



**TOKAT YÖRESİNDE
DOMATES BAKTERİYEL SOLGUNLUK HASTALIĞI
ETMENİ (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'NİN
TANILANMASI VE EPİDEMİYOLOJİSİ
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Sabriye BELGÜZAR
Doktora Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Prof. Dr. Yusuf YANAR
Prof. Dr. Yeşim AYSAN
2014
Her hakkı saklıdır

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

DOKTORA TEZİ

**TOKAT YÖRESİNDE
DOMATES BAKTERİYEL SOLGUNLUK HASTALIĞI ETMENİ
(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'NİN TANILANMASI
VE EPİDEMİYOLOJİSİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

SABRİYE BELGÜZAR

**TOKAT
2014**

Her Hakkı Saklıdır

Bu alışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:2011/102).

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 içerdiki yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Sabriye BELGÜZAR

Prof. Dr. Yusuf YANAR ve Prof. Dr. Yeşim AYSAN danışmanlığında, Sabriye BELGÜZAR tarafından hazırlanan bu çalışma 23/10/2014 tarihinde aşağıdaki juri tarafından oy birliği ile Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Yusuf YANAR

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Yeşim AYSAN

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Naif GEBOLOğLU

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Mustafa MİRİK

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özer ALIş

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Mehmet Ali SAKİN

Enstitü Müdürü



ÖZET

Doktora Tezi

TOKAT YÖRESİNDE DOMATES BAKTERİYEL SOLGUNLUK HASTALIĞI ETMENİ (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'NİN TANILANMASI VE EPİDEMİYOLOJİSİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Sabriye BELGÜZAR

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf YANAR
İkinci Danışman: Prof. Dr. Yeşim AYSAN

Bu çalışmada, 2011 ve 2012 yıllarında Tokat ilinde domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Merkez, Pazar, Turhal, Niksar ve Erbaa ilçelerinde domates üretim alanlarında sürvey yapılarak domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranlarının belirlenmesi, hasta bitki örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testleri, serolojik (ELISA), moleküler (PCR) ve yağ asit metil ester (Fatty Acid Methyl Ester: FAME) analizleri ile tanısının yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca hastalığın bölgemiz koşullarında epidemiyolojisi incelenerek hastalığı başlatma yeteneği olan ilk inokulum kaynaklarının tespit edilmesi ve hastalık belirtisi göstermeyen, üreticiler tarafından Tokat yöresinde kullanılan domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan sürvey çalışmalarında 2011 yılında hastalığın tarlada bulunma oranı ortalama %9,64, 2012 yılında ise %4,98 olarak belirlenmiştir. Bölgede hastalığın bulunma oranı ise 2011 yılında Merkez'de %88,88, Niksar'da %54,54, Erbaa'da %52,38, Turhal'da %46,15 ve Pazar'da %18,18 olarak, 2012 yılında ise Erbaa'da %61,90, Merkez'de %52,85, Turhal'da %47,72, Pazar'da %44,44 ve Niksar'da ise %0 olarak belirlenmiştir. Sürveylerde toplanan hasta bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu 2011 yılında toplam 99 adet, 2012 yılında ise toplam 163 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Patojenite ve virülenslik testine tabi tutulan izolatlar, yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler ile tanıyı destekleyici ELISA, PCR ve yağ asit metil ester analizleri ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanımlanmıştır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tohum, toprak ve bitki artıklarındaki latent/epifitik yaşam süresinin saptanması amacıyla yapılan çalışmada, kullandığımız yöntemlere göre, etmenin domates tohumlarında birincil inokulum kaynağı oluşturduğu ve tohumlardaki inokulumun hastalığı başlatacak yeteneğe sahip olduğu belirlenmiştir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

ile bulaştırılmış tohumlarda etmen 370. güne kadar canlılığını srdrmştir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in topraktaki yaşam süresinin saptanması amacıyla yürütülen denemede ise, etmenin yaz aylarında yaklaşık 15 gün, kiş aylarında ise yaklaşık 30 gün canlı kalabildiği saptanmıştır. Toprakta bulunan bulaşık bitki artıklarında patojenin yaşam süresini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada ise, bulaşık bitki artıklarında etmen bir ay canlı kalabilmiştir. Bölgemizde yapılan gözlemlerde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in görüldüğü üretim sezonundan sonraki sezonlarda da hastalığın yeniden ortaya çıktığı saptanmıştır. Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada ise, yarı seçici besi yerine ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak total genomik DNA izolasyonunu takiben, etmene spesifik PCR testleri şeklinde uygulanan yöntemle, bakteriyel solgunluk hastalığı belirtisinin henüz domates fidelerinde görülmediği dönemlerde, etmenin varlığı başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan 104 fide örneğinin 19'unda etmene rastlanılmıştır. Bu alışma ile hastalığın Tokat yöresindeki epidemiyolojisinde kullanılan fidelerdeki epifitik bulaşıklığın rolü de ortaya konulmuştur.

2014, 140 sayfa

Anahtar kelimeler: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, domates bakteriyel solgunluk, Tokat, tanı, epidemiyoloji, epifitik popülasyon, simptomsuz bitki

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

STUDIES ON THE IDENTIFICATION AND EPIDEMIOLOGY OF TOMATO BACTERIAL WILT DISEASE (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) IN TOKAT PROVINCE

Sabriye BELGÜZAR

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

Advisor : Prof. Dr. Yusuf YANAR

Co-advisor : Prof. Dr. Yeşim AYSAN

This study aimed to determine the intensity of bacterial wilt disease of tomato in Central, Pazar, Turhal, Niksar and Erbaa counties which are main tomato production areas of Tokat. For this purpose surveys were conducted during the 2011 and 2012 growing seasons. For identification of the bacterial isolates, which were isolated from infected plant samples, morphological, physiological and biochemical tests were performed and also serological (ELISA), molecular (PCR) and fatty acid methyl-ester (FAME) analysis were performed. Additional purpose of the study was to evaluate the epidemiology of disease, to determine the initial inoculum sources and determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on symptomless tomato seedling used by farmers in Tokat province. Based on the survey results, the average disease intensities were 9,64% and 4,98% in 2011 and 2012 respectively. In 2011, the disease prevalences in Central, Niksar, Erbaa, Turhal and Pazar counties were 88,88%, 54,54%, 52,38%, 46,15% and 18,18% respectively. In 2012 the disease prevalence in Erbaa, Central, Turhal, Pazar and Niksar counties were 61,90%, 52,85%, 47,72%, 44,44% and 0%. In 2011, 99 bacterial isolates were isolated from infected plant samples. Number of bacterial isolates, obtained from infected plants, were 163 in 2012 survey. These bacterial isolates were identified as *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by morphological, physiological and biochemical tests and confirmed by ELISA, PCR and FAME analysis. In the studies conducted to determine latent/epiphytic survival time of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in soil, seed and plant debris, it was determined that tomato seeds were primary inoculum source and infected seeds were capable of establishing the disease according to the methods used in the present study. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* could persist for 370 days in infested tomato seeds. In the conducted to survival period survival of the pathogen in infested soil, it was determined that *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* could survive in soil for 15 days during summer and 30 days during winter time. On the other hand, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* could persist on infected plant debris only for a month. It was observed that *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis can be re-emerge in sub-sequent season when it was observed previous season in Tokat province. In the studies conducted to determine epiphytic population of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on symptomless tomato seedling, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* was detected successfully on symptomless tomato seedling by specific polymerase chain reaction (PCR) assay after streaking on semiselective medium and extracting DNA of the bacteria growing on the medium. In the symptomless seedling tests, 19 out of 104 tomato seedlings, collected from Tokat province, were contaminated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. This study demonstrated the role of epiphytically contaminated tomato seedlings in the epidemiology of the disease in Tokat province.

2014, 140 pages

Keywords: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Tomato Bacterial Wilt Disease, Tokat, identification, epidemiology, epiphytic population, symptomless plant

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, daima bir yol gösterici olan ve en zor zamanlarda manevi desteğini hissettiren saygı değer hocam Prof. Dr. Yusuf YANAR'a sonsuz teşekkürler.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren, çalışmamın her aşamasında bana değerli bilgilerini aktaran ve Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden ders almamı sağlayarak beni Bakteriyoloji alanında yetiştiren değerli hocam Prof. Dr. Yeşim AYSAN'a sonsuz teşekkürler.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ'a çalışmamın tüm aşamalarında yönlendirici ve olumlu katkılarından dolayı, çalışmamda sera ve Biyoteknoloji Laboratuvarı olanaklarından yararlanmamı sağladıklarından dolayı sonsuz teşekkürler.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi değerli hocam Prof. Dr. Naif GEBOLOĞLU'na yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulunduklarından dolayı sonsuz teşekkürler.

Doktora Tezi jüri üyelerinden sayın hocam Doç. Dr. Mustafa MİRİK'e bilgi ve deneyimlerini paylaştıkları için sonsuz teşekkürler.

Doktora ders döneminde bana özel olarak ders veren ve engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Sayın Hocam Prof. Dr. Hikmet SAYGILI'ya, Adana'da bana ev sahipliği yapan, laboratuvar deneyimlerini benimle paylaşan canım arkadaşım Arş. Gör. Sümer HORUZ'a teşekkürler. Ayrıca Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü hocalarına bana çalışma olanağı sağladıkları için teşekkürler.

Sürvey çalışmalarında ve fide temininde bana imkanlar sağlayan ve destek olan Tokat İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü Bitki Koruma Şube Müdürü Timur KAPLAN'a ve diğer elemanlara teşekkür ederim.

Çalışmam içerisinde yer alan yağ asit metil ester analizleri için laboratuvar olanakları sağlayan Sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e (Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyogenetik Bölümü) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında desteklerini her zaman gördüğüm, çalışmamda tüm bölüm olanaklarını sağlayan Bölüm Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. İzzet

KADIOĞLU'na, çalışmamı destekleyen Bitki Koruma Bölümü değerli hocalarına ve tez çalışmalarında emeği geçen tüm laboratuvar ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Canım annem ve babama, kız kardeşlerime girdiğim her yolda beni destekledikleri için sonsuz teşekkürler.

Sevgisi ve sonsuz sabrı ile beni destekleyen eşim Ahmet BELGÜZAR'a, beni hayata bağlayan, henüz 10 aylık olan oğlum Göktuğ Berk'e de yürekten teşekkürler...

Sabriye BELGÜZAR
Kasım 2014

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
2.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in Neden Olduğu Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı ile İlgili Genel Bilgiler.....	12
2.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in Tohum, Toprak ve Bitki Artıklarındaki Latent/Epifitik Yaşam Süresinin Saptanması ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	30
2.3. Domates Fidelerinde <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in Epifitik Popülasyonunun Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. Materyal.....	35
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Sürvey çalışmaları.....	36
3.2.2. Domates bakteriyel solgunluk etmeninin izolasyonu.....	37
3.2.3. Potasyum hidroksit testi (KOH) ile Gram reaksiyon.....	37
3.2.4. Patojenite ve Virülenslik Testi.....	38
3.2.5. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in Tanı Testleri.....	39
3.2.6. Tanıyı Destekleyici Testler.....	41
3.2.7. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in tohum, toprak ve bitki artıklarındaki epifitik yaşam süresinin saptanması ve ilk inokulum kaynaklarının belirlenmesi.....	46
3.2.8. Domates fidelerinde <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi.....	52
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	56
4.1. Sürvey çalışmaları.....	56
4.2. Domates bakteriyel solgunluk etmeninin izolasyonu.....	75
4.3. Potasyum hidroksit testi (KOH) ile Gram reaksiyonu	78
4.4. Patojenite ve Virülenslik Testi	83
4.5. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in Tanı Testleri.....	92
4.5.1. Koloni gelişimi.....	92
4.5.2. Bakteri yoğunluğunun belirlenmesi.....	94

4.6. Tanıyı Destekleyici Testler.....	95
4.6.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatlarının ELISA testi ile tanısı.....	95
4.6.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatlarının PCR tekniği ile tanısı.....	100
4.6.3. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatlarının yağ asit profillerinin belirlenmesi.....	102
4.7. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in tohum, toprak ve bitki artıklarındaki latent/epifitik yaşam süresinin saptanması ve ilk inokulum kaynaklarının belirlenmesi.....	106
4.7.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in bulaşık tohumda yaşam süresinin belirlenmesi.....	106
4.7.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in bulaşık toprakta yaşam süresinin belirlenmesi.....	110
4.7.3. Topraktaki bitki artıklarında <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in yaşam süresinin belirlenmesi.....	114
4.8. Domates Fidelerinde <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in Epifitik Popülasyonunun Belirlenmesi.....	118
5. SONUÇ	126
KAYNAKLAR	128
EKLER	136
EK A.....	136
EK B.....	138
EK C.....	139
ÖZGEÇMİŞ	140

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	yüzde
g	gram
°C	Santigrat derece
dk	dakika
ml	mililitre
da	dekar
m ²	metrekare
µl	mikrolitre
l	litre
mg	miligram
cm	santimetre
mm	milimetre
Kısaltmalar	Açıklama
<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
ELISA	Enzim bağlı immunolojik deney (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FAME	Yağ Asit Metil Ester (Fatty acid methyl ester)
DNA	Deoksiribonükleik asit
bp	Baz çifti
King B	King's medium B
NA	Nutrient Agar
PSF	Pseudomonas Agar F
NB	Nutrient Broth
SCM	<i>Clavibacter michiganensis</i> için seçici besi yeri (Selective <i>Clavibacter</i> Medium)
NBY	Nutrient Broth Yeast Ekstract
YDC	Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat
KOH	Potasyum Hidroksit
HCl	Hidroklorik asit
NaCl	Sodyum klorür
Rif ⁺	Rifampicin'e dayanıklı izolat
pv.	pathovar

