

**TOKAT DOMATES ÜRETİM ALANLARINDA
BAKTERİYEL KANSER
(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*)
HASTALIĞININ RASTLANMA SIKLIĞI VE BU HASTALIĞA KARŞI
DOMATES EBR3 MUTANTLARININ
REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ**

Sevilay SAYGI

**Yüksek Lisans Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ
2010
Her hakkı saklıdır**

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOKAT DOMATES ÜRETİM ALANLARINDA BAKTERİYEL KANSER
(*CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* (SMİTH) DAVIS *ET AL.*) HASTALIĞININ RASTLANMA SIKLIĞI VE BU HASTALIĞA KARŞI
DOMATES EBR3 MUTANTLARININ REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Sevilay SAYGI

TOKAT
2010

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ danışmanlığında, Sevilay SAYGI tarafından hazırlanan bu çalışma 20/08/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Yusuf YANAR

İmza:



Üye : Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

İmza:



Üye : Doç. Dr. Hüseyin ÖNEN

İmza:



Üye : Doç. Dr. Naif GEBOLOĞLU

İmza:



Üye : Yrd. Doç. Dr. İsa KARAMAN

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Metin YILDIRIM



Enstitü Müdürü

27/08/2010

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Sevilay SAYGI

2010

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOKAT DOMATES ÜRETİM ALANLARINDA BAKTERİYEL KANSER (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.) HASTALIĞININ RASTLANMA SIKLIĞI VE BU HASTALIĞA KARŞI DOMATES EBR3 MUTANTLARININ REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Sevilay SAYGI

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Domateste Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) olup hastalık etmeni özellikle domateste önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bakteriyel hastalık etmeni tohum kaynaklı bir etmen olduğundan yapılan kültürel önlemler tek başına yetersiz kalmakta kimyasal kullanımını artırmaktadır. Hastalığın kontrolü için dayanıklılık genleri taşıyan domates bitkilerinin geliştirilmesi hastalığın %100 genetik kontrolünü sağlayacak ve tarımsal üretimin çevre üzerindeki olumsuz baskısını azaltacaktır.

Tokat ili karasal iklim ile karadeniz nemli ikliminin birleştiği ve bakteriyel kanser hastalık etmenin ihtiyaç duyduğu tüm şartları içermektedir. Bu amaçla çalışmada Tokat ili domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda 2008 ve 2009 yıllarında hastalık etmeni Cmm' nin rastlanma sıklığını belirlemek amacıyla iki yıllık sürveyler yapılmıştır. İlk yıl sürvey çalışmalarında domates yetiştiriciliği yapılan alanlardan 44 adet bakteri izolatu elde edilerek izolatlarda yapılan biyokimyasal analizler sonucunda Cmm hastalık etmeni bulunamamıştır. İkinci yıl sürvey çalışmaları domates arazilerinden 55 tarlada yürütülmüş, bunlardan 39 ayrı bölgeden toplanan özellikle solgunluk belirtisi gösteren bitkilerden elde edilen 39 adet bakteri izolatu moleküler analizlerden geçirilmiş, izole edilen bakterilerden 3 adetinin Cmm olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar Tokat ili domates üretim alanlarında 2009 yılı bakteriyel kanser hastalığının %1,65'lik bir sıklıkta olduğunu ortaya koymuştur.

Bakteriyel kanser etmenine karşı dayanıklı domatesler elde edebilmek için hassas EBR3 domates hattı mutasyona uğratarak oluşturulan M2 mutant populasyonunda bitkiler patojenisite testlerinden geçirilmiştir. Patojenisite testlerinden geçirilen 300 adet M2 mutant domates bitkisinden 25 adeti bakteriyel kanser hastalık etmeninden etkilenmemiş ve M3 mutant populasyonu için tohumları alınmıştır. Bakteriyel kanser hastalığına dayanıklı kültür domatesi oluşturabilmek için genotip üzerinde yapılan tek baz çiftinden (single base pairs) oluşan mutasyonlar sonucunda bulunan 25 adet M2 domates bitkisi ileride yapılacak çalışmalar için çok önemli sonuçlar vermektedir.

2010, 67 sayfa

Anahtar kelimeler: Domates, bakteriyel kanser , sürvey, mutasyon

ABSTRACT

Master of Science Thesis

PREVALENCE OF TOMATO BACTERIAL CANCER DISEASES IN PRODUCTION FIELD OF TOKAT AND DETERMINATION OF TOMATOES EBR3 MUTANTS REACTION AGAINST THIS DISEASES

Sevilay SAYGI

Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Tomato Bacterial Wilt and Canker Disease caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) reasons significant crop loss especially on tomatoes. The bacterial canker is seedborn disease; however, cultural management is insufficient to control the disease and chemical applications slightly increase to control the bacterial pathogen. Tomato plants containing disease resistant genes are able to ensure resistance the bacterial disease in 100% efficiency and the genetical control prevents environment from unwanted chemical applications.

Continental and humid black sea climates meet at Tokat, therefore, the climatic factors encourage the bacterial canker disease. Two year survey programs have established to investigate prevalence of bacterial Cmm for 2008 and 2009 years in tomato grown areas at Tokat. In the first year surveys 44 bacterial isolates were collected and analyzed with biochemical tests analysis, none of the bacterial isolates was found as Cmm. In the second year surveys, 39 bacterial isolates were collected from tomatato fields. All 39 isolates were analyzed with molecular test and 3 of them were found as Cmm. These results revealed that tomato grown areas of Tokat province infected with bacterial canker where bacterial canker density was %1,65.

To obtain resistant tomatoes, tomato cultivars were tested in pathogenicity tests. A susceptible EBR3 tomato line was mutagenised and all produced M2 mutant plants were inoculated with Cmm2 bacteria. The pathogenicity tests have shown that 25 M2 tomato mutant plants were resistant among 500 M2 seedlings. Bacterial canker resistant 25 M2 tomato mutant plants have single base pair mutation in their genotypes, the mutations will be further analyzed in future studies.

2010, 67 pages

Key words: Tomato, Bacterial canker, surveys, mutation

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve tez konumun oluşturulmasında fikir ve görüşleriyle bana yol gösteren danışman hocalarım Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ ve Doç. Dr. Yusuf YANAR' a, yüksek lisans tezimin jüri üyeleri olan, yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulunan sayın hocalarım Doç. Dr. Hüseyin ÖNEN, Doç. Dr. Naif GEBOLOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. İsa KARAMAN' a, yüksek lisans çalışmalarım içerisinde yer alan bakteri tanılama analizleri için Atatürk Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı olanaklarından yararlanmamı sağlayan hocalarım ve burada bulunan çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerini sabırla benimle paylaşan sevgili hocam Arş. Gör. Dr. Mesude Figen DÖNMEZ' e, yine yüksek lisans çalışmalarım esnasında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı olanaklarından yararlanmamı, engin bilgi ve görüşleriyle çalışmalarımın gerçekleşmesini sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Hüseyin BASIM' a ve çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Zir. Yük. Müh. Nurhan ÖZTÜRK ve Zir. Müh. Gözde BOZAN' a, tez çalışmalarım sırasında emeği geçen arkadaşlarım Arş. Grv. Şerife TOPKAYA, Arş. Grv. Sabriye YAZICI ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, her sıkıntılı ve mutlu anlarımda her zaman yanımda olan, yanındayken bütün sıkıntılarımı bana unutturan biricik arkadaşım Arş. Grv. Tuğba ESERKAYA GÜLEÇ' e içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım esnasında da maddi manevi desteklerini ve sevgilerini hiç esirgemeyen, zorluklarla savaştıkça daha güçlü olacağımı öğreten, başarılarımın asıl kahramanı olan sevgili AİLEME ve sonsuz sabrı ile beni her konuda destekleyen değerli ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Salih SAYGI' ya yürekten sonsuz teşekkürler.

Sevilay SAYGI

08/2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Kullanılan Fitopatojen Bakteriler.....	24
3.1.2. Kullanılan Test Bitkileri.....	24
3.1.3. Kullanılan Çözelti ve Besi Yerlerinin Hazırlanışı.....	25
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Araziden Toplanması.....	27
3.2.2. Bakteri Strainlerinin İzolasyonu ve Muhafazası.....	27
3.2.3. Tanılamada Kullanılan Biyokimyasal Testler.....	28
3.2.3.1. Gram Reaksiyon Testi.....	28
3.2.3.2. Katalaz Testi.....	29
3.2.3.3. Oksidaz Testi.....	29
3.2.3.4. Nişasta Hidrolizi Testi.....	30
3.2.3.5. Levan Testi.....	31
3.2.4. Tanılamada Kullanılan Moleküler Testler.....	32
3.2.4.1. Biolog Testi.....	32
3.2.5. Elde Edilen Bakteri Strainlerinin Teşhis Edilmesi.....	40
3.2.5.1. Master Mix' in Hazırlanması.....	41
3.2.5.2. PCR Programının Hazırlanması.....	41
3.2.5.3. PCR Ürünlerinin Elektroforez Jelinde Yürütülmesi.....	41
3.2.6. Cmm2' e Karşı Domates Genotiplerinin Reaksiyonlarının Belirlenmesi.....	43
3.2.6.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	43
3.2.6.2. Patojenisite Testi.....	43
3.2.6.3. EBR3 Domates Hattının Kimyasal Mutasyona Uğratılması.....	44
3.2.6.4. M2 Bitki Tohumlarının Eldesi ve Bitkilerin Cmm2 ile inokulasyonu.....	44
4. BULGULAR	45
4.1. Hastalıklı bitki örneklerinin araziden toplanması.....	45
4.2. Tanılamada kullanılan biyokimyasal test sonuçları.....	46
4.3. Tanılamada Kullanılan Moleküler Test Sonuçları.....	49
4.3.1. Biolog Testi Sonuçları.....	49
4.4. İkinci Yıl Sürvey Sonuçları.....	50
4.4.1. Elde Edilen Bakteri Strainlerinin Teşhis Edilmesi.....	51
4.4.2. PCR Analiz Sonuçları.....	53
4.5. Cmm2' e Karşı Domates Genotiplerinin Reaksiyonları.....	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1.	Gram reaksiyon testi sonucunda gram negatif özellik gösteren bakteride meydana gelen viskoz bir uzama.....	28
Şekil 3.2.	Katalaz testi sonucunda katalaz pozitif özellik gösteren bakteride meydana gelen kabarcık oluşumu	29
Şekil 3.3.	Oksidaz testi sonucu renk değişimi görülen oksidaz pozitif bakteriler (A); oksidaz testi sonucu renk değişimi oluşturmayan negatif bakteriler (B;C)..	30
Şekil 3.4.	Lugol solüsyonu ile mavi renk oluşumu görülen negatif bakteriler (A); Lugol solüsyonu ilave edildikten sonra bakteriler çevresinde hale oluşumu gösteren amilaz pozitif (B) bakterilerin görünümü	31
Şekil 3.5.	Levan sucrase enziminin sukrozu kullanması sonucu bakteri kolonilerin NSA besi ortamında gelişimi ve levan sucrase enzimine sahip olup NSA besi yerinde mukoid bir kolani yapısı gösteren bakterilerin gelişimi	32
Şekil 3.6.	Bakterilerin salina tampon çözeltisi içerisinde süspanse edilmesi.....	38
Şekil 3.7.	Standart turbidity tüpüne göre turbidimetre ile konsantrasyon ayarlamasının yapılması.....	38
Şekil 3.8.	Yoğunlukları ayarlanan süspanسیونların uygun mikroplateler üzerindeki çukurcuklara yüklenmesi.....	39
Şekil 3.9.	İnkübasyon sonrası mikroplateler üzerinde gelişen metabolik reaksiyonun renklenme şeklinde görülmesi ve mikroorganizmaların metabolik reaksiyon profillerinin okunması için sisteme yerleştirilmesi.....	39
Şekil 3.10.	Sistemin paket programındaki bilinen mikroorganizmaların metabolik profillerinin test edilen mikroorganizmaların profilleri ile karşılaştırılması...	40
Şekil 3.11.	Bakteri örneklerinin PCR amplifikasyonundan sonra ilave edilen loading boyası ile birlikte hazırlanan % 1'lik agaroz jelle yüklenmesi.....	42
Şekil 3.12.	Gram pozitif bulunan bakteri izolatlarının PCR amplifikasyonundan sonra %1,5 lik agaroz jelle koşturulması; Koşturulan agaroz jelin ethidium bromid ile boyandıktan sonra jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmesi ve analizleri.....	42

- Şekil 3.13. Steril şartlarda besi ortamında geliştirilen Cmm2 bakteri izolatlarının steril kurdan yardımıyla domates fidelerinin gövdelerine iliştilererek inokulasyonların gerçekleştirilmesi..... 43
- Şekil 4.1. PCR da spesifik Cmm primeri ile amplifike edilen ürünlerin %1,5 lik elektroforezde görüntülenmesi. Örneklerden SS-9, SS-10 ve SS-15 izolatları tıpkı pozitif kontrol Cmm bakterisinde olduğu gibi spesifik primerler ile 614 bp ürün oluşturmuştur. 1 Kb ladder: moleküler marker; SS-9 ile SS-36 izole edilen gram pozitif örnekler; P. Kontrol: Gram pozitif Cmm bakterisi; N. Kontrol: Distile su. 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1.	Tokat'ta domates üretim alanı ve üretim miktarının ilçelere göre dağılımı	2
Çizelge 3.1.	Kullanılan test bitkileri, orijinleri ve Latince isimleri.....	24
Çizelge 3.2.	Gram negatif strainler için değerlendirilen 95 karbon kaynağının mikropate'e kodlanması.....	33
Çizelge 3.3.	Gram pozitif strainler için değerlendirilen 95 karbon kaynağının mikropate'e kodlanması.....	35
Çizelge 4.1.	Projenin 2008 yılında survey çalışmaları yapılan domates ekim alanları. Hastalık belirtisi gösteren domates arazilerinde hesaplanan hastalık oranları ve izole edilen bakteriler.....	45
Çizelge 4.2.	Kullanılan bakterilerin suş kodları ve biyokimyasal test sonuçları.....	47
Çizelge 4.3.	Seçilen bakteri izolatlarının biyokimyasal ve biolog test sonuçları	49
Çizelge 4.4.	Projenin 2009 yılında survey çalışmaları yapılan domates ekim alanları. Hastalık belirtisi gösteren domates arazilerinde hesaplanan hastalık oranları ve izole edilen bakteriler	50
Çizelge 4.5.	Kullanılan bakterilerin suş kodları ve gram reaksiyon test sonuçları.....	52
Çizelge 4.6.	Virulent Cmm2 ile patojenisite testlerinden geçirilen 7 homozigot domates hattının fenotipik reaksiyonları	55

1. GİRİŞ

Anavatanı Güney Amerika'nın orta ve güney kısımları olduğu bilinen domates (*Lycopersicon esculentum* L.) dünyada tarımı en fazla yapılan sebzelerden biridir. Kültür domatesi Amerika'dan Avrupa'ya, oradan da Afrika'ya geçmiştir. Bugün kültürü yapılmış olan domateslerin *L. hirsutum*, *L. peruvianum* ve *L. pimpinellifolium*' dan faydalanılarak geliştirildiği, ana materyalin ise *L. peruvianum* olduğu bilinmektedir (Vural ve ark., 2000). Taze olarak tüketilmesinin yanında domates işlenmiş ürün olarak sofralarımızda salça, domates kurusu, domates suyu ve konserve olarak yer almakla birlikte insan beslenmesinde de oldukça önemli bir yere sahiptir (Topkaya, 2008). Domatesin 100 gr.' da 0,55 mg. vitamin B6, 1000 IU vitamin A ve 0,10 mg. Vitamin B1 ile 21 mg. Vitamin C vardır. Bu değerler bir yetişkinin günde 4-5 adet domates yemesi halinde günlük vitamin gereksinimini karşılayabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır (Sevgican, 1981). Kalori değerinin düşük olması taze domatesi iyi bir rejim besini haline getirmiştir. Domatesin beyin hücrelerinin yaşlanmasını yavaşlattığı, bağışıklık sistemini güçlendirdiği, kireçlenmeyi önlediği, saçları ve cildi güzelleştirdiği, kalp hastalıkları ve kansere karşı koruyucu etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Sevgican, 1999).

Dünya taze domates üretimine bakıldığında dünya genelinde yaklaşık 126 milyon ton taze domates üretilmektedir. Ancak üretimin tamamı taze olarak tüketilmemektedir. 2006 yılında endüstriye yönelik olarak yaklaşık 30 milyon ton domates üretilirken, 2008 yılında yaklaşık 36,5 milyon ton domates üretilmiştir. Dünya taze domates ihracatı 2007 yılında 5,6 milyon tondur. Türkiye 2007 yılı verilerine göre dünya taze domates ihracatında 370.613 ton ile 5. sıradadır (Anonim, 2007). Türkiye' de toplam sebze üretiminin yaklaşık % 38' ini domates oluşturmaktadır. Dünya taze domates üretimi içerisinde Türkiye FAO' nun 2008 yılı verilerine göre 260 bin hektar (ha) alanda 9,9 milyon ton (t) domates üretimi ile 3. sırada yer almaktadır (Anonim, 2008). Üretilen domatesin % 80' i taze olarak tüketilmekte % 20' si ise işleme endüstrisine gönderilmektedir. İklim koşulları açısından pek seçici olmayan domates Türkiye'nin hemen her bölgesinde yetiştirilmektedir. Özellikle Güney Marmara, Ege, Akdeniz Bölgelerindeki çoğu ilde üretimi yapılan sebzenin üretimi giderek artmaktadır. Bunda ülkemiz doğal koşullarının domates yetiştirilmesi için son derece uygun olmasının

yanında özellikle 1960'lı yıllardan sonra hızla bu sebze yi işleyecek sanayinin kurulmuş, ilerleyen yıllarda çeşitlenmiş olması da etkili olmuştur (Doğanay, 1992).

Araştırma sahamız olan Tokat ili Türkiye' de domates tarımı yapılan illerden en önemlilerinden birini oluşturmaktadır. 2007 yılında Türkiye domates üretiminde yaklaşık %7'lik, Dünya domates üretiminde ise yaklaşık % 0,5'lik bir paya sahip olan ilimizde 8571.2 ha alanda yaklaşık 510 bin ton üretim gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2007). Özellikle 1994 yılından itibaren başlatılan çalışmalarla dış pazar isteklerine uygun çeşitlerin üreticilere kazandırılmış olması günümüzde Tokat ilinde gerçekleştirilen üretimi elde edilen verim miktarını Dünya ve Türkiye ortalamasının üzerine çıkarmıştır (Yürüdür ve Akkurt, 2008). Ilık ve sıcak iklim meyvesi olan domates, sıcaklık değerleri açısından minimum 16 °C, maksimum 35 °C' de normal gelişimini sürdürebilir. Tokat'ın sahip olduğu sıcaklık ve yağış değerleri domates tarımına oldukça müsaittir. Tokat'ın uygun doğal koşulları hemen her ilçede bu sebzenin üretimine olanak sağlamış olsa da pazarlama sorununun çözüldüğü, sulanabilen ovalık alanlarda yoğun bir üretim gerçekleştirilmektedir (Yürüdür ve Akkurt, 2008).

Çizelge 1.1. Tokatta Domates Üretim Alanı ve Üretim Miktarının İlçelere Göre Dağılımı (2007)

İlçeler	Ekilen alan (ha)	Üretim (ton)
Merkez	1 916	149.739,26
Almus	150	3.000,00
Artova	1	30,00
Başçiftlik	-	-
Erbaa	865	45.250,00
Niksar	1 900	51.500,00
Pazar	1 650	117.500,00
Reşadiye	13	195,00
Sulusaray	0.2	72,00
Turhal	2 036	141.440,00
Yeşilyurt	-	-
Zile	40	2.000,00
TOPLAM	8571.2	510.726,26

2007 yılında 8571,2 ha olan domates üretim alanlarının yaklaşık % 97' si ve üretiminin yaklaşık % 99' u Merkez, Erbaa, Niksar, Pazar, Turhal ilçeleri tarafından karşılanmıştır. Tokat iklimsel olarak hem Karadeniz hem de karasal iklimin sıcak ve nemli özelliklerini gösterdiği için bu derece önemli olan üründe hastalıkların salgın halinde görülmesi kaçınılmazdır.

