da önemli olduğunu göstermektedir. Leverentz vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada faj kokteyli uygulaması bakteri uygulamasından önce ve sonra yapılmıştır. Bakteri uygulamasından 1 saat önce gerçekleştirilen faj uygulamasının daha etkili olduğu bildirilmiştir. Faj formüasyonlarının bitki hastalıklarının şiddetini azaltmada başarılı olduğu görülmektedir. Faj formüasyonları her ne kadar abiyotik faktörlerden koruma sağlasa da bu durum maruziyet süresi ile ilişkilidir. Dolayısıyla formüasyonun bitkilere uygulanma zamanı da etkinliklerinin artırılmasında önemli bir parametredir. Faj uygulamalarının sabah erken saatlerde veya akşam geç saatlerde yapılması fajın sıcaklık, pH ve UV radyasyonun zararlı etkilerine minimum maruz kalmasına sebep olacağından fajların filozferdeki kalıcılıklarını artırmaktadır. Özellikle sera ve arazi koşullarında gerçekleştirilecek uygulamalarda bu durum dikkate alınmalıdır.

Sonuç olarak, yapılan literatür taramasında Tokat, Antalya ve Mersin illerindeki domates üretim alanlarından *Cmm* izolasyonu yapıldığı belirtilmesine rağmen (Baysal vd., 2011; Belgüzar, 2016; Sen vd., 2012), gerçekleştirdiğimiz tez çalışması ile Türkiye'nin batısında bulunan Çanakkale, İzmir ve Bilecik illerinden ilk kez *Cmm* izole edilmiştir. Ayrıca, *in-vitro* koşullarda etkili olduğu belirlenen *Cmm* spesifik Phage33, İzmir ilinden izole edilmiştir. NCBI veri tabanına kayıtlı *Clavibacter* CMP1 fajı dışında bugüne kadar *Cmm* spesifik bir fajın komple genom analizi yapılmamış olup bu tez çalışması ile Phage33'ün komple genom analizi yapılarak faj literatürüne yeni bir faj türü kazandırılmış ve sahip olduğu özellikler ile biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabilceği teyit edilmiştir. Ayrıca, Phage33'ün abiyotik faktörlere olan toleransını artırmak amacıyla emülsiyon formülasyonu ilk kez Taguchi metodu ile optimize edilmiş ve patojenin mücadelesinde kullanılabilcek yerli bir prototip ürün ortaya konmuştur.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in sebep olduğu domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığına karşı spesifik fajların emülsiyon formülasyonları geliştirilerek etkinliği gösterilmiş oldu. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda gelecek çalışmalar için aşağıdaki öneriler sunulmuştur.

1. Phage33'ün komple genom analizi sonucu belirlenen hipotetik proteinlerin görevlerinin ortaya konabilir.
2. Rekombinant DNA teknolojisinden faydalanarak Phage33'ün arazi koşullarında etkinliğini artırılabilir.
3. Hazırlanan emülsiyonun arazi koşullarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerinde etkinliği denebilir.
4. Hazırlanan emülsiyon formülasyonun üreticilerin kullanımına sunulabilmesi için ruhsatlandırma çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKÇA

- Abdelsattar, A. S., Safwat, A., Nofal, R., Elsayed, A., Makky, S., & El-Shibiny, A.** (2021). Isolation and Characterization of Bacteriophage ZCSE6 against *Salmonella* spp.: Phage Application in Milk. *Biologics*, 1(2), 164–176.
- Abeysekera, G. S., Love, M. J., Manners, S. H., Billington, C., & Dobson, R. C. J.** (2022). Bacteriophage-encoded Lethal Membrane Disruptors: Advances in Understanding and Potential Applications. *Frontiers in Microbiology*, 13(October), 1–11.
- Abo-Elyousr, K. A. M., & Hassan, S. A.** (2021). Biological Control of *Ralstonia solanacearum* (Smith), The Causal Pathogen of Bacterial Wilt Disease by Using *Pantoea* spp. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1).
- Abolaji, A. O., Fasae, K. D., Iwezor, C. E., Aschner, M., & Farombi, E. O.** (2020). Curcumin Attenuates Copper-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity in *Drosophila Melanogaster*. *Toxicology Reports*, 7(1), 261–268.
- Ackermann, H.W., Tremblay, D., & Moineau, S.** (2004). Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsl*, 38,35-40.
- Ackermann, H. W.** (2007). 5500 Phages Examined in The Electron Microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227–243.
- Ackermann, H.W.** (2011). Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiol Science*, 4:214- 218.
- Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T.** (2012). Utilization of Filamentous phage ϕ RSM3 to Control Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia Solanacearum*. *Plant Disease*, 96(8), 1204–1209.
- Adhya, S., Merrill, C. R., & Biswas, B.** (2014). Therapeutic and Prophylactic Applications Of Bacteriophage Components in Modern Medicine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(1), 1–14.
- Ahern, S. J., Das, M., Bhowmick, T. S., Young, R., & Gonzalez, C. F.** (2014). Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*, 196(2), 459–471.
- Akbaba, M., & Ozaktan, H.** (2021). Evaluation of Bacteriophages in the Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Isolated From Cankers On Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) in Turkey. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1).

- Aksyuk, A. A., & Rossmann, M. G.** (2011). Bacteriophage assembly. *Viruses*, 3(3), 172–203.
- Alfadhel, M., Puapermpoonsiri, U., Ford, S. J., McInnes, F. J. & Van Der Walle, C. F.** (2011). Lyophilized Inserts for Nasal Administration Harboring Bacteriophage Selective for *Staphylococcus aureus*: In Vitro Evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), 280–287.
- Ali, M., Ondokuz, S., & Sevik, M. A.** (2016). A Viral Pathogen Threatening Vegetable Production : Tomato spotted wilt virus Sebze Üretimini Tehdit Eden Viral Hastalık Etmeni : Domates A Viral Pathogen Threatening Vegetable Production : Tomato., 5(10), 17–23.
- Álvarez, B., Gadea-Pallás, L., Rodríguez, A., Vicedo, B., Figàs-Segura, À., & Biosca, E. G.** (2022). Viability, Stability and Biocontrol Activity in Planta of Specific *Ralstonia solanacearum* Bacteriophages After Their Conservation Prior to Commercialization and Use. *Viruses*, 14(2).
- Álvarez, B., López, M. M., & Biosca, E. G.** (2019). Biocontrol of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Water and Host Plants by Novel Waterborne Lytic Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 10(12), 1–17.
- Atterbury, R. J.** (2009). Bacteriophage Biocontrol in Animals and Meat Products. *Microbial Biotechnology*, 2(6), 601–612.
- Bae, H. W., & Cho, Y. H.** (2013). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* podophage MPK7, Which Requires Type IV Pili for Infection. *Genome Announcements*, 1(5), 2013.
- Bae, Y. J., Wu, J., Lee, H. J., Jo, E. J., Murugaiyan, S., Chung, E., & Lee, S. W.** (2012). Biocontrol Potential of a Lytic Bacteriophage PE204 Against Bacterial Wilt of Tomato. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1613–1620.
- Baer, A., & Kehn-Hall, K.** (2014). Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *Journal of Visualized Experiments*, (93), 1–10.
- Bai, J., Liu, Y., Liu, M., Luo, S., Cheng, Y., Li, G., & Jin, Y.** (2022). Application of Phage Therapy Against Red-Fleshed Kiwifruit Canker. *Biological Control*, 169(10), 104893.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P., & Jackson, L. E.** (2003). Improved Efficacy of Newly Formulated Bacteriophages for Management Of