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1.	Sürvey alanlarının belirlenmesinde kullanılan değerler.....	36
Çizelge 3.2.	Sürvey alanlarının köy bazında dağılımı.....	37
Çizelge 3.3.	Yağ asit profilleri belirlenen izolatlar	44
Çizelge 4.1.	2011 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı	56
Çizelge 4.2.	2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı.....	59
Çizelge 4.3.	2011 yılında Tokat ilinde hastalığın bölgedeki ve tarladaki bulunma oranı	67
Çizelge 4.4.	2012 yılında Tokat ilinde hastalığın bölgedeki ve tarladaki bulunma oranı.....	68
Çizelge 4.5.	Tokat ili 2011 ve 2012 yıllarına ait iklim verileri.....	69
Çizelge 4.6.	2011 yılında domateslerde yapılan izolasyonlarda elde edilen izolatlar ve izole edildikleri yerler.....	75
Çizelge 4.7.	2012 yılında domateslerde yapılan izolasyonlarda elde edilen izolatlar ve izole edildikleri yerler.....	77
Çizelge 4.8.	2011 yılına ait izolatlar, izolatların elde edildiği yerler ve KOH testi ile Gram reaksiyon sonuçları.....	79
Çizelge 4.9.	2012 yılına ait izolatlar, izolatların elde edildiği yerler ve KOH testi ile Gram reaksiyon sonuçları.....	81
Çizelge 4.10.	2011 yılına ait izolatların virülenslik düzeyleri.....	83
Çizelge 4.11.	2012 yılına ait izolatların virülenslik düzeyleri.....	88
Çizelge 4.12.	ELISA testi sonuçlarına göre 405 nm okumada <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatlarının absorbans değerleri (2011 yılı bölge izolatları).....	95
Çizelge 4.13.	ELISA testi sonuçlarına göre 405 nm okumada <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatlarının absorbans değerleri (2012 yılı bölge izolatları).....	98
Çizelge 4.14.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatları ile yapılan PCR çalışması sonuçları.....	100
Çizelge 4.15.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatlarının içerdikleri yağ asitleri ve izolatlarda bulunma oranları.....	103
Çizelge 4.16.	Yağ asit profilleri belirlenen izolatlar ve <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'ye benzerlik oranları.....	105
Çizelge 4.17.	Bulaşık domates tohumlarında patojenin yaşam süresi.....	107
Çizelge 4.18.	Yaz ayları boyunca <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in bulaşık topraktaki yaşam süresinin belirlenmesi..	111
Çizelge 4.19.	Kış ayları boyunca <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in bulaşık topraktaki yaşam süresinin belirlenmesi..	111
Çizelge 4.20.	Domates fidelerinde <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada kullanılan fidelere ait bilgiler ve PCR çalışması sonuçları.....	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	6
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in domates bitkisinde oluşturduğu tek taraflı solgunluk	
Şekil 1.2.	7
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in domates meyvesinde oluşturduğu kuşgözü belirtileri.....	
Şekil 1.3.	7
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in domates meyvesinde oluşturduğu kuşgözü belirtileri.....	
Şekil 2.1.	14
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in dağılımı EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization-IMI, 1996-www.eppo.org).....	
Şekil 3.1.	38
Patojenite testinde <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatlarının bitkilere inokulasyonu.....	
Şekil 3.2.	39
Patojenite testinde nem çemberindeki bitkiler.....	
Şekil 3.3.	47
Bakteri süspansiyonuna rifampicin antibiyotikinin eklenmesi.....	
Şekil 3.4.	48
Tohumlarda vakum ve daldırma yöntemleri kullanılarak bakteri süspansiyonu ile inokulasyonu.....	
Şekil 3.5.	48
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ile bulaşık tohumların rifampicin içeren besi yerine ekimi.....	
Şekil 3.6.	49
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatu ile bulaştırılmış toprağın teneke kutular içerisinde gömülmesi.....	
Şekil 3.7.	50
Domates bitkilerinin <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ile inokulasyonu.....	
Şekil 3.8.	50
Bitki gövdelerinin kesilmesi ve tartılması.....	
Şekil 3.9.	51
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ile bulaşık bitki gövdelerinin gömülmesi.....	
Şekil 3.10.	51
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ile bulaşık bitki gövdelerinin NB'de çalkalanması ve süzülmesi.....	
Şekil 3.11.	51
Süspansiyonun santrifüj edilmesi ve PSF besi yerine ekimi.....	
Şekil 3.12.	52
Domateste <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in epifitik popülasyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntem.....	
Şekil 3.13.	53
Zirai ilaç Bayilerinden alınan domates fideleri.....	
Şekil 3.14.	54
Fidelerin kök boğazından kesilmesi	
Şekil 3.15.	54
SCM besi yerinde gelişen bakteri kolonilerinin toplanması	
Şekil 3.16.	55
Toplanan bakteri kolonilerinin NB'a eklenmesi	
Şekil 3.17.	55
Fide çalışmasında DNA izolasyonu	
Şekil 4.1.	71
Domates bitkisinde görülen tek taraflı solgunluk ve yanıklık.....	
Şekil 4.2.	72
Domates bitkilerinde iletim demetlerindeki kahverengileşme.....	
Şekil 4.3.	72
İletim demetlerine koflaşma veya özün boşalması.....	
Şekil 4.4.	73
Domates bitkilerinde meyve saplarında görülen çatlamalar.....	
Şekil 4.5.	73
Meyvelerde görülen kuş gözü belirtisi.....	
Şekil 4.6.	74
Üretim alanındaki Domates bakteriyel solgunluk hastalığının şiddeti.....	

Şekil 4.7.	Hastalıktan dolayı üreticinin arazi bakımından vazgeçtiği tarladan genel bir görüntü	74
Şekil 4.8.	PSF besi yerinde gelişen sarı renkte koloniler.....	75
Şekil 4.9.	KOH testine göre Gram (+) ve Gram (-) değerlendirmesi.....	79
Şekil 4.10.	Patojenite testinde gözlemlenen solgunluk simptomları.....	86
Şekil 4.11.	Pozitif ve negatif kontrolde iletim demetlerindeki farklılıklar.....	86
Şekil 4.12.	Negatif kontrol, pozitif kontrol ve <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (SB-9c) izolatının uygulandığı bitkilerde iletim demetlerindeki farklılıklar.....	87
Şekil 4.13.	Negatif kontrol, pozitif kontrol ve <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (SB-20b) izolatının uygulandığı bitkilerdeki hastalık şiddetinin düzeyi.....	87
Şekil 4.14.	Negatif kontrol, pozitif kontrol ve <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (SB-11b) izolatının uygulandığı bitkilerdeki hastalık şiddetinin düzeyi.....	88
Şekil 4.15.	Negatif kontrol, pozitif kontrol ve <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (K-55/1) izolatının uygulandığı bitkilerdeki hastalık şiddetinin düzeyi.....	91
Şekil 4.16.	Pozitif ve negatif kontrolde iletim demetlerindeki farklılıklar.....	91
Şekil 4.17.	Uygulama yapılan bitkilerin iletim demetlerindeki kahverengileşme.....	92
Şekil 4.18.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> bölge izolatının (SB-1b) PSF ve NA besi yerlerindeki gelişimi.....	93
Şekil 4.19.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatının SCM besi yerindeki gelişimi.....	94
Şekil 4.20.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> izolatının seyreltme serilerindeki (10^0 - 10^6) koloni gelişimi.....	95
Şekil 4.21.	ELISA testi sonucunda platen görünümü.....	97
Şekil 4.22.	PCR çalışması sonucu oluşan bantlar (PK: Pozitif Kontrol (YY-2); 1: T-5/1a-2 (r); 2: SB-8a/1 (r); 3: SB-19a/1 (r); 4: K-40/1a-1 (r); 5: SB-13a/1 (r); 6: SB-7a/1 (r); 7: SB-20a/1 (r); 8: K-49/1-1 (r); 9: K-23/1a-1 (r); 10: K-5/1a-1 (r)).....	101
Şekil 4.23.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ile bulaşık tohumlarında etrafında gelişen koloniler.....	106
Şekil 4.24.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ile bulaşık tohumlardan gelişen domates fideleri.....	108
Şekil 4.25.	Bulaşık topraktan yapılan izolasyonlarda petride gelişen <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> kolonileri.....	112
Şekil 4.26.	28. günde yapılan izolasyonlarda petrideki görünüm (<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> elde edilememiştir.).....	112
Şekil 4.27.	10^3 seyreltmesinde petride gelişen <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> kolonileri.....	113
Şekil 4.28.	Temmuz ayında yapılan izolasyonda King B besi yerinde gelişen koloniler.....	115
Şekil 4.29.	Ağustos ayında yapılan izolasyonda King B besi yerinde gelişen koloniler.....	116
Şekil 4.30.	Ekim ayında yapılan izolasyonda King B besi yerinde herhangi bir koloni gelişimi görülmemiştir.....	116

Şekil 4.31.	SCM besi yerinde <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'nin gelişimi.....	121
Şekil 4.32.	SCM besi yerinde F-5 fidesinden gelişen koloniler.....	122
Şekil 4.33.	SCM besi yerinde F-38 fidesinden gelişen koloniler.....	122
Şekil 4.34.	F-35 fide örneğinde SCM besi yerinde koloni gelişimi görülmemiştir.....	123
Şekil 4.35.	Domates fidelerinde <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 'in varlığının belirlenmesi çalışmasında PCR testi sonucu oluşan bantlar (PK: Pozitif Kontrol (YY-2); 1: F-6; 2: F-8; 3: F-9; 4: F10; 5: F12; 6: F-16; 7: F-19; PK Cmm: SCM'de gelişen Cmm).....	123

1. GİRİŞ

Ülke ekonomisinde çok önemli bir yeri olan domates (*Lycopersicum esculentum* Miller) yetiştirme yapılan bölgelerde çiftçimizin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır. Dünya’da ve Türkiye’de taze ve işlenerek tüketimi en başta gelen sebzeler arasında yer almaktadır. Domates iç piyasada taze olarak tüketilmesinin yanı sıra gıda endüstrisinde de ham madde olarak kullanılmakta, dış pazarlara ise taze olarak veya işlenerek ihraç edilmektedir. Üretim miktarı açısından incelendiğinde 2012 yılı verilerine göre domates üretiminde Türkiye (11.350.000 ton), Çin (50.125.055 ton), Hindistan (17.500.000 ton) ve Amerika Birleşik Devletleri (13.206.50 ton)’nden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2012).

Türkiye farklı iklim bölgelerine sahip oluşu hem açık alanda hem de örtü altında sofralık ve sanayi domatesinin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle Marmara, Akdeniz ve Ege bölgelerinde büyük alanlarda domates yetiştirilmektedir. Çalışmanın yürütüldüğü Tokat ilinde yine domates, üreticilerin önemli gelir kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Tokat ilinde Merkez ve ilçeler dahil 2011 yılında 76.737 da ekiliş alanından yaklaşık 513.886 ton, 2012 yılında 76.337 da alandan 449.892 ton domates üretimi gerçekleşmiştir (Anonim, 2013).

Tokat ekolojik yapısı itibariyle hem Karadeniz hem de karasal iklimin sıcak ve nemli özelliklerini göstermektedir. Bu nedenle bölgede önemli bir ürün olan domateslerde hastalıkların salgın halinde görülmesi kaçınılmazdır. Bölgede yaygın olarak üretimi yapılan domates bitkisinin diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi fitopatolojik sorunları vardır. Domateslerde fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanı sıra pek çok bakteriyel etmen de önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Karaca ve Saygılı, 1982). Bu bakteriyel hastalıklardan birisi de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis ve ark.’in neden olduğu domates bakteriyel solgunluk hastalığıdır.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ilk kez 1909 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nin Michigan eyaletinde saptanmıştır. 1945'de Doğu Afrika'nın bazı arazilerinde %80'nin üzerinde, 1960'larda Kuzey Carolina'da yine %80'nin üzerinde, 1962'de Kenya'da %60'ın üzerinde ciddi ürün kayıplarına neden olmuştur. Etmen 1965-1971 yılları arasında ABD'nin Ontario eyaletlerinde sera üretimi de dahil tüm domates üretim alanlarında yıllık ortalama %5-10 arasında değişen oranlarda ürün kaybına neden olmuştur. Bu yıllarda üretici bazındaki ürün kaybı ise %60'nin üzerinde görülmüştür (Sherf ve Macnab, 1986).