Domateslerde fungal ve viral etmenlerin yanı sıra pek çok bakteriyel etmende önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Karaca ve Saygılı, 1982). Bu bakteriyel hastalıklardan biride *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis ve ark.,'in (Cmm) neden olduğu bakteriyel solgunluk hastalığıdır. Bakteriyel solgunluk hastalığı tohum kaynaklı olması nedeniyle savaşı güç hastalıklardandır (Smith ve Jensen, 1982; Gitaitis, 1991; Agarwal ve Sinclair, 1997; Erkan, 1998). Etmen domates bitkisi dışında fasulye, bezelye, mısırdada da ürün kayıplarına neden olmaktadır. Patojen 1910 yılında A.B.D' de ilk rapor edilmişinden bu yana tüm Dünya'ya yayılmış, tarla ve seradaki domateslerde ciddi kayıplara neden olmuştur (Hayward ve Waterson, 1964). Tokgönül (1998)' ün bildirdiğine göre ülkemizde bakteriyel kanser hastalığının varlığı ilk olarak İç Anadolu Bölgesinde (Bremer ve ark, 1952) saptandıktan sonra , Güney Doğu Anadolu (Bremer ve ark.,1952), Marmara (Karahan, 1965) ve Ege bölgesinde (Karaca ve Saygılı 1977) tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda etmen Doğu Akdeniz (Çınar, 1980), Batı Akdeniz (Basım ve ark., 2004) ve Doğu Anadolu (Şahin ve ark., 2002) bölgelerinde domates üretim alanlarında belirlenmiştir.

Bakteriyel kanser hastalığı domatesin tohum kaynaklı en önemli hastalıklarındandır. Cmm tarafından oluşturulan hastalık ilk olarak, iletim dokularının bakterilerce işgal edilmesi sonucu oluşan ilk görünür belirti diyebileceğimiz solgunluk şeklinde ortaya çıkar. Bu hastalıkta bitkinin bir tarafı solduğu halde diğer tarafı sağlıklı görülebilir. Etmen gövde, meyve ve iletim demetlerinde renk değişikliği, gövdede çatlama şeklindeki kanserlere ve sonunda bitkinin ölümüne neden olan sistemik semptomların yanı sıra meyveler üzerinde 3-6 mm. çaplı ortası kahverengi ve çevresi beyaz bir hale ile çevrili kuş gözü lekeleri olarak bilinen semptomlar gösterir (Özaktan ve Bora , 1991). Yaprakta da genelde kenar kısımlarda yanıklık şeklinde belirtiler oluşur. Hastalık köpek üzümü gibi *Solanaceae* familyası üyelerinde de yaşayabilir. Nem, etmenin bitkiyi hastalandırabilmesi için önemli bir etkidir (Fatmi ve Schaad, 1988).

Hastalığa karşı alınabilecek mücadele önlemleri, Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığının primer inokulum kaynağının tohum kabuğu veya embriyoda bulunan bakteri olması nedeniyle tohumdaki patojeni elemine etmeye yönelik olmalıdır (Özaktan ve Bora, 1991). Ancak uygulanabilirliği kabul edilmiş olan tohum uygulamaları da Cmm' e karşı her zaman etkili olmayabilir (Thyr ve ark., 1973; Shoemaker ve Echandi, 1976). Aynı zamanda kültürel önlemlerin tek başına yetersiz oluşu çiftçileri yoğun olarak kimyasal kullanımına yöneltmektedir. Kimyasalların kullanımı kolay uygulanabilirliği, çabuk ve gözle görülebilir sonuçlar vermesi gibi özelliklere sahip olmasına rağmen hem ürün maliyetini artırması hem de çevre ve öteki canlılara verebileceği zararlar yüzünden her geçen gün kısıtlanmaktadır (Özcan ve ark., 2001).

Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada ilk olarak Tokat ikliminin sıcak ve nemli özellikler göstermesi ve domates tohumlarının özellikle Antalya bölgesindeki firmalardan temin edilmesi ile tohum kaynaklı olan domates bakteriyel solgunluğu hastalığının varlığının tespit edilmesi amacıyla 2008-2009 döneminde Tokat ili Merkez, Kazova, Erbaa, Niksar bölgelerinde sürvey çalışmaları yapılmıştır. Projenin ikinci aşamasında Cmm2' ye karşı hassas olan hatlar patojenisite testleri yapılarak belirlenmiştir. Bu hassas kültür domatesleri mutasyona uğratarak bitkilerde hastalığa karşı dayanıklılık elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis ve ark., hakkında genel bilgiler

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ; Prokaryota alemi, *Firmicutes* bölümü, *Thallobacteria* sınıfı, *Microbacteriaceae* familyası, *Clavibacter* cinsi içerisinde yer alır (Agrios, 1997). Etmen Erwin F. Smith tarafından yaklaşık 50 yıl *Corynebacterium michiganense* olarak adlandırılmış, 1980'lerde patojenin hücre duvarı yapısı ile ilgili olarak yeni bilgilere dayanılarak *Clavibacter* sınıfı içerisinde yeniden sınıflandırma yapılmış ve Cmm olarak isimlendirilmiştir (Gleason ve ark., 1993).

Cmm' nin sebep olduğu Domates Bakteriyel Kanser hastalığının birincil inokulum kaynağının tohum olduğu bilinmektedir. Etmenin bulaşık meyve etinin ekstraksiyon işlemi sırasında tohumları yüzeysel olarak bulaştırabildiği ve tohumdan kotiledonu daha sonrada vasküler dokuyu kapladığı bilinmektedir (Özaktan ve Bora, 1991).

Bazı araştırmacılar Cmm için toprağında inokulum kaynağı olduğunu ve etmenin toprakta belirli koşullarda canlılığını sürdürebildiğini belirtmişlerdir. Ciccarone ve Carili (1948) bu etmenin toprakta 4 yıl süreyle canlı kalabildiğini belirtmişlerdir. Cmm' nin ikincil bulaşma kaynağının ise budama, koltuk alma gibi kültürel işlemlerle birlikte yağmur, su ve pestisit damlacıklarının olduğu belirtilmektedir. Dick (1981) kışı toprakta geçiren bakterinin meyve üzerinde lekelenmelere sahip olduğunu saptamışlardır.

Cmm domates bitkisinin her döneminde belirti oluşturan bir hastalıktır. Bu belirtiler bitkinin enfekte olduğundaki yaşına, enfeksiyon şekline ve çevre faktörlerine bağlıdır. Cmm; aerobik, gram pozitif, coryneform çubuk, 0.6-0.7 μ x 0.7-1.2 μ büyüklükte, tek veya 'V' şeklinde çiftler halinde bulunan, hareketsiz, spor oluşturmayan, kemoorgano ototrofik, glikozdan ve diğer bazı karbonhidratlardan zayıf asit oluşturan, optimum gelişme sıcaklığı 20-29 °C olan, 35 °C' nin üstünde çok nadir gelişme gösterebilen, katalaz pozitif, oksidaz negatif bakteriyel bir organizmadır (Holt ve ark., 1994).

Hastalık belirtileri sistemik veya lokalize olmuş enfeksiyonlardan meydana gelmelerine göre farklılık göstermektedir. Belirtilerin nedeni genelde sistemik enfeksiyonlardır. Sekonder enfeksiyonlardan meydana gelenler genelde sınırlı

kalmaktadır. Enfeksiyon tohum veya açılan yaralar yolu ile direkt iletim demetleri dokusu içerisine taşınan inokulumdan meydana gelirse sistemik enfeksiyonların belirtileri oluşur ve hastalık ilk olarak solgunlukla kendini göstermeye başlar. Bitkiler sistemik olarak enfektelendiği zaman genç fideler hızla solar ve çöker, yaşlı bitkilerde ise solgunluk belirtileri yavaş ve aşama aşama gerçekleşir. Enfekteli gövdelerde iletim demetleri sarımsı bir renk bozulması gösterir, daha sonra kahverengiye döner, özellikle dikey çatlak gövdelerde ki boğumlarda bu durum açıkça görülebilir. Hastalık adını spesifik koşullar altında gelişen gövde solgunluklarından alır. Patojen ksilemden floem ve parankima hücrelerine yayıldığı için hasta gövdede açık sarı kahverengi çizgiler şeklinde belirti oluşturur. Bu çizgiler gittikçe koyulaşır ve bazen çatlaklar açılır, koyu kahverengi yapılar öz ve nekrozda büyük nekrozların açığa çıkmasıyla sonuçlanır. Eğer patojen doğal açıklıklardan ve yaralardan giriş yapmışsa, ilk olarak nekrozlar ve yaprak lekeleri ile kendini gösteren lokalize olmuş belirtiler görülür. Yaprakçıkların kenar nekrozları genellikle lokalize olmuş enfeksiyonların ilk belirtileridir. Bazen 'yanmış faz' olarak belirtilen bu görünüm ilk olarak kahverengilik, alt yaprakçık kenarlarının kuruması olarak başlar. Bazen de ince, sarı bir doku ile çevrilerek yeşil kısımdan ayrılır. Nekrotik alan gittikçe genişler, yaprağın ve zamanla bütün gövdenin büzülmesine neden olur (Yıldız, 2007).

Meyvelerde kuş gözü lekesi olarak bilinen ve taze olarak tüketilen meyvenin pazar değerini düşüren küçük, beyaz hale ile çevrili kahverengi lezyonlar etmenin lokalize olmuş enfeksiyonunda görülmektedir. Enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında ise meyve iletim demetlerinde sarılaşma ve kahverengileşme görülmektedir. Etmen *Solanaceae* familyasından domates, biber, patlıcan gibi türlerde hastalık oluştursa da domates ekonomik anlamda önemli olduğu tek kültür bitkisidir (Yıldız, 2007).

Hastalık ile mücadelede en etkin yöntem başlangıç inokulumunu azaltmaktır. Temiz üretim alanlarına hastalık, tohum ve fideler yolu ile taşındığı için temiz tohum ve fide kullanımı en etkin mücadele şeklidir. Domateslerde budama ve koltuk alma işlemlerinde kullanılan budama makasları her bitkiden bitkiye geçişte % 1 ' lik NaOCl süspansiyonuna daldırılarak dezenfeksiyon sağlanmalıdır (Gitaitis, 1991). Hastalıklı bitkiler üretim alanından uzaklaştırılmalı ve yakılmalıdır. Eğer hasta bitkiler üretim alanında var ise bunların budama ve koltuk alma işlemleri en sona bırakılmalıdır. Dikim

ve üretim esnasında kullanılacak bütün malzemeler (saksı, sırtık, ip vs.) % 2-5 oranında ticari formalin içinde 1 saat süre ile tutulduktan sonra 24 saat süreyle plastik torba içerisinde tutularak kapalı halde bırakılmalıdır. Üretim alanında ikincil yayımları en aza indirebilmek için bitkiler ıslak halde iken herhangi bir kültürel işlem yapılmamalıdır. Bulaşık alanlarda *Solanaceae* familyasına dahil olmayan bitkiler ile ürün rotasyonu yapmak toprakta bulunan inokulumun azaltılmasında önemlidir (Gitaitis, 1991). Üretim alanlarında özellikle fidelik ve seralarda iyi havalandırma yapılarak aşırı nem birikimi önlenmelidir. Bulaşık sera toprağı eğer yeniden kullanılacak ise mutlaka sterilize edilmelidir.

Hastalık ile mücadelede etkili bir kimyasal uygulaması yoktur. Fakat özellikle örtü altı domates yetiştiriciliğinde budama ve koltuk alma işlemlerinden sonra bakır uygulaması hastalığa giriş kapısı olabilecek yara yerlerinin kapanmasını sağlamakta, 5-7 gün ara ile yapılacak bakırlı preparat uygulamaları ile yaklaşık hastalık % 50 oranında azaltılabilmektedir (Özaktan ve Bora, 1991).

Domates tohumlarının ekimden önce 54-56 °C' deki suya 20 dakika daldırılması ya da meyve eti ile domates tohumlarının 72 saat süreyle fermantasyonunun tohumdaki patojeni elimine ettiği belirlenmiştir (Özaktan ve Bora, 1991). Tohuma sulandırılmış hidroklorik asit, kalsiyum hipoklorit veya sıcak su uygulamalarıyla hastalık yok edilebilir. Antagonist bakterilerin hastalık gelişimini temiz toprakta % 46-100, bulaşık toprakta ise % 65-100 arasında değişen oranlarda engellediği saptanmıştır (Tokgönül ve Çınar, 1999). Son dönemde araştırılan konulardan biri de farklı maddelerin *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* aktivitesi üzerine olan etkisidir. Polen ve propolis ekstraktının *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* ' e karşı antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir (Basım ve ark., 2005). Ayrıca çeşitli kekik türlerinde bulunan uçucu yağların da patojene karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. (Kızıl ve Uyar, 2006). Etmen ile mücadelede araştırılan alternatif yöntemlerden biri de çalışılmaya başlanan Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakterilerle (PGPR) biyolojik mücadele olanağıdır. (Yıldız, 2007).

2.2. *C. m. subsp. michiganensis*' in yaygınlığı ile ilgili yapılan çalışmalar

Dünyada domates üretiminin yapıldığı hemen hemen her alanda görülen ve üretimi sınırlayan en önemli bir bakteriyel etmen olan Cmm ilk olarak 20. yüzyılın başında A.B.D.' de saptanmıştır (Gleason ve ark., 1993). Avusturya, Beyaz Rusya, Belçika, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Mısır, Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İrlanda Cumhuriyeti, İsrail, İtalya, Lübnan, Litvanya, Fas, Hollanda, Norveç (eredike edilmiş), Polonya, Portekiz (eredike edilmiş), Romanya, Rusya, Slovenya, İspanya, İsviçre, Tunus, Ukrayna, Ermenistan, Azerbaycan, Çin (geçmişte bulunmuş ancak daha sonra tespit edilememiş), Hindistan, İran, Japonya, Kenya, Kuzey Afrika, Kanada, A.B.D, Meksika, Avustralya ve Yeni Zelanda' da Cmm' nin varlığı rapor edilmiştir. Etmenin varlığı son olarak 1999 yılında Tanzanya'da (Black ve ark., 1999), 2000 yılında Kıbrıs'da (Ioannou ve ark., 2000), 2004 yılında ise Endonezya'da bildirilmiştir (Anwar ve ark., 2004; Yıldız, 2007).

Cmm domateslerde hem kalite hem de kantite de azalmaya neden olmaktadır. Etmenin A.B.D.' nin Midwest (1930' lu ve 1980' li yıllar), Ontario (1960' lı ve 1980' li yıllar) ve Kuzey Carolina (1960' lı yıllar) eyaletlerinde farklı yıllarda meydana getirdiği epidemilerde üretici bazında % 80' nin üzerinde, bölgesel olarak ise % 5-10 oranında ürün kaybına neden olduğu saptanmıştır (Yıldız, 2007).

Hindistan' ın farklı bölgelerinde yapılan bir çalışmada elde edilen domates tohumlarının Cmm ile doğal bulaşıklığının önemli bir tehlike oluşturduğu saptanmıştır (Nedumaran ve Vidhyasekaran, 1982, 1982a).

Ülkemizde domates yetiştiriciliğinin yapıldığı her bölgede görülebilen Cmm ilk kez Bremer ve ark., (1952) tarafından Ankara ilinde tespit edilmiştir. Sonraki yıllarda Karahan (1965), İç ve Güney Anadolu' da, Karaca ve Saygılı (1977), Marmara ve Ege Bölgesi'nde, Ulukuş (1982), Elazığ, Diyarbakır ve Mardin' de, Çınar (1980), Çukurova Bölgesi'nde, Öktem (1985), Ankara ve Eskişehir' de bulunduğunu bildirmişlerdir. (Akat, 2008).

Hastalığın Ankara ilinde %0.5 ile %23 arasında bir yaygınlık gösterdiği tespit edilmiş, ancak bazı ilçelerde %100 bulaşık tarlalara da rastlanmıştır (Öktem, 1984).

Orta Anadolu Bölgesi'nde Afyon, Ankara, Bolu, Burdur, Çankırı, Eskişehir, Isparta, Kayseri, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Niğde, Yozgat ve Zonguldak olmak üzere 14 ilde domates ekim alanlarında domates bakteri hastalıkları sürveyi yapılmıştır. Sürveyler sonucunda Afyon dışındaki illerde 97 tarlada Domates Bakteriyel Kanser Hastalığına rastlanmıştır. Hastalık sırayla Isparta (%5.25), Yozgat (%4.67), Ankara (%3.71), Çankırı (%1.8) ve Niğde (%1.4) illerinde oldukça yüksek oranda görülmüş, diğer illerde ise %0.07-0.71 arasında değişen oranlarda saptanmıştır (Özyılmaz, 2001).

Kahveci ve Gürcan (1993) yaptıkları çalışmada Antalya (Alanya, Elmalı, Kaş, Korkuteli, Kumluca, Manavgat, Merkez ve Serik ilçeleri) ilinde incelenen sera ve tarla domateslerinde solgunluk gösteren bitkilerden izole edilen 72 adet bakteri izolatını yaptıkları testler sonucunda Cmm olarak tanımlanmışlardır.

Yapılan bir çalışmada Doğu Anadolu Bölgesi'nde Oltu, İspir ve Yusufeli ilçelerinde Target çeşidi ticari domates üretimi yapılan 6 farklı üretim alanında hastalık yaygınlığının % 100 olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri izolatları yaptıkları biyokimyasal testler ve yağ asit metil ester analizleri sonucunda Cmm olarak saptamışlardır (Şahin ve ark., 2002; Yıldız, 2007).

Basım (2002) tarafından yapılan bir çalışmada Isparta ili ve çevresinde örtü altı domates üretim alanlarının bakteriyel hastalıklar yönünden incelenmesi sonucunda 40 seranın Cmm ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Batı Akdeniz Bölgesi'nde Isparta (Keçiborlu, Çandır ve Şeyhler İlçeleri) ve Antalya (Serik, Aksu, Kumluca, Derme ve Kınık İlçeleri) illerinde örtü altı domates yetiştiriciliği yapılan üretim alanlarının bakteriyel hastalıklar yönünden incelenmesi sonucunda % 26 ve % 65 arasında değişen oranlarda Cmm ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Basım ve ark., 2004).

Yıldız (2007) 'nin Çukurova Bölgesi'nde yaptığı arazi sürveyleri sonucu hasta domates bitkilerinden yapılan izolasyonlarda domates bitkilerinin yoğun biçimde Cmm etmeni ile bulaşık olduğunu tespit etmiştir. Çalışmada Adana, Mersin, Antalya, Bursa, Artvin ve İzmir illerinde domates üretim alanlarında sürveyler yapılmıştır. Sürvey yapılan üretim alanlarında simptomolojik olarak yapılan gözlemler sonucunda bakteriyel kanser hastalığının görüldüğü yıllarda % 15-25 arasında değişen oranlarda yaygınlık gösterdiği

belirlenmiştir. Özellikle bir önceki üretim sezonunda hastalık saptanmış ve yaygınlık oranının % 70-80'lere vardığı saptanmıştır.

Özyılmaz (2001)'in yaptığı bir çalışmada 2000 yılı güz dönemi (Kasım-Aralık)'nde inceledikleri toplam 91 domates serasından 8' inde bakteriyel hastalık belirtilerine rastlamış, bunlardan aldıkları örneklerden yapılan izolasyon çalışmalarında 11 izolat elde etmişlerdir. Çine ilçesinde 2 (% 1- % 10), İncirliova ilçesinde 1 olmak üzere 3 serada Bakteriyel Kanser hastalığı belirtilerine rastlamışlardır. Araştırmacı elde ettiği izolatları yaptıkları testler sonucunda Cmm olarak saptamıştır.

2.3. Bitki patojeni bakterilerin tanılanması ve karakterizasyonu

Dünya nüfusuna yetecek gıda maddelerinin üretimi, kültür bitkilerinin yetiştirildiği alanların genişletilmesi ve birim alandan alınacak olan verim miktarını artırmak amacıyla kullanılan uygulamalarla gerçekleştirilebilir. Bu uygulamalar içerisinde en önemlilerinden birisi modern bitki koruma yöntemlerinin kullanılmasıdır. Bu sayede uygun olmayan çevre koşullarının, hastalık, zararlı ve yabancı otların oluşturacağı kayıplar en az düzeye indirilebilecektir (Döken, 2000). Patojenlerin tanılarının doğru olarak yapılması, patojen popülasyonları içerisindeki varyasyonların tespit edilmesi, patojenlerin inokulum kaynaklarının saptanması, yayılma şekli ve yollarının belirlenmesi ve bunlara bağlı olarak da mücadele yöntemlerinin belirlenmesi için mikrobiyal tanı yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir (Dönmez, 2004). Mikroorganizmaların tanılanmasında klasik ve moleküler sistemler kullanılmaktadır.

2.3.1. Klasik yöntemler

Mikroorganizmaların tanısı, moleküler biyoloji tekniklerinin geliştirilmesine kadar klasik metotlarla yapılmıştır. Bu metotlarla mikroorganizmaların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve patolojik karakterlerinden faydalanılmıştır. Klasik tanı yöntemleri genellikle birbirlerinden bağımsız olarak kullanılamamakta ve her birisi kendisinden başka alternatif sistemlere ihtiyaç duymaktadır. Uzun süreli deneylere, fazla iş gücüne, yetişmiş araştırmacılara ihtiyaç oluşturması ve alınan sonuçların farklı yorumlara açık oluşu klasik testlerin dezavantajları arasındadır (Miller ve Joaquim, 1993). Son yıllarda

moleküler biyoloji alanındaki ilerlemeler, yeni mikrobiyal tanı tekniklerinin geliştirilmesini hızlandırmış, buna bağlı olarak da moleküler yöntemler geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur (Dönmez, 2004).