Bacterial Spot on Tomato. *Plant Disease*, 87(8), 949–954.

Basim, E., & Basim, H. (2004). Note: Evaluation of Antibacterial Activity of Essential Oil of *Rosa Damascena* on *Erwinia amylovora*. *Phytoparasitica*, 32(4), 409–412.

Baysal, Ö., Mercati, F., Ikten, H., Yildiz, R. Ç., Carimi, F., Aysan, Y. & Teixeira da Silva, J. A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75(3), 113–119. doi:10.1016/j.pmp.2010.10.002

Becker, S. C., Foster-Frey, J., Stodola, A. J., Anacker, D., & Donovan, D. M. (2009). Differentially Conserved Staphylococcal SH3b_5 Cell Wall Binding Domains Confer Increased Staphylococcal and Streptococcal Activity to a Streptococcal Prophage Endolysin Domain. *Gene*, 443(1–2), 32–41.

Benson, H. J. (1985). *Microbiological Applications, a Laboratory Manual in General Microbiology*, Brock, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.

Belgüzar, S. (2016). Tokat İlinde Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığının Yaygınlığı ve Etmenin (Cl. Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University, 33(2016–2), 34–34.

Bertozi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host Receptors for Bacteriophage Adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, 363(4), 1–11.

Bhunchoth, A., Phironrit, N., Leksomboon, C., Chatchawankanphanich, O., Kotera, S., Narulita, E., & Yamada, T. (2015). Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting Bacteriophages from Tomato Fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 1023–1033.

Born, Y., Bosshard, L., Duffy, B., Loessner, M. J., & Fieseler, L. (2015). Protection of *Erwinia amylovora* bacteriophage Y2 from UV-induced Damage by Natural Compounds. *Bacteriophage*, 5(4), e1074330.

Boudyach, E. H., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E., & Ait Ben Aoumar, A. (2001). Selection of Antagonistic Bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Evaluation of their Efficiency Against Bacterial Canker of Tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 11(1), 141–149.

Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of Bacteriophage and Bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31(4), 230–314.

- Bremer, H., G., Karel, G., Biyikoğlu, K., Göksel, N., & Petrak, F.** (1952). Türkite' nin Parazit Mantarları Üzerinde İncelemeler (Schizomycetes, Oomycetes, Ascomycetes 2). *İ.Ü Fen Fakültesi Mecmuası*, 17: 145 -160
- Brüssow, H., & Hendrix, R. W.** (2002). Phage Genomics. *Cell*, 108(1), 13–16.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A.** (2017). Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8(1), 1–15.
- Carlson, R. R. & Vidaver, A. K.** (1982). Taxonomy of Corynebacterium Plant Pathogens, Including a New Pathogen of Wheat, Based on Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Cellular Proteins. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(3), 315–326.
- Casjens, S. R.** (2005). Comparative Genomics and Evolution of the Tailed-bacteriophages. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 451–458.
- Catalão, M. J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., São-José, C., & Pimentel, M.** (2013). Diversity in Bacterial Lysis Systems: Bacteriophages Show the way. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(4), 554–571.
- Cemen, A., Saygili, H., Horuz, S., & Aysan, Y.** (2018). Potential of Bacteriophages to Control Bacterial Speck of Tomato (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(12), 9366–9373.
- Çetinkaya Yıldız, R.** (2007). *Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Etmeni (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Smith) Davis et. al.)'nin Tanılanması ve Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakteriler İle Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması.* (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Çevik, K., Alaşalvar, H., Çam, M., & Yalçın, H.** (2021). Ketan Tohumu Yağı Ve Yağsız Süt Tozu İçeren Emülsiyonların Püskürterek Kurutma İle Enkapsülasyonu: Yağ Oranı Ve Kurutma Sıcaklığını Etkileri. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 9(3), 735–742.
- Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C.** (2013). Phage Cocktails and the Future of Phage Therapy. *Future Microbiology*, 8(6), 769–783.
- Chang, R. Y., Wong, J., Mathai, A., Morales, S., Kutter, E., Britton, W., & Chan, H. K.** (2017). Production of Highly Stable Spray Dried Phage Formulations for Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 121, 1–13.

- Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W., & Skaradzińska, A.** (2015). Bacteriophage Encapsulation: Trends and Potential Applications. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 212–221.
- Claus, D.** (1992). A Standardized Gram Staining Procedure. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(4), 451–452.
- Clavijo-Coppens, F., Ginet, N., Cesbron, S., Briand, M., Jacques, M. A., & Ansaldi, M.** (2021). Novel Virulent Bacteriophages Infecting Mediterranean Isolates of the Plant Pest *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas albilineans*. *Viruses*, 13(5):725.
- Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J. C., Arias, J., Arévalo, A., & Vives-Flores, M.** (2019). Phage Cocktail SalmoFREE® Reduces *Salmonella* on a Commercial Broiler Farm. *Poultry Science*, 98(10), 5054–5063.
- Czajkowski, R., Ozymko, Z., & Lojkowska, E.** (2014). Isolation and Characterization of Novel Soilborne Lytic Bacteriophages Infecting *Dickeya* spp. biovar 3 ('D. solani'). *Plant Pathology*, 63(4), 758–772.
- Damicone, J. P., & Brandenberger, L.** (2015). Common Diseases of Tomatoes-Part II. Diseases Caused by Bacteria , Viruses , and Nematodes. *Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets EPP-7626*, 1–8.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., & Mozafari, M. R.** (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 1–17.
- Davison, S., Couture-Tosi, E., Candela, T., Mock, M., & Fouet, A.** (2005). Identification of the *Bacillus anthracis* γ Phage Receptor. *Journal of Bacteriology*, 187(19), 6742–6749.
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K. & Harris, R. W.** (1984). Clavibacter: A New Genus Containing Some Phytopathogenic Coryneform Bacteria, Including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., Pathogens That Cause Ratoon Stunting Disease of Sugarcane and Bermudagrass Stunting Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(2), 107–117.
- dela Cruz, T. E. E. & Torres, J. M. O.** (2012). Gelatin Hydrolysis Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 1–10.
- de León, L., Siverio, F., López, M. M., & Rodríguez, A.** (2008). Comparative Efficiency of Chemical Compounds for in Vitro and in Vivo Activity Against *Clavibacter michiganensis*

subsp. *michiganensis*, the Causal Agent of Tomato Bacterial Canker. *Crop Protection*, 27(9), 1277–1283.