Ülkemizde ise domates bakteriyel solgunluk hastalığının varlığı Tokgönül (1998)'ün bildirdiğine göre ilk olarak İç Anadolu bölgesinde (Bremer ve Özkan, 1950) saptandıktan sonra, Güney Doğu Anadolu (Bremer ve ark., 1952), Marmara (Karahan, 1965) ve Ege bölgesinde (Karaca ve Saygılı, 1977) tespit edilmiştir. Doğu Akdeniz Bölgesinde ise domates bakteriyel solgunluk hastalığının varlığı Çınar (1980) tarafından belirlenmiştir. Çınar (1980), hasta domates bitkilerinden elde ettiği izolatları yaptığı biyokimyasal testlerle *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılamıştır. Öktem (1984), Ankara ilinde hastalığın %0,5-23 arasında bir yaygınlık gösterdiğini ve bazı ilçelerde %100 bulaşık tarlalara rastlanıldığını bildirmiştir. Öktem ve Benlioğlu (1993) tarafından yapılan ön çalışmada Orta Anadolu Bölgesi'nde Afyon, Ankara, Bolu, Burdur, Çankırı, Eskişehir, Isparta, Kayseri, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Niğde, Yozgat ve Zonguldak'ı kapsayan 14 ilde domates ekim alanlarında 354 örnekleme noktasında domates bakteriyel solgunluk hastalığının sürveyi yapılmıştır. Sürveyler sonucunda Afyon dışındaki 13 ilde 97 tarlada domates bakteriyel solgunluk 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. Kahveci ve Gürcan (1993), Antalya ilinde domateslerdeki bakteriyel hastalıkların tespiti üzerine yaptıkları çalışmada Alanya, Elmalı, Kaş, Korkuteli, Kumluca, Manavgat, Merkez ve Serik ilçelerinde sera ve tarla domateslerinde solgunluk gösteren bitkilerden izole edilen 72 adet bakteri izolatını yaptıkları biyokimyasal testlerle *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılamışlardır. Özyılmaz (2001), Aydın

ilinde 2000 yılı g z döneminde incelediği toplam 91 domates serasından 8'inde bakteriyel hastalık belirtilerine rastlamış olup, hastalıklı bitkilerden yapılan izolasyonlarda 11 adet izolat elde etmiş ve %1-10 arasında değişen oranlarda hastalık yaygınlığı belirlenen  ine ilçesinde 2,  incirlio a ilçesinde 1 serada domates bakteriyel solgunluk hastalığı belirtilerine rastlamıştır. Araştırmacı yaptığı testler sonucunda elde ettiği izolatları *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılamıştır. Doğu Anadolu Bölgesi'nde ise hastalığın varlığı Şahin ve ark. (2002) tarafından belirlenmiştir. Oltu,  spir ve Yusufeli ilçelerinde 6 farklı üretim alanında yürütülen çalışmada hastalık yaygınlığı %100 olarak belirlenmiştir. Elde edilen izolatlar biyokimyasal testlerle *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak belirlenmiş olup, 16 izolat yapılan yağ asit metil ester analizleri ile %47-89 benzerlik oranıyla *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılanmıştır. Basım (2002) tarafından Isparta ve çevresindeki sera domateslerinde görülen bakteriyel patojenlerin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmada, 40 seranın *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Yine Batı Akdeniz Bölgesinde Basım ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada, domates bakteriyel solgunluk hastalığının varlığı ilk kez rapor edilmiştir. Antalya'da Serik, Aksu, Kumluca, Demre ve Kınık ilçelerinde, Isparta'da Keçiborlu,  andır ve Şeyhler ilçelerinde 2003 yılı üretim sezonu boyunca yürütülen çalışmada, Selin, Astona, 198 RN, Malike ve Tülin domates çeşitlerinin üretiminin yapıldığı seralarda hastalık yaygınlığı %26-65 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir. Patojenite testinde elde edilen re-izolatlarla SCM'de koloni gelişimine bakılmış olup, 30 izolat ile yapılan PCR ve FAME analizleri sonucunda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılanmıştır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in meyvede oluşturduğu enfeksiyonlar ise ilk kez  zdemir (2005) tarafından rapor edilmiştir. 2004 yılında yapılan çalışmada NDM 447 domates çeşidinin üretildiği  zmir Torbalı'da hastalık belirlenmiştir. Hastalıklı bitki gövdelerinden ve kuşgözü simptomları görülen meyvelerden izolasyonlar yapılmış olup, elde edilen izolatlar patojenite testi ve akşam safası (*Mirabilis jalapa*) bitkisinde aşırı duyarlılık testleri ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak belirlenmiştir. Mersin ve Adana illerinde  etinkaya-Yıldız

(2007) tarafından yapılan sürvey çalışmaları sonucunda hastalık yaygınlığı %15-25 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir. Bir nceki üretim sezonunda hastalığın görüldüğü alanlarda ise yaygınlığın %70-80 oranlarına ulaştığı saptanmıştır. Çalışmada, Adana ve Mersin illerinde domates üretim alanlarında yapılan srveylerin yanı sıra Antalya, Artvin, Bursa ve İzmir illerinden temin edilen hasta domates bitkilerinden toplam 57 bakteri izolatu morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, ELISA, PCR ve yağ asit metil ester analizleri ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılanmıştır. Bölgemizde ise Saygı (2010) domates bakteriyel solgunluk hastalığının Tokat ili domates üretim alanlarında %1,65'lik bir sıklıkta olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmada Tokat ilinde domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in rastlanma sıklığını belirlemek amacıyla 2008 ve 2009 yıllarında iki yıllık srveyler yapılmıştır. İlk yıl sürvey çalışmalarında 44 adet bakteri izolatu elde edilerek izolatlarla yapılan biyokimyasal analizler sonucunda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* hastalık etmeni bulunamamıştır. İkinci yıl 55 tarlada gözlem yapılmış olup, 39 ayrı bölgeden toplanan özellikle solgunluk belirtisi gösteren bitkilerden 39 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Yapılan moleküler analizler sonucunda, izole edilen bakterilerden 3 adetinin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olduğu bulunmuştur.

Solanaceae familyasından biber ve patlıcanda da hastalık oluşturabilme yeteneğindeki etmen sadece domateste ekonomik zarar meydana getirir. Hastalık belirtileri sistemik veya lokalize olmuş enfeksiyonlardan meydana gelmelerine göre farklılık göstermektedir. Enfeksiyon tohum veya açılan yaralar yolu ile direkt iletim demetleri içerisine taşınan inokulumdan meydana gelirse sistemik enfeksiyonun belirtileri oluşur ve hastalık ilk olarak solgunluk ile kendini göstermeye başlar (şekil 1.1.). Bitkiler sistemik olarak enfektelendiği zaman genç fideler hızla solar ve ker, 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 yanındaki

floem ve parankima hücrelerine yayıldığı için hasta gövdede ve petiollerde açık sarı kahverengi çizgiler şeklinde belirti oluşturur. Bu çizgiler gittikçe koyulaşır ve bazen çatlaklar açılır, koyu kahverengi yapılar öz ve korteksde büyük nekrozların açığa çıkması ile sonuçlanır (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008).

Eğer patojen hidatodlar gibi doğal açıklıklar veya tüylerin kırılması ile açılan 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 kurumaması 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 (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008).

Meyvelerde kuş gözü lekesi olarak bilinen ve taze olarak tüketilen meyvenin pazar değerini düşüren küçük (0,3 cm çapından daha küçük), beyaz hale ile çevrili kahverengimsi lezyonlar etmenin lokalize olmuş enfeksiyonunda görülmektedir (Şekil 1.2. ve Şekil 1.3.). Enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında ise meyve iletim demetlerinde sarılaşma ve kahverengileşme görülebilmektedir (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008).



Şekil 1.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domates bitkisinde oluşturduğu tek taraflı solgunluk



Şekil 1.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domates meyvesinde oluşturduğu kuşgözü simptomsu



Şekil 1.3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domates meyvesinde oluşturduğu kuşgözü simptomsu

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* sistemik yayılan bir hastalık etmeni olması nedeniyle genelde enfekteli tohumlarla taşınmakta, ayrıca hastalıklı bitki artıkları ve bulaşık topraklarla gelecek üretim sezonuna aktararak büyük ürün kayıpları meydana getirebilmektedir. Nedumaran ve Vidhyasekaran (1982, 1982a) Hindistan'ın farklı bölgelerinden elde ettikleri domates tohumları ile yaptıkları çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile doğal bulaşıklılığın ciddi bir tehlike oluşturduğunu saptamışlar ve bununla ilgili geniş çalışmaların acil olarak başlaması gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca enfekteli domates tohumlarından etmenin elde edilmesi ve tanılanması için çeşitli yöntemleri araştırmışlardır. Chang ve ark. (1991) tarafından domates bakteriyel solgunluk hastalık etmeninin epidemiyolojisi üzerine yapılan bir çalışmada, Midwest'te tohumdan fideye %0,01-0,05 (1000 fide başına 1-5 hastalıklı tohum) gibi düşük bir tohum bulaşma oranının, tarlada önemli bir epideminin başlangıcı olabileceği sonucuna varılmıştır. Bryan (1930) etmenin iletim sistemi yardımıyla tohumları sistemik olarak enfekte ettiğini ve embriyoda bulunduğunu belirtmiştir. Patino-Mendez (1964) etmenin tohumları tohum kabuğu veya tohum zarından geçerek enfekte ettiğini, tohum zarının en içteki hücrelerine doğru hareket ettiğini ancak embriyoya girmediğini saptamıştır. Bryan (1930) doğal enfekteli tohumlarda bakterinin tohuma geçişinin %1-5, yapay enfekteli tohumlarda %21-40 oranında olduğunu saptarken, Strider (1967) yaptıkları çalışmada tohuma geçme oranının %0,25-81 arasında değiştiğini, ancak %1 oranında tohuma geçişin tarlada %54 oranında domates bitkisinin enfeksiyonuna neden olabileceğini belirtmiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in diğer bir inokulum kaynağının toprak olduğu ve patojenin toprakta belirli koşullarda yaşamını sürdürebildiği Byran (1930) tarafından bildirilmiştir. Yapılan çalışmada, Washington ve New York'da etmenin 11 ay boyunca enfekteli toprakta canlı kalabildiğini belirlemiştir. Çetinkaya- Yıldız (2007)'in bildirdiğine göre, Ciccarone ve Carili (1948)'de yaptıkları çalışmada İtalya'da etmenin toprakta dört yıl süreyle yaşayabildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in topraktaki yaşam süresi üzerinde belirli koşulların etkili olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Bryan, 1930; Strider, 1967; Basu, 1970). Yapılan

bir çalışmada, inokulasyondan 8 ay sonra hava ile kurutulmuş topraktan etmen geri izole edilemezken, 2 °C'deki nemli toprakta 18-30 ay süre ile canlı ve virulent kalabildiği saptanmıştır (Strider, 1967). Basu (1970), topraktaki %2,7 ile 21 arasındaki nem değişikliğinin patojenin canlılığını etkilediğini belirlemiştir.

Çeşitli araştırmacılar, kışı bulaşık bitki artıklarında geçiren epifitik *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populasyonunun primer inokulum kaynağı olarak rol oynayabileceğini bildirmektedirler (Chang ve ark., 1992a; Gleason ve ark., 1991; Fatmi ve Schaad, 2002). Gleason ve ark. (1991), toprak yüzeyinde kalan bulaşık bitki artıklarında etmenin en az 24 ay boyunca canlı kalabildiğini, toprağa gömülen bulaşık bitki artıklarında ise 7 ay boyunca canlılığını sürdürdüğünü belirlemişlerdir. Basu (1970) yaptığı çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşık domates yapraklarında toprak sıcaklığı -20 °C iken en az 36 hafta canlı kalabildiğini bildirmiştir. Patojen toprak sıcaklığı 5-35 °C iken 3 haftadan daha fazla canlı kalamamıştır. Chang ve ark., (1992a), Fatmi ve Schaad (2002) tarafından yapılan çalışmalarda ise, toprak yüzeyine bırakılan domates gövdelerinde, gömülenlere oranla organizma daha uzun süre canlılığını korumuştur.

Patojen ayrıca çeşitli yabancı otlarda, değişik malzemeler (fide saksısı, oluk, vb), sera konstrüksiyon malzemeleri ve çeşitli aletler üzerinde de yaşamını devam ettirebilmektedir (Gitiatis ve Beaver, 1990; Gleason ve ark., 1991; Gleason ve ark., 1993). Ayrıca küçük alanlarda hastalık yayılımı rüzgar, yağmur, böcekler, kültürel işlemler esnasında kullanılan alet ve ekipmanlar ile insanlar tarafından olurken, geniş alanlarda yayılım tohum ve fidelerle olmaktadır. Özellikle tüylerin kırılma noktaları patojen girişi için önemlidir. Kumlu yapıya sahip topraklarda, organik yapılı topraklara göre daha şiddetli enfeksiyonlar görülmektedir. Kuş gözü adı verilen meyve enfeksiyonları genelde yağmurlama sulama sonucu ıslak kalan meyvelerde görülmektedir. Damlama sulamanın yapıldığı seralarda ise bu kuş gözü simptomsu çok nadir olarak gözlenmektedir (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008).

Etmenin farklı yerlerde yaşamını sürdürebilme özelliğinden dolayı mücadelesinde zorluklar yaşanmaktadır. Hastalık ile mücadelede en etkin yöntem başlangıç inokulumunu azaltmaktır. Sertifikalı tohum ve fide kullanımı bakteriyel solgunluk hastalığının mücadelesi için önemlidir. Ancak bu etmenle epifitik olarak bulaşık olan tohumların sertifika alabilme olasılığı bulunmaktadır. Bu şekildeki tohumlar ve yine bu tohumlardan elde edilen fidelerin kullanımı ile hastalık yayılabilmektedir (Chang ve ark., 1992a).