2.3.2. Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemler karbonhidratları, lipidleri, proteinleri ve genetik materyalleri (DNA ve RNA) çalışma materyali olarak kabul etmekte ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımı ile mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonunun yapılmasını sağlamaktadır (Manceau ve Horvais, 1997). Metabolik enzim profillerinin belirlenmesi (Biolog), yağ asit analizleri (Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi), serolojik teknikler (Aglütinasyon, Immunofluorescence, Dot Immunobinding Assay, Immunoblot, Radioimmunoassay, Enzim-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), gen amplifikasyonu ve genetik profiller (Randomly Amplified Polimorphic Detection = RAPD, Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP, Repetitive Extragenic Palindromic = Rep-PCR, Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus = Eric-PCR, rDNA-PCR, Box -PCR, Spesifik PCR) gibi elektroforetik yöntemler son yıllarda sık olarak kullanılan moleküler metotlar olmuştur. Bu yöntemlerin her birisi tek başına, alternatifsiz olarak kullanılabilen, kısa zamanda çok sayıda örnek tür altı seviyede tanılabilmektedir. Elde edilen sonuçlar oldukça hassas ve güvenilirdir (Dönmez, 2004). Ancak sistemlerin pahalı olması ve deneyimli elemanlar tarafından yapılması gerekliliği bu yöntemlerin dezavantajıdır. Biolog, Mikrobiyal İdentifikasyon, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Seroloji testleri son yıllarda yaygın olarak kullanılan moleküler tanı yöntemleri olarak bilinmektedir (Dönmez, 2004).

2.3.2.1. Biyolog sistem

Mikroorganizmaların çeşitli karbon kaynaklarını enerji kaynağı olarak kullanma ihtiyacında gösterdiği farklılıklar tanı ve karakterizasyonda kullanılabilir. Mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını (basit şekerler, alkoller, amino asitler, deterjanlar, amino asit benzeri moleküller) kullanımında gösterdikleri farklılıklar

metabolik profil olarak adlandırılmakta ve profildeki bu farklılıklar sahip oldukları metabolik enzimlerin çeşitliliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Black ve Sweetmore 1994, Hobbie ve ark., 2003). Mikroorganizmaların taşıdığı bu enzim farklılığı ise onların familya düzeyinden başlayıp alt tür seviyesine kadar devam etmektedir (Miller ve ark., 1993; Konopka ve ark., 1998).

Bu şekilde metabolik farklılıklara göre tanılamada en yaygın olarak kullanılan sistem Biolog mikrolate sistemidir (Dönmez, 2004). Bilgisayar kontrollü çalışan Biolog sistemi; turbidimetre, kinetik okuyucu ve bilgisayar sistemi olmak üzere 3 ana parçadan oluşmaktadır (Kingler ve ark., 1992). Ayrıca mikroorganizmalar kendi aralarında gruplandırılmış (fungus, maya, anaerobik bakteri, GN bakteri, GP bakteri), her bir mikroorganizma grubu için belirleyici olan karbon kaynaklarından oluşan farklı mikrolateler oluşturulmuştur. Mikrolatelerin üzerlerindeki çukurcuklardan bir tanesine negatif kontrol olarak sadece su, diğer 95 çukurcuğun her birisine ise farklı bir karbon kaynağı kodlanmış ve redox boyası olarak da tetrazolium violet ilave edilmiştir (Garland ve Mills, 1991; Bernards ve ark., 1995; Garland, 1996). Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonlarının mikrolateler üzerindeki farklı karbon kaynakları ile kodlanmış çukurlara verilmesi sonucunda, onların karbon substratlarını kullanıma bağlı olarak ortamda organik asit içerikli metabolitler üretilmekte ve ortam asidik özellik kazanmaktadır. Oluşan asit ise pH indikatörü boyalar ile reaksiyona girmekte ve sonuçlar renklenme şeklinde gözlenmektedir. Kullanılan karbon substratlarında görülen renk değişikliği otomatik bir plate okuyucusu yardımı ile değerlendirildikten sonra her organizmanın karbon – kullanım profili (metabolik profili) belirlenmektedir (Miller ve ark., 1993; Konopka ve ark., 1998). Elde edilen bu veriler kullanılarak, mikroorganizmalar ait oldukları gruplar içerisinde, ticari kütüphaneleri bulunan MicroLog paket programına bağlı olarak cins, tür ve tür altı seviyede tanımlanmaktadır (Fang ve ark., 2001). Analiz sonuçları, metabolik profil tablosu ve tanı sonucu yazılı rapor halinde verildiği gibi sistemin genel hafızasına otomatik olarak kayıt edilmekte ve bu bilgilere istenilen zamanda ulaşılarak tekrar yeni bir çıktı alınabilmektedir (Şahin, 2003).

2.3.2.2. Mikrobiyal İdentifikasyon Sistem

Mikroorganizmaların yağ asitleri çeşitliliği, karbon atomlarının sayısına, bu atomlar arasındaki çift bağ miktarına, çift bağın hangi karbon atomları arasında olduğuna ve karbonların hidrojen atomları tarafından doyurulup doyurulmamalarına bağlıdır (Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Yağ asidi profillerindeki farklılıklar ise dolaylı olarak mikroorganizmalar arasındaki genetiksel farklılığı ifade etmektedir (Şahin ve ark., 2000; Fang ve ark., 2001).

Mikroorganizmaların hücre yapılarında (sitoplazma ve membranda) fosfolipid, glikolipid veya lipopolisakkarit olarak bulunan yağ asitlerini, sayısına, çeşitliliğine ve % miktarlarına göre tanıyan sistem 1985 yılında geliştirilmiştir (Miller ve Berger, 1985). Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS), bilgisayar kontrolünde çalışmakta olup, gaz kromatografisi, bu kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve hava), bilgisayar ünitesi, bilgisayar ünitesi ile uyumlu çalışan kütüphaneler ve yazıcı olmak üzere 5 kısımdan meydana gelmektedir (Lelliott ve Stead, 1987). Anaerobik ve aerobik bakteriler, actinomycetes, maya ve gelişmiş funguslar bu sistem sayesinde kolaylıkla ve çok kısa sürede tanımlanabilmektedir (Miller ve Berger, 1985).

2.3.2.3. Serolojik tanı metotları

Serolojik metotlar antijen-antikor ilişkisine dayanan testleri içermekte ve bunlar arasında ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) hızlı sonuç vermesi ve uygulanabilirliğinin kolaylığı sayesinde fitopatolojide yaygın olarak kullanılmaktadır (Miller ve Joaquim, 1993; Narayanasamy, 1997). ELISA, plateler üzerine kodlanan antijenlerin, enzim kodlanmış antikorlarla tespit edilerek substrat ile reaksiyona sokulması sonucu elde edilen pozitif reaksiyonların renklenmiş bir şekilde alındığı bilgisayar kontrollü bir sistemdir (Lelliott ve Stead, 1987). ELISA direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Bu konuda yürütülen çalışmalar indirekt ELISA'nın daha hassas bir yöntem olduğunu göstermiştir (Şahin, 2000).

2.3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR (polimerase chain reaction) olarak tanımlanan yöntem; genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir veya birden fazla bölgenin *in vitro* şartlar altında oligonükleotit primer ve Taq polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termocycle sistem (PCR aleti) yardımıyla amplifiye edilmesidir (Şahin ve ark., 2000).

PCR üç farklı basamaktan oluşan reaksiyonlar zinciridir:

- PCR reaksiyonları; DNA çift zincirinin birbirinden ayrıldığı denatürasyon basamağı;
- Primerlerin tek zincirli DNA'ya yapıştığı bağlanma (annealing) basamağı;
- Taq polimeraz enziminin nükleotidleri zincire eklediği uzama (extension) basamağından oluşmaktadır.

PCR ilk kez 1985'de Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. *Thermus aquaticus* bakterisinden yüksek sıcaklıklara dayanıklı Taq DNA polimeraz enziminin izole edilmesi ve bu enzimin DNA amplifikasyonunda kullanılması PCR'ın uygulanabilirliğini artırmıştır (Narayanasamy 1997; Şahin ve ark., 2000; Dönmez, 2004). Bugün birçok obligat fungal ve bakteriyel mikroorganizmaların ve kültür ortamlarında çoğaltılamayan patojenlerin oluşturduğu hastalıkların teşhisi PCR ile kolayca yapılabilmektedir. PCR, tohum saflığının belirlenmesinde, çeşitli türlerin tanısında ve türler arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesinde kullanılmaktadır (Arı, 1999).

Patojen-konukçu arasındaki uyumlu reaksiyonu kodlayan bazı genler (patojenite, virülanslık, avirülanslık, toksin, enzim ve hormon üretimini kodlayan) vardır. Farklı patojenlerde bu tür genlerin baz dizilişleri, genlerin kromozom üzerindeki dağılımları ve tekrarlanma sıklıkları hakkında elde edilen genetik bilgiler patojenin kimliğini açıklamaktadır. O nedenle yukarıda bahsedilen genlerden bir veya bir kaçını için spesifik olarak sentezlenen oligonükleotit primerler yardımı ile farklı patojenlerden izole edilen genetik materyaller PCR ile kolayca amplifiye edilmektedir. Daha sonra elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde elektroforez edilmesiyle patojene spesifik bant

veya bant profilleri belirlenerek hastalığa neden olan etmenin tanısı ve aynı zamanda da hastalığın teşhisi yapılmaktadır (Şahin ve ark., 2000).

2.4. *C. m. subsp. michiganensis*' in izolasyonu ve tanısı ile ilgili çalışmalar

Kahveci ve Gürçan (1993) Antalya ilinde yaptıkları sürveyler sonucu topladıkları hastalıklı bitki örneklerini naylon torbalara koyarak izolasyon yapılıncaya kadar + 4 °C' de saklamışlardır. İzolasyon için bitkilerin yaprak veya yaprakçık sapından aldıkları doku parçalarını ezerek steril distile su ile hazırlanan süspansiyondan GYCA besi yerine öze ile çizgi ekimi yapılmış ve besi yerlerini 27 °C' de inkubasyona bırakmışlardır (Fahy ve Persley, 1983). Yaprak ve meyve lekeleri bulunan bitkilerden de tek bir lekeyi içeren doku parçasından hazırlanan süspansiyon KBA (King' s Medium B Agar)' a ekilmiş ve 25 °C' de geliştirmişlerdir. GYCA besi yerinde gelişen sarı ve KBA besi yerinde gelişen floresan pigment oluşturan koloniler saflaştırıldıktan sonra GYCA eğik besi yerinde + 4 °C' de saklanmıştır. Patojenisite testleri sonucunda bakterilerin tanılanması amacıyla Gram Boyama, % 3' lük KOH testi, hareketlilik, GYCA' da pigmentasyon, koloni özellikleri ve gelişme hızı, KingB besi yerinde floresan pigment oluşumu, NSA' da levan oluşumu, glikozun oksidatif/fermantatif metabolizması, jelatinin hidrolizi testleri yapılmıştır (Fahy ve Persley, 1983).

Balkan (1987) etmenin izolasyonunda yarı seçici ortam olan SCM (semiselective medium for Cmm)' nin başarı ile kullanılabileceğini bildirmiştir. Gleason (1993)' ün bildirdiğine göre patojen için yarı seçici özellik gösteren diğer bir besi yeri olan KBTS besi yerinin daha hızlı koloni gelişimine olanak verdiği ve SCM besi yerinden daha duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Kaaya ve Mortensen (1993) Cmm ' nin domates tohumlarından izolasyonunda önce tohumları 3 saat 5 °C' de inkübe etmişler ardından 1 saat süreyle çalkalamışlardır. Daha sonra süzerek santrifüj etmişler ve elde ettikleri pelletleri KB, PF, PFCC, NA, NAD, CKTM ve SCM besi yerlerine yaymışlardır. Yapılan çalışmada SCM besi yeri en duyarlı besi yeri olarak saptanmıştır. Ayrıca araştırmacılar elde ettikleri izolatları Das-ELİSA yardımı ile de Cmm olarak tanılamışlardır.

Dünya’ da Cmm’ nin izolasyonu için yarı seçici besi yerleri ile birçok araştırma yapılmıştır. Özyılmaz (2001)’ in bildirdiğine göre bu araştırmalar sonucunda D2 (Kado ve Heskett, 1970), D2an (Hwanger, 1975), SCM (Fatmi ve Schaad, 1988), KBT ve mSCM (Waters ve Bolkan, 1992) yarı seçici besi yerleri geliştirilmiştir.

Fatmi ve Schaad (1988) yapmış oldukları çalışmada Domateste Bakteriyel Kanseri etmeni Cmm’in tohumdan tespitine yönelik SCM adı verilen bir yarı seçici besi yeri geliştirmişlerdir. Geliştirmiş oldukları bu yeni seçici besi yerinin testlenen 34 adet Cmm izolatının karşılaştırma ortamı nutrient broth yeast ekstrakt (NBY)’a göre %85–132 oranında gelişmesine müsaade ettiğini ve saprofitik karakterli bakterilerin gelişmesini de %98 oranında engellediğini bulmuşlardır.

Yıldız (2007)’ in bildirdiğine göre yapılan bir çalışmada, dört günlük domates fidelerinin tam gelişmiş kotiledon yapraklarına, en az 105 hücre/ml yoğunlukta hazırlanan Cmm solüsyonu pamuklu bir çubuk yardımıyla sürüldükten sonra, 26 °C’ de yaklaşık %50 -70 nispi nem içeren iklim odası koşullarında 3-4 gün inkübe edildiğinde yapraklarda beyazımsı siğil benzeri yapıların oluştuğunu bildirilmiştir.

Etmenin tanılanmasında serolojik bir yöntem olan ELISA testi de kullanılmaktadır. Gitaitis ve ark., (1990) semptomsuz bitkilerde Cmm’in varlığının ELISA testi ile belirlenebileceğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada ELISA testinde patojenin son sulandırma noktası 10^3 hücre/ml yoğunluk olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar domates tohumlarından ve bulaşık topraktan elde ettikleri izolatları ELISA yöntemini kullanarak tanılamışlardır (Yıldız, 2007).

Etmenin tanılanmasında kullanılan serolojik yöntemlerden biride immunofluorescence (IF) yöntemidir. Gleason (1993)’ un bildirdiğine göre IF ve seroloji ile agar ortamı üzerinde gelişmenin birleştirildiği bir diğer yönteminde, diğer bitki patojenlerinde olduğu gibi Cmm’ nin izolasyonunda da yüksek seçicilik ve duyarlılık gösterdiği saptanmıştır.

Cmm' nin PCR testi ile saptanması amacıyla Santos ve ark., (1997) tarafından CM3 - 5'CCT CGT GAG TGC CGG GAA CGT ATC 3' ve CM4 - 5' CCA CGG TGG TTG ATG CTC GCG AGA T 3' primer çifti, Louws ve ark., (1999) tarafından ise CMM5-5' GCGAATAAGCCCATATCAA 3' ve CMM6-5'CGTCAGGAGGTTTCGCTAATA 3' primer çifti geliştirilmiştir (Yıldız, 2007).

Burokiene (2006) domates fidelerinde Cmm'in neden olduğu enfeksiyonun erken dönemde tanılanabilmesi için Bio-PCR'in kullanım olanaklarını araştırmıştır. Araştırmacı CMM-5 ve CMM-6 primerlerini kullandığı Bio-PCR çalışması sonucunda bu tekniğin seçiciliğinin yüksek, hızlı ve güvenilir olduğunu, sağlıklı domates bitkilerine patojenin yayılmasını erken dönemde önlemede kullanılabileceğini bildirmiştir. Yapılan tanı çalışmalarında virulent Cmm izolatlarını ayırt etmek için PCR testinde kullanılan primer dizilerinin *pat-1* geni üzerinde bulunan baz dilimlerine göre dizayn edildiğini bildirmişlerdir (Yıldız, 2007).

Bach ve ark., (2003) ise fitopatojenik *C. michiganensis* alt türlerinin farklılıklarının ve niteliklerinin belirlenmesi için TaqMan-PCR protokolü oluşturmuşlardır.

Yapılan bir çalışmada çeşitli firmalardan temin edilen 75 tohum örneğini ISTA (International Seed Testing Association) prosedürlerine göre testlenmiş ve elde edilen izolatlar biyokimyasal testler, PCR testi ve Immunofloresan boyama testi ile Cmm olarak saptanmıştır. (Geylani ve ark., 2005).

Hücre duvarı yapısında 2,4-diaminobutrikasit bulunan, yüksek Guanin/Sitozin oranına sahip gram pozitif bitki patojenlerini içeren *Clavibacter* cinsi serolojik ve moleküler testler ile üç ana gruba ayrılmıştır. 1. grupta *C. michiganensis* (*C. m. ssp. michiganensis*, *C. m. ssp. nebraskensis*, *C. m. ssp. sepedonicus*, *C. m. ssp. tessellarius* ve *C. m. ssp. insidious* alt türlerini içermektedir), 2. grupta otsu bitkilerde zamklanma oluşturan türler (*C. iranicus*, *C. rathayi*, *C. tritici* ve *C. toxicus*), 3. grupta ise ksileme yerleşen *C. xyli* (*C. x. ssp. xyli* ve *C. x. ssp. cynodontis*) alt türleri yer almaktadır. Araştırmacılar özellikle *C. michiganensis* ve *C. xyli* alt türlerinin bitkilerde sık sık simptomsuz bulunmaları nedeni ile tanılanmalarının zor olabileceğini saptamışlar ve bu hastalıkların kontrolünün sağlanması için serolojik ve DNA temelli tanı sistemlerinin geliştirilmesinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir (Yıldız, 2007).

Etmenin tanılanmasında kullanılan yöntemlerden biride yağ asit analizleriyle ilgili yapılan çalışmalardır. Gitaitis ve Breaver (1990) etmenin yağ asit metil ester (FAME) profillerinin kütüphanesini oluşturmuşlardır. Araştırmacılar tohumlardan ve domates bitkilerinden elde etmiş oldukları türlerin içerdiği yağ asit metil ester oranlarında bulunan farklılıkları belirlemişlerdir. Bu analiz ile bütün izolatların Cmm olarak tanılanması, aşırı duyarlılık reaksiyonu ve patojenite testlerinin de pozitif sonuç vermesiyle sonuçlanmıştır. Cmm' ninde içinde bulunduğu gram-pozitif bakteriler için spesifik BIOLOG test platelerinin dizayn edilmesi ile etmenin karakterizasyonu için gereken sürenin daha da kısaldığı bildirilmiştir (Gleason, 1993).

Özyılmaz (2001)' in yaptıkları arazi sörveyleri sonucunda inceledikleri seralardan toplanan izolatlara gram boyama, tütünde aşırı duyarlılık testleri yapmışlar ve bu testlerin sonucunda izolatların hepsini gram pozitif olduğunu bazılarının da aşırı duyarlılık reaksiyonu verdiğini saptamışlardır.

Yıldız (2007) tarafından yapılan çalışmada Çukurova Bölgesi'nde domates üretimi yapılan tarla ve seralardan elde ettikleri bakteri izolatları YDC besi yerinde geliştirilmiştir. Elde ettikleri izolatlar ile yapılan patojenisite testlerinin pozitif sonuçlar vermesiyle tipik hastalık semptomu gösteren bitkilerden yapılan re-izolasyonlarla tekrar re-izolat elde etmişlerdir. Araştırmacının bu izolatları tanılamak amacıyla koloni gelişimi , potasyum hidroksit testi, aşırı duyarlılık testi gibi çalışmalar yapmıştır. Aynı zamanda bu geleneksel tanı yöntemlerini desteklemek amacıyla Indirect-ELİSA, PCR testi, yağ asit metil ester analizi gibi testlerde yapmışlardır. Bu testler sonucunda izolatların Cmm olarak tanılamışlardır.

2.5. Hastalıklara dayanıklı bitki kullanımı

Yerleşik yaşamın başlayıp ilk insanların tarım hayatına geçişleri, patojenler ile kültür bitkileri arasında yakın bir ilişkinin başlangıcını oluşturmuştur. Bu yakın ilişki bazen hastalık salgınlarının ortaya çıkarak tüm ürünün kullanılmayacak duruma gelmesine ve bunun sonucunda da bir çok insanın yaşamını yitirdiği kıtlıkların görülmesine neden olmuştur. Ürünleri hastalık ve zararlıların verebileceği zararlardan korumak için bir çok

yöntem kullanılmasına rağmen hastalıklar halen kültür bitkilerini tehdit edici boyuttadır. Hastalıklar ürün miktarını düşürmekle birlikte aynı zamanda ürünün kalitesini de etkilemektedir. Hastalıkların yaptığı zararları önlemek için bir çok durumda kimyasallar kullanılsa bile bitki hastalıklarının oluşturacağı zarar tamamen önlenemez. Üstelik kimyasalların kullanımı hem ürün maliyetini artırması hem de çevreye ve öteki canlılara verebileceği zarar yüzünden her geçen gün kısıtlanmaktadır (Özcan ve ark., 2001).