Desai, K.G.H. & Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.

Deveau, H., Van Calsteren, M. R., & Moineau, S. (2002). Effect of Exopolysaccharides on Phage-Host Interactions in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4364–4369.

Dini, C., Islan, G. A., de Urza, P. J., & Castro, G. R. (2012). Novel Biopolymer Matrices for Microencapsulation of Phages: Enhanced Protection Against Acidity and Protease Activity. *Macromolecular Bioscience*, 12(9), 1200–1208.

Dnil, E., Moldovan, Z., Albu Kaya, M. G., & Ghica, M. V. (2019). Formulation and characterization of some oil in water cosmetic emulsions based on collagen hydrolysate and vegetable oils mixtures. *Pure and Applied Chemistry*, 91(9), 1493–1507.

Dreier, J., Bermpohl, A., & Eichenlaub, R. (1995). Southern Hybridization and PCR for Specific Detection of Phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 85(4), 462–468.

Duan, X., Yang, X., Ren, G., Pang, Y., Liu, L., & Liu, Y. (2016). Technical Aspects in Freeze-Drying of Foods. *Drying Technology*, 34(11), 1271–1285.

Echandi, E. & Sun, M. (1973). Isolation and Characterization of a Bacteriophage for the Identification of *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology*, 63, 1401–1403.

El-Abyad, M. S., El-Sayed, M. A., El-Shanshoury, A. R., & El-Sabbagh, S. M. (1993). Towards the Biological Control of Fungal and Bacterial Diseases of Tomato Using Antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil*, 149(2), 185–195.

Elhalag, K., Eldin, M. N., Hussien, A., & Ahmad, A. (2018). Potential Use of Soilborne Lytic Podoviridae Phage as a Biocontrol Agent Against *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Basic Microbiology*, 58(8), 658–669.

Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage Therapy in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 327–349.

Erdrich, S. H., Sharma, V., Schurr, U., Arsova, B., & Frunzke, J. (2022). Isolation of

Novel Xanthomonas Phages Infecting the Plant Pathogens *X. translucens* and *X. campestris*. *Viruses*, 14(7), 1–18.

Eski, A., Demir, İ., & Demirbağ, Z. (2018). Improvement of Delta-endotoxin Production from Local *Bacillus thuringiensis* Se13 using Taguchi's Orthogonal Array Methodology. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(6), 662–670.

Esteban, P. P., Alves, D. R., Enright, M. C., Bean, J. E., Gaudion, A., Jenkins, A. T. A., & Arnot, T. C. (2014). Enhancement of the Antimicrobial Properties of Bacteriophage-K via Stabilization Using oil-in-water Nano-emulsions. *Biotechnology Progress*, 30(4), 932–944.

Esteban, P. P., Jenkins, A. T. A., & Arnot, T. C. (2016). Elucidation of the Mechanisms of Action of Bacteriophage K/nano-emulsion Formulations Against *S. aureus* Via Measurement of Particle Size and Zeta potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 87–94.

Fatmi, M., & Schaad, N. W. (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in Infected Tomato Stems Under Natural Field Conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*, 51(2), 149–154.

Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G., & Ysebaert, M. (1976). Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage MS2 RNA: Primary and Secondary Structure of the Replicase Gene. *Nature* 260: 500–507

Flaherty, J. E., Jones, J. B., Harbaugh, B. K., Somodi, G. C., & Jackson, L. E. (2000). Control of Bacterial Spot on Tomato in the Greenhouse and Field with H-mutant Bacteriophages. *HortScience*, 35(5), 882–884.

Fokine, A., & Rossmann, M. G. (2014). Molecular Architecture of Tailed Double-stranded DNA Phages. *Bacteriophage*, 4(2), e28281.

Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, Italy (FAO) (2022). [Erişim tarihi 17.06.2023, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/>]

Francis, D. M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B., & St. Clair, D. (2001). Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease*, 85(11), 1171-1176.

Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by Treatment with Lytic Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4155–4162.

- Gaidelyte, A., Cvirkaite-Krupovic, V., Daugelavicius, R., Bamford, J. K. H., & Bamford, D. H.** (2006). The Entry Mechanism of Membrane-containing Phage Bam35 Infecting *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 5925–5934.
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A.** (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First Steps in the Understanding of Virulence of a Gram-positive Phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2–3), 179–191.
- Gašić, K., Ivanović, M. M., Ignjatov, M., Calić, A., & Obradović, A.** (2011a). Isolation and Characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*, 93(2), 415–423.
- Gašić, K., Ivanović, M. M., Ignjatov, M., Calić, A., & Obradović, A.** (2011b). Isolation and Characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*, 93(2), 415–423.
- Gašić, Katarina, Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Šević, M., & Obradović, A.** (2018). Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage KΦ1, Its Survival and Potential in Control of Pepper Bacterial Spot. *Frontiers in Microbiology*, 9(8), 1–12.
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T.** (2012). Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149–163.
- Gill, J., & Abedon, S. T.** (2003). Bacteriophage Ecology and Plants APSnet Feature. APSnet Feature, *Science*.
- Gleason, M. L., Braun, E. J., Carlton, W. M., & Peterson, R. H.** (1991). No Tit Survival and Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81, 1519–1523.
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., & Ricker, M. D.** (1993). Recent Progress in Understanding and Controlling Bacterial Canker of Tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 77(11), 1069–1076.
- González, A. J. & Trapiello, E.** (2014). *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* subsp. nov., Pathogenic in bean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(5), 1752–1755.
- Gonzalez-Menendez, E., Fernandez, L., Gutierrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B., &**