Tokat ilinde 2010 yılında yapılan arazi surveylerinde domates bitkilerinde solgunluk, iletim demetlerinde kahverengileşme, özde koflaşma, kuruma ve meyvelerde kuş gözü belirtileri tespit edilmiştir. Bu hastalık belirtilerine *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olabileceği düşünülmüştür. Arazi surveyleri sonucu toplanan örneklerin Koch postulatı ile elde edilen patojenik özellikteki re-izolatlarının, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre ve tanıyı desteklemek için yapılan PCR test sonuçlarına göre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılanması ile bölgedeki domates üretim alanlarının yoğun biçimde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* etmeni ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Etmen 2010 yılında özellikle Tokat Merkez, Turhal ve Erbaa ilçelerindeki domates üretim alanlarında epidemi oluşturmuş ve %2 ile %100 arasında değişen oranlarda ürün kayıplarına neden olmuştur. Hastalığın epidemik boyutlara ulaşmasında iklim koşullarının hastalık gelişimi için uygun olması yanında, özellikle bölgede %90 oranında tek bir çeşidin yetiştirilmiş olmasının ve fide kaynaklı bir enfeksiyonun rol oynadığı kanısına varılmıştır (Yazıcı ve ark., 2011).

Bu çalışma kapsamında; 2011 ve 2012 yıllarında Tokat ilinde domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Merkez, Pazar, Turhal, Niksar ve Erbaa ilçelerindeki domates üretim alanlarında sürvey yapılarak domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranlarının belirlenmesi, hasta bitki örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testleri, serolojik (ELISA), moleküler (PCR) ve yağ asit metil ester (Fatty Acid Methyl Ester: FAME) analizleri ile tanısının yapılması, hastalığın bölgemiz koşullarında epidemiyolojisi incelenerek hastalığı başlatma yeteneği olan ilk

inokulum kaynaklarının tespit edilmesi ve hastalık belirtisi göstermeyen, üreticiler tarafından Tokat yöresinde kullanılan domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

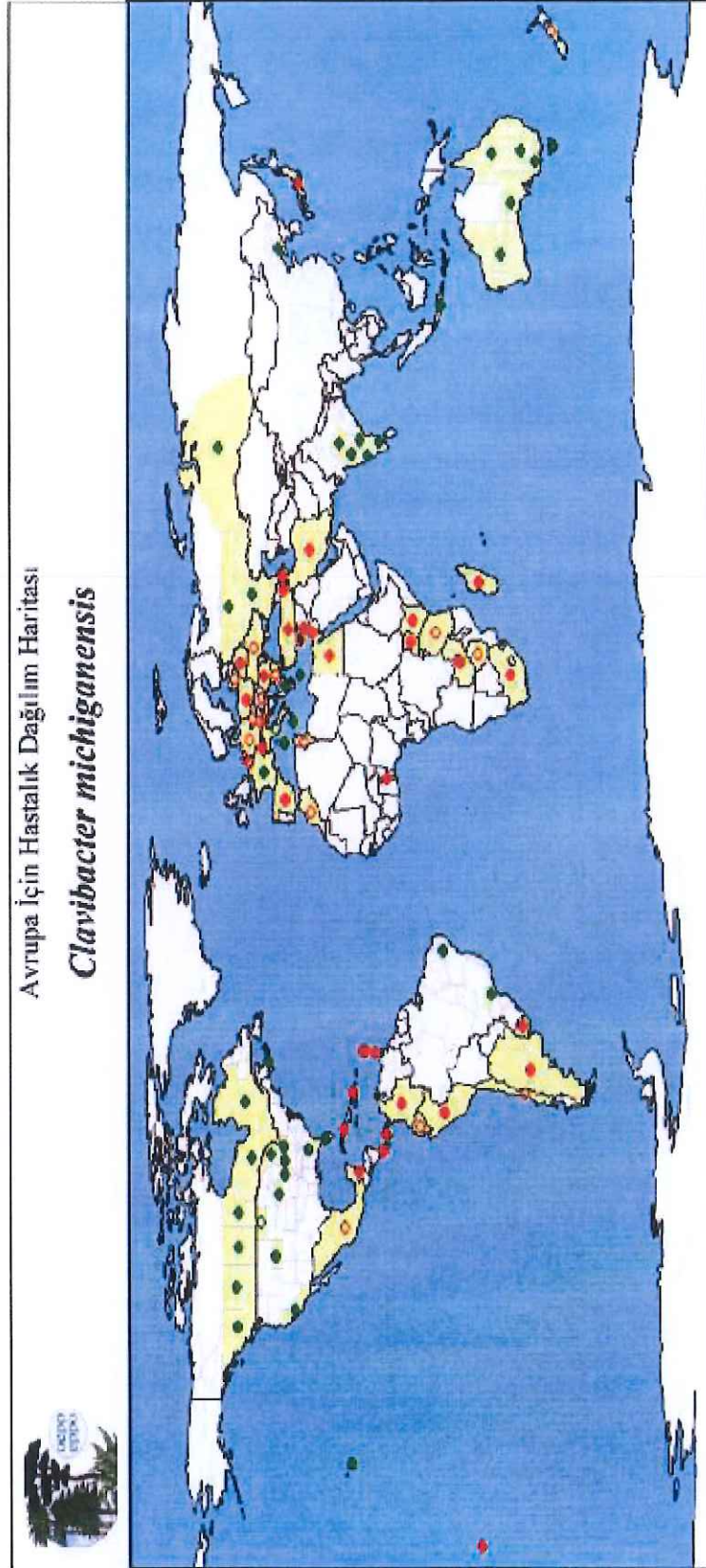
2.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Neden Olduğu Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı ile İlgili Genel Bilgiler

Domateslerde fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanı sıra pek çok bakteriyel etmen de önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Karaca ve Saygılı, 1982). Bu bakteriyel hastalıklardan birisi de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis ve ark.'in neden olduğu domates bakteriyel solgunluk hastalığıdır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Prokaryota alemi, Firmicutes bölümü, *Thallobacteria* sınıfı, *Microbacteriaceae* familyası, *Clavibacter* cinsi içerisinde yer almaktadır (Agrios, 2005). Etmen Erwin F. Smith tarafından ilk olarak *Bacterium michiganense* daha sonra *Aplanobacter michiganense* olarak isimlendirmiştir. *Pseudomonas michiganensis*, *Phytomonas michiganensis* ve *Mycobacterium michiganensis*'i içeren ilave isimlendirme girişimlerinden sonra terminolojik isimlendirme kabul edilmiş ve yaklaşık 50 yıl *Corynebacterium michiganense* olarak adlandırılmıştır. 1980'lerde patojenin hücre duvarı yapısı ile ilgili yeni bilgilere dayanılarak *Clavibacter* cinsi içerisinde yeniden sınıflandırma yapılmış ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis ve ark. olarak isimlendirilmiştir (Gleason ve ark., 1993).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* dünya çapında domates üretimini kısıtlayan en önemli bakteriyel etmenlerden birisidir (Gleason ve ark., 1993). Etmen hem örtü altı hem de açık alanda yapılan domates üretimini olumsuz etkilemektedir. Domates bitkileri özellikle genç dönemde hastalığa karşı çok duyarlıdır. Sıcak ve nemli havada hastalık şiddetli zarar yapabilmektedir (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008).

Etmen *Solanaceae* familyasından domates, biber, patlıcan ve *Lycopersicum hirsutum*, *L. pimpinellifolium* gibi türlerde hastalık oluştursa da ekonomik anlamda zarar verdiği tek kültür bitkisi domatestir (Gleason ve ark., 1993). Ayrıca *Solanaceae* familyasındaki yabancı otlar (*Solanum mammosum*, *S. douglasii*, *S. nigrum* ve *S. triflorum*) da konukçuları arasındadır (Sherf ve Macnab, 1986).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ilk kez 1909 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) saptandıktan sonra (Gleason ve ark., 1993), 1950'li yılların başında ülkemizde de rapor edilmiştir. Etmen dünyada domates üretiminin yapıldığı hemen hemen her alanda görülmektedir. (Şekil 2.1.; EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization-IMI, 1996-www.eppo.org). Avusturya, Beyaz Rusya, Belçika, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Mısır, Finlandiya (doğrulanmamış bilgi), Fransa, Almanya, Yunanistan, Macaristan, İrlanda Cumhuriyeti, İsrail, İtalya (Sardinya ve Sicilya), Lübnan, Litvanya, Fas, Hollanda, Norveç (hastalık eradikasyonu yapılmış), Polonya, Portekiz (hastalık eradikasyonu yapılmış), Romanya, Rusya (Avrupa ve Sibirya kısmı), Slovenya, İspanya, İsviçre, Tunus, İngiltere (geçmişte bulunmuş ama daha sonra tespit edilememiş), Ukrayna, Yugoslavya, Ermenistan, Azerbaycan, Çin (geçmişte bulunmuş ama daha sonra tespit edilememiş), Hindistan (Madhya ve Pradesh bölgeleri), İran, Japonya, Kenya, Kuzey Afrika, Tunus, Togo Cumhuriyeti, Uganda, Zambia, Zimbabve, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri (California, Florida, Georgia, Hawaii, Iowa, Illinois, Indiana, Michigan, Kuzey Dakota, Ohio, Wyoming), Meksika, Kosta Rika, Küba Dominik Cumhuriyeti, Grenada, Panama Cumhuriyeti, Arjantin, Brezilya, Şili, Kolombiya, Peru, Uruguay, Avusturalya, Tonga Krallığı ve Yeni Zelanda'da *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in 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 Endonezya'da (Anwar ve ark., 2004), Sumatra ve Java'da (Zainal ve ark., 2008), 2010 yılında ise Suriye'de (Ftayeh ve ark., 2010) bildirilmiştir.



Şekil 2.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in dağılımı EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization-IMI, 1996-www.eppo.org)

Etmen 1965-1971 yılları arasında ABD'nin Ontario eyaletlerinde sera üretimi de dahil tüm domates üretim alanlarında yıllık ortalama %5-10 arasında değişen oranlarda ürün kaybına neden olmuştur. Bu yıllarda üretici bazındaki ürün kaybı ise %60'nin üzerinde görülmüştür (Sherf ve Macnab, 1986). Fidelerin tarlaya şaşırtılması esnasında enfektelenen domates bitkilerinde %31-83 oranında enfeksiyon oluştuğunda, ortalama meyve ağırlığında 13 g, toplam ürün miktarında ise %46 oranında azalma olduğu bildirilmiştir (Chang ve ark., 1992b). Yapılan diğer bir çalışmada, fideler tarlaya şaşırtılmadan önce etmen tarafından enfektelendiğinde ise çevre şartlarına bağlı olarak ürün miktarının %63-93 oranında azaldığı saptanmıştır (Ricker ve Riedel, 1993).

Gram pozitif bakteriler grubuna giren etmen Yeast Dekstrozu Kalsiyum Karbonat (YDC) agar besi yeri kullanılarak kolaylıkla izole edilebilir. Patojen Nutrient agar besi yerinde 5 gün içinde sarı renkli, düzgün kenarlı karakteristik koloniler oluşturmaktadır (Gitaitis, 1991). Patojen akşam safası (*Mirabilis jalapa*) bitkilerinin yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonuna neden olmakta, dört günlük domates fidelerinin yapraklarında oluşturduğu beyazımsı siğil benzeri yapılar tanıda kullanılmaktadır (Gitaitis, 1990; Chaldecott ve Preece, 1983). Ayrıca yarı seçici besi yeri olan SCM besi yerinde etmenin oluşturduğu koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler tanıda kullanılan bir diğer önemli kriterdir (Fatmi ve Schaad, 1988). Ftayeh ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domates bitkilerinden ve tohumlardan izolasyonunda yeni bir besi yeri geliştirilmiştir. BCT (domates bakteriyel kanser) aynı zamanda *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*, *nebraskensis* ve *tessellarius* patojenlerinin izolasyonunda da kullanılmaktadır.

Bakterinin optimum gelişme sıcaklığı yaklaşık 26 °C'dir. Bakteri besi yerinde uzun süre saklanabilir ve kolay ölmez. Nutrient agar besi yerinde 13 °C'de en azından 58 ay yaşamını devam ettirebilir. Bu bakterinin sarı, beyaz veya pembe renkli kolonileri vardır ancak en virulent koloniler genellikle sarı olanlardır (Sherf ve Macnab, 1986).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in patojenik özelliklerinin *pat-1* geni üzerinde toplandığı belirlenmiştir (Jahr ve ark., 1999). *Pat-1* genine sahip olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatları virulent, sahip olmayanlar ise avirulent olarak belirlenmiştir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in

virulent izolatu NCPPB382, pCM1 ve pCM2 plazmidlerini taşımaktadır (Gartemann ve ark., 2003). Her iki plazmid de selülozla kodlanan bir gen ihtiva eder. pCM1’de *CelA*, pCM2’de proteaz *Pat-1* virülenslik faktörleri mevcuttur. Aynı zamanda bu genler patates bitkisi patojenlerinden *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*’ta da bulunmaktadır. Chalupowicz ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada da, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in patojenitesinin kromozomal *chp/tomA* bölgesi üzerinde bulunan serin proteaza ve plazmidlere bağlı virülenslik faktörlerinden kaynaklandığı bulunmuştur. Çalışmada, enfeksiyon boyunca *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in kolonize olması ve hareketliliği yeşil bir fluoresan protein ırkı ile (GFP) tespit edilmiştir. GFP ile ifade edilen plazmid bitkide en az bir ay boyunca sabit kalmıştır. İnokulasyonun yapıldığı bitki gövdeleri mikroskopla incelendiğinde, ksilem dokusuna tamamen yayıldığı ve özellikle protoksilem dokusunu tercih ettiği görülmüştür. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in virulent izolatu NCPPB382’nın 15 gün sonra geniş bir şekilde sistemik olarak yayıldığı da gözlenmiştir. Buna rağmen, pCM1 ve pCM2 plazmidlerine sahip olmayan *Cmm100* ve *chp/tomA* PAI bölgesi bulunmayan *Cmm27* izolatlarında ise inokulasyon bölgesinde yayılma sınırlı olmuştur. Elde edilen sonuçlar *chp/tomA* bölgesindeki virülenslik faktörlerinin ve plazmidlerin, domates bitkisinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in yayılmasında ve kolonize olmasında etkili olduğunu göstermektedir.