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki yeni gelişmeler ile birlikte hastalık, zararlı ve kötü çevre koşullarına karşı saptanan dayanıklılık genlerinin kolayca ve kısa zamanda çok sayıda kültür bitkisine aktarılma imkanı veren bir teknoloji geliştirilmiştir. Bu nedenle zirai mücadele çalışmalarında da bakteriyel patojenlere karşı dayanıklılık geni bulunduran kültür veya yabancı bitki türlerinin belirlenmesi üzerine yapılan araştırmalar artmıştır (Schuster ve ark., 1983, Silva ve ark., 1989). Dayanıklılık çalışmaları bitki genotiplerinde var olan ve bir veya birden fazla gen tarafından kontrol edilen dayanıklılığın tespit edilmesi, bu dayanıklılığı veren genlerin klonlanması ve agronomik özellikleri çok iyi olan bitkilere klonlanan genlerin transferini içermektedir (Agrios, 1997).1963' te Vanderplank yapılan bütün epidemiyolojik çalışmaları incelemiş bitkilerdeki dayanıklılık mekanizmasını 2 kısımda toplamıştır (Dönmez, 2004).

- **İrk spesifik dayanıklılık** (Vertikal dayanıklılık, Qualitative dayanıklılık)

Tek gen tarafından kontrol edilen dayanıklılık mekanizmasıdır. Bu dayanıklılık tipinde bitkide simptom gelişimi görülmez. Dayanıklılık fenotipik olarak aşırı duyarlılık (Hypersensitive Response=HR) şeklinde ortaya çıkmaktadır. İrk spesifik dayanıklılıkta bitki ile patojen arasındaki dayanıklılık mekanizması “gen için gen” hipotezine dayalı olduğu için sürdürülebilir bir dayanıklılık değildir ve patojendeki avirülans geni ya da bitkideki dayanıklılık geni kısa sürede kırılabilir. Ancak genin yerinin tespiti kolay olduğu için biyoteknolojik yöntemlerle klonlanması ve bitkiler arası transferi daha kolay ve başarılı olmaktadır (Dönmez, 2004).

- **İrk spesifik olmayan dayanıklılık** (Horizontal dayanıklılık, Quantitative dayanıklılık)

Birden fazla gen ve çevresel faktörlerin ortak katkısı ile kontrol edilen dayanıklılık mekanizmasıdır. Her bir gen belirli oranlarda dayanıklılığa katkı sağlamaktadır. Bu dayanıklılık patojenin bir bireyine veya ırk grubuna karşılık değil patojenin bütün izolat/ırk/strainlerine karşı etkili bir dayanıklılıktır. İrk spesifik olmayan dayanıklılık mekanizmasında simptom oluşumu az da olsa vardır ancak bitki bunu tolere edebilmektedir. Uzun süre kalıcı olan bir dayanıklılıktır ve kırılması çok zordur. Konukçu dayanıklılık mekanizması çok sayıda genin ortak katkısı ile kontrol edildiği için mutasyonlara dayalı dayanıklılığın kırılması söz konusu değildir. (Dönmez, 2004).

Bitkisel üretimde arzulanan üretim artışlarının gerçekleştirilebilmesi için yapılacak çalışmaların başında ya ekim alanlarının genişletilmesi ya da birim alan veriminin artırılması gelir. Verimin artırılmasında önemli olan etkenlerden birisi hastalıklara karşı dayanıklı bitkilerin kullanımınıdır. Ülkemizde çeyrek yüzyıl öncesine kadar daha çok ekim alanı artışıyla gerçekleştirilen üretim artışları, daha sonraki çalışmalarda birim alan veriminin artırılmasına yöneltilmiştir. Bu konuda yapılacak çalışmalarda, değişik ıslah yöntemleriyle genetik yapıları farklı yeni genotiplerin elde edilmesi amaçlanmaktadır (Ünver, 1989).

Yeni çeşitlerin elde edilmesi amacıyla yapılacak ıslah çalışmalarında ya doğada bulunan ya da yapay olarak ortaya çıkarılacak varyasyonlardan yararlanılır. Farklı genotiplerin yaratılması için bugüne kadar uygulanan ıslah yöntemlerinin başında melezleme ıslahının geldiği bilinmektedir. Ancak son çeyrek yüzyılda uygulamaya konulan ve ıslahçıların uygulamaya başladıkları mutasyon ıslahı doğrudan veya melezleme ıslahının tamamlayıcısı olarak büyük bir önem kazanmıştır (Akbaş, 1988). Mutasyon ıslahında temel ilke bitkilerin değişik kısımlarına farklı yöntemlerle değişik mutagenlerin farklı dozlarda uygulanarak olumlu veya olumsuz varyasyonların ortaya çıkarılmasıdır. Önemli olan diğer bir nokta ise bu varyasyonlar içinden uygun yöntemlerle amaca yönelik seleksiyonların yapılabilmesidir. Böylece elde edilen yeni çeşitlerin ekonomik amaçla üretime alınması ya da mutantların melezleme ıslahında ebeveyn olarak kullanılması ıslahçının ulaşmak istediği sonuçtur (Ünver 1989).

Mutasyon ıslahında kullanılan mutagenler genelde fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki grupta toplanır. Kimyasal mutagenlerin tohumla üretilen bitkilerde fiziksel mutagenlere oranla daha yüksek mutasyon frekansı oluşturduğu bilinmektedir. Ancak tüm mutagenlerin uygulandıkları bitkilerde fizyolojik zararlar oluşturduğu ve aşırı doz uygulamalarında ise ölümlere neden olduğu bilinmektedir (Ünver, 1989).

2.6. Bakteriyel Kanser Hastalığı (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis ve ark.)' na karşı yapılmış olan dayanıklılık mekanizmalarıyla ilgili çalışmalar

Bakteriyel kanser etmeni olan Cmm hem açık alanda hem de örtü altında yapılan domates yetiştiriciliğinde önemli oranlarda verim kaybına neden olmaktadır. Bu hastalığın zararını önlemek için kimyasallar kullanılsa bile bitkide oluşturacağı zarar tamamen önlenemez.

Dünyanın çeşitli ülkelerinde diğer birçok bitki patojenine karşı olduğu gibi Cmm'e karşı da dayanıklı çeşitler hakkında çalışmalar yapılmıştır.

Ulukuş (1982) tarafından Elazığ, Mardin ve Diyarbakır illerinde yürütülmüş olan bir dayanıklılık çalışmasında 15 çeşitten Süper-1 ve Red top çeşitlerinin hastalığa karşı oldukça hassas, buna karşı Süpermarmande, P378RT17, Süper-14, SC2121, Es-24, Cal-Ace ve YF-134 çeşitlerinin hastalığa daha az duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak hastalığa tam bağışık bir çeşit saptanamamıştır.

Çınar (1980) Çukurova Bölgesinde yaptığı çalışmada 23 adet domates çeşidini Cmm'e dayanıklılık yönünden incelemiş ve 3 domates çeşidini az duyarlı olarak saptamıştır.

Cmm'e dayanıklılığın kaynağı daha çok domatesin yabani akrabalarında bulunmuştur (Thyr, 1968,1969).

Thyr ve Berry (1969) en yüksek dayanıklılık seviyesinin *Lycopersicum pimpinellifolium* ve *L. hirsutum*' da bulunduğunu belirtmişlerdir. Ancak bu kaynaklar dayanıklılığın sadece kısmi bir seviyesine sahiptir.

Lindhout ve Purimahua (1989) Cmm'e dayanıklılık için *L.peruvianum*' un 57 genotipini taramışlardır. Sadece 5 çeşit hastalığa karşı daha az duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Dayanıklı buldukları çeşitlerden olan LA2157 ve hassas çeşit olan LA2172 hattını melezleyerek dayanıklılığın kalıtımını araştırmışlardır. Dayanıklılığın kalitatif bir özellikte olduğunu yani tek bir gen tarafından kontrol edildiği sonucuna varmışlardır.

Cmm'e karşı dayanıklılığı kontrol eden genler hakkında farklı tahminler vardır. Bazı yazarlar dayanıklılığın tek bir gen tarafından kontrol edildiği sonuçlarını bulmuş, bazıları ise Cmm'e dayanıklılığın kalıtımının birden fazla gen tarafından kontrol edildiği yani kantitatif özellikte olduğunu öne sürerek bu durumun türlere göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir (Thry, 1969).

Coaker (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *Lycopersicon hirsutum*' un LA407 hattı Cmm'e karşı kısmi bir dayanıklılığa sahip olduğu yapılan patojenisite testleriyle bulunmuştur. Bu hattın genetik olarak özellikleri incelendiğinde ise kantitatif özellikte bir dayanıklılığa sahip olduğu belirlenmiştir.

Dayanıklılığın genetik özelliklerinin saptanması yanında hastalığa karşı bitkinin savunma sistemini artırması konusunda da çalışmalar yapılmaktadır.

Bitkilerde dayanıklılığın teşvik edilebilmesi için biyotik uyarıcılar (bakteri, fungus, virüs ve nematodlar) yada abiyotik uyarıcılar (salisilik asit, glisin, jasmonat, etilen ve bazı herbisitler) oldukça geniş bir patojen dizisine karşı pek çok kültür bitkisinde kullanılmıştır (Ozeretskoykaya, 1995).

Baysal ve Soylu (2003) tarafından yapılan bir çalışmada bitki aktivatörü kullanılarak domates bitkilerinde peroxidase, glutathione peroxidase, chitinase, superoxide dismutasu ve glutathione S-transferase enzimlerinin miktarlarını artırarak Cmm'e karşı dayanıklılığı teşvik ettiği ayrıca uygulamalar sonucu bitkilerde hastalık şiddetini %76, bakteriyel gelişmeyi ise %68 oranında azalttığı belirlenmiştir.

Türküsay ve Tosun (2005), bitki aktivatörü olarak bilinen hidrojen peroksit' in *in vivo* ve *in vitro* etkilerini değerlendirmiştir. Bitki aktivatörü yardımıyla domatesin Cmm'e karşı etkililiğın arttırılması ve uyarılan bitki savunma mekanizması enzimlerinde

meydana gelen değişikliklerin saptanması amacıyla yapılan bu çalışmada hidrojen peroksit'in laboratuvar koşullarında petrilere, tohumlar üzerine ve fidelere uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu denemede in vitro testlerde, bitki aktivatörü tarafından Cmm'nin koloni gelişimi %61.3 oranında engellenmiştir. Tohumlara yapay olarak Cmm inokulasyonundan sonra uygulanan hidrojen peroksit muamelesi % 73.5'lik bir etki sağlamıştır. Domates fidelerinde Cmm'nin engellenmesi amacıyla uygulanan aktivatörün etkisi incelendiğinde ise patojenin etkisinin %70'lik bir oranda azaldığı tespit edilmiştir (Türküsay ve Tosun 2005).

Yapılan uygulamalar sonucunda Cmm ile enfekte edilmiş olan bitkilerde savunma tepkisinin bir göstergesi olarak peroksidaz enziminin spesifik aktivitesinde kontrol grubuna oranla önemli artış saptanmıştır. Bu alışma sonucunda bitkide peroksidaz enziminin arttığı görülmüştür. Savunma mekanizmasının işleyişinde etkin olarak yer alan peroksidaz enziminin bitkilerdeki çoklu savunma sisteminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve bitkilerin çoğunda kloroplastlarda sentezlenmektedir (Türküsay ve Tosun 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan fitopatojen bakteriler

Çalışmada 2008 ve 2009 yaz dönemleri ayrı ayrı olmak üzere Tokat ili domates ekim alanı en fazla olan Merkez, Kazova, Niksar ve Erbaa ovalarında domates tarlalarında sürvey yapılmıştır. Tipik olarak solgunluk belirtisi gösteren bitki örnekleri toplanarak bakteriler izole edilmiştir. Elde edilen bakteri strainleri çalışmamızın materyalini oluşturmaktadır. Aynı zamanda projenin ikinci kısmını oluşturan mutasyon çalışmalarında kullanmak için *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* etmeninin en virulent ırkı olan Cmm2 Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hüseyin Basım tarafından çalışmalarda kullanılmak üzere hediye edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan test bitkileri

Çalışmada kullanılan domates NCEBR 1-6 hatları Prof. Dr. Randy GARDNER(Horticultural Science, North Caroline University, USA) tarafından, diğer yabancı domates tohumları ve kültür domates tohumları NC84173 California Üniversitesi Tomato Genetics Resource merkezinden temin edilmiştir. Aşağıdaki çizelgede çalışmalarımızda kullanılan kültür domateslerinin orijinleri verilmiştir

Çizelge 3.1. Kullanılan test bitkileri, orijinleri ve Latince isimleri

Tohumun adı (Accession No)	Orijini	Latince adı
NC84173	Amerika	<i>L. esculentum</i>
NC EBR-1	Amerika	<i>L. esculentum</i>
NC EBR-2	Amerika	<i>L. esculentum</i>
NC EBR-3	Amerika	<i>L. esculentum</i>
NC EBR-4	Amerika	<i>L. esculentum</i>
NC EBR-5	Amerika	<i>L. esculentum</i>
NC EBR-6	Amerika	<i>L. esculentum</i>

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve besiyerlerinin hazırlanışı

1. Glikoz yeast carbonate agar (GYCA): 5 g glucose, 5 g yeast extract, 40 g calcium carbonate sırasıyla tartılarak içerisine 1 L distile su eklenmiştir. Karışımın PH' ı 7.2 ' ye ayarlandı. Sonrasında 15 g agar ilave edilmiştir. Besi yeri 20 dk 1 atm basınçta otoklav edilmiştir. Soğutulduktan sonra steril plastik petrilere dökülerek ortamın donmasına izin verilmiştir.

2. Nutrient agar (NA): 28 g nutrient agar tartılarak içerisine 1 L distile su ilave edilmiştir. Besi yeri otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir. 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır.

3. Nutrient broth (NB): 13 g nutrient broth tartılarak üzerine 1 L distile su ilave edildikten sonra karışım otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir.

4. Lauryl broth (LB): 10 g pepton, 10 g NaCl ve 5 g yeast extract sırasıyla tartılarak içerisine 1 L distile su eklenmiştir. Sıvı besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir.

5. % 30 'luk Gliserol: 70 ml steril distile su içerisine 30 ml gliserol eklendikten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilerek hazırlanmıştır.

6. % 3'lük KOH çözeltisi: 3 g KOH 100 ml steril distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

7. Biolog Universal Growth Agar + % 0.025 Maltoz (BUG+M): 1 L distile su içerisine besiyeri karışımı ilave edilerek otoklavda 121 °C'de 15 dk. steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 45 °C'ye kadar soğutulan besiyeri steril petrilere dökülmüş ve katılaşması sağlanmıştır.

8. % 7'lik H₂O₂ Çözeltisi: 7 ml H₂O₂'in hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

9. Trypticase soy broth agar (TSBA) besiyeri: 30 g Trypticase soy broth (BBL # 11768), 15 g granüle agar (BBL # 11849) 2 L'lik bir erlenmayer içerisindeki 1 L dH₂O içerisine ilave edilmiştir, ısıtmalı magnetik karıştırıcı üzerinde agar eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 121 °C'de 15 psi basınç altında 15 dk süreyle

otoklav edilmiştir. Steril edilen ortam 60 °C' ye ayarlı su banyosunda soğutulduktan sonra steril kabinde petrilere (100x15 mm) 20-25 ml'lik kısımlar halinde dökülüp oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

10. Nutrient strach agar (NAS): 23 g nutrient agar (Difco) ve 10 g %1'lik nişasta 1 L saf su içerisine konularak otoklavda 121 °C'de 15 dk. steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 45 °C'ye kadar soğutulan besi yeri steril petrilere dökülmüş ve katılaşması sağlanmıştır.

11. Nutrient sukroz agar: 23 g nutrient agar (Difco) ve 50 g sukroz tartılmış, toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Besi yeri otoklavda 121 °C'de 15 dk. steril edildikten sonra 45 °C'ye kadar soğutulmuş ve steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır.

12. % 0.85'lik NaCl çözeltisi: 8.5 g NaCl'ün hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edilmiştir.

13. %70'lik Etil alkol: 70 ml etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

14. Mutagenin (EMS) hazırlanışı: Çalışmada mutajen olarak Ethyl methano sulfonate (EMS: Sigma) kullanılmış olup bu kimyasal bitki genomu üzerinde tek bazlık mutasyonlar oluşturmaktadır. EMS mutajeni %0.5'lik hazırlanmış olup 100 ml dsH₂O'ya 500 µl EMS ilave edilmiştir.

3.2. YÖNTEM

Bu çalışmada ilk olarak Tokat ili domates üretim alanlarında bakteriyel kanser etmeninin varlığını belirlemek için 2008 ve 2009 yaz dönemleri boyunca , ikinci olarak da bu hastalığa karşı hassas homozigot domates çeşidinde kimyasal mutasyonlar oluşturulup dayanıklı mutant bitkileri araştırmak için çalışmalar yapılmıştır.

3.2.1. Hastalıklı bitki örneklerinin araziden toplanması

2008 ve 2009 yılı yaz dönemlerinde Tokat ili domates ekim alanı en fazla olan Kazova, Niksar ve Erbaa ovalarında domates tarlaları seçilerek solgunluk belirtisi görülen hastalıklı bitki örnekleri alınmıştır. Bölgedeki varlığını belirlemek amacıyla her 50 bitkiden bakteriyel solgunluk belirtisi gösteren bitkiler sayılmış arazideki hastalık yüzdesi hesaplanarak kaydedilmiştir. Alınan örnekler polietilen torbalara konulmuş araziye ait bilgiler (Üreticinin ismi, arazi alanı, mevkii) yazılarak etiketlenmiştir. Toplanan örnekler buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiş, izolasyon işlemine kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Bakteri strainlerinin izolasyonu ve muhafazası

Laboratuara getirilen hastalıklı bitki örnekleri musluk suyunda yıkandıktan sonra iletim demetlerinden hastalıklı ve sağlıklı kısmı içeren 1-2 cm büyüklüğünde bitki parçaları kesilmiştir. Bu parçalar yüzey dezenfeksiyonu için %5'lik sodyum hipoklorür çözeltisinde ve % 70' lik alkol içerisinde 45 saniye (s) bekletildikten sonra 2 ayrı distile su içerisinde 1-2 dakika (dk) bırakılmıştır. Daha sonra 3. distile su içerisinde yaklaşık yarım saat bekletilerek bakterilerin suya geçmesi sağlanmıştır. Bir öze dolusu bakterili süspansiyon NA ve GYCA besi yeri içeren petrilere çizgi ekimiyle çizilmiştir. 25-28 °C' deki inkübatörde 2-3 gün inkübe edildikten sonra gelişen koloniler incelenmiş ve açık sarı renkli koloni morfolojisine sahip olanlar saflaştırılmıştır. 2008 yılında yapılan çalışma sonucu elde edilen 44 adet bakteri ve 2009 yılında elde edilen 39 adet bakteri izolatu teşhis çalışmalarında kullanılmak üzere 500 µl %30 gliserol ve 500 µl Nutrient Broth (NB) yada 500 µl Lauryl Broth (LB) içeren ependorf tüplerinde stok haline

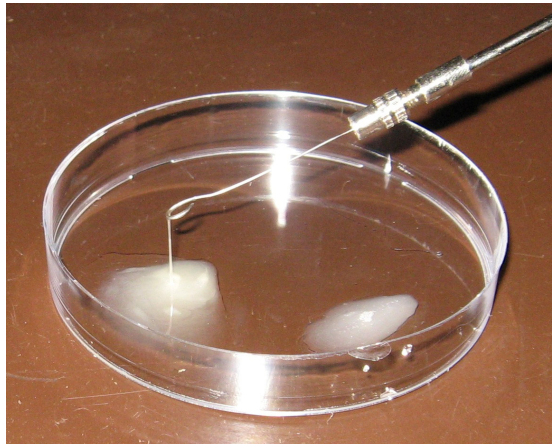
getirilmiştir. Bu stoklar $- 80^{\circ}\text{C}$ ' de buzdolabında ileride yapılacak çalışmalar için muhafaza edilmektedir.