- García, P.** (2018). Comparative Analysis of Different Preservation Techniques for the Storage of Staphylococcus phages Aimed for the Industrial Development of Phage-based Antimicrobial Products. *PLoS ONE*, 13(10), 1–14.
- Gorzynski, M., De Ville, K., Week, T., Jaramillo, T., & Danelishvili, L.** (2023). Understanding the Phage–Host Interaction Mechanism toward Improving the Efficacy of Current Antibiotics in Mycobacterium abscessus. *Biomedicines*, 11(5).
- Guerrero-Ferreira, R. C., & Wright, E. R.** (2013). Cryo-electron Tomography of Bacterial Viruses. *Virology*, 435(1), 179–186.
- Güngör, Ö., Zungur, A., Koç, M., & Kaymak-Ertekin, F.** (2013). Emülsiyonların Özellikleri ve Emülsifikasyon Koşullarının Aroma ve Yağların Mikroenkapsülasyonu Üzerine Etkisi. *Academic Food Journal* , 11(2), 116–124.
- Griffin, K., Gambley, C., Brown, P., & Li, Y.** (2017). Copper-tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. *Crop Protection*, 96, 144–150.
- Han, M., Niu, X., Xiong, G., Ruan, C., Chen, G., Wu, H., & Wang, G.** (2023). Isolation , Characterization and Genomic Analysis of a Novel *Arthrobacter* sp . phage SWEP2. *Archives of Virology*, (1–9).
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., & Balcão, V. M.** (2018). Biotechnological Applications of Bacteriophages: State of the Art. *Microbiological Research*, 38–58.
- Hari Narayana Kola, V. D., Srikanth, K., Pasha, S. M., Goutham, Y. sudha., & Pasha, C.** (2023). Optimization Of Salmonella Bacteriophages Production By Taguchi Approach. *European Chemical Bulletin*, 12(8), 2580–2592.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U.** (2009). Microencapsulation of Probiotic Cells by Means of Rennet-gelation of Milk Proteins. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1670–1677.
- Hyman P., & Abedon S. T.** (2010). Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70:217-48.
- Imm, S., & Chang, Y.** (2023). Evaluation of the Biocontrol Potential of a Collagen Peptide/Trehalose-Based *Cronobacter sakazakii* phage Powder in Rehydrated Powdered Infant Formula. *Food Research International*, 173(1), 113257.

- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B.** (2007). Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1704–1711.
- Jagdale, S., & Kapadnis, B.** (2021). Bacteriophage Liquid Formulation: A potential Green Tool for the Management of Pomegranate Bacterial Blight. *Biological Control*, 158(10), 104597.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., & Eichenlaub, R.** (2000). The endo- β -1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a Pathogenicity Determinant Required for Induction of Bacterial Wilt of Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(7), 703–714.
- James, S. L., Rabiey, M., Neuman, B. W., Percival, G., & Jackson, R. W.** (2020). Isolation, Characterisation and Experimental Evolution of Phage that Infect the Horse Chestnut Tree Pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. *Current Microbiology*, 77(8), 1438–1447.
- Jang, H., Kim, S. T., & Sang, M. K.** (2022). Suppressive Effect of Bioactive Extracts of *Bacillus* sp. H8-1 and *Bacillus* sp. K203 on Tomato Wilt Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microorganisms*, 10(2), 1–18.
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., & Momol, M. T.** (2008). Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 245–262.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y.** (2010). Microencapsulation Techniques, Factors Influencing Encapsulation Efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187–197.
- Kallel, H., Zaïri, H., Rourou, S., Essafi, M., Barbouche, R., Dellagi, K., & Fathallah, D. M.** (2002). Use of Taguchi's Methods as a Basis to Optimize Hybridoma Cell Line Growth and Antibody Production in a Spinner Fask. *Cytotechnology*, 39(1), 9–14.
- Kalpage, M. D., & De Costa, D. M.** (2015). Isolation of Bacteriophages and Determination of their Efficiency in Controlling *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt of Tomato. *Tropical Agricultural Research*, 26(1), 140.
- Kaneko, J., Narita-Yamada, S., Wakabayashi, Y., & Kamio, Y.** (2009). Identification of ORF636 in Phage ϕ SLT Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes, Acting as an

Adhesion Protein for a Poly(glycerophosphate) Chain of Lipoteichoic Acid on the cell Surface of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4674–4680.

Kaneshiro, W. S., Mizumoto, C. Y., & Alvarez, A. M. (2006). Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from Seed-borne Saprophytes Using ELISA, Biolog and 16S rDNA Sequencing. *European Journal of Plant Pathology*, 116(1), 45–56.

Karahan, O. (1965). Muhtelif Sebzelerde Zararlı Hastalık Amilleri ve Mücadeleleri. *Ayyıldız Matbaası*, Ankara.

Kazantseva, O. A., Pilgrimova, E. G., & Shadrin, A. M. (2022). Novel Bacillus-Infecting Bacteriophage B13: The Founding Member of the Proposed New Genus Bunatrivirus. *Viruses*, 14(10).

Kering, K. K., Kibii, B. J., & Wei, H. (2019). Biocontrol of Phytobacteria With Bacteriophage Cocktails. *Pest Management Science*, 75(7), 1775–1781.

Khawaja, K. A., Rauf, M., Abbas, Z., & Rehman, S. U. (2016). A Virulent phage JHP against *Pseudomonas aeruginosa* Showed infectivity against multiple genera. *Journal of basic microbiology*, 56(10), 1090–1097.

Killmann, H., Braun, M., Herrmann, C., & Braun, V. (2001). FhuA Barrel-Cork Hybrids are Active Transporters and Receptors. *Journal of Bacteriology*, 183(11), 3476–3487.

Kimmelshue, C., Goggi, A. S. & Cademartiri, R. (2019). The Use of Biological Seed Coatings Based on Bacteriophages and Polymers Against *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in Maize Seeds. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.

Kizheva, Y., Eftimova, M., Rangelov, R., Micheva, N., Urshev, Z., Rasheva, I., & Hristova, P. (2021). Broad Host Range Bacteriophages Found in Rhizosphere Soil of a Healthy Tomato Plant in Bulgaria. *Heliyon*, 7(5), 07084.

Kizheva, Y., Urshev, Z., Dimitrova, M., Bogatzevska, N., Moncheva, P., & Hristova, P. (2023). Phenotypic and Genotypic Characterization of Newly Isolated *Xanthomonas euvesicatoria*-Specific Bacteriophages and Evaluation of Their Biocontrol Potential. *Plants*, 12(4), 947.

Kongari, R.R., Yao, G.W., Chamakura, K.R., & Kutty Everett, G.F. (2013). Complete Genome of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicusis* Siphophage CN1A. *Genome Announcements*, 1(6), 10-1128.