Hastalığa karşı mücadelede dayanıklı çeşit kullanımı en etkin ve çevreci yöntem olarak görülmektedir. Domates bakteriyel solgunluk hastalığına domatesin yabani türü *Solanum pimpinellifolium*, *S. hirsutum* ve *S. peruvianum* dayanıklıdır. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM) tarafından yürütülen bir çalışmada, BATEM gen havuzundaki hatların dayanıklılık durumlarının belirlenmesi ve ıslah programlarına dahil edilmesi amaçlanmıştır. Araştırmada yurtdışından temin edilen LA 2157 ve LA 407 dayanıklı yabani materyalleri ile enstitü gen havuzunda bulunan 3 saf hat (BATEM 1, 2, 3) kullanılmıştır. Testlemelerde inokulasyon yöntemi olarak gövdeye enjeksiyon metodu uygulanmıştır. İnokulasyondan 8-10 gün sonra enfekteli fidelerde oluşan solgunluk belirtileri ve iletim demetlerinde oluşan kahverengileşmelere göre çalışma sonucunda, yurtdışından temin edilen 2 materyalin dayanıklılığı teyit edilmiş, enstitü hatları ise hassas bulunmuştur (Kabaş ve ark., 2009).

Domateslerde bakteriyel solgunluğa dayanıklılıkla ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise, *Lycopersicon hirsutum* LA407'deki dayanıklılığın seviyesinin, kontrol grubu *L. peruvianum* LA2157'den farklı olmadığı belirlenmiştir. LA407'den gelen dayanıklılık hem açık alanda hem de serada yapılan denemelerde BC₂S₄ (IBC) populasyonu ile kazanılmıştır. Arazi ve sera koşullarında yürütülen çalışmalarda dayanıklılık durumları arasında doğrusal bir korelasyon bulunmuştur. Dayanıklılıktaki çevresel ve genetik varyasyon için IBC populasyonunda genetik olarak aktarılan bileşenler kullanılmıştır. Bu değerler 0,34-0,85 arasında değişmiştir. Çalışma sonucunda, teorik olarak *L. esculentum* genomik içeriğinin %87,5'ine sahip olduğu bilinen, IBC populasyonundan gelen iki hat IBL 2353 ve IBL 2361 dayanıklılığın kaynağı olarak teşhis edilmiştir (Francis ve ark., 2001).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in tanılanmasında çeşitli tanı testleri kullanılmaktadır. Gitatis ve Beaver (1990) tarafından yapılan tanı çalışmalarında, Kanada, Çin, Tayland, Tayvan ve Amerika'dan elde edilen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının yağ asit metil ester profilleri analiz edilmiş olup, 45 izolatın yağ asit metil esterlerinin birbirine benzer olduğu ve C12-C17 zincirlerinin varlığı ile karakterize edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, yarı seçici besi yerinde gelişen morfolojik olarak Gram pozitif bakterilere benzeyen farklı izolatlar da kullanılmıştır.

Serolojik bir yöntem olan ELISA ile etmen 10³-10⁴ hücre/ml gibi düşük oranlarda bile saptanabilmektedir. Çetinkaya-Yıldız, (2007)'ın bildirdiğine göre Omer (2002) Agdia marka poliklonal antiserum ve alkaline fosfatla etiketli konjugat kullanarak yaptığı DAS-ELISA'da tespit sınırı 10⁷ hücre/ml olarak saptamıştır.

Santos ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığı CM₃-5'CCT CGT GAG TGC CGG GAA CGT ATC 3' ve CM₄-5'CCA CGG TGG TTG ATG CTC GCC AGA T 3' primerleri kullanılarak tespit edilmiştir. Louws ve ark. (1998) tarafından ise CMM-5 (GCGAATAAGCCCATATCAA) ve CMM-6 (CGTCAGGAGGTTTCGCTAATA) primerleri kullanılarak rep-PCR ile patojen izolatların moleküler tanısı yapılmıştır.

Doğal olarak enfekteli ve suni olarak zarar görmüş domates tohum lotlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in belirlenmesi için kullanılan birkaç tohum ekstraksiyon prosedürü geliştirilmiştir. Hadas ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 3 farklı besi yerine ekim (CNS, mSCM, D₂ANX) ve tohumdan direk PCR ve BIO-PCR yöntemleri ile belirlenmiştir. 10000 adet tohum içerisinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile enfekteli 1 tohum BIO-PCR yöntemi ile saptanmıştır. Çalışma sonucunda, suni olarak enfekteli tohumlar ve hastalık şiddeti arasında yüksek bir ilişki ($R^2=0,945$) tespit edilmiştir. 58 hücre/g ile enfekteli tohumlar sera koşullarında hastalığa sebep olmazken, 1000 hücre/g'a sahip lotlar 2000 bitkinin 78'inde hastalık yapmıştır.

Leon ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, immunomagnetic seperation (IMBs) yöntemini kullanmışlardır. Farklı IMBs konsantrasyonu ve iki antiserum kullanılarak yapılan çalışmada, 1/3200 oranında sulandırılan 10^6 IMBs/ml polyclonal antiserum ile kaplama yapılarak, 10^3 - 10^0 hücre/ml ile inokule edilen bakteriler %50'den daha yüksek oranda tespit edilmiştir. IMBs yöntemi yüksek hassasiyete sahip doğal olarak enfekteli domates tohumlarından *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in izolasyonunda, yarı seçici besi yerlerinde hızlı bir şekilde izolasyonda ve tanı laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilen bir yöntemdir.

Simptomsuz domates tohumlarından ise, TaqMan çalışması yapılarak 2 saat içerisinde DNA ekstraksiyonu ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* belirlenmiştir (Zhao ve ark., 2007).

Kokoskova ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, PTA-ELISA, PABs Neogen Europe Ltd (UK) IFAS ve PCR tekniklerini kullanılarak 15 bitki patojenini ve 4 saprofitik bakteriyi tanılamışlardır. IFAS tekniği ile *Pantoea dispersa*, *P. agglomerans* ve *Rahnella aquatilis*, PTA-ELISA ile de *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pectobacterium atrosepticum* ve *Dickeya* sp. türleri tanılanmıştır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ise PCR ile Dreier'in yöntemine göre 30 s 65°C sıcaklıkta tanılanmıştır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, sırasıyla 10^5 hücre/ml ve 10^3 hücre/ml konsantrasyonlarında iken PTA-ELISA ve IFAS teknikleri ile

tanılanabilmiştir. PCR tekniğinde ise 10^3 hücre/ml konsantrasyonunda iken tanılanmıştır.

Milijasevic ve ark. (2009a) tarafından yürütülen bir çalışmada domates tohumlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in belirlenmesi için öğütme ve ıslatma şeklinde 2 yöntem geliştirilmiştir. Sağlıklı 2000 ve 5000 adet tohuma 1, 5 ve 10 adet enfekteli tohum eklenerek yapılan çalışmada, suni besi yerine izolasyon, tohumdan direkt PCR, NBY besi yerinde geliştirilen bakteri ile yapılan BİO-PCR ve PCR olmak üzere 4 farklı yöntem kullanılmıştır. Öğütme ve ıslatma işlemleri ile 1, 5 ve 10 adet enfekteli tohum içeren 2000 adetlik örnekte 5 tekrerrün 4'ünde 3 farklı metod ile (seçici ortam, direkt PCR ve BİO-PCR) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* belirlenmiştir. 5000 tohum başına 5 enfekteli tohumun olduğu örnekte ise *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 4 farklı yöntem ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda öğütme ve ıslatma işlemleri arasında fark olmadığı, uygulanan 4 ekstraksiyon yöntemi ile de patojenin belirlenebileceği gözlenmiştir.

Benzer bir çalışma Mraz ve ark. (2011) tarafından 10 adet domates tohumunda ELISA, IF ve PCR yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Tohum çeşitlerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in belirlenmesinde en etkili yöntem PCR olmuştur. Kök, gövde ve yapraklardan alınan örneklerin hepsinde PCR ile patojen belirlenirken, IF ve ELISA yöntemlerinde ise sadece yaprak örneklerinde belirlenmiştir. Daha önceden *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının belirlenemediği 4 adet tohum çeşiti, 10^8 hücre/ml oranında 2 referans *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatında (BCCM/LMG 7333 ve 5727) 48 saat bekletilerek inokulasyona tabi tutulmuştur. Ezilen tohumlardan bakteri DNA'sının izolasyonu ise DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak yapılmıştır.

Domates yapraklarındaki hidadotlar *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için oldukça etkili enfeksiyon noktalarıdır. Carlton ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, inokulasyondan yaklaşık 2 hafta sonra klorotik lezyonların yaprakçıkların uçlarında olduğu belirlenmiştir. Zamanla yaprak kenarları boyunca lezyonların geliştiği ve nekrotikleştiği görülmüştür. Histolojik gözlemler patojen popülasyonunun ilk olarak stomaların altında uzanan interselüler yüzeylerde

geliştiğini göstermiştir. İnokulasyondan 7 gün sonra bakterinin ilk olarak kenar damarlar içerisinde geliştiği, 14 gün sonra damarlarda görüldüğü ve 21 gün sonra ise dokularda çöküş meydana getirdiği görülmüştür.

Medina-Mora ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in aerosoller ve direkt uygulanması ile domates meyvelerinde kuş gözü simptomlarının oluşumu izlenmiştir. Çalışmada 10^8 hücre/ml'lik *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 1-2 kez çiçeklere inokule edilmiştir. 3 farklı gün 2 kez inokule edildiğinde maksimum etki (%80) ve şiddetli meyve lekesi (12 leke/meyve) tespit edilmiştir. Çiçeklerin tam açtıktan 2 gün sonra enfeksiyona daha duyarlı olduğu da belirlenmiştir. Ayrıca bir fırça ile meyve yüzeyine uygulandığında da meyve lekesinin oldukça fazla olduğu (≤ 456 leke/meyve) görülmüştür. Domates gövdelerine inokulasyon uygulamalarında avirulent olan ve akşam safası (*Mirabilis jalapa*) bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyona sahip olduğu belirlenen izolatların bile çok düşük seviyede de olsa meyve lekesi oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada geliştirilen inokulasyon metodlarının, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatları arasındaki konukçu-patojen interaksiyonunu gözleme fırsatı verdiği ayrıca kaliteli enfeksiyon oluşumuna da yardımcı olduğu kanaatine varılmıştır.

Domates bakteriyel solgunluk hastalığı, bitkiden bitkiye efekteli tohumlarla ve mekanik olarak yayılmaktadır. Üretim alanlarında oluşan yaralar patojenin yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak endofitlerde olduğu gibi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bitkilerde gelişimi ve yayılması üzerinde çevresel faktörlerin etkisi tam olarak açıklanamamaktadır. Xu ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, virulent biyoluminesans üreten BL-Cmm 17 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatı, domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in görüntülenmesini sağlamıştır. Çalışmada, yaralar yoluyla fidelerdeki bakteriyel enfeksiyon düşük (%45) ve yüksek (%83) oransal nemde karşılaştırılmıştır. Bakteri hızlı bir şekilde inokulasyon noktasında çoğalarak gövde boyunca köklere ve sürgünlere taşınmıştır. Parlak renkler domates fidelerinin köklerinde oluşmuş, her iki nem oranında da kök gelişimi zayıflamıştır. Yüksek nem oranında fidelerde solma daha şiddetli görülmüştür. Çalışma sonucunda, ışık yoğunluğu ile bakteri popülasyonu arasındaki ilişki, bioluminesans üreten *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis izolatlarının bakterisitlerin ve konukçu dayanıklılığının etkisinin artırılmasında kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

Domates bakteriyel solgunluk hastalığına karşı etkili bir mücadele yöntemi olmadığından çok sayıda ülkede ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalık ile mücadelede yapılan çalışmalar incelendiğinde, Fatmi ve ark. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* doğal olarak enfekteli tohumlardan 5 saat boyunca 0,6 M hidroklorik asit (HCl), 20 dk boyunca %0,25 ve %0,50 asitli bakır asetat (ACA)'da, 52 °C'de 20 dk ve 56 °C'de 30 dk suda bekletilerek yok edilmiştir. Çalışmada çoğu uygulama tohumlar üzerindeki saprofitik bakteri florasını azaltmıştır. Ancak HCl ve 20 dk boyunca 52 °C'de %0,25 ACA uygulamalarının saprofitleri tamamen yok ettiği görülmüştür. Buna ilaveten uygulama yapılan tohumlardaki çimlenmenin çimlenme testleriyle değiştiği de görülmüştür. Çalışma sonucunda kurutma kağıdı testinde, 56 °C'de suda bekletme uygulaması hariç diğer tüm uygulamalarda önemli ölçüde çimlenmenin azaldığı da görülmüştür.

Özaktan (1991)'ın *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olduğu Domates Bakteriyel Solgunluk hastalığına karşı savaşım olanakları üzerine yaptıkları çalışmada, testlenen tohum uygulamaları arasında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı en etkili ve sorunsuz uygulamanın sıcak su uygulaması (54-56 °C/25 dk) olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca çalışmada meyve etli domates tohumlarının 72 saat süreyle fermentasyonunun *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'i elimine edebildiği saptanmıştır. Yapılan çalışmada fide uygulamalarında yapay enfekteli fidelerin köklerini streptomycin'e (1 g/l) daldırmanın hastalık çıkışı ve gelişimini başarıyla engelleyebildiği gözlenmiştir.