3.2.3. Tanılamada kullanılan Biyokimyasal testler

2008 yılında yapılan sürvey çalışmaları sonucunda elde edilen bakteri strainlerini tanılamak amacıyla çalışmanın biyokimyasal test aşaması Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyojji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Gram reaksiyon testi

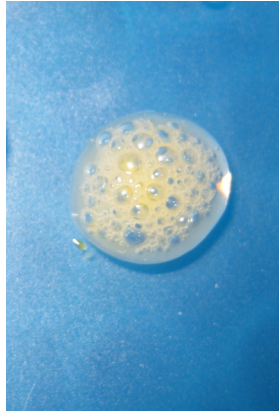
Bakteri strainlerinin hücre duvarlarındaki farklılığını belirleyebilmek için bir lam üzerine, % 3'lük KOH çözeltisinden bir iki damla damlatılmıştır. Ardından GYCA üzerinde geliştirilen 24-48 saatlik (sa) bakteri kültüründen öze ile alınarak KOH çözeltisi ile 5-10 s karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırılmıştır. Gram negatif özellikte olan mikroorganizmalarda hücre duvarındaki peptidoglycan tabakası tek katlı olup, takoik asit içermediğinden KOH ile kolayca parçalanmış, sitoplazma sıvısı serbest hale geçmiştir. Bunun sonucunda da viskoz bir uzama görülmüştür. Hücre duvarı özelliği gram pozitif olan bakterilerde ise KOH-bakteri karışımı sulu bir sıvı halinde kalmış ve öze yukarı doğru kaldırıldığında uzama gözlenmemiştir (Saygılı 1995).



Şekil 3.1. Gram reaksiyon testi sonucunda gram negatif özellik gösteren bakteride meydana gelen viskoz bir uzama

3.2.3.2. Katalaz testi

Katalaz, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan H_2O_2 'in parçalanarak O_2 ve H_2O 'ya dönüşümünü sağlayan bir enzimdir. Katalaz enziminin varlık veya yokluğunu belirlemek için bakteri strainleri NA ortamında geliştirilmiştir. 24-48 sa'lik bakteri kültüründen bir öze alınmış ve üzerine 1 damla H_2O_2 ilave edilmiştir. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Klement ve ark., 1990).



Şekil 3.2. Katalaz testi sonucunda katalaz pozitif özellik gösteren bakteride meydana gelen kabarcık oluşumu

3.2.3.3. Oksidaz testi

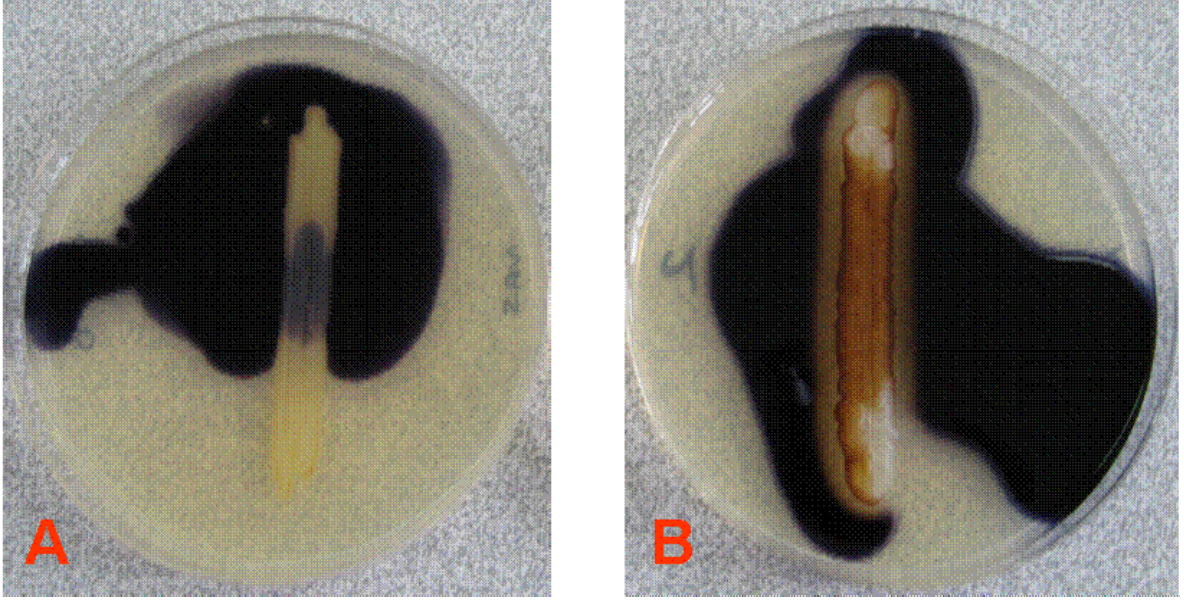
Elektron transferinde bakterilerin cytochrome c proteinine sahip olup olmadıkları bu testle saptanmıştır. Solunum prosesinde cytochrome c proteini (oksidaz c) görev almakta ve elektron transfer sisteminde maddeleri birinden diğerine indirgeyerek hücresel enerji (ATP) oluşumuna neden olmaktadır. Test için % 1 tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren diskler kullanılmıştır. Bu diskler 1 damla sH_2O ile doyurulmuş ve sonra üzerleri 24-48 sa'lik bakteri ile kaplanmıştır. Gözlemlenen mavimsi-mor renk, diskte kodlu olan kimyasal ile enzimin reaksiyona girdiğini ve bakteride citochrome c proteininin olduğunu ifade etmiştir. Bu renk değişiminin oluşması pozitif, oluşmaması ise negatif sonuç olarak kabul edilmiştir (Klement ve ark.,1990, Saygılı 1995, Narayanasamy 1997).



Şekil 3.3. Oksidaz testi sonucu renk değişimi görülen oksidaz pozitif bakteriler (A); oksidaz testi sonucu renk değişimi oluşturmayan negatif bakteriler (B; C).

3.2.3.4. Nişasta hidrolizi (Amilaz) testi

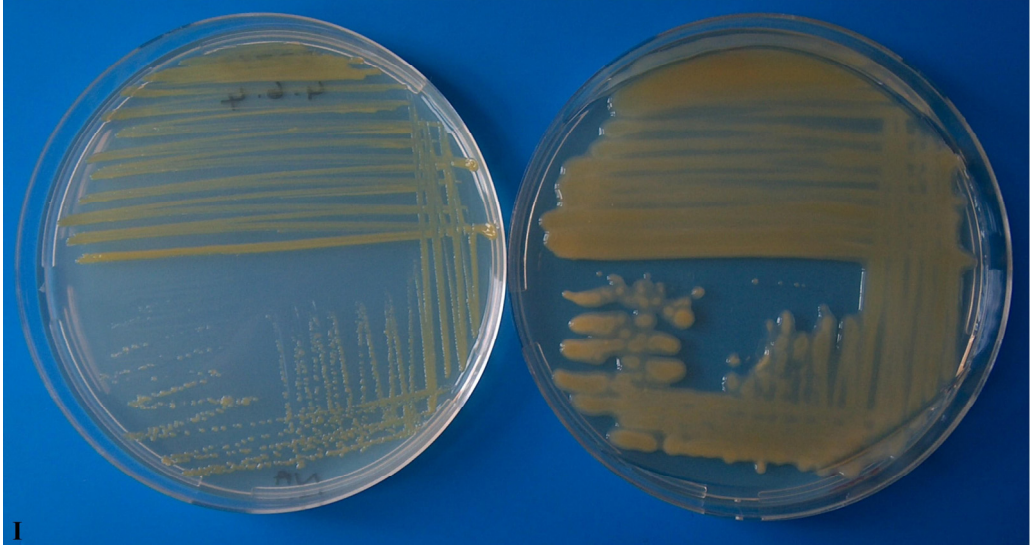
Nişasta molekülünü parçalayarak biyolojik enerjiye dönüştürmede görev yapan amilaz enziminin var olup olmadığı bu testle belirlenmiştir. NAS besi yerine bakteriler nokta veya çizgi ekimle kontamine edilmiştir. 2-7 günlük bir inkübasyon sonrasında bakteri kolonisinin etrafında görülen renk açıklığı veya hale amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç çıplak gözle fark edilemediğinde lugol solüsyonundan 5 ml petrilere dökülmüş ve mavi renk verenler negatif, mavi renk vermeyip ekim çizgileri etrafında açık renk hale verenler pozitif olarak tespit edilmiştir (Klement. ve ark., 1990, Saygılı 1995, Narayanasamy 1997).



Şekil 3.4. Lugol solüsyonu ile mavi renk oluşumu görülen negatif bakteriler (A); Lugol solüsyonu ilave edildikten sonra bakteriler çevresinde hale oluşumu gösteren amilaz pozitif (B) bakterilerin görünümü.

3.2.3.5. Levan (Sukroz) testi

Bu teste nutrient sukroz agar besi yeri kullanılmıştır. Kültürler çizgi ekim şeklinde ekilerek 27 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Levan sucrase enziminin sukrozu kullanması sonucu oluşan konveks, mukoid koloniler levan pozitif, konveks ve mukoid yapıda olmayan koloniler ise levan negatif olarak belirlenmiştir (Klement ve ark., 1990, Lelliot ve Stead 1987).



(negatif)

(pozitif)

Şekil 3.5. Levan sucrase enziminin sukrozu kullanması sonucu bakteri kolonilerin NSA besi ortamında gelişimi (solda) ve levan sucrase enzimine sahip olup NSA besi yerinde mukoid bir koloni yapısı gösteren bakterilerin gelişimi (sağda)

3.2.4. Tanılamada kullanılan moleküler testler

3.2.4.1. BIOLOG testi

Biolog testi için gram negatif ve gram pozitif hücre yapısına sahip olan bakteriler ayrılmıştır. Bu amaçla plateler içerisinde hazır olarak bulunan farklı karbon kaynakları üzerine çalışmalarda gram pozitif yada gram negatif olarak bulunan bakteriler ilave edilmiştir. Gram negatif ve gram pozitif strainler için değerlendirilen 95 karbon kaynağı içeren plateler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.2. Gram negatif strainler için değerlendirilen 95 karbon kaynağının mikroplate'e kodlanması

A1	Sterilsu	B1	İ-Erythritol
A2	α -Cyclodextrin	B2	D-Fructose
A3	Dextrin	B3	L-Fucose
A4	Glycogen	B4	D-Galactose
A5	Tween 20	B5	Gentiobiose
A6	Tween 80	B6	α -D-Glucose
A7	N-Acetyl-D-Galactosamine	B7	m-Inositol
A8	N-Acetyl-D-Glucosamine	B8	α -D-Lactose
A9	Adonitol	B9	Lactulose
A10	L-Arabinose	B10	Maltose
A11	D-Arabitol	B11	D-Mannitol
A12	D-Cellobiose	B12	D-Mannose
C1	D-Melibiose	D1	Acetic Acid
C2	β -Methyl-D-Glucoside	D2	Cis-Aconitic Acid
C3	D- Psicose	D3	Citric Acid
C4	D-Raffinose	D4	Formic Acid
C5	L-Rhamnose	D5	D-Galactonic Acid Lactone
C6	D-Sorbitol	D6	D- Galacturonic Acid
C7	Sucrose	D7	D-Gluconic Acid
C8	D-Trehalose	D8	D- Glucosaminic Acid
C9	Turanose	D9	D-GlucuronicAcid
C10	Xylitol	D10	α -Hydroxybutyric Acid
C11	Pyruvic Acid Methyl Ester	D11	β -Hydroxybutyric Acid
C12	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	D12	γ -Hydroxybutyric Acid

Çizelge 3.2. Devam ediyor..

E1	p-Hydroxy-phenlyacetic Acid	F1	Bromosuccinic Acid
E2	Itaconic Acid	F2	Succinamic Acid
E3	α -Ketobutyric Acid	F3	Glucuronamide
E4	α -Ketoglutaric Acid	F4	L-Alaninamide
E5	α -Ketovaleric Acid	F5	D-Alanine
E6	D.K-Lactic Acid	F6	L-Alanine
E7	Malonic Acid	F7	L-Alanyl-Glycine
E8	Propionic Acid	F8	L-Asparagine
E9	Quinic Acid	F9	L-Aspartic acid
E10	D-Saccharic Acid	F10	L-Glutamic Acid
E11	Sebacic Acid	F11	Glycyl-L-Aspartic Acid
E12	Succinic Acid	F12	Glycyl-L-Glutamic Acid
G1	L-Histidine	H1	Urocanic Acid
G2	Hydroxy-L-Proline	H2	Inosine
G3	L-Leucine	H3	Uridine
G4	L-Ornithine	H4	Thymidine
G5	L-Phenylalanine	H5	Phenylethyl-amine
G6	L-Proline	H6	Putrescine
G7	L-Pyroglutamic Acid	H7	2-Aminoethanol
G8	D-Serine	H8	2,3- Butanediol
G9	L-Serine	H9	Glycerol
G10	L-Threonine	H10	D,L, α -Glycerol Phosphate
G11	D,L-Camitine	H11	α -D-Glucose-1-Phosphate
G12	γ -Aminobutyric Acid	H12	D-Glucose-6- Phosphate

Çizelge 3.3. Gram pozitif strainler için değerlendirilen 95 karbon kaynağının mikroplate'e kodlanması

A1	Steril su	B1	L-Arabinose
A2	α -Cyclodextrin	B2	D-Arabitol
A3	β - Cyclodextrin	B3	Arbutin
A4	Dextrin	B4	D-Cellobiose
A5	Glycogen	B5	D-Fructose
A6	Inulin	B6	L-Fucose
A7	Mannan	B7	D-Galactose
A8	Twen 40	B8	D-Galacturonic Acid
A9	Twen 80	B9	Gentiobiose
A10	N-Acetyl-D-Glucosamine	B10	D-Gluconic Acid
A11	N-Acetyl- β -D-Mannosamine	B11	α -D-Glucose
A12	Amygdalin	B12	M-Inositol
C1	α -D-Lactose	D1	β -Methyl-D-Glucoside
C2	Lactulose	D2	α -Methyl-D-Mannoside
C3	Maltose	D3	Palatinose
C4	D-Maltotriose	D4	D-Psicose
C5	D-Mannitol	D5	D-Raffinose
C6	D-Mannose	D6	L-Rhamnose
C7	D-Melezitose	D7	D-Ribose
C8	D-Melibiose	D8	Salicin
C9	α -Methyl-D-Galactoside	D9	Sedoheptulosan
C10	β -Methyl-D-Galactoside	D10	D-Sorbitol
C11	3-Methyl-D-Glucose	D11	Stachyose
C12	α -Methyl-D-Glucoside	D12	Sucrose

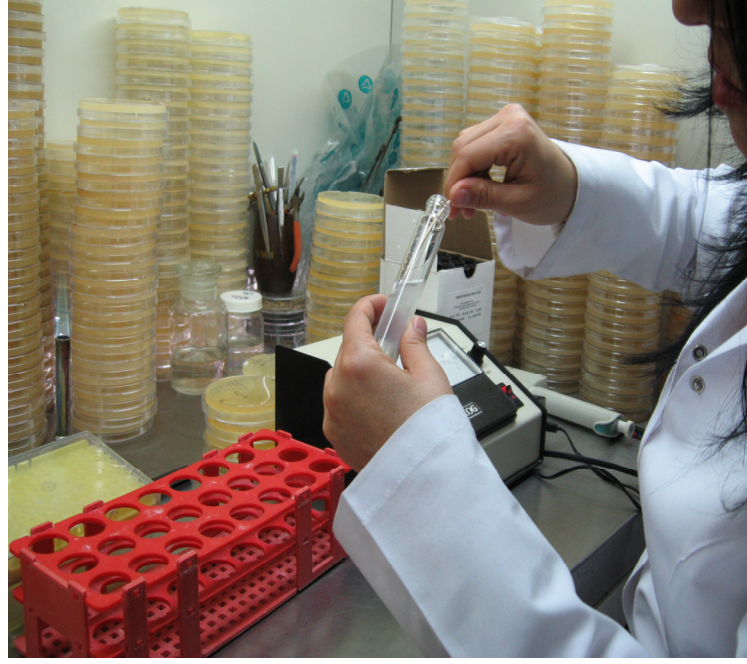
Çizelge 3.3. Devam ediyor..

E1	D-Tagatose	F1	Lactamide
E2	D-Trehalose	F2	D-Lactic Acid Methyl Ester
E3	Turanose	F3	D-Lactic Acid
E4	Xylitol	F4	D-Malic Acid
E5	D-Xylose	F5	L-Malic Acid
E6	Acetic Acid	F6	Pyruvic Acid Methyl Ester
E7	α -Hydroxybutyric Acid	F7	Succinic Acid Mono-Methyl Ester
E8	β -Hydroxybutyric Acid	F8	Propionic Acid
E9	γ -Hydroxybutyric Acid	F9	Pyruvic Acid
E10	p-Hydroxy-phenlyacetic Acid	F10	Succinamic Acid
E11	α -Ketoglutaric Acid	F11	Succinic Acid
E12	α -Ketovaleric Acid	F12	N-Acetyl-L-Glutamic Acid
G1	L-Alaninamide	H1	Adenosine
G2	D- Alanine	H2	2'-Deoxy Adenosine
G3	L-Alanine	H3	Inosine
G4	L-Alanyl-Glycine	H4	Thymidine
G5	L-Asparagine	H5	Uridine
G6	L-Glutamic Acid	H6	Adenosine-5'-Monophosphate
G7	Glycyl-L-Glutamic Acid	H7	Thymidine-5'-Monophosphate
G8	L-Pyroglutamic Acid	H8	Uridine-5'-Monophosphate
G9	L-Serine	H9	D-Fructose-6-Phosphate
G10	Putrescine	H10	α -D-Glucose-1-Phosphate
G11	2,3-Butanediol	H11	D-Glucose-1-Phosphate
G12	Glycerol	H12	D-L- α -Glycerol Phosphate

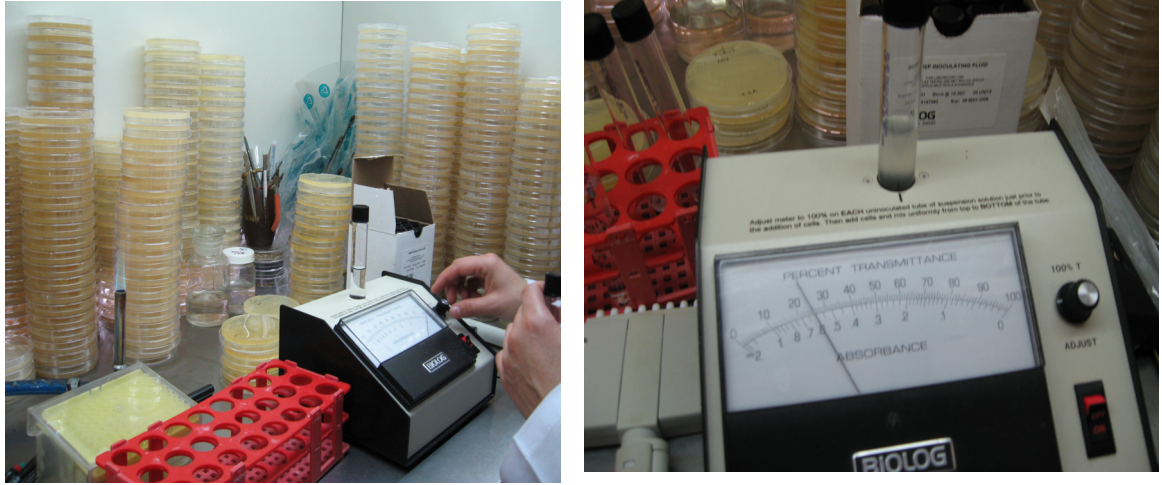
BİOLOG test protokolü

Domates bitkisinden izole edilen bakteriyel strainlerin metabolik profillerinin belirlenmesi, bu profillere göre tanılanması, tür içi ve türler arası metabolik akrabalıklarının saptanması aşağıda anlatılan protokole göre yapılmıştır.