- Korniienko, N., Kharina, A., Zrelavs, N., Jindřichová, B., Moravec, T., Budzanivska, I., & Kalachova, T.** (2022). Isolation and Characterization of Two Lytic Phages Efficient Against Phytopathogenic Bacteria From *Pseudomonas* and *Xanthomonas* Genera. *Frontiers in Microbiology*, 13(4).
- Koskella, B., Lin, D. M., Buckling, A., & Thompson, J. N.** (2012). The Costs of Evolving Resistance in Heterogeneous Parasite Environments. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1735), 1896–1903.
- Kropinski, A. M. & Martha, C. R. J.** (2009). Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions, Martha R. J. Clokie , Andrew Kropinski. Introduction. *Bacteriophages. Methods and Protocols*, 1(2), 3–68,
- Kurtboke, I.** (2012). Bacteriophages, Kurtboke, I. Bacteriophages, 260-267, Australia.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S.** (2010). Bacteriophage Resistance Mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327.
- Lamichhane, J. R., Balestra, G. M., & Varvaro, L.,** (2011). Severe outbreak of bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato in central Italy. *Plant Disease*, 95, 221.
- Laslett, D., & Canback, B.** (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 11–16.
- Leiman, P. G., Arisaka, F., Van Raaij, M. J., Kostyuchenko, V. A., Aksyuk, A. A., Kanamaru, S., & Rossmann, M. G.** (2010). Morphogenesis of the T4 Tail and Tail Fibers. *Virology Journal*, 7(1), 355.
- Leiman, P. G., Chipman, P. R., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V., & Rossmann, M. G.** (2004). Three-dimensional Rearrangement of Proteins in the Tail of Bacteriophage T4 on Infection of its Host. *Cell*, 118(4), 419–429.
- Letarov, A. V.** (2020). History of Early Bacteriophage Research and Emergence of Key Concepts in Virology. *Biochemistry (Moscow)*, 85(9), 1093–1112.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W., & Camp, M. J.** (2004). Optimizing Concentration and Timing of a Phage Spray Application to Reduce *Listeria monocytogenes* on Honeydew Melon Tissue. *Journal of Food Protection*, 67(8), 1682–1686. d
- Li, M., Wang, J., Zhang, Q., Lin, L., Kuang, A., Materon, L. A., & Wei, Y.** (2016).

Isolation and Characterization of the Lytic Cold-Active Bacteriophage MYSP06 from the Mingyong Glacier in China. *Current Microbiology*, 72(2), 120–127.

Li, X., Tambong, J., Yuan, K. X., Chen, W., Xu, H., André Lévesque, C., & De Boer, S. H. (2018). Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the Basis of Whole-Genome and Multi-locus Sequence Analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 234–240.

Lim, J. A., Jee, S., Lee, D. H., Roh, E., Jung, K., Oh, C., & Heu, S. (2013). Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Using Bacteriophage PP1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1147–1153.

Lin, L., Hong, W., Ji, X., Han, J., Huang, L., & Wei, Y. (2010). Isolation and Characterization of an Extremely Long Tail Thermus Bacteriophage From Tengchong Hot Springs in China. *Journal of Basic Microbiology*, 50(5), 452–456.

Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and Cons of Phage Therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114.

Louws, F. J., Wilson, M., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Jones, J. B., Shoemaker, P. B., & Miller, S. A. (2001). Field Control of Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato Using a Plant Activator. *Plant Disease*, 85(5), 481–488.

Luo, J., Dai, D., Lv, L., Ahmed, T., Chen, L., Wang, Y., & Li, B. (2022). Advancements in the Use of Bacteriophages to Combat the Kiwifruit Canker Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Viruses*, 14(12), 1–18.

Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Sabour, P. M., Huang, X., & Xu, Y. (2012). Enhanced Alginate Microspheres as Means of Oral Delivery of Bacteriophage for Reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 434–440.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour Encapsulation and Controlled Release - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1–21.

Magnone, J. P., Marek, P. J., Sulakvelidze, A., & Senecal, A. G. (2013). Additive Approach for Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* spp. on Contaminated Fresh Fruits and Vegetables Using Bacteriophage Cocktail and Produce Wash. *Journal of Food Protection*, 76(8), 1336–1341.

Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladisavljevic, G.

- T., & Kirpichnikova, A.** (2017). Formulation, Stabilisation and Encapsulation of Bacteriophage for Phage Therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249(5), 100–133.
- Mallmann, W. L. & Hemstreet, C.** (1924). Isolation of an inhibitory substance from plants. *Journal of Agricultural Research*, 28(6), 599 - 602.
- Malliarakis, D., Pagoulatou, M. G., Mpalantinaki, E., Trantas, E., Ververidis, F., & Goumas, D. E.** (2023). Phylogenetic Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Isolates Causing Bacterial Canker of Tomato in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 105, 1403-1419.
- Manzer, F. and Genereux, H.** (1981) Ring rot. In: Compendium of Potato Disease (Hooker, W.J. ed.). *American Phytopathological Society Press*, 31–32.
- Marks, T., & Sharp, R.** (2000). Bacteriophages and Biotechnology: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75(1), 6–17.
- Marti, R., Zurfluh, K., Hagens, S., Pianezzi, J., Klumpp, J., & Loessner, M. J.** (2013). Long Tail Fibres of the Novel Broad-Host-Range T-even Bacteriophage S16 Specifically Recognize *Salmonella* OmpC. *Molecular Microbiology*, 87(4), 818–834.
- Matinkhoo, S., Lynch H., K., Dennis J., J., Finlay H., W., & Vehring, R.** (2012). Molecular Nanomedicine Towards Cancer. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(7), 2271–2280.
- McClements, D. J., & Decker, E. A.** (2000). Lipid Oxidation in oil-in-water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282.
- McCulloch, L.** (1925). *Aplanobacter insidiosum* the cause of an Alfalfa disease. *Phytopathology*, 15, 496–497.
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M.** (2017). VICTOR: Genome-based Phylogeny and Classification of Prokaryotic Viruses. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(21), 3396–3404.
- Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandes, F. M., & Yliperttula, M.** (2021). Preservation of Biomaterials and Cells by Freeze-drying: Change of Paradigm. *Journal of Controlled Release*, 336(3), 480–498.
- Milijašević-Marcic, S., Gartemann, K. H., Frohwitter, J., Eichenlaub, R., Todorović, B.,**