Hausbeck ve ark. (2000) arazi ve sera koşullarında bakterisitlerin etkilerini araştırmışlardır. Sera koşullarında, bakır hidroksit, bakır hidroksit/mancozeb, bakır hidroksit/mancozeb (spreyleme yapmadan 12 saat önce karıştırılmıştır), streptomycin ve streptomycin/bakır hidroksit uygulamaları pozitif kontrol grubundan farklı olmasa da, arazideki kontrole kıyaslandığında bitkilerin daha uzun süre canlı kalmalarını sağlamışlardır. 1995 ve 1996 yıllarında yürütülen çalışmada, mancozeb dışındaki tüm

uygulamalar kontrolle benzer verim sonuçlarını ortaya koymuştur. Ancak yapılan hiçbir uygulama meyve lekelenmelerini azaltmamıştır.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'e karşı antagonistik bakterilerin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, topraktan, rizosferden ve rizoplaneden izole edilen 178 adet bakteri izolatu kullanılmıştır. İzolatların hepsinin NBYA besi yerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in gelişimini engellediği, 2-30 mm arasında değişen inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmada, en etkili izolatlar Gram negatif olup domates köklerinde kolonize olan fluoresan *Pseudomonas*'lardır. Ayrıca saksı denemesinde tohum uygulaması şeklinde uygulanan 18 izolatin 3'ünün enfeksiyonu azalttığı, kök uygulamasını takiben tohum uygulaması şeklinde yapıldığında ise izolatların hepsinin enfeksiyonu tamamen engellediği görülmüştür (Boudyach ve ark., 2001).

Kekik, gazel otu, güvey otu, lavanta, biberiye, adaçayı ve fesleğen uçucu yağlarının *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, suni besi yerlerinde kekik, gazel otu ve güvey otu yağlarının düşük konsantrasyonlarının (85-300 µg/ml) her üç patojenin gelişimini tamamen engellediği, lavanta, biberiye, adaçayı ve fesleğen yağlarının ise 1000 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğu görülmüştür (Daferera ve ark., 2003).

Bitki aktivatörü acibenzolar-S-methyl (ASM)'in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bakteri gelişimi %68,2'den daha yüksek oranda bastırılarak hastalık %75 oranında azalmıştır (Soylu ve ark., 2003). ASM uygulanan bitkilerde peroksidaz (POX) ve glutathione peroxidase (GPX) enzimlerinin varlığı hastalığa dayanıklılığı artırmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, inokulasyonun yapıldığı bölgelerde her iki enzimde görülen artış sonucu dayanıklılığın geliştiği böylece hastalık gelişiminin baskılandığı belirlenmiştir.

Baysal ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada ise, domates bakteriyel solgunluk hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı bitki aktivatörü acibenzolar-S-methyl (benzo-[1,2,3]-thiadizole-7-carbothioic acid-S-methyl ester, ASM;Bion 50WG) kullanılmıştır. Çalışmada ASM uygulanmadan önce bitkilerde,

hastalık yoğunluğundaki artış (%76,3'den daha yüksek), düşük bakteriyel gelişim (%68,2'den daha düşük) ile bağlantılı bulunmuştur. Çalışma sonucunda ASM'nin etkisinin peroksidaz (POX) ve kitinazın aktivitesindeki değişikliklerle belirlendiği, ASM uygulanan bitkilerdeki dayanıklılığın POX ve kitinazın aktivitesindeki artış ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Sera koşullarında domates bakteriyel solgunluk hastalığına karşı farklı biyolojik uygulamaların yapıldığı bir çalışmada, *Bacillus subtilis* (Quadra 136), *Trichoderma harzianum* (RootShield), lizozim, vermikompost, *Rhodosporidium diobovatum* (S33) ve *B. subtilis* (Quadra 137)'in sırasıyla 0,3 g/l, 0,6 g/l, 10 g/l, 1×10^9 hücre/ml ve 0,5 g/l konsantrasyonlarında etkili oldukları görülmüştür (Utkhede ve Koch, 2004).

Bacillus pumilus INR7, *Bacillus pumilus* SE34, *Bacillus pumilus* T4, *Bacillus subtilis* GBO3, *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a ve *Brevibacillus brevis* IPC11 kullanılarak yapılan bir çalışmada da testlenen PGPR (Bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler-Plant Growth Promoting Rhizobacter) izolatlarından yalnızca 3'ü (IN937a, GBO3 ve IPC11) tohum çimlenmesini ve gelişimini artırmıştır. Sera koşullarında yürütülen çalışmada bu 3 izolatın hastalık gelişimini azalttığı da belirlenmiştir (Girish ve Umesha, 2005).

Yapılan bir çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı deniz kaplumbağası *Caretta caretta* yağı kullanılmıştır (Baysal ve ark., 2005). Petri çalışmasında etkili olmayan yağ, sera koşullarında da denenmiş olup, inokulasyondan 7 gün sonra bakteri gelişimini %50,7'den daha yüksek oranda düşürdüğü ve hastalık gelişimini azalttığı görülmüştür. Gaz kromotografi analizi ile yağın eicosapentaenoic asit ve docosaheptaenoic asit bileşenlerine sahip olduğu ve bu bileşenlerin enzim aktivitesini yükselttiği ve patojene karşı da bitkide dayanıklılığı artırdığı düşünülmektedir.

Yapılan diğer bir çalışmada ise, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı HuwaSan TR 50 isimli bitki aktivatörü kullanılmıştır. Laboratuvar koşullarında, domates tohumlarında ve fidelerinde tek başına ve kombine edilerek *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in mücadelesindeki etkisi araştırılmıştır. Deneme sonuçları göstermiştir ki, petrilerde gerçekleştirilen testlerde

HuwaSan TR 50, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (%61,3)'ye karşı önemli oranlarda inhibisyon oluşturmıştır. Tohumlara yapay olarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* inokulasyonundan sonra bitki aktivatörü uygulandığında, HuwaSan TR 50 ile yapılan muamelede % 73,5'lik bir engelleme etkisi saptanmıştır. Bitki aktivatörlerinin domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in engellenmesindeki rolü incelendiğinde, HuwaSan TR 50 'nin bakterisit etkili ChampFormula ile birlikte kullanıldığında etmene karşı % 80,0 oranında etkili olduğu saptanmıştır. Domates bitkilerindeki total protein ve peroksidaz enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde Peroksidaz enzimi için en iyi aktivite, tek başına HuwaSan TR 50 ve ChampFormula ile kombinasyonda uygulanan gruplarda gözlenmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, HuwaSan TR 50 bitki aktivatörü sınıfında yer alabileceği düşünülmektedir (Türküsay ve Tosun, 2005).

Tanovic ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, *Verticillium albo-atrum* ve *Rhizoctonia* sp. patojenlerine karşı 17 adet uçucu yağın etkinliği araştırılmıştır. *In vitro* test şeklinde yürütülen denemede 7 gün boyunca patojenler uçucu yağ ile muamele edilmiştir. 0,65 µl/ml konsantrasyonundaki uçucu yağların hepsinde patojenlerin gelişimi kısmen veya tamamen engellenmiştir. Tarçın, kekik, rezene ve reyhan uçucu yağları 0,16 µl/ml konsantrasyonunda antifungal ve antibakteriyel etki göstermiştir. Çalışma sonucunda testlenen uçucu yağların bazılarının toprak kökenli patojenlerin mücadelesinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Sera koşullarında yürütülen bir çalışmada ise, bazı kimyasal bileşenlerin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerindeki *in vitro* ve *in vivo* etkileri araştırılmıştır. 7 adet antibakteriyel bileşen (bronopol, bakır sülfat, kasugamycin, oxolinik asit, oxytetracycline, streptomycin ve 8-hidroksiquinoline) ve 3 adet kimyasal formülasyon (çinko ve bakır içeren oligoelement bileşen olan Antibak RZ, potasyum sabunu Orthopol, Param) ve tüm bu maddelerin kombinasyonu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı test edilmiştir. *In vitro* uygulamalar antibakteriyel maddelerin en düşük engelleme konsantrasyonunun (MIC) 4-8 µg ml⁻¹ arasında değiştiğini göstermiştir. Kimyasal formülasyonların MIC değerleri ise 5-40 µl

ml⁻¹ arasında değişmiştir. Bakır sülfat içeren uygulamalar büyük ölçüde bitkiler üzerindeki hastalık simptomlarını azaltmıştır. Yapılan alışma sonucunda hiçbir uygulamanın hastalığı tam olarak kontrol altına alamadığı ancak 8-hidroksiquinoline+bakır sülfat kombinasyonunun sera koşullarında hastalığı kontrol etmede kullanılabilir olduğu ayrıca çevreye dost ve ürünlere uygulanan bakırın miktarını da azaltıcı etkiye sahip olduğu kanaatine varılmıştır (Leon ve ark., 2008).

Patlıcan yapraklarından elde edilen peptit ekstraktlarının, *Ralstonia solanacearum* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* gelişimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yaprak yüzeyindeki (ES) ve hücre duvarındaki (EP) peptitlerin %60'dan daha yüksek oranlarda patojenlerin gelişimini engellediği görülmüştür (Almeida ve ark., 2008). Benzer bir alışma Teixeira ve ark. (2006) tarafından yapılmış olup, bitki patojenlerine karşı dayanıklı olan "Samara" ve "Sunshine" biber çeşitlerinde hücre duvarı ekstraktlarından elde edilen anyonik ve katyonik peptitlerin in vitro koşullarda *Ralstonia solanacearum* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* gelişimini güçlü bir şekilde engellediği tespit edilmiştir.

Zanon ve Jorda (2008), sera ve laboratuvar koşullarında yürüttükleri 3 uygulama ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'i eradike etmeyi amaçlamışlardır. Birinci uygulamada, torf ve kum hastalığın olmadığı sağlıklı domates bitkileriyle karıştırılmıştır. Saksılar plastik torbalarla kapatılmıştır. 6 haftalık periyotta 2 farklı sıcaklık (25 °C ve 45 °C) denenmiştir. Yapılan uygulamada, 25 °C'de etki görülmezken, 4 hafta sonrasında 45 °C'de patojen elde edilememiştir. Suni olarak enfekteli toprak ve bitkilerle yapılan ikinci uygulamada, *Bacillus*, *Paenibacillus* ve *Brevibacillus* saprofit türlerinin gelişimi gözlenmiş ve *Bacillus subtilis* ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* arasında in vitro antagonizm görülmüştür. 3. uygulamada substrat ile dezenfeksiyona tabi tutularak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığına bakılmıştır. Suni olarak substrat ile inokule edilen platlerde 25 °C'de 4 hafta sonra, 45 °C'de 1 hafta sonra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* büyük ölçüde azalmıştır. Yapılan alışma sonucunda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in 4 haftaya kadar oda sıcaklığında canlı kalabildiği ve biofumigasyon, solarizasyon ve organik materyallerin eklenmesi gibi

farklı dezenfeksiyon tekniklerin ve ekolojik uygulamaların *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in yaşam süresini etkilediği görülmüştür.

Milijasevic ve ark. (2009b), 3 bakırlı preparat (bakır hidroksit, bakır oksiklorit, bakır sülfat), 2 antibiyotik (streptomycin ve kasugamycin) ve bir bitki aktivatörünün (ASM) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e etkilerini araştırmışlardır. Sera koşullarında yürütülen çalışmada, patojenin popülasyonunun azalmasında en etkili uygulama, Streptomycin antibiyotiği olmuştur. Hatta Streptomycin'in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in inokulasyon bölgesinden bitkiye yayılmasını tamamen durdurduğu görülmüştür. Bakırlı bileşikler, ASM, kasugamycin tek başına uygulandığında yeterince etkili olamamıştır. Bakırlı bileşikler içerisinde de en etkili bakır hidroksit olmuştur. Bunun yanında bakır hidroksit ile streptomycin kombinasyonunun patojen popülasyonunun düşmesinde çok büyük etkiye sahip olduğu da görülmüştür. ASM'nin inokulasyondan 3 gün önce uygulanmasında patojen gelişimi üzerinde daha etkili olduğu da yapılan çalışma sonuçlarına göre belirlenmiştir.

Besi yerinde ve toprakta yapılan bir çalışmada Streptomyces grubunda yer alan HL-12 izolatının *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e olan etkisi araştırılmıştır. Zhejiang Üniversitesi Kampüsü arazisinden elde edilen izolatın düşük Kadmiyum varlığında 24 saati takiben en yüksek engelleme oranına sahip olduğu görülmüştür (Yuan ve ark., 2009).