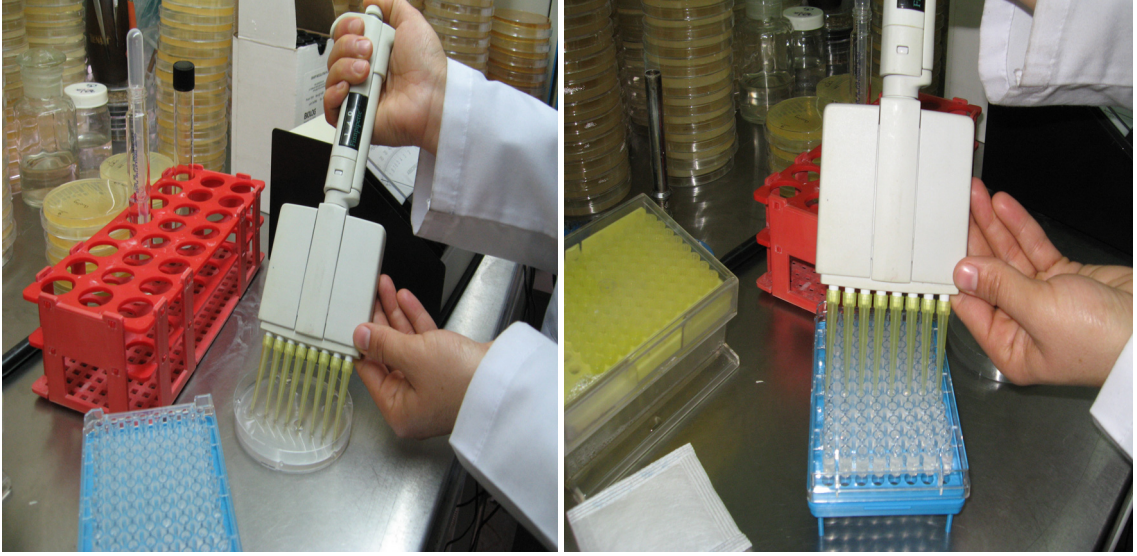
1. Gram reaksiyon özelliklerine göre mikroorganizmalar gruplara ayrılmış, gram negatif olan bakteri strainleri TSA'a, gram pozitif olanlar ise ise BUG+M besi yerine ekilmiştir.
2. 27 °C'de 16-24 sa süreyle kültür ortamında çoğaltılan canlı hücreler salina tampon çözeltisi (% 0.85'lik NaCl) içerisinde süspanse edilmiştir.
3. Standart turbidity tüpüne göre turbidimetre ile konsantrasyon ayarlaması yapılmıştır.
4. Yoğunlukları ayarlanan mikroorganizma süspanسیونlarından uygun mikroplate (Biolog 3938 Trustway, Hayward, CA 94545, USA) üzerindeki her bir çukurcuğa 150 µl eklenerek, plateler 4 saat süreyle 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyon sonrası mikroplateler üzerinde gelişen metabolik reaksiyon renklenme şeklinde gözlenmiştir. Test edilen mikroorganizmaların metabolik reaksiyon profilleri biolog kinetik (Program: Biolog MicroLog3 4.20, $\lambda_1=405$ nm $\lambda_2=750$ nm) ile okunmuştur.
6. Sistemin paket programındaki bilinen mikroorganizmaların metabolik profilleri, test edilen mikroorganizmaların profilleri ile karşılaştırılarak tanısı yapılmıştır.



Şekil 3.6. Bakterilerin salina tampon çözeltisi içerisinde süspanse edilmesi



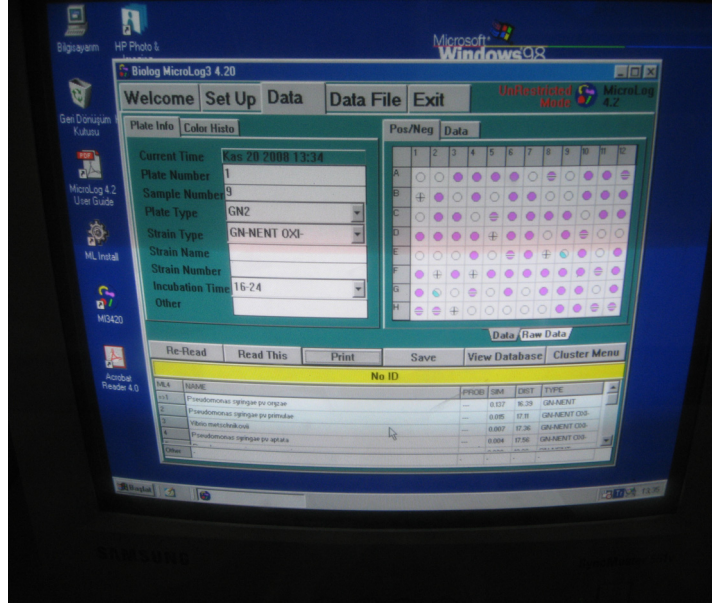
Şekil 3.7. Standart turbidity tüpüne göre turbidimetre ile konsantrasyon ayarlaması yapılması



Şekil 3.8. Yoğunlukları ayarlanan süspansiyonların uygun mikroplateler üzerindeki çukurcuklara yüklenmesi



Şekil 3.9. İnkübasyon sonrası mikroplateler üzerinde gelişen metabolik reaksiyonun renklenme şeklinde görülmesi ve mikroorganizmaların metabolik reaksiyon profillerinin okunması için sisteme yerleştirilmesi



Şekil 3.10. Sistemin paket programındaki bilinen mikroorganizmaların metabolik profillerinin test edilen mikroorganizmaların profilleri ile karşılaştırılması

3.2.5. Elde edilen bakteri strainlerinin teşhis edilmesi

2009 yaz dönemi yapılan sürvey çalışmaları sonucunda 39 ayrı bölgeden alınan hastalıklı bitkilerden elde edilen 39 adet bakteri izolatının tanılanması amacıyla çalışmanın bu kısmı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarında Prof. Dr. Hüseyin BASIM yönetiminde yürütülmüştür. – 80 °C' de derin dondurucuda muhafaza edilen 39 adet bakteri izolatu Cmm için seçici besi yeri olan GYCA besi yeri içeren petrilere 3' lü çizgi ekimi ile çizilmiştir. 25-28 °C' deki inkübatörde 2 gün bırakılan petrilere bakteri oluşumu gözlenmiştir. Bakteriler geliştikten sonra kültürlerle gram reaksiyon testleri uygulanmıştır. Gram pozitif olarak belirlenen bakterilerden öze yardımıyla çok az miktarda alınıp içerisinde 700 µl distile su bulunan ependorf tüplere konularak bakteri solüsyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlar bakterileri teşhis etmek amacıyla PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.5.1. Master mix'in hazırlanması

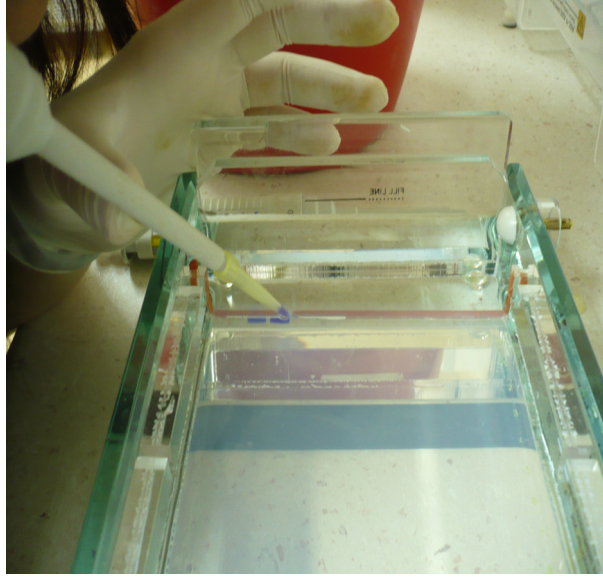
Çalışmada 13 örnek baz alınarak PCR' ı yapılacak her bir örnek için 361.4 µl dH₂O, 65 µl 10X, 39 µl MgCl₂, 104 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 13 µl Primer 1 (Cmm5), 13 µl Primer2 (Cmm6), 3.25 µl taq polimeraz ependorf tüpe konularak mix elde edilmiştir. 10 tane PCR tüpüne bir tanesi negatif kontrol olmak üzere 4' er µl bakteri solüsyonu koyulmuştur. Negatif kontrole ise 4 µl dH₂O koyulmuştur. Bakteri solüsyonları üzerine 46 µl hazırlanmış olan PCR mix eklenmiştir.

3.2.5.2. PCR programının hazırlanması

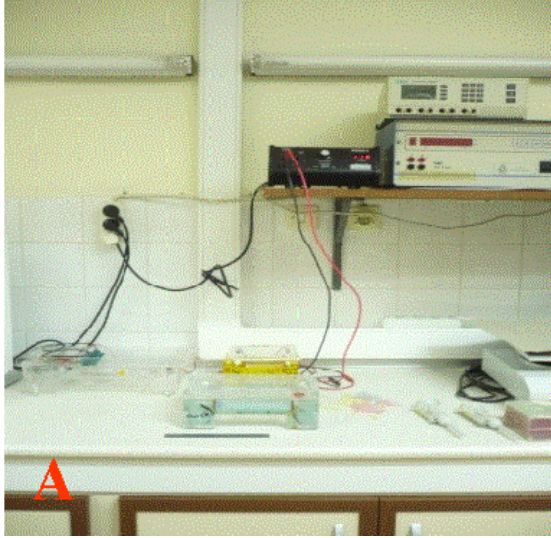
PCR termocycler cihazında 95 °C' de denetürasyon, 58 °C' de anealing, 72 °C' de extention ve 72 °C' de final programları ayarlanarak hazırlanan örnekler cihaza yerleştirilmiştir. 1,5 saat boyunca ürünler PCR cihazında bırakılmıştır.

3.2.5.3. PCR ürünlerinin Elektroforez jelde yürütülmesi

Çalışmada PCR ürünlerini görüntüleyebilmek için örnekler hazırlanan %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Yükleme yapılmadan önce PCR ürünlerine 1 µl loading die eklenmiştir. Jel donduktan sonra ilk kuyucuğa 1 kilobaz (kb)'lık PCR marker'dan yüklenmiştir. Diğer kuyucuklara ise her bir örnek için 51 µl PCR ürünü yüklenmiştir. Elektroforez jel düzeneği 120 volta ayarlanarak örnekler 1h 30 dk koşturulmuştur. Yürütme işleminden sonra jel, içerisinde etidium bromid bulunan 0.5 x TBE tamponlu bir kaba alınarak 20 dk bekletilmiştir. Jel üzerinde bulunan ve ethidium bromid ile boyanan bantlar jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir ve bilgisayar ortamında analiz edilmiştir.



Şekil 3.11. Bakteri örneklerinin PCR amplifikasyonundan sonra ilave edilen loading boyası ile birlikte hazırlanan % 1'lik agaroz jele yüklenmesi



Şekil 3.12. Gram pozitif bulunan bakteri izolatlarının PCR amplifikasyonundan sonra %1,5 lik agaroz jelde koşturulması (A); Koşturulan agaroz jelin ethidium bromid ile boyandıktan sonra jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmesi ve analizleri (B).

3.2.6. Cmm' ye karşı domates genotiplerinin reaksiyonlarının belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde Cmm' ye karşı hassas olarak bulunan domates çeşitlerinde oluşturulacak kimyasal mutasyonlarla dayanıklı mutant bitkileri belirlemek için bitkiler patojenisite testlerinden geçirilmişlerdir.

3.2.6.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Kültür domatesi bitkilerinin tohumları viyollere ekilerek 2-3 gerçek yapraklı hale gelince büyük saksılara şaşırtılmıştır. Bu bitkiler Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı serasında kontrollü atmosfer şartlarında yetiştirilmiştir.

3.2.6.2. Patojenisite testi

Patojenisite testleri hastalık etmeninin dayanıklı ve hassas domates bitkilerini ortaya koyabilmek için yapılmıştır. Bu amaçla steril şartlarda besi ortamında geliştirilen Cmm2 izolatları steril bir kürdan yardımıyla domates fidelerinin gövdelerine batırılarak inokule edilmiştir(Yıldız, 2007). Hassas domates çeşitlerinden olan EBR3 hattı seçilmiş, bu hattın kimyasal mutasyona uğratılarak dayanıklı mutantlar elde etme amacıyla çalışmalar yürütülmüştür.



Şekil 3.13. Steril şartlarda besi ortamında geliştirilen Cmm2 bakteri izolatlarının steril kürdan yardımıyla domates fidelerinin gövdelerine iliştilere inokulasyonların gerçekleştirilmesi.

3.2.6.3. EBR3 domates hattının kimyasal mutasyona uğratılması

Cmm2' ye karşı hassas olan EBR3 domates hattının mutasyona uğratılarak dayanıklı mutant tohumların elde edilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle 200 adet domates tohumu 8-10 saat boyunca ıslak kurutma kağıdına konmuştur. Daha sonra 20 ml. distile su içerisine % 0,5 EMS solüsyonu hazırlanmış ve tohumlar 12 saat boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. EMS mutajeni C/G' nin T/A' ya dönüşümüne sebep olan bir bazlık mutasyon oluşturan bir kimyasaldır. Çalkalayıcıda 12 saat karıştıktan sonra tohumlar EMS solüsyonu içerisinden alınarak çeşme suyunda 10 dk. boyunca yıkanmıştır. EMS solüsyonuna ise 150 ml. 1M NaOH ilave edilerek nötr hale getirmek amacıyla bir gün bekletilerek EMS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Çeşme suyunda yıkanan tohumlar petri içerisinde kurutma kağıdı üzerine alınarak 1-2 saat kurutulmuştur. Aynı gün içerisinde tohumlar viyollere ekilerek sera şartlarında yetiştirilmiştir. Mutant tohumların ekimden 8 gün sonra çimlendikleri gözlenmiştir. Mutasyona uğratılan 200 tohumdan tümü ekilmiş, 191 tanesi çimlenerek saksılara şaşırtılmış, geri kalan tohumlarda çimlenme olmamıştır.

3.2.6.4. M2 bitki tohumlarının eldesi ve bitkilerin Cmm2 ile inokulasyonu

Ekilen M1 bitkileri kontrollü şartlar altında büyütülerek meyvelerinden 3600 adet M2 bitki tohumu elde edilmiştir. Elde edilen M2 bitki tohumları karıştırılarak bir bulk oluşturulmuştur. Bu bulkten 500 adet mutant domates tohumu Biyoteknoloji serasında viyollere ekilmiştir. Ekilen tohumlardan çimlenen 400 adet bitki büyük saksılara şaşırtılmıştır. Saksılara şaşırtılan 400 fideden 100 tanesi kontrol olarak ayrılmış, 300 fideye steril kürdan yardımıyla Cmm2 inokule edilmiştir. İnokulasyonun başarısı için kürdan ile inokule edilen bitkilere inokulasyondan 10 gün sonra gövdenin köke yakın kısımlarından her bitkiye 5 ml. olmak üzere enjektör ile bakteri solüsyon uygulaması yapılmıştır.

4. BULGULAR

Proje çalışmasının ilk aşamasını oluşturan arazi sürveysleri projenin başlangıcında tek yıllık yapılması düşünülmüş olup sonradan sonuçların güvenilirliği için 2 yıllık yaz dönemi süresi boyunca yapılmasına karar verilmiştir. Sürveysler sonucunda hastalıklı bitkilerden elde edilen bakteri izolatlarından ilk yıl alınanların tanınması biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle yapılırken ikinci yıl hastalıklı bitkilerden alınan örneklerden elde edilen izolatların tanınması ise gram reaksiyon testi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle yapılmıştır.

4.1. Hastalıklı bitki örneklerinin araziden toplanması

Projenin ilk yılı olan 2008 yılı yaz döneminde Tokat ili domates ekim alanı en fazla olan Kazova, Niksar ve Erbaa ovalarında gerek sırtık gerekse yer domatesi üretimi yapılan tarlalardan solgunluk belirtisi görülen hastalıklı bitki örnekleri alınmıştır. Hastalık belirtisi gösteren bitki örneklerinin alındığı yerler, elde edilen bakterilerin suş kodları, arazi alanları ve hastalık oranları Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Projenin 2008 yılında sürvey çalışmaları yapılan domates ekim alanları. Hastalık belirtisi gösteren domates arazilerinde hesaplanan hastalık oranları ve izole edilen bakteriler.

Sıra no	Suş kodu	Yer	Alan (Dekar)	Hastalık oranı (%)
1	SS-1	Erbaa/Aşağıçandır	12	%30
2	SS-2	Çerçi	5	%20
3	SS-3	Güryıldız	10	%10
4	SS-4	Güryıldız	15	%16
5	SS-5	Güryıldız	10	%10
6	SS-6	Güryıldız	8	%10
7	SS-7	Pazar/ Beyovası	4	%10
8	SS-8	Erbaa/Aşağıçandır	5	%30
9	SS-9	Erbaa/Aşağıçandır	5	%20
10	SS-10	Pazar/ Dereçayaltı	2	%80
11	SS-11	Pazar/ Dereçayaltı	5	%40
12	SS-12	Niksar	5	%20
13	SS-13	Güryıldız	5	%20
14	SS-14	Niksar /Muradiye	5	%30
15	SS-15	Niksar /Muradiye	6	%20
16	SS-16	Kat Kasabası	8	%20
17	SS-17	Kat Kasabası/ Doğanlı Çiftliği	15	%20
18	SS-18	Dökmetepe/Kantaryanı	50	%10
19	SS-19	Erbaa/ Ereğ	10	%20
20	SS-20	Erbaa/ Ereğ	15	%20
21	SS-21	Erbaa/Yukarıçandır	10	%70
22	SS-22	Kat Kasabası	8	%20

Çizelge 4.1. Devam ediyor...

Sıra no	Suş kodu	Yer	Alan (Dekar)	Hastalık oranı (%)
23	SS-23	Kat Kasabası	12	%30
24	SS-24	Pazar/Beyovası	8	%10
25	SS-25	Niksar	6	%20
26	SS-26	Erbaa/Akça	6	%30
27	SS-27	Erbaa /Erek	1	%20
28	SS-28	Erbaa /Erek	4	%10
29	SS-29	Güryıldız	4	%10
30	SS-30	Çerçi	3,5	%10
31	SS-31	Pazar	15	%4
32	SS-32	Uzunören	8	%10
33	SS-33	Erbaa /Erek	10	%20
34	SS-34	Erbaa/Ortayollar	5	%5
35	SS-35	Erbaa/Ortayollar	7	%20
36	SS-36	Erbaa/Ortayollar	8	%5
37	SS-37	Büyükıldız	10	%12
38	SS-38	Büyükbağlar	6	%20
39	SS-39	Büyükıldız	8	%10
40	SS-40	Kat Kasabası	8	%20
41	SS-41	Erbaa/Aşağıçandır	4,5	%20
42	SS-42	Erbaa/Çevresu	10	%1
43	SS-43	Niksar /Muradiye	4	%20
44	SS-44	Erbaa/Aşağıçandır	5	%30

Çizelge 4.1. de verilen 44 ayrı araziden alınan domates örneklerinde solgunluk belirtisi gösteren domates bitkilerinin olduğu bir sırada bulunan 50 bitki arasından hastalıklı domates bitkileri sayılarak bitkilerin hastalık oranları hesaplanmıştır. Bitkilerde ön gözlemler ile bulunan hastalık oranları %1 ile %70 arasında değiştiği ortaya konmuştur. Laboratuara getirilen hastalıklı bitki örneklerinin iletim demetlerinden hastalıklı ve sağlıklı kısmı içeren bitki parçaları alınarak 44 adet bakteri izolatu elde edilmiştir.

4.2. Tanılamada kullanılan biyokimyasal test sonuçları

2008 yılı yapılan sürvey çalışmaları sonucunda elde edilen bakteri izolatlarının tanılanması amacıyla yapılan biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.2. de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kullanılan bakterilerin suş kodları ve biyokimyasal test sonuçları

Suş kodu	GRT	KT	OT	AT	LT
SS-1	G(+)	K(+) (kuvvetli)	O(+) (çok zayıf)	A(+)	L(+) (zayıf)
SS-2	G(+)	K(+)	O(-)	A(+)	L(-)
SS-3	G(+)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-4	G(+)	K(+)	O(+)	A(-)	L(-)
SS-5	G(-)	K(+)	O(+)	A(-)	L(-)
SS-6	G(+)	K(+) (kuvvetli)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-7	G(-)	K(+)	O(+) (zayıf)	A(-)	L(-)
SS-8	G(+)	K(+) (kuvvetli)	O(-)	A(+)	L(-)
SS-9	G(+)	K(+) (kuvvetli)	O(-)	A(+)	L(-)
SS-10	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(+)	A(+)	L(-)
SS-11	G(-)	K(+)	O(+)	A(-)	L(+)
SS-12	G(+)	K(+)	O(+) (çok zayıf)	A(-)	L(-)
SS-13	G(+)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)
SS-14	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)
SS-15	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)
SS-16	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(-)	A(+)	L(+) (zayıf)
SS-17	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(+) (zayıf)	A(-)	L(-)
SS-18	G(+)	K(+) (kuvvetli)	O(+) (çok zayıf)	A(-)	L(+)
SS-19	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-20	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-21	G(+)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-22	G(-)	K(+)	O(+)	A(-)	L(-)
SS-23	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-24	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(-)	A(+) (kuvvetli)	L(+) (zayıf)
SS-25	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(-)	A(+)	L(+) (zayıf)
SS-26	G(+)	K(+)	O(-)	A(+)	L(-)
SS-27	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(+) (zayıf)	A(-)	L(-)
SS-28	G(-)	K(+)	O(+)	A(-)	L(-)

Çizelge 4.2. Devam ediyor..