- Rekanović, E., & Potočnik, I.** (2012). Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 134(4), 697–711.
- Mojica, K. D. A., & Brussaard, C. P. D.** (2014). Factors Affecting Virus Dynamics and Microbial Host-Virus Interactions in Marine Environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(3), 495–515.
- Molina, F., Simancas, A., Ramírez, M., Tabla, R., Roa, I., & Rebollo, J. E.** (2021). A New Pipeline for Designing Phage Cocktails Based on Phage-Bacteria Infection Networks. *Frontiers in Microbiology*, 12(2), 1–14.
- Moore E.** (1926) D’Herelle’s Bacteriophage in Relation to Plant Parasites. *South African Journal of Science*, 23, 306.
- Moraru, C., Varsani, A., & Kropinski, A. M.** (2020a). VIRIDIC: A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of. *Viruses*, 12, 1268.
- Moraru, C., Varsani, A., & Kropinski, A. M.** (2020b). VIRIDIC: A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-infecting viruses. *Viruses*, 12(11), 1268.
- Morcia, C., Piazza, I., Ghizzoni, R., Terzi, V., Carrara, I., Bolli, G., & Chiusa, G.** (2023). Molecular Diagnostics in Tomato: Chip Digital PCR Assays Targeted to Identify and Quantify *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* in planta. *Horticulturae*, 9(5), 553.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S.** (2007). Principles and Methods of Microencapsulation of Probiotic Microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1–18.
- Mulia, K., Safiera, A., Pane, I. F., & Krisanti, E. A.** (2019). Effect of High Speed Homogenizer Speed on Particle Size of Polylactic Acid. *Journal of Physics: Conference Series*, 1198(6).
- Müller-Merbach, M., Rauscher, T., & Hinrichs, J.** (2005). Inactivation of Bacteriophages by Thermal and High-pressure Treatment. *International Dairy Journal*, 15(6–9), 777–784.
- Nakayinga, R., Makumi, A., Tumuhaise, V., & Tinzaara, W.** (2021). *Xanthomonas* bacteriophages: A Review of Their Biology and Biocontrol Applications in Agriculture. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–20.

- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., & Yuan, Z. C.** (2018). *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 2036-2050.
- Nashwa, S. M. A., & Abo-Elyou, K. A. M.** (2012). Evaluation of Various Plant Extracts Against the Early Blight Disease of Tomato Plants Under Greenhouse and Field Conditions. *Plant Protection Science*, 48(2), 74–79.
- Nguyen, H. M., Hwang, I. C., Park, J. W., & Park, H. J.** (2012). Enhanced Payload and Photo-Protection for Pesticides Using Nanostructured Lipid Carriers with Corn Oil as Liquid Lipid. *Journal of Microencapsulation*, 29(6), 596–604.
- Nikolich, M. P., & Filippov, A. A.** (2020). Bacteriophage Therapy: Developments and Directions. *Antibiotics*, 9(3), 135.
- Ninot, A., Aletà, N., Moragrega, C., & Montesinos, E.** (2002). Evaluation of a Reduced Copper Spraying Program to Control Bacterial Bight of Walnut. *Plant Disease*, 86(6), 583–587.
- Niu, Y. D., Liu, H., Du, H., Meng, R., Sayed Mahmoud, E., Wang, G., & Stanford, K.** (2021). Efficacy of Individual Bacteriophages Does Not Predict Efficacy of Bacteriophage Cocktails for Control of *Escherichia coli* O157. *Frontiers in Microbiology*, 12(2).
- Obradovic, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Balogh, B., & Olson, S. M.** (2004). Management of Tomato Bacterial Spot in the Field by Foliar Applications of Bacteriophages and SAR Inducers. *Plant Disease*, 88(7), 736–740.
- Orlova, E. V., Gowen, B., Dröge, A., Stiege, A., Weise, F., Lurz, R., & Tavares, P.** (2003). Structure of a Viral DNA Gatekeeper at 10 Å Resolution by Cryo-electron Microscopy. *The EMBO Journal*, 22(6), 1255–1262.
- Orynbayev, A. T., Dzhailov, F. S. U., & Ignatov, A. N.** (2020). Improved Efficacy of Formulated Bacteriophage in Control of Black Rot Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Cabbage Seedlings. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(7–8), 379–394.
- Özaktan, H.** (1991). *Domates Bakteryel Solgunluğu (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Smith) Davis et al.) ile Savaşım Olanakları Üzerinde Araştırmalar.*(Doktora Tezi), Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Pekkle Lam, H. Y., Peng, S. Y., Paramita, P., Wu, W. J., Chen, L. K., Chao, H. J., &**

- Chang, K. C.** (2022). Biological and Genomic Characterization of Two Newly Isolated *Elizabethkingia anophelis* Bacteriophages. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 55(4), 634–642.
- Pereira, C., Duarte, J., Costa, P., Braz, M., & Almeida, A.** (2022). Bacteriophages in the Control of *Aeromonas* sp. in Aquaculture Systems: An Integrative View. *Antibiotics*, 11(2), 163.
- Peritore-Galve, F. C., Miller, C., & Smart, C. D.** (2020). Characterizing Colonization Patterns of *Clavibacter michiganensis* During Infection of Tolerant Wild Solanum Species. *Phytopathology*, 110(3), 574–581.
- Peritore-Galve, F. C., Tancos, M. A., & Smart, C. D.** (2021). Bacterial Canker of Tomato: Revisiting a Global and Economically Damaging Seedborne Pathogen. *Plant Disease*, 105(6), 1581-1595.
- Pickard, D. J. J.** (2009). *Preparation of bacteriophage lysates and pure DNA*, Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M., Bacteriophages, 502, Canada, UK.
- Plisson, C., White, H. E., Auzat, I., Zafarani, A., São-José, C., Lhuillier, S., & Orlova, E. V.** (2007). Structure of Bacteriophage SPP1 Tail Reveals Trigger for DNA Ejection. *The EMBO Journal*, 26(15), 3720–3728.
- Puapermpoonsiri, U., Ford, S. J., & Van der Walle, C. F.** (2010). Stabilization of Bacteriophage During Freeze Drying. *International Journal of Pharmaceutics*, 389(1–2), 168–175.
- Puapermpoonsiri, U., Spencer, J., & Van der Walle, C. F.** (2009). A Freeze-dried Formulation of Bacteriophage Encapsulated in Biodegradable Microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(1), 26–33.
- Rabiey, M., Roy, S. R., Holtappels, D., Franceschetti, L., Quilty, B. J., Creeth, R., & Jackson, R. W.** (2020b). Phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1428–1445.
- Rahimi-Midani, A., & Choi, T. J.** (2020). Transport of Phage in Melon Plants and Inhibition of Progression of Bacterial Fruit Blotch. *Viruses*, 12(4), 477.
- Rajput, V., Minkina, T., Fedorenko, A., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Lysenko, V., & Ghazaryan, K.** (2018). Toxicity of Copper Oxide Nanoparticles on Spring Barley (*Hordeum sativum* distichum). *Science of the Total Environment*, 645, 1103–1113.

- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Szwajcer Dey, E., & Novik, G. I.** (2010). Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145–155.
- Ramírez, M., Neuman, B., & Ramírez, C. A.** (2020a). Bacteriophages as Promising Agents for the Biological Control of Moko Disease (*Ralstonia solanacearum*) of Banana. *Biological Control*, 104238.
- Ranjani, P., Gowthami, Y., Gnanamanickam, S. S., & Palani, P.** (2018). Bacteriophages: A New Weapon for the Control of Bacterial Blight Disease in Rice Caused by *Xanthomonas oryzae*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46(4), 346–359.
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., & Cammue, B. P. A.** (2020). Screening for Novel Biocontrol Agents Applicable in Plant Disease Management : A review. *Biological Control*, 144(2), 104240.
- Robb, M. L., & Shahrezaei, V.** (2014). Stochastic Cellular Fate Decision Making by Multiple Infecting Lambda Phage. *PLoS one* , 9(8).
- Sabri, M., Benkirane, R., Habbadi, K., Sadik, S., Ou-Zine, M., Diouri, M., & Achbani, E. H.** (2021). Phages as a Potential Biocontrol of Phytobacteria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(17–18), 1277–1291.
- Sadatrasul, M. S., Fiezi, N., Ghasemian, N., Shenagari, M., Esmaeili, S., Ollah Jazaeri, E., & Jamali, A.** (2017). Oil-in-water Emulsion Formulated with Eucalyptus Leaves Extract Inhibit Influenza Virus Binding and Replication In Vitro. *AIMS Microbiology*, 3(4), 899–907.
- Sahidin, I.** (2018). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. 43), 1(مجلة اسبوط للدراسات البيئية, العدد الحان), 1.
- Sahoo, S., Dalei, R. K., Rath, S. K., & Sahu, U. K.** (2023). Selection of PSO Parameters Based on Taguchi Design-ANOVA- ANN Methodology for Missile Gliding Trajectory Optimization. *Cognitive Robotics*, 3(5), 158–172.
- Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C.** (2015). A Century of the Phage: Past, Present and Future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777–786.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Friedmann, T., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., & Smith, M.** (1978). The nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174. *Journal of Molecular Biology*, 125(2), 225-246.

- Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F. & Petersen, G. B.** (1982). Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology*, 162, 729–773.
- Santos, B. M., Gilreath, J. P., Motis, T. N., Noling, J. W., Jones, J. P., & Norton, J. A.** (2006). Comparing Methyl Bromide Alternatives for Soilborne Disease, Nematode and Weed Management in Fresh Market Tomato. *Crop Protection*, 25(7), 690–695.
- Santos, S. B., Carvalho, C. M., Sillankorva, S., Nicolau, A., Ferreira, E. C., & Azeredo, J.** (2009). The Use of Antibiotics to Improve Phage Detection and Enumeration by the Double-layer Agar Technique. *BMC Microbiology*, 9, 1–10.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Zoina, A., & Bridge, P. D.** (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd ed., 812-814, *American Phytopathological Society Press*, St. Paul, MN.
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., van der Wolf, J., Visser, R., & Van Heusden, A.** (2012). Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*, 190, 309-317.
- Sherf, A. F., & Macnab, A. A.** (1986). Vegetable Diseases and Their Control. A Wiley Interscience Publication, 711, New York.
- Shin, H., Lee, J. H., Kim, H., Choi, Y., Heu, S., & Ryu, S.** (2012). Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *PLoS one*, 7(8).
- Shoda, M.** (2000). Bacterial Control of Plant Diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 515–521.
- Singh, D., Chaudhary, G., & Yadav, D. K.** (2021). Characterization and Diversity of Indian Isolates of *Ralstonia solanacearum* Inciting Bacterial Wilt of Tomato. *Indian Phytopathology*, 74(2), 425–429.
- Slusarski, C.** (2005). Evaluation of Chemical and Biological Control Methods for Their Potential to Reduce Bacterial Canker of Tomato in a Greenhouse Stonewool Cultivation System. *Acta Horticulturae*, 698, 299–304.
- Smith, E.** (1910). A New Tomato Disease of Economic Importance. *Science*, 31, 794–796.
- Soykut, E. A., & Tunail, N.** (2009). Termofilik Faj Taksonomisi. *Gida*, 34(4), 251–258.
- Stamereilers, C., LeBlanc, L., Yost, D., Amy, P. S., & Tsourkas, P. K.** (2016).

Comparative Genomics of 9 Novel *Paenibacillus larvae* Bacteriophages . *Bacteriophage*, 6(3), e1220349.

Strauch, E., Hammerl, J. A., & Hertwig, S. (2007). Bacteriophages: New tools for safer food?. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2(2), 138–143.

Sullivan, T., Manuel, N., Clark, J., Liu, M., & Burrowes, B. (2022). Complete Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Siphophage Suzuki. *Microbiology Resource Announcements*, 11(4), e00136-22.

Sun, Y., Roznowski, A. P., Tokuda, J. M., Klose, T., Mauney, A., Pollack, L., & Rossmann, M. G. (2017). Structural Changes of Tailless Bacteriophage Φx174 During Penetration of Bacterial cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(52), 13708–13713.

Suttle, C. A. (2007). Marine viruses - Major Players in the Global Ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 801–812.

Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture. *Viruses*, 10(5), 1–13.

Sweere, J. M., Belleghem, J. D. Van, Ishak, H., Bach, M. S., Popescu, M., Sunkari, V., & Bollyky, P. L. (2019). Bacteriophage Trigger Antiviral Immunity and Prevent Clearance of Bacterial Infection. *Science*, 363(6434), 1–31.

Tabare, E., Glonti, T., Cochez, C., Ngassam, C., Pirnay, J. P., Amighi, K., & Goole, J. (2021). A Design of Experiment Approach to Optimize Spray-Dried Powders Containing *Pseudomonas aeruginosa* Podoviridae and Myoviridae Bacteriophages. *Viruses*, 13(10), 1926.

Tahjib-Ul-Arif, M., Sohag, A. A. M., Mostofa, M. G., Polash, M. A. S., Mahamud, A. G. M. S. U., Afrin, S., & Tran, L. S. P. (2021). Comparative Effects of Ascobin and Glutathione on Copper Homeostasis and Oxidative Stress Metabolism in Mitigation of Copper Toxicity in Rice. *Plant Biology*, 23, 162–169.

Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, J. R., Sabour, P. M., & Wang, Q. (2013). Whey Protein Improves Survival and Release Characteristics of Bacteriophage Felix O1 Encapsulated in Alginate Microspheres. *Food Research International*, 52(2), 460–466.