Benzer bir çalışma Pradhanang ve Collier (2009) tarafından yapılmıştır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürüne ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile inokule edilen ve doğal olarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile enfekteli domates tohumlarına hidroklorik asit (HCl) uygulaması yapılmıştır. %1'lik HCl solüsyonunda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürü canlı kalamamıştır. Çalışmada, 30 dk boyunca %1'lik HCl solüsyonunda tohumlar bekletilmiştir. Kontrol olarak asit uygulanmamış tohumlar kullanılmıştır. Asit uygulanmış (AT) ve asit uygulanmamış (NAT) tohumlar $7,7 \times 10^7$ - $7,7 \times 10^3$ hücre/g *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* popülasyonu ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan 12 ay sonra, asit uygulanmamış tohumlarda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* popülasyonu azalmazken, asit

uygulanmış tohumlarda popülasyon ciddi bir şekilde azalma göstermiştir. Çalışmada, 1 yıl sonra asit uygulanmış tohumlarda canlı bakteri kalmamıştır. Enfekteli domates tohumlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in kontrolünde asit uygulamanın etkisini belirlemek için suni olarak inokule edilen tohumlar inokulasyondan 15 gün sonra HCl ile muamele edilmiştir. Ayrıca çalışmada, doğal olarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile enfekteli tohumlarda HCl'nin etkisi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile aşırı derecede enfekteli domates meyvelerindeki tohumlar kullanılarak yapılmıştır. Tohumlar, 1) bir gece boyunca fermentasyona tabi tutulmuştur, 2) HCl ve enzim uygulamadan lapa haline getirildikten sonra 2 saat yıkanmıştır, 3) pektinaz uygulaması ile lapa haline getirildikten sonra 2 saat yıkanmıştır, 4) asit ekstraksiyonuna (7-10 dk %5'lik HCl solüsyonunda bekletildikten sonra suda yıkanmıştır) tabi tutulmuştur. Uygulanan ekstraksiyon metodlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* popülasyonunun sırasıyla 1) $7,6 \times 10^3$, 2) $6,4 \times 10^6$, 3) $6,5 \times 10^5$ ve 4) $2,4 \times 10^4$ hücre/g tohum oranında olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda asit uygulamasının *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'i tohumlardan tamamen elimine etmediği görülmüştür. Ayrıca herhangi bir uygulamada toz haline getirilen tohumlarda canlı *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* belirlenememiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'e karşı alternatif mücadele yöntemlerden biri olarak biyolojik mücadelede kullanılabilecek domates bitkisinin köklerinden ve rhizosferden elde edilen 303 adet Fluoresan *Pseudomonas* izolatu olduğu düşünülmektedir. Amkraz ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada rifampicin, nalidixic asit, ampisilin ve chloramphenicol ile muamele edilen 42 izolattan 28'inin köklerde kolonize olduğu görülmüştür. Bu 42 izolatla yapılan kotileden yaprak testinde 42 izolattan 8'inin hastalık oranını ve hastalık belirtilerini azalttığı görülmüştür. Daha sonra 8 izolat da sera koşullarında domates bitkisi ile teste tabi tutulmuştur. Tohum ve kök uygulamaları şeklinde yapılan testte tüm izolatların hastalık gelişimini önemli ölçüde engellediği tespit edilmiştir.

Çetinkaya-Yıldız (2007) domates bakteriyel solgunluk hastalığı ile mücadelede kimyasal mücadeleye alternatif olarak bitki büyüme düzenleyici rizobakterilerin (PGPR) kullanılma olanaklarını araştırmıştır. Adana, Antalya, Hatay, Osmaniye, Mersin

ve Muğla illerinden temin edilen 39 farklı toprak örneğinden 499 adet aday PGPR bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu isolatlar arasında en fazla fosforu çözme, azotu bağlama özelliklerine sahip 30 izolatu aday PGPR olarak seçilmiş olup, bu isolatlar arasında en etkili olan 8 izolatu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* tarafından neden olunan hastalığı baskılayabilme potansiyelleri *in vivo* saksı çalışmaları ile belirlenmiştir. Saksı çalışmaları sonucunda 3 izolatu ve kombinasyonları ile tohum denemeleri, 2 izolatu ve kombinasyonları ile tarla çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre PGPR isolatları ile muamele görmüş domates bitkilerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* tarafından neden olunan hastalık şiddetinin tarla koşullarında ortalama %43 oranında azaldığı belirlenmiştir.

Soykan (2010) yaptıkları çalışmada, yedi adet bitki aktivatörü ve organik/inorganik gübrelerin (Auxigro, EM1, Herbagreen, ISR-2000, Messenger, Protamin Cu, Regalia) bakteriyel solgunluk etmenine karşı etkinliğini araştırmıştır. Testlenen preparatlar kökten, yapraktan ve hem kök hem de yapraktan olmak üzere üç farklı şekilde bitkiye uygulanmıştır. Seradaki saksı çalışmalarında beş preparat (ISR-2000, Messenger, Auxigro, Herbagreen ve Regalia), açık alanda yapılan tarla çalışmasında sadece ISR-2000 hastalığa karşı etkili olmuştur. Bitki aktivatörü ile organik ve inorganik gübrelerin hem kökten hem de yeşil aksamdan kombinasyon şeklinde uygulanması ise hastalıkla mücadelede daha etkili bulunmuştur.

Tireng-Karut (2011) yaptıkları çalışmada, tohum kökenli inokulumun yok edilmesi veya azaltılmasında organik tarımda kullanılabilecek farklı tohum uygulamalarının etkinlikleri araştırmışlardır. Çalışmada, tohum uygulaması olarak antagonist bakteri, Serenade, ISR 2000, sodyum hipoklorit, üzüm sirkesi, elma sirkesi, sıcak su ve laktik asit denenmiştir. Ayrıca, uygulamaların tohumun çimlenme gücüne etkisi de araştırılmıştır. Yapılan tohum uygulamalarının tohumdaki bakteri popülasyonunu %77-100, bulaşık tohum sayısını %31-100 oranında azalttığı belirlenmiştir. Sodyum hipoklorit, üzüm sirkesi, elma sirkesi, sıcak su ve laktik asit uygulamaları başarılı tohum uygulamaları olarak saptanmıştır. Fakat sıcak su uygulaması tohumların çimlenme gücünü %12,5 oranında azaltmıştır. Ayrıca laktik asit ve sodyum hipoklorit uygulamalarında az sayıda olsa da tohumda bulaşıklık saptanmıştır. Sonuç olarak, uygulamaların etkinliği ve çimlenme düzeyleri dikkate

alındığında organik tarım yetiştiriciliğinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı tohum uygulaması olarak üzüm sirkesi ve elma sirkesi uygulamalarının daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kasselaki ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ise, asitlendirilmiş nitrit, antagonistic *Bacillus* spp. ve kompost ekstraktlarının *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Uygulamaların etkisi tohum dezenfeksiyon yöntemi ile yapılmıştır. 10 dk boyunca 300 mmol l⁻¹ asitlendirilmiş nitritte bekletilen tohumlarda %98 oranında etki gözlenmiştir. Bakır hidroksit, kompost uygulamalarının hepsinin ve bazı *Bacillus* türlerinin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* gelişimini %100 oranında engellediği görülmüştür.

Talibi ve ark. (2011), Fas'tan toplanan bitkilerin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı antibakteriyal etkilerini incelemiştir. *In vitro* test şeklinde yapılan çalışmada 15 familyaya ait 40 tıbbi ve aromatik bitkinin etkinliğine bakılmıştır. Çalışma sonucunda testlenen 40 bitkinin hepsinin, 5-50 mm arasında değişen oranlarda oluşturdukları inhibisyon zon ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in gelişimini engelledikleri görülmüştür. En etkili bitkilerin *Rubus*, *Anvillea* ve *Pistacia* cinsinde yer aldığı belirlenmiştir. Bu bitki ekstraktlarıyla muamele edilen tohumlarda çimlenme oranının kontrole oranla oldukça yüksek olduğu, ayrıca bitki ekstraktı uygulanmadan önce suni olarak tohum yüzeyi bakteri ile kaplandığında yüzeydeki bakteri oranının da ekstraktlar ile azaldığı tespit edilmiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* patojenlerine karşı mücadele yöntemlerinden solarizasyonun etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, tek başına solarizasyonun yanında metam sodyum, hidrojen peroksit+benzoik asit kombinasyonunun etkisi araştırılmıştır. 2009 yılı Temmuz-Agustos aylarında Muğla Ortaca'da yapılan çalışmada solarizasyon öncesi her parsel *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ile suni olarak bulaştırılmıştır. Solarizasyon periyodu boyunca Metam sodyum bir kez uygulanırken hidrojen peroksit+benzoik asit 2 farklı dozda 2 kez uygulanmıştır. Çalışma sonucunda tek başına solarizasyonun patojenlerin gelişimini

baskılamadığı, 300 l/ha dozundaki hidrojen peroksit+benzoik asit uygulamasının ise en yüksek etkiye sahip olduğu görülmüştür (Yüce ve ark., 2011).

2.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Tohum, Toprak ve Bitki Artıklarındaki Latent/Epifitik Yaşam Süresinin Saptanması ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* sistemik yayılan bir hastalık etmeni olması nedeniyle genelde enfekteli tohumlarla taşınmakta, ayrıca hastalıklı bitki artıkları ve bulaşık topraklarla gelecek üretim sezonuna aktarılacak büyük ürün kayıpları meydana getirebilmektedir. Chang ve ark. (1991) tarafından yapılan domates bakteriyel solgunluk hastalık etmeninin epidemiyoloji çalışmasında, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in rifampicin'e dayanıklı (Rif^r) izolatları kullanılmıştır. Çalışmada budama yapılan fideler rifampicin'e dayanıklı (Rif^r) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaştırılmıştır. 9-13 gün sonra belirtiler görülmeye başlanmıştır. Hasattan bir hafta önce üretim alanlarındaki sistemik olarak enfekteli bitkiler yaklaşık %10 artmıştır. Dikimden yaklaşık 35-42 gün sonra sağlıklı bitkilerde belirtiler görülmeye başlanmıştır. Çalışma sonucunda, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* yaralanma veya budama yoluyla yayıldığı için domates bakteriyel solgunluk hastalığının bir kültürel uygulama hastalığı olduğu kanaatine varılmıştır. Ayrıca çalışmada, Midwest'te %0,01-0,05 (1000 fide başına 1-5 hastalıklı tohum) gibi düşük bir tohum bulaşma oranının da hastalığı başlatma yeteneğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bryan (1930) etmenin iletim sistemi yardımıyla tohumları sistemik olarak infekte ettiğini ve embriyoda bulunduğunu belirtirken, Patino-Mendez (1964) etmenin tohumları tohum kabuğu veya tohum zarından geçerek enfekte ettiğini, tohum zarının en içteki hücrelerine doğru hareket ettiğini ancak embriyoya girmediğini saptamıştır. Bryan (1930) doğal enfekteli tohumlarda bakterinin tohuma geçişinin %1-5, yapay enfekteli tohumlarda %21-40 oranında olduğunu saptarken, Strider (1967) yaptıkları çalışmada tohuma geçme oranının %0,25-81 arasında değiştiğini, ancak %1 oranında tohuma geçişin tarlada %54 oranında domates bitkisinin enfeksiyonuna neden olabileceğini belirtmiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in diğerk bir inokulum kaynağının toprak olduğu ve patojenin toprakta belirli koşullarda yaşamını sũrdũrebildiđi Byran (1930) tarafından bildirilmiştir. Yapılan alışmada, Washington ve New York'da etmenin 11 ay boyunca enfekteli toprakta canlı kalabildiğini belirlemiştir. Çetinkaya- Yıldız (2007)'in bildirdiğine gĩre, Ciccarone ve Carili (1948)'de yaptıkları çalışmada İtalya'da etmenin toprakta dĩrt yıl sũreyle yaşayabildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in topraktaki yaşam sũresi ũzerinde belirli koşulların etkili olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Bryan, 1930; Strider, 1967; Basu, 1970). Yapılan bir çalışmada, inokulasyondan 8 ay sonra hava ile kurutulmuş topraktan etmen geri izole edilemezken, 2 °C'deki nemli toprakta 18-30 ay sũre ile canlı ve virũlent kalabildiği saptanmıştır (Strider, 1967). Basu (1970), topraktaki %2,7 ile 21 arasındaki nem değişikliğinin patojenin canlılığını etkilediğini belirlemiştir.

Çeşitli araştırcılar, kışı bulaşık bitki artıklarında geçiren epifitik *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populasyonunun primer inokulum kaynağı olarak rol oynayabileceğini bildirmektedirler (Chang ve ark., 1992a; Gleason ve ark., 1991; Fatmi ve Schaad, 2002). Gleason ve ark. (1991), toprak yũzeyinde kalan bulaşık bitki artıklarında etmenin en az 24 ay boyunca canlı kalabildiğini, toprağa gĩmũlen bulaşık bitki artıklarında ise 7 ay boyunca canlılığını sũrdũrdũđũnũ belirlemişlerdir. Basu (1970) yaptığı çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşık domates yapraklarında toprak sıcaklığı -20 °C iken en az 36 hafta canlı kalabildiğini bildirmiştir. Patojen toprak sıcaklığı 5-35 °C iken 3 haftadan daha fazla canlı kalamamıştır. Farklı araştırcılar tarafından yapılan çalışmalarda, toprak yũzeyine bırakılan domates gĩvdelerinde, gĩmũlenlere oranla organizmanın daha uzun sũre canlılığını koruduğu belirlenmiştir (Chang ve ark., 1992b; Fatmi ve Schaad, 2002). Domates ũretim alanlarında domates bakteriyel solgunluk hastalığının gelişmesinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in inokulum kaynakları ile ilgili yapılan bir çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşmasının, kış mevsimini canlı geçirmesinin, ũretim alanlarında alternatif konukçularına ve konukçusu olmayan bitkilere yayılmasının rifampicin'e dayanıklı (Rif^r) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatları ile olduğu belirlenmiştir (Chang ve ark., 1992a). Sera koşullarında yũrũtũlen çalışmada, dũřũk yoğunluktaki bakteri tohumlardan

fidelere bulaştırılmıştır. Daha sonra fideler üretim alanlarına dikilmiştir. Hasat edilen meyvelerdeki tohumlarda Rif⁺ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* yoğunluğunun 10²-10⁵ hücre/g tohum oranında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada, enfekteli domates yığınlarında Rif⁺ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in yaşam süresinin, toprağa gömülenlerle kıyaslandığında toprak yüzeyinde kalanlarda daha uzun süreli olduğu görülmüştür. Toprağın 10, 20 ve 30 cm derinliklerine gömülen örneklerde Rif⁺ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* popülasyon yoğunluğu aynı oranda azalmıştır. Çalışmada, alternatif konukçu bitkilerde ve konukçusu olmayan bitkilerde Rif⁺ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* popülasyon yoğunluğu *Solanaceae* bitkilerinde (*Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum melongena*, *S. nigrum*, *S. tuberosum*) 0-10⁹ hücre/g arasında, *Solanaceae* familyasına ait olmayan yabancı otlarda ise (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Xanthium saccharatum*) 0-10³ hücre/g arasında değiştiği görülmüştür. *Solanaceae* familyasına ait olmayan bitkilerin yaprak yüzeylerindeki Rif⁺ *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* popülasyon yoğunluğunun domates bitkisine nazaran oldukça düşük olduğu, ayrıca bu bitkilerde ikincil enfeksiyonların simptomlarının da görülmediği tespit edilmiştir. Hassas (Heinz 1810) ve kısmen dayanıklı (Heinz 7417) domates çeşitlerinin yaprak yüzeyinde 10⁷-10⁹ hücre/g popülasyon yoğunluğu da bu tespiti desteklemiştir. Hassas ve dayanıklı domateslerde 10⁶ ve 10⁷ hücre/g yoğunluğu aşmadıkça ikincil enfeksiyon simptomları görülmemiştir. Aynı zamanda ikincil enfeksiyon simptomların ilk olarak daha hassas olan çeşitte görüldüğü de belirlenmiştir.