Suş kodu	GRT	KT	OT	AT	LT
SS-29	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(+) (zayıf)	A(-)	L(-)
SS-30	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(+)	A(-)	L(-)
SS-31	G(+)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-32	G(-)	K(+)	O(+) (zayıf)	A(-)	L(-)
SS-33	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(+)	A(-)	L(-)
SS-34	G(-)	K(+) (kuvvetli)	O(+)	A(-)	L(-)
SS-35	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)
SS-36	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)
SS-37	G(-)	K(+)	O(+)	A(-)	L(-)
SS-38	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-39	G(-)	K(+)	O(+)	A(-)	L(-)
SS-40	G(+)	K(+) (kuvvetli)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-41	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)
SS-42	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)
SS-43	G(+)	K(+) (kuvvetli)	O(+) (çok zayıf)	A(-)	L(-)
SS-44	G(+)	K(+)	O(-)	A(+) (zayıf)	L(+)

Çizelge 4.2 incelendiğinde Gram Reaksiyon testlerinde (GRT) 16 adet bakteri izolatu gram pozitif (G+) sonuç verirken diğer 28 adet bakteri izolatu gram negatif (G-) olarak bulunmuştur. Gram reaksiyon testleri biyokimyasal testler içerisinde ucuz ve hızlı olarak gerçekleştirildiği için önemli bir ilk aşamadır. Cmm G(+) bir bakteridir. Katalaz testi (KT) sonuçlarında ise 44 adet bakteri izolatının tümü katalaz pozitif (K+) olarak belirlenmiştir. SS-1, SS-6, SS-8, SS-9, SS-10, SS-16, SS-17, SS-18, SS-23, SS-24, SS-25, SS-27, SS-29, SS-30, SS-33, SS-34, SS-40, SS-43 suş kodlu bakteri izolatları kuvvetli pozitif olarak bulunmuştur. Cmm K(+) bir bakteridir. Oksidaz testi (OT) sonuçlarına bakıldığında 44 adet bakterinin 11 adedi oksidaz pozitif (O+) olarak bulunurken 9 adet bakteri izolatu çok zayıf/zayıf oksidaz pozitif sonuç vermiştir. Geriye kalan 24 bakteri izolatında herhangi bir oksidaz aktivite tespit edilmemiştir. İzole edilen 44 bakterinin %54.5' nin oksidaz aktiviteye sahip olmadığı bulunurken %45.5'nin farklı

seviyelerde oksidaz aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Cmm O(-) bir bakteridir. Bakterilerde amilaz enziminin var olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan Amilaz testi (AT) sonuçlarında 44 adet bakteri izolatu arasında 10 adet izolat Amilaz pozitif (A+), 34 adet izolat ise Amilaz negatif (A-) olarak bulunmuştur. Cmm A(-) bir bakteridir. Levan sucrase enziminin sukrozu kullanması sonucu bakterilerde oluşan mukoidliği belirlemek amacıyla yapılan Levan testi (LT) sonuçlarında ise 44 adet bakteriden 9 adeti levan sucrase enziminin zengin iken (L+), 4 bakteri levan sucrase enzimine daha az sahiptir. Test edilen diğer 31 bakteri izolatu (L-) levan sucrase enzimine sahip olmadığı için sukrozu kullanamamakta ve mukoid bir yapı oluşturmamaktadır. Levan testi için bakteriler NSA ortamına ekilmiş olup %70.4'ü ortamdaki sukrozu kullanamazken diğer %29.6' sını besi ortamındaki sukrozu kullanabilmektedir. Cmm L(+) bir bakteridir.

4.3. Tanılamada kullanılan moleküler test sonuçları

4.3.1. BIOLOG testi sonuçları

İzole edilen 44 adet bakteri strainlerinin biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde Cmm' in özelliklerine yakın olan 7 adet bakteri izolatu biyolog testine tabi tutulmuştur. Çizelge 4.3 de 44 adet bakteri arasında seçilen izolatların hem biyokimyasal hemde biyolog testleri sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.3. Seçilen bakteri izolatlarının biyokimyasal ve biyolog test sonuçları

Suş kodları	Gram reaksiyon	Katalaz testi	Oksidaz testi	Amilaz testi	Levan testi	Biyolog testi		
						Prob	Sim	Benzerlik gösteren bakteri
SS-41	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)	100	0.69	<i>Pantoea agglomerans</i>
SS-35	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)	99	0.50	<i>Pantoea agglomerans</i>
SS-15	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)	100	0.56	<i>Serratia odorifera</i>
SS-31	G(+)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)	100	0.55	<i>Curtobacterium pusillum</i>
SS-26	G(+)	K(+)	O(-)	A(+)	L(-)	---	0.16	<i>Microbacterium saperdae</i>
SS-42	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(-)	83	0.63	<i>Burkholderia glumae</i>
SS-14	G(-)	K(+)	O(-)	A(-)	L(+)	100	0.52	<i>Pantoea agglomerans</i>

Çizelge 4.3 incelendiğinde 44 izolat arasından seçilen Cmm' in biyokimyasal özelliklerine yakın olan bakteri izolatlarının metabolik profilleri ile sistemin paket programındaki bilinen mikroorganizmaların metabolik profilleri karşılaştırıldığında teste tabi tutulan bakterilerin Cmm' e benzerlik göstermediği belirlenmiştir.

4.4. İkinci yıl sürvey sonuçları

Yapılan ilk yıl sürvey sonuçlarında elde edilen bakteri izolatlarının tanılanması amacı ile yapılan testler sonucunda Cmm' nin elde edilememesi ile 2009 yılı yaz döneminde de sürvey çalışmaları yapılmıştır. Solgunluk belirtisi görülen bitki örneklerinin alındığı yerler, elde edilen bakterilerin suş kodları, arazi alanları ve hastalık oranları çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelgede gösterilen hastalık oranları hesaplanırken bir önceki yılda yapılan çalışmalarda olduğu gibi solgunluk belirtisi gösteren domates bitkilerinin olduğu arazilerde bir sırada bulunan 50 bitki arasından hastalıklı olanlar sayılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Projenin 2008 yılında sürvey çalışmaları yapılan domates ekim alanları. Hastalık belirtisi gösteren domates arazilerinde hesaplanan hastalık oranları ve izole edilen bakteriler.

Sıra no	Suş kodu	Yer	Alan (dönüm)	Hastalık oranı (%)
1	SS-1	Güryıldız	10	% 5
2	SS-2	Güryıldız	10	%10
3	SS-3	Güryıldız	15	%10
4	SS-4	Kat Kasabası	8	%15
5	SS-5	Erbaa/Değirmenli	3,5	%20
6	SS-6	Kat Kasabası	3	% 5
7	SS-7	Erbaa/Aşağıçandır	3	% 5
8	SS-8	Niksar/Yolkonak	2	% 5
9	SS-9	Küçükbağlar	10	%10
10	SS-10	Emirsehit	5	%100
11	SS-11	Güryıldız	8	%40
12	SS-12	Erbaa/Çevresu	8	%60
13	SS-13	Erbaa/Değirmenli	2	%40
14	SS-14	Erbaa/Değirmenli	5	%30
15	SS-15	Erbaa/Değirmenli	10	%2
16	SS-16	Erbaa/Değirmenli	4	%40
17	SS-17	Erbaa/Değirmenli	5	%2
18	SS-19	Erbaa/Değirmenli	5	%80
19	SS-20	Pazar/Küçükbağlar	4,5	%20
20	SS-21	Pazar/Küçükbağlar	1,5	%2
21	SS-22	Pazar/Küçükbağlar	2,5	%40
22	SS-23	Pazar/Küçükbağlar	2,5	%10
23	SS-24	Çerçi	15	%20
24	SS-25	Pazar/Büyükbağlar	4	%10
25	SS-26	Pazar/Büyükbağlar	8	%2

Çizelge 4.4. Devam ediyor..

Sıra no	Suş kodu	Yer	Alan (dönüm)	Hastalık oranı (%)
25	SS-26	Pazar/Büyükbağlar	8	%2
26	SS-27	Pazar/Erkilet	3	%10
27	SS-28	Pazar/Erkilet	2	%60
28	SS-29	Dökmetepe	6	%20
29	SS-30	Pazar/Küçükbağlar	4	%2
30	SS-31	Pazar/Erkilet	10	%60
31	SS-32	Erbaa/Değirmenli	5	%100
32	SS-33	Niksar/Şahinli	2	%100
33	SS-34	Niksar/Şahinli	2,5	%100
34	SS-35	Erbaa/Değirmenli	2	%100
35	SS-36	Niksar/Şahinli	2	%100
36	SS-37	Niksar/Şahinli	5	%80
37	SS-38	Niksar/Şahinli	3,5	%60
38	SS-39	Niksar/Yolkonak	5	%100
39	SS-40	Niksar/Şahinli	2	%100

Laboratuara getirilen hastalıklı bitki örneklerinin iletim demetlerinden hastalıklı ve sağlıklı kısmı içeren bitki parçaları alınarak 39 adet bakteri izolatu elde edilmiştir.

Örneklere izole edilen 39 adet bakteri izolatu Cmm için seçici besi ortamı olan GYCA besi yeri içeren petrilere üçlü çizgi ekimi yapıldıktan sonra 25-28⁰C'deki inkübatörde 2 gün gelişmeye bırakılmış ve bakteri kolonileri gözlenmiştir.

4.4.1. Elde edilen bakteri strainlerinin teşhis edilmesi

Bakteri strainlerinin hücre duvarlarındaki farklılığı belirlemek amacıyla yapılan gram reaksiyon test sonuçlarına göre izole edilen bakterilerin %23'ü gram pozitif bakteri çıkmış geri kalan gram negatif bakterilerin oranı ise %77 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Kullanılan bakterilerin suş kodları ve gram reaksiyon testi sonuçları

Sıra No	Suş Kodu	Test Sonucu
1	SS-1	G(-)
2	SS-2	G(-)
3	SS-3	G(-)
4	SS-4	G(-)
5	SS-5	G(-)
6	SS-6	G(-)
7	SS-7	G(-)
8	SS-8	G(-)
9	SS-9	G(+)
10	SS-10	G(+)
11	SS-11	G(-)
12	SS-12	G(-)
13	SS-13	G(+)
14	SS-14	G(+)
15	SS-15	G(+)
16	SS-16	G(+)
17	SS-17	G(+)
18	SS-19	G(-)
19	SS-20	G(-)
20	SS-21	G(-)
21	SS-22	G(-)
22	SS-23	G(-)
23	SS-24	G(-)
24	SS-25	G(-)
25	SS-26	G(-)
25	SS-27	G(+)
27	SS-28	G(-)
28	SS-29	G(-)
29	SS-30	G(-)
30	SS-31	G(-)
31	SS-32	G(-)
32	SS-33	G(-)
33	SS-34	G(-)
34	SS-35	G(-)
35	SS-36	G(+)
36	SS-37	G(-)
37	SS-38	G(-)
38	SS-39	G(-)
39	SS-40	G(-)

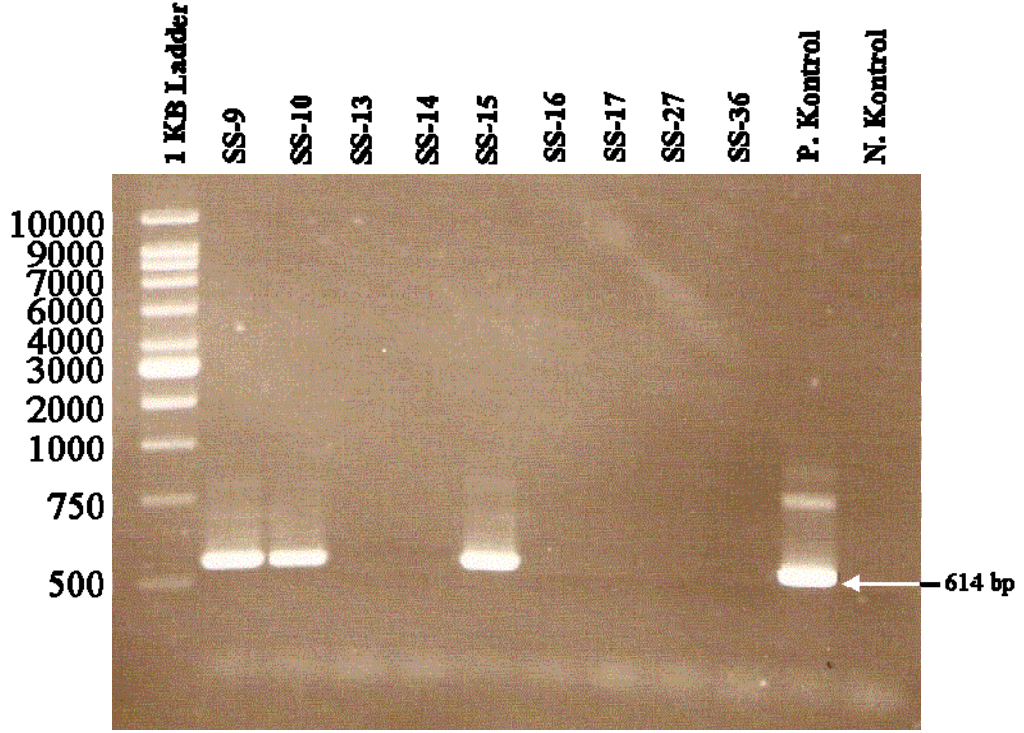
Çizelge 4.5 de görüldüğü gibi yapılan gram reaksiyon testi sonucunda SS-9, SS-10, SS-13, SS-14, SS-15, SS-16, SS-17, SS-27, SS-36 suş kodlu izolatlar gram pozitif (G+) reaksiyon vermiştir. Bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni Cmm gram pozitif bir

bakteri olduğundan izole edilen bakterilerden sadece pozitif olarak sonuç verenler PCR analizlerinde kullanılmıştır.

4.4.2. PCR analiz sonuçları

PCR amplifikasyonunda CMM5 ve CMM6 primer kombinasyonu (Bakınız Materyal ve Metot) ile çoğaltılan sadece Cmm'ye spesifik olan 614 bp büyüklüğündeki bantlar SS-9, SS-10 ve SS-15 bakteri izolatlarında ve pozitif kontrolde bulunmuştur (Şekil 4.1). Diğer 6 bakteri izolatu ve negatif kontrolde herhangi bir bant oluşumu bulunmamıştır (Şekil 4.1). Cmm' e spesifik olan PCR analizleri sonucunda 2009 yılında izole edilen 39 bakteri içerisinde 3 bakteri izolatının Cmm olarak bulunması survey çalışmalarının yürütüldüğü domates üretimi yapılan alanlarda Cmm etmenine ~%1.65 oranında rastlandığını ortaya koymaktadır.

PCR yöntemi ile daha hassas ve hızlı olarak Tokat domates üretim alanlarından izole edilen bakterilerin teşhisi yapılmıştır. PCR yöntemi bir kaç saat içerisinde sonuca ulaşmayı sağlarken maliyeti biyokimyasal testlere göre daha fazladır.



Şekil.4.1. PCR da spesifik Cmm primeri ile amplifike edilen ürünlerin %1,5 lik elektroforezde görüntülenmesi. Örneklerden SS-9, SS-10 ve SS-15 izolatları tıpkı pozitif kontrol Cmm bakterisinde olduğu gibi spesifik primerler ile 614 bp ürün oluşturmuştur. 1 Kb ladder: moleküler marker; SS-9 ile SS-36 izole edilen gram pozitif örnekler; P. Kontrol: Gram pozitif Cmm bakterisi; N. Kontrol: Distile su.

4. 5. Cmm2' ye karşı domates genotiplerinin reaksiyonları

Çalışmanın son bölümünde Cmm2 virulent bakterisine karşı dayanıklı domates genotiplerini ortaya koyabilmek için homozigot olan 7 kültür domates hattı hastalık etmeni ile patojenisite teslerine tabi tutulmuştur. Test edilen tüm hatlar Cmm2 ye karşı hassas bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Virulent Cmm2 ile patojenisite testlerinden geçirilen 7 homozigot domates hattının fenotipik reaksiyonları. Aynı sayıda domates hattı kontrol olarak kullanılmış kontrollerde sadece steril distile su ile inokulasyon yapılmıştır.

HAT	FENOTİPİK REAKSİYONLAR			Kontrol
	Hassas	Az hassas	Dayanıklı	
EBR1	10	-	-	10
EBR2	10	-	-	10
EBR3	10	-	-	10
EBR4	10	-	-	10
EBR5	10	-	-	10
EBR6	10	-	-	10
NC84173	10	-	-	10

Hassas kültür domateslerinden agronomik özellikleri iyi olduğu için seçilen EBR3 hattında EMS mutasyonu oluşturulmuştur. Homozigot EBR3 hattında mutasyon oluşturulduktan sonra M1 bitkileri kendilemeye bırakılmış ve oluşturulan M2 popülasyonundaki 300 domates bitkisi patojenisite testlerinden geçirilmiştir. Patojenisite testleri 25 adet M2 mutant domates bitkisinin hastalıktan etkilenmediğini ortaya koymuştur. İnokulasyondan sonraki 2 hafta içerisinde bitkilerde solgunluk belirtileri gözlenmiştir. Hastalığın hassas bitkilerde ilerleyen dönemlerdeki gelişimi bitkilerden gövde boyunca lezyon uzunluğu ölçülerek bulunmuştur. Çalışmada dayanıklı domates genotipleri bulmak esas olduğu için domateslerde görülen dayanıklılık ve hassaslık bir skala derecelendirmesine tabii tutulmamış olup hassas ve dayanıklı fenotipler karşılaştırılarak, inokulasyondan sonra hastalık belirtisi göstermeyen sağlıklı bitkiler ümitvar dayanıklı olarak kabul edilmiştir. Bu ümitvar dayanıklı bitkiler normal gelişimlerini sürdürerek tohum oluşturmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakteriyel Kanser ve Solgunluk etmeni olan Cmm gerek açık alanda gerek örtü altında yapılan domates yetiştiriciliğinde önemli oranlarda verim kaybına neden olmaktadır. Bu hastalığın ilk inokulum kaynağının tohum kabuğu yada embriyo olması nedeniyle mücadele olarak tohumdaki patojeni elemine etmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Özaktan ve Bora, 1991). Ancak tohum uygulamaları da hastalığı önlemede yeterli olmamaktadır. Bu hastalığın bitkiye verdiği zararları önlemek için kimyasallar kullanılmış olsa bile bitkide oluşturacağı zarar tamamen önlenemez. Aynı zamanda kimyasal kullanımı ürün maliyetini artırmakta ve de çevreye ve diğer canlılara zarar verebilmektedir.

Dünyanın çeşitli ülkelerinde birçok bitki patojenine karşı olduğu gibi Cmm' e karşı da dayanıklı çeşitler hakkında çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bu hastalığa karşı tam dayanıklı bir domates çeşidi saptanamamıştır. Yapılan çalışmalarda Cmm'ye dayanıklılığın kaynağı daha çok yabani domates çeşitlerinde bulunmuştur. Thyr ve Berry (1989) en yüksek dayanıklılık seviyesinin *Lycopersicum pimpinellifolium* ve *L. hirsutum*' da bulunduğunu belirtmişlerdir. Ancak bu türler de hastalığa karşı tam dayanıklılık göstermemektedir.

Tokat ilinde domates üretimi yapılan alanlarda Bakteriyel Kanser ve Solgunluk hastalık etmeni 2009 yılı çalışmaları sonucunda yaklaşık %1.65 oranında bulunmuştur. Özellikle son yıllarda Türkiye'de iç karantina tedbirlerinin uygulanmasındaki yetersizlik başta *Clavibacter* gibi bakteriler olmak üzere bakteriyel ve viral hastalıkların Antalya, Adana ve Mersin gibi ticari domates tohumu ve fideciliğinin yaygın olduğu alanlardan bölgemize girişine neden olmaktadır. Özellikle çok miktarda tohum ve fidenin belirtilen illerden getirilerek Tokat domates üretim alanlarında kullanılması bakteriyel ve viral hastalıkların yayılmasının önünü açmıştır. Bu yüzden hem üretim alanlarındaki hava sıcaklıklarındaki artışlar hemde üreticilerin dışarıdan getirttikleri hazır tohum ve fidelerden kaynaklanan domates hastalıklarında bir artış görülmektedir. Belki çalışmanın ilk yılı olan 2008 de Bakteriyel Kanser ve Solgunluk hastalığının bulunamaması, 2009 yılı sürveylerinde %1.65'lik oranda rastlanması bu yukarıdaki hipotezi doğrulayan sonuç olarak görülebilir. Sürvey çalışmalarına 2010 yılında devam

edilebilseydi domatesten alınan bu yıl örneklerinde çok büyük oranda bakteriyel kanser bulaşıklığı görülebilecekti. Yapılan sürvey çalışmaları sonucunda hastalıkların bulaşma nedenlerinin iklim şartlarının hastalıklara uygun olmasının yanında bilinçsiz ve yetersiz kültürel işlemlerin de etkili olduğu gözlemlenmiştir. Tokat domates üretim alanlarında üreticilerin yanlış uygulamalar yapmaları, münavebe uygulamadan hastalığın bulunduğu araziye ertesi yıl yeniden domates ekimi yapmaları, drenaj kanallarındaki suyu sulama suyu olarak kullanmaları özellikle toprak kökenli hastalıkların arazilerde her yıl daha fazla oranlarda görülmesinin sebepleri arasında olduğu tahmin edilmektedir.