Taslem Mourosi, J., Awe, A., Guo, W., Batra, H., Ganesh, H., Wu, X. & Zhu, J. (2022). Understanding Bacteriophage Tail Fiber Interaction with Host Surface Receptor: The Key

“Blueprint” for Reprogramming Phage Host Range. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12146.

Tewfike, T. A., & Desoky, S. M. (2015). Biocontrol of *Xanthomonas axonopodis* Causing Bacterial Spot by Application of Formulated Phage. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 53(4), 615–624.

Thapa, S. P., Pattathil, S., Hahn, M. G., Jacques, M. A., Gilbertson, R. L., & Coaker, G. (2017). Genomic Analysis of *Clavibacter michiganensis* Reveals Insight into Virulence Strategies and Genetic Diversity of a Gram-positive Bacterial Pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(10), 786–802.

Tian, Q., Chuan, J., Sun, X., Zhou, A., Wang, L., Zou, J., & Li, X. (2021). Description of *Clavibacter zhangzhiyongii* sp. nov., a Phytopathogenic Actinobacterium Isolated from Barley Seeds, Causing Leaf Brown Spot and Decline. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(5).

Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021). A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*, 13(3), 1–10.

Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., & Dutilh, B. E. (2023). Abolishment of Morphology - Based Taxa and Change to Binomial Species Names : 2022 Taxonomy Update of the ICTV Bacterial Viruses Subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2), 1–9.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (2022). Bitkisel Üretim İstatistikleri. [Erişim Tarihi: 15.12.2023, <https://data.tuik.gov.tr/Search/Search?text=B%C4%B0TK%C4%B0SEL%20%C3%9CRET%C4%B0M&dil=1>].

Udomrati, S., Cheetangdee, N., Gohtani, S., Surojanametakul, V., & Klongdee, S. (2020). Emulsion Stabilization Mechanism of Combination of Esterified Maltodextrin and Tween 80 in oil-in-water Emulsions. *Food Science and Biotechnology*, 29(3), 387–392.

Ul Haq, I., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and Their Implications on Future Biotechnology: A review. *Virology Journal*, 9, 1–8.

Umsha, S. (2006). Occurrence of Bacterial Canker in Tomato Fields of Karnataka and Effect of Biological Seed Treatment on Disease Incidence. *Crop Protection*, 25(4), 375–381.

Umrao, P. D., Kumar, V., & Kaistha, S. D. (2021). Biocontrol Potential of Bacteriophage

φsp1 Against Bacterial Wilt-causing *Ralstonia solanacearum* in Solanaceae crops. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1).

Valenzuela, M., Besoain, X., Durand, K., Cesbron, S., Fuentes, S., Claverías, F., & Seeger, M. (2018). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Strains From Central Chile Exhibit Low Genetic Diversity and Sequence Types Match Strains in Other Parts of the World. *Plant Pathology*, 67(9), 1944–1954.

Varzakas, T., & Tzia, C. (2014). Food Engineering Handbook, Varzakas, T., Tzia, C., Food Engineering Handbook, 672.

Vidaver, A. K. (1981). Diversity of *Corynebacterium nebraskense* Strains Causing Goss's Bacterial Wilt and Blight of Corn . *Plant Disease*, 65(6),480.

Vikram, A., Tokman, J. I., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2020). Phage Biocontrol Improves Food Safety by Significantly Reducing the Level and Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in Various Foods. *Journal of Food Protection*, 83(4), 668–676.

Wang, K., Chen, D., Liu, Q., Zhu, P., Sun, M., & Peng, D. (2022). Isolation and Characterization of Novel Lytic Bacteriophage vB_RsoP_BMB50 infecting *Ralstonia solanacearum*. *Current Microbiology*, 79(9), 1–12.

Wang, Q., Zhang, H., Han, Y., Cui, Y., & Han, X. (2023). Study on the Relationships Between the oil HLB Value and Emulsion Stabilization. *RSC Advances*, 13(35), 24692–24698.

Wei, C., Liu, J., Maina, A. N., Mwaura, F. B., Yu, J., Yan, C., & Wei, H. (2017). Developing a Bacteriophage Cocktail for Biocontrol of Potato Bacterial Wilt. *Virologica Sinica*, 32(6), 476–484.

Weigel, C., & Seitz, H. (2006). Bacteriophage Replication Modules. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 321–381.

Wittmann, J., Eichenlaub, R., & Dreiseikelmann, B. (2010). The Endolysins of Bacteriophages CMP1 and CN77 are Specific for the Lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. *Microbiology*, 156(8), 2366–2373.

Wittmann, J., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R. & Dreiseikelmann, B. (2011). Genomic and Molecular Analysis of Phage CMP1 from *Clavibacter michiganensis* subspecies. *michiganensis* . *Bacteriophage*, 1(1), 6–14.

- Xia, G., Corrigan, R. M., Winstel, V., Goerke, C., Gründling, A., & Peschel, A.** (2011). Wall Teichoic Acid-Dependent Adsorption of Staphylococcal Siphovirus and Myovirus. *Journal of Bacteriology*, 193(15), 4006–4009.
- Xiang, Y., Leiman, P. G., Li, L., Grimes, S., Anderson, D. L., & Rossmann, M. G.** (2009). Crystallographic Insights into the Autocatalytic Assembly Mechanism of a Bacteriophage Tail Spike. *Molecular Cell*, 34(3), 375–386.
- Xiao, Y., Huang, P., Huang, Z., Yu, K., Song, Y., Guo, N., & Wei, Q.** (2022). Influencing Factors on the Preservation of Lytic Bacteriophage VP3. *Biosafety and Health*, 4(5), 314–320.
- Tokgönül, S.** (1998). Ticari Domates Tohumlarında Bakteriyel Solgunluk Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)’nin Saptanması ve Etmene Karşı Mücadele Olanakları Üzerinde Araştırmalar. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 141-143.
- Vural, H., Eşiyok, D., & Duman, İ.** (2000). Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme) EÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Yamada, T., Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Usami, S., & Fujie, M.** (2007). New Bacteriophages that Infect the Phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology*, 153(8), 2630–2639.
- Yıldız, R., & Aysan, Y.** (2007). *Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Etmeni (Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.)’nin Tanılanması ve Bitki Büyüme Düzenleyicisi Rhizobakteriler ile Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması. (Doktora Tezi) Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yin, Y., Ni, P., Deng, B., Wang, S., Xu, W., & Wang, D.** (2019). Isolation and Characterisation of Phages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 69(3), 199–208.
- Zheng, H.** (2023). Devitrification of Lyoprotectants: A Critical Determinant for Bacteriophages Inactivation in Freeze-drying and Storage. *Food Research International*, 173, 113307.