Tarımsal verimin artırılmasında önemli olan etkenlerden birisi hastalıklara karşı dayanıklı bitkilerin kullanılmasıdır. Bu amaçla yapılacak olan çalışmalarda değişik ıslah yöntemleriyle genetik yapıları farklı yeni genotiplerin elde edilmesi amaçlanmıştır (Ünver, 1989). Yeni çeşitlerin elde edilmesi amacıyla yapılacak ıslah çalışmalarında ya doğada bulunan ya da yapay olarak ortaya çıkarılacak genetik varyasyonlardan yararlanılmaktadır. Son çeyrek yüzyılda uygulamaya konulan ve ıslahçıların uygulamaya başladıkları mutasyon ıslahı doğrudan veya melezleme ıslahının tamamlayıcısı olarak büyük bir önem kazanmıştır (Akbaş, 1988). Mutasyon ıslahında temel ilke bitkilerin genetik yapılarına farklı yöntemlerle değişik mutagenlerin farklı dozlarda uygulanarak olumlu veya olumsuz genetik varyasyonlarının ortaya çıkarılmasıdır. Böylece elde edilen yeni çeşitlerin ekonomik amaçla üretime alınması ya da mutantların melezleme ıslahında ebeveyn olarak kullanılması ıslahçının ulaşmak istediği sonuçtur (Ünver 1989).

Bu amaçla yapılan çalışmanın bir bölümü Cmm2'ye karşı hassas olan domates hattında dayanıklılık elde etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla patojenisite testleri sonucunda oldukça hassas olduğu belirlenen fakat agronomik özellikleri iyi EBR3 hattı kimyasal mutasyona uğratılmıştır. Mutasyon sonucunda M2 populasyonunu oluşturan bitkilerden 500 adeti patojenisite testlerinden geçirilmiştir. Viyollere ekilen 500 adet M2 tohumdan 100 adedi çimlenmemiştir. Bu sonuç bize tohumlarda yapılan mutasyonun başarısını göstermektedir. Çünkü kimyasal mutagenler uygulandıkları bitkilerin genetik yapılarında letal değişimler yanında fizyolojik ve metabolik bozukluklara neden olabilmektedir. Patojenisite teslerinden geçirilen M2 mutant

domates bitkilerinden 25 adeti bakteriyel kanser hastalığından etkilenmeyip M3 popülasyonu oluşturmuştur. Bu 25 adet ümitvar dayanıklı domates bitkisinin oluşturduğu tohumlar ileride yapılacak çalışmalar için son derece önem arz etmektedir.

Projenin ikinci aşamasında izole edilen bakteri izolatlarının PCR yöntemiyle *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak açıkça bulunması Tokat ili domates üretim alanlarında bu hastalığın varlığını kesinlikle ortaya koymuş, izole edilen örneklerdeki belirtilerin *Ralstonia solanacearum* bakterisi (bakteriyel solgunluk hastalık etmeni) gibi diğer bakterilere benzemesi nedeniyle izole edilen bakterilerde daha detaylı moleküler çalışmalar yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, V.K., Sinclair, J.B., 1997. Principles of seed pathology, 2.ed. Boca Raton: CRC, 1997. 538p
- Agrios, M. G., 1997. Plant Pathology. Academic Press, Inc., p635.
- Akat, S., 2008. Domates Bakteriyel Leke Veya Kanser (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) Hastalığı'na Karşı Biyolojik Mücadele Yöntemleri (Yüksek Lisans tezi),Ege Üniv. Zir. Fak., İzmir.
- Akbay, g., 1988. Farklı EMS Dozlarının Uygulandığı Tokak 157/37 (*Hordeum vulgare* L.) İki Sıralı Arpa Çeşidi Tohumlarının Farklı Ortam Ve Farklı Sürelerle Bekletilmesinin M1 Bitkilerinin Bazı Özellikleri Üzerine Etkileri. A.Ü.Zir. Fak. Yayınları Bilimsel Araştırmalar Ve İncelemeler No:1, 573s.
- Anonim,2007. <http://www.fao.org.tr>
- Anwar A., Van Der Zouwen, P. S., Ilyas, S., and Van Der Wlof, J. M., 2004. Bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) of tomato in commercial seed production in Indonesia. Plant Diseases, No:88,680-684p.
- Arı, Ş.,1999. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniv., Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEN).Yayın No: 1, 57-68s.
- Bach, H. J., Jessen, I., Schloter, M. And Munch J. C., 2003. A Taqman-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. Journal of Microbiological Methods No:52, 85-91s.
- Basım, E., 2002. Isparta Ve Çevresindeki Sera Domateslerinde Görülen Bakteriyel Patojenlerin Belirlenmesi. S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi No:6,1-8s.
- Basım, E., Basım, H., Dıkkstein E. R. and Jones J. B., 2004. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* on greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean Region of Turkey. Plant Disease No: 88,1048s.
- Basım, E., Basım, H., Özcan, M., 2005. Antibacterial activities of turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of Food Engineering No: 77, 992–996p.
- Baysal, Ö., Soylu E. M., and Soylu S., 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-s-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Plant Pathology. No:52, 747- 753s.
- Bernards, A. T., Dijkshoorn L., Van Der Toorn J., Bochner B. R. and Van Boven C. P. A., 1995. Phenotypic characterization of Acinetobacter strains of 13 DNA-DNA hybridization groups by means of the biolog system. J. Med. Microbiol., No:42, 113-119p.

- Black, S. and Sweetmore A., 1994. Appropriate bacterial identification systems for small plant-pathology laboratories overseas incorporating the biyolog method. *Plant Pathology*. No: 43 (3), 438-441p.
- Black, R., Seal, S., Abubakar, Z., Nono-Womdim, R., And Swai, I., 1999. Wilt pathogens of solanaceae in Tanzania: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Diseases* No: 83,1070p.
- Bremer, H.G., Karel, K., Bıyıkoğlu, N., Göksele, F. P., 1952. Türkiye' Nin Parazit Mantarları Üzerinde İncelemeler (*Schizomycetes*, *Oomycetes*, *Ascomycetes* 2). İ.Ü Fen Fakültesi Dergisi No:17,145 -160s, İstanbul.
- Burokiene, D., 2006. Early detecion of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Agronomy Research* No:4,151-154s.
- Ciccarone, A. and A. Carili., 1948. Osservation di Camposu *Cornebacterium michiganense* (Smith) Jensen e considerazioni su unposibble caso di sua sopravvivenza nel terreno. *Bolletino della Stazione di Patologia Vegetale* No: 6, 177 -179p.
- Coaker, Gitta L., (2004). Proteomic Analysis of Resistance Mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, Two Loci Controlling Resistance to Bacterial Canker of Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(9)
- Çınar, Ö., 1980. Bakteriyel Domates solgunluğu hastalığı (*Corynebacterium michiganense* (Erwin. F. Smith) Jensen)' nın tanımı, savaş yöntemleri ve etmene karşı dayanıklı domates çeşitleri üzerine araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Bilimsel Araştırma ve İnceleme Tezleri. 139s, Adana.
- Dick, J.A., 1981. Epidemiology of Bacterial Cancer Tomato Resistant of Common Cultivars and Biocantrol of Seed- borne Inoculum. M. Sc. Thesis. University of Guelph, 61 pp.
- Doğanay, H., 1992, Türkiye Ekonomik Coğrafyası I, Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 737, s284. Erzurum
- Döken, M. T., Demirci E. ve Zengin H., 2000. Fitopatoloji. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 729, Ziraat Fakültesi yayınları No: 314, Ders Kitapları serisi No: 66, s256.
- Dönmez, M.F., 2004. Erzurum Ve Erzincan İllerinde Fasulye(*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinde Görülen Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Tanılanması Ve Bu Etmenlere Karşı Çeşitli Fasulye Genotiplerinin Duyarlılıklarının Belirlenmesi (Doktora tezi), Atatürk Üniv. Zir. Fak., Erzurum
- Erkan, S., 1998. Tohum Patolojisi. Gözdem Ofis. 275 s.
- Fahy, P.C. and Persley G.J., 1983. *Plant Bacterial Diseases, A. Diagnoslic Guide*. Academic Pres, New York 393s.

- Fang, C., Radosevich M. and Fuhrmann J. J., 2001. Characterization of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using fame and biyolog analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol:33, Issues:4-5, 679-682.
- FAO, 2008. Tomato production and area. Food and Agriculture Organization of The United Nations. <http://www.fao.org.tr>
- Fatmı, M., And Schaad N. W., 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology* No: 78, 121-126p.
- Garland, J. L. and Mills A. L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of commity-level sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (8), 2351-2359
- Garland, J. L., 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential carbon source utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol:28, No:2, 213-221.
- Geylani, E., Saygılı, H., Aysan, Y., Cetinkaya Yıldız, R., And Sahın, F., 2005. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from infected tomato seeds using conventional and molecular methods. 5th ISTA-SHC Seed Health Symposium, May 10- 13, Anger, France, pp27.
- Gitaitis, R. D., And Beaver, R.W., 1990. Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*. No:80, 318-321p.
- Gitaitis, R.D., 1991. Bacterial cancer. In: Compendium of Tomato Diseases (J.B. Jones, J.P. Jones, R.E. Stall, T.A. Zitter (Eds.). APS Press. St. Paul., Minnesota 25-26 p.
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D. And Ricker M. D., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in easternnorth America. *Plant Disease* No:77:1069-1076.
- Hayward, A. C. and J. M., Waterson, 1964. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No:19.
- Hobbie, E. A., Watrud L. S., Maggard S., Shiroyama T. and Rygiewicz P. T., 2003. Carbohydrate use and assimilation by litter and soil fungi assessed by carbon isotopes and biyolog assays. *Soil and Biology&Biochemistry*, 35, 303-311p.
- Holt, J. G., N. R., Krieg, P. H. A., Sneath, J. T., Staley and S. T., Williams, 1994. *Clavibacter*. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore, 787p.
- Hwang, R. C., 1975. Ecological studies of *Corynebacterium michiganense* the tomato canker pathogen, Hawai, (Master Thesis) 194. USA., 1975.

- Ioannou, N., Psallidasand, P. G. And Glynos, P., 2000. First record of bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*) on tomato in Cyprus. *Journal of Phytopathology* No:148, 383-386p.
- Kaaya, N. A. K. F., and Nieves Mortensen, C., 1993. Evaluation of a testing method in the detection of phytopathogenic bacteria in tomato seed. 1st ISTA, Plant Diseases Committe, Symposium on Seed Health, p. 23-32, Ottawa, Canada, 9-11 Agust.
- Kado, C. I. and M. G., Heskett, 1970. Selective media for isolatin of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- Kahveci, E. ve Gürcan A., 1993. Antalya İlindeki domates bakteriyel hastalık etmenlerinin tespiti. *Bitki Koruma Bülteni*, Cilt 33, No 3 -4, s 147-151, Temmuz-Arallık
- Karaca, İ. ve H., Saygılı, 1977. Domateslerde bakteriyel hastalıklar. İzmir Bölge Zirai Mücadele ve Karantina Başkanlığı Yayın No: 1, 22s, İzmir.
- Karaca, İ., ve Saygılı, H., 1982. Batı Anadolunun bazı illerinde domates ve biberde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar, III. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 12-15 Ekim, Adana, 182-192.
- Karahan, O., 1965. Muhtelif sebzelerde zararlı hastalık amilleri ve mücadeleleri. Tarım Bakanlığı Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Müdürlüğü No: 42, 52s, Ankara.
- Keha, E. E. and Küfrevioğlu Ö., 1997. *Biyokimya*. S636.
- Kingler, J. M., Stowe R. P., Obenhuber D. C., Groves T. O., Mishra S. K. and Pierson D. L., 1992. Evaluation of the biolog automated microbial identification system. *Applied and Environmental microbiology*, No:58 (6), 2089-2092p.
- Kizil, F., and Uyar, F., 2006. Antimicrobial activities of some thyme (*thymus*, *staureja*, *origanum* and *thymbra*) species against important plant pathogens. *Asian journal of chemistry* 18: 1455- 1461.
- Klement, Z., Rudolph K. and Sands D.C., 1990. *Methods in Phyto bacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, p547.
- Konopka, A., Oliver L. and Turco R. F., 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology* No: 35, 103-115p.

- Lelliott, R.A. and Stead D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blacwell Scientific Publications. p216.
- Lindhout, P., and C, Purimahua., 1989. Resistance against *Corynebacterium michiganense* found in *Lycopersicon peruvianum*. Pages 162 - 165 in modern trends in tomato genetics and breeding: synopses 10th meeting eucarpia tomato working group.
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., Brujin, F. J., Fulbrigh, D. W., 1999. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. Phytopathology, No:88, 862s.
- Manceau, C., Horvais A., 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. Analysis of rRNA operons with special emphasis on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Applied and Environmental Microbiology 63 (2), 498-505.
- Miller, I. and Berger T., 1985. bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Hewlet-Packard gas chromatography application note, Hewlett-Packard co., Alto, CA., 228-238.
- Miller, S. A. and Joaquim T. R., 1993. Diagnostik techniques for plant pathogens, Biotechnology in Plant Disease Control, p321-339.
- Narayanasamy, P., 1997. Plant pathogen detection and disease diagnosis. p331.
- Nedumaran, S., and Vidhyasekaran, P., 1982. Seed-borne infection of *Corynebacterium michiganense*. Indian Phytopathology-Phytopathology Notes No:35, 510s.
- Nedumaran, S., and Vidhyasekaran, P., 1982a. Techniques to detect *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* infection in tomato seed. Indian Phytopathology- Phytopathology Notes, 35:143-144.
- Ozeretskovskaya, O.L., 1995. Induced Resistance in the *Solanaceae*. (R.Hammerschmidt and J. Kuc, eds.) Induced Resistance to Disease in Plants. Kluwer Academic Publishers, London, p.31-62.
- Öktem, Y., E ., 1984, Domates bakteriyel solgunluğu (*Corynebacterium michiganense*)' nun Ankara İlindeki yayılışı, etmenin toprak ve bitkiden izolasyonu ile bitki artıklarında yaşama süresi üzerine çalışmalar. Türkiye' de Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Simpozyumu, 8 -10 Şubat, s27, Ege Üniv. Atatürk Kültür Merkezi, İzmir.
- Öktem, Y., E ., 1985, Domates bakteriyel solgunluğu (*Corynebacterium michiganense*)' nun Ankara İlindeki yayılışı, etmenin toprak ve bitkiden izolasyonu ile bitki artıklarında yaşama süresi üzerine çalışmalar. Türkiye' de Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Simpozyumu, 8 -10 Şubat 1985, İzmir.

- Özaktan, H., Bora, T., 1991. Domates Bakteriyel Solgunluğu(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al*) ile savaşım olanakları üzerinde Araştırmalar (Doktora Tezi)
- Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi II: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.
- Özyılmaz, Ü., 2001. Aydın İlinde Sera Domateslerinde Toprak Kaynaklı Bakteriyel Hastalıkların Saptanması (Yüksek Lisans tezi), Adnan menderes üniv. Zir. Fak., Aydın
- Sahin, F., Uslu, H., Kotan, R. And Donmez, F. 2002. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. Plant Pathology No: 51,399p.
- Sahin, F., 2005. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from infected tomato seeds using conventional and molecular methods. 5th ISTA-SHC Seed Health Symposium, May 10-13, Anger, France, pp27.
- Santos, M, S., Cruz, L., Norskov, P., and Rasmussen, O. F., 1997. A Rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. Seed Science and Technology, 25:581-584.
- Saygılı, H., 1995. Fitobakteriyoloji. Ege Üniv. Ziraat Fak., Bitki Koruma Böl., Bornova-İzmir, s208.
- Schuster, M. L. and Smith C. C., 1983. Variability of *Xanthomonas phaseoli* from Dominican Republic. Report of the bean improvement cooperative. No. 26, March, 37-38.
- Sevgican, A., 1981. Sebzelerin bileşimleri ve insan beslenmesi ve sağlığındaki yeri ve kış boyunca taze olarak saklanmaları. Ege Üniv. Matbaası, Yayın No: 419. İzmir.
- Sevgican, A., 1999. Örtüaltı Sebzeçiliği. Ege Üniv. Zir. Fak., Yayın No:528. Bornova, İzmir.
- Shoemaker, P. B. and F. Echandi, 1976. Seed and plant bed treatment for bacterial canker of tomato. *Plant Dis. Rep.* No: 60,163 -166.
- Silva, L. O., Singh S. P. and Pastor-Corrales M. A., 1989. Inheritance of resistance to bacterial blight in common bean. *Theoretical and Applied Genetics (TAG)*, 78, 619-624.
- Smith E.F. and H.L. Jensen, 1982. Data sheets on Quarantine Organisms *Corynebacterium michiganense*. *Eppo Bulletin* No: 12(1),1982.
- Şahin, F., 2003. Moleküler tanı yöntemleri (Eds: telefoncu A., Küfrevioğlu Ö. İ. Pazarlıoğlu, N., Biyoinformatik I).22-28 Haziran, Lisansüstü Yaz Okulu, s237.

- Şahin, F., Pirim İ. ve Çiftçi M., 2000 .Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu , 15-20 Mayıs 2000 , Erzurum , p18-27.
- Thyr, B.D., 1968. Resistance to bacterial cancer in tomato, and its evaluation. *Phytopathology*, 3: 279 -281.
- Thyr, B.D., 1969. Assaying tomato seed for *Corynebacterium michiganense*. *Plant Dis. Repr.*, 53: 858-860.
- Thyr, B. D., Webb R., E., Jaworski, C. A., And Ratcliffe, T. C., 1973. Tomato bacterial canker control by seed treatment. *Plant Diseases Reporter* No: 57, 974- 977p.
- Tokgönül, S., 1998. Ticari Domates Tohumlarında Bakteriyel Solgunluk Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*)’nin Etmeninin Saptanması ve Mücadele Olanakları Üzerine Araştırmalar (Doktora Tezi). Ç. Ü. Ziraat Fakültesi. Adana.
- Tokgönül, S. Ve Çınar, Ö., 1999. Domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ile mücadelede antagonist bakterilerin kullanım olanakları. Türkiye 4. Biyolojik Mücadele Kongresi, 26-29 Ocak, 1999, Adana.
- Topkaya, Ş., 2008. Domateste Erken Yanıklık Hastalığına Dayanıklılık Sağlayan Genlerin Moleküler Markörler Yardımıyla Genetik Haritalaması Ön Çalışmaları (Yüksek Lisans tezi), Gaziosmanpaşa Üniv. Zir. Fak., Tokat
- Türküsay, H., Tosun. N., 2005, hidrojen peroksit uygulamalarının Domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığı (*Clavibacter michiganense ssp. michiganense*.(Smith) Davis et al)’ na etkileri. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. No:42(2), 45-46s.
- Ulukuş, İ., 1982. Elazığ, Diyarbakır ve Mardin İllerinde domates ve biberlerde bakteriyel hastalıkların sürveyi , belirtileri, etmenlerin tanısı ve en önemlisine karşı korunma çareleri üzerine araştırmalar (Doktora tezi).
- Ünver, S., 1989. Arpa (*Hordeum vulgare*)’ da uygulanan EMS Dozları , yıkama suyu sıcaklık ve süresinin M1 ve M2 bitki üzerine etkileri (Doktora Tezi), Ankara Üniv. Zir. Fak., Ankara
- Vural, H., Eşiyok, D., Duman,İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniv. Zir. Fak., Bornova, İzmir.
- Waters, C. M. and H. B., Bolkan, 1992. An improved semi-selective medium for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Phytopathology* No: 82,1072p.
- Yıldız, R. Ç., 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. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana.

Yürüdür, E. ve Akkurt, A., 2008. Tokat' ta Domates Üretimi. Gaziosmanpaşa Üniv. Sosyal Bilimler Dergisi No:8,155-168s. Tokat

ÖZGEÇMİŞ**KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı soyadı : Sevilay SAYGI
Doğum Tarihi ve Yeri : 03.07.1982
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 05372073747
e-mail : sevilays_s@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı	2010
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı	2007
Lise	Mehmet Akif Ersoy Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2000