Domates bakteriyel solgunluk hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in yaşam süresi ve yarı yaşam süresi yarı seçici bir besi yeri kullanılarak enfekteli bitki artıkları içerisinde belirlenmiştir. Çalışma, Fatmi ve Schaad (2002) tarafından California, Ohio ve Fas'da doğal arazi koşulları altında yapılmıştır. Çalışılan tüm lokasyonlarda toprak yüzeyine bırakılan domates gövdelerinde, gömülenlere oranla organizma daha uzun süre canlılığını korumuştur. Toprak yüzeyine bırakılan domates gövdelerinde patojen ABD'nin Ohio, California eyaletlerinde ve USA'da 314 gün, MelkZhar'da 194 gün, Ait Melloul ve Fas'da 132 gün canlılığını sürdürmüştür. Toprağa gömülenlerde ise patojen Ohio'da 314., California'da 240., MelkZhar ve Ait Melloul'da

60. güne kadar canlılığını sürdürmüştür. Yine yapılan çalışmada patojenin yarı yaşam süresi ise toprak yüzeyine bırakılan gövdelerde ABD’de 23,2-24,8 gün, Fas’da 7,8-12,3 gün arasında değişmiştir. Buna rağmen toprağa gömülenlerde ise ABD’de 14,0-16,7 gün, FAS’da 3,7-9,5 gün arasında değiştiği görülmüştür. Çalışma sonuçları, bitki artıklarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in yaşam süresinin oldukça uzun olduğunu ve coğrafik lokasyonun ve toprağa bırakılma pozisyonunun etkili olduğunu göstermektedir.

Patojen ayrıca çeşitli yabancı otlarda, değişik malzemeler (fide saksısı, oluk, vb), sera konstrüksiyon malzemeleri ve çeşitli aletler üzerinde de yaşamını devam ettirebilmektedir (Gitaitis ve Beaver, 1990; Gleason ve ark., 1991; Gleason ve ark., 1993). Ayrıca küçük alanlarda hastalık yayılımı rüzgar, yağmur, böcekler, kültürel işlemler esnasında kullanılan alet ve ekipmanlar ile insanlar tarafından olurken, geniş alanlarda yayılım tohum ve fidelerle olmaktadır. Özellikle tüylerin kırılma noktaları patojen girişi için önemlidir. Kumlu yapıya sahip topraklarda, organik yapılı topraklara göre daha şiddetli enfeksiyonlar görülmektedir. Kuşgözü adı verilen meyve enfeksiyonları genelde yağmurlama sulama sonucu ıslak kalan meyvelerde görülmektedir. Damlama sulamanın yapıldığı seralarda ise bu kuş gözü semptomu çok nadir olarak gözlenmektedir (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008).

2.3. Domates Fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in Epifitik Popülasyonunun Belirlenmesi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Gitaitis ve ark. (1991) semptomsuz domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in varlığını belirlemişlerdir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolasyonu, fidelerden alınan örneklerin, %100 etanol ile yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulması ve yarı seçici (mCNS) besi yerinde geliştirilmesiyle yapılmıştır. Sera koşullarında yürütülen testlerde, bakterinin köklere doğru yayılması inokulasyondan sonra 1-3 gün arasında olmuştur. İzolasyon, inokulasyondan 7 gün sonra inokulasyon noktasının 10 cm aşağısından gövde parçaları alınarak yapılmıştır. Güney Georgia’da 24 araziden toplanan 24 000 fideden yalnızca 3’ünde mCNS besi yerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’e rastlanmıştır. Yapılan ELISA testi ile *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis'in varlığı teyit edilmiştir. Ayrıca Gaz kromotografisi ile de bakterilerin yağ asit profilleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmada bitki dokularından izolasyonda 1×10^8 hücre/ml bakteri yoğunluğunun yeterli olduğu ve inokulasyondan 7 gün sonra simptomsuz fidelerde ortalama *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* yoğunluğunun $1,7 \times 10^8$ hücre/cm olarak geliştiği görülmüştür.

Çetinkaya-Yıldız (2007)'nin bildirdiğine göre Gleason (1993), antiserum ile kaplanmış ELISA çukurlarına direkt bitki gövdesinden özsuynun sıkılması veya gövdenin batırılması yöntemlerini kullanarak simptomsuz bitkilerde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığını belirlemişlerdir. Fakat bu çalışmaların patojenin canlılığı konusunda bilgi vermemesi ve sonuçları teyit etmek için kültür olmaması çalışmaların sınırlayıcı yönü olarak bildirilmiştir. Benzer şekilde, Gitatis ve ark. (1995) simptomsuz bitkilerde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının ELISA testi ile belirlenebileceğini bildirmişlerdir (Çetinkaya-Yıldız, 2007). Omer (2002), BIO-PCR testi ile hastalık semptomu görülmeden bile patojenin tespit edilebileceğini bildirmiştir. Bitkinin erken gelişme devrelerinde özellikle bitki semptom göstermediğinde ve ürün tohum üretimine yönelik olduğunda patojenin tespit edilmesi için BIO-PCR yöntemini önermiştir (Çetinkaya-Yıldız, 2007).

Yapılan bir çalışmada, domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığı BIO-PCR metodu kullanılarak yapılmıştır. Türe spesifik CMM5 ve CMM6 primerleri kullanılarak koloniler tespit edilmiştir. Çalışmada uygulamadan 3 gün sonra örneklerin %95'inde, inokulasyonun yapıldığı bölgeden 8 cm uzaklıkta bakterinin varlığı tespit edilebilmiştir. Yaklaşık 40 cm uzunluğundaki bitkiler 9 gün sonra tamamen bakteriden etkilenmiştir. Çalışma sonuçları, BIO-PCR metodunun, enfeksiyonun ilk aşamasında bile patojenin varlığını tespit edebileceğini ve sağlıklı domates bitkilerine patojenin yayılmasını önlemede kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Burokiene, 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Tokat ili Merkez, Niksar, Erbaa, Turhal ve Pazar ilçelerinde domates üretim alanlarındaki hastalıklı domates bitkilerinden elde edilen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatları oluşturmaktadır. Çalışmalarda Pozitif Kontrol olarak YY-2 izolatı (2010 yılında tarafımızca yürütülen ön çalışmalardan izole edilen ve Gram testi, patojenite ve PCR test sonuçlarına göre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanımlanan en virulent izolat) kullanılmıştır. Gram reaksiyon testinde ise *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatı kullanılmıştır.

İzolasyon çalışmalarında *Pseudomonas* Agar F (PSF), izolatların koloni gelişimi çalışmasında PSF, Nutrient Agar (NA), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için yarı seçici besi yeri Selective *Clavibacter* Medium (SCM), rifampicin antibiyotikğine dayanıklı izolat hazırlamada Nutrient Broth Yeast Extract (NBY), domates fidelerindeki *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunu belirleme çalışmalarında SCM, King B, Nutrient Broth (NB), bakteri izolatlarından hazırlanan süspansiyonlarda NB besi yerleri kullanılmıştır. Besi yerlerinin içerikleri EK-A'da verilmiştir.

Etmenin patojenite ve virülenslik testlerinde, tohumdaki yaşam süresini belirleme çalışmalarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e aşırı duyarlı olduğu bilinen Alsancak RN F₁ domates çeşidi kullanılmıştır.

Tanıyı destekleyici testlerde ELISA (Agdia marka ticari kit-AGD 44000) tanı kiti ve PCR (Iontek, Fermantes, Thermo marka) malzemeleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sürvey çalışmaları

Domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranlarının belirlenmesi için 2011 ve 2012 yıllarında Tokat ili Merkez, Niksar, Erbaa, Turhal ve Pazar ilçelerinde domates üretim alanlarında, Tokat İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nden alınan veriler doğrultusunda sürveyler yapılmıştır. Örneklenme alanı, ilçe bazında mevcut ekiliş alanının %0,2'si olacak şekilde belirlenmiştir. Örneklemelerde 1 dekar'a kadar olan üretim alanlarında 250 m², 1-3 da arası üretim alanlarında 500 m², 3-5 da arası üretim alanlarında 1000 m², 5-7 da üretim alanlarında 1500 m², 7-10 da arası üretim alanlarında ise 2000 m² alan incelenmiştir. İncelenen alanda tesadüfi olarak seçilen 100 adet bitki incelenerek hastalık belirtisi gösterip göstermediği kaydedilmiş ve elde edilen verilerle hastalığın bulunma oranı hesaplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970). Tokat İli Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nden alınan veriler doğrultusunda; Tokat ili Merkez ve ilçelerinde yapılan sürvey çalışmalarında kullanılan değerler Çizelge 3.1'de ve sürvey alanlarının köy bazında dağılımı ise Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sürvey alanlarının belirlenmesinde kullanılan değerler (Anonim, 2013)

İl/İlçeler	2011		2012	
	Domates Üretim Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Domates Üretim Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)
Tokat-Merkez	12 250	24,5	12 315	24,6
Erbaa	9 900	19,8	10 100	20,2
Niksar	18 850	37,7	17 285	34,5
Pazar	17 600	35,2	18 000	36
Turhal	17 000	34	17 300	34,6
Toplam	75 600	151,2	75 000	149,9

Çizelge 3.2. Sürvey alanlarının köy bazında dağılımı

Tokat/Merkez	Turhal	Pazar	Niksar	Erbaa
Küçükbağlar	Kat	Üzümlören	Şahinli	Değirmenli
Kızılköy	Dökmetepe	Dereköy	Buzköy	Çevresu
Güryıldız	Şenyurt	Bağlarbaşı	Direkli	Kızılçubuk
Büyükyıldız	Necip	Tatar	Gürçeşme	
Küçükyıldız	Kalaycık	Erkilet	Gökçeli	
Yeşilyurt	Tatlıca	Beyçayır	Delicek	
Çerçi				
Ulaş				
Gözova				

3.2.2. Domates bakteriyel solgunluk etmeninin izolasyonu

Sürvey çalışmalarında domates bakteriyel solgunluk hastalığından şüphelenilen bitkiler gazete kağıdı arasına sarılarak etiketlenmiş ve polietilen torba içerisinde laboratuara getirilmiştir. Ayrıca üreticiler tarafından laboratuara getirilen örneklerden de etmen izolasyonu yapılmıştır.

Domates bakteriyel solgunluk hastalığından şüphelenilen bitkilerin özellikle iletim demetlerinden 2-3 mm büyüklüğünde doku parçaları kesilmiş ve %70'lik alkol ile yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulmuştur. Dezenfekte edilen parçalar steril porselen havanda fizyolojik tuzlu su (%0,85'lik NaCl çözeltisi-saline buffer) ile homojenize edilmiştir. Hazırlanan süspansiyondan bir öze dolusu alınmış ve PSF besi yeri içeren petrilere çizgi ekim yapılmıştır. Petriler 28 °C'deki inkübatörde 2-3 gün inkübe edilmiştir. Petrilerde gelişen koloniler incelenmiş ve açık sarı renkli koloni morfolojisine sahip olan koloniler saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar Gliserol ve Nutrient Broth içerisinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Potasyum hidroksit testi (KOH) ile gram reaksiyon

KOH testinde %3'lük Potasyum Hidroksit solüsyonu kullanılmıştır. Lam üzerine bir damla solüsyondan damlatılmış, 72 saatlik *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatları bir plastik öze ile alınarak solüsyonla karıştırılmıştır. Öze

yukarı doğru kaldırıldığında lam üzerinde viskoz, yapışkanimsi bir uzamanın oluşmaması ile sonuç Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada Pozitif Kontrol olarak YY-2 izolatu, negatif kontrol olarak uzamanın olduğu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatu kullanılmıştır.

3.2.4. Patojenite ve virulenslik testleri

Sera koşullarında yürütölen çalışmada, Alsancak RN F1 domates çeşidi kullanılmıştır. PSF besi yerinde 72 saat geliştirilmiş olan bölge izolatları spektrofotometrede 600 nm 0,2 absorbans değeriine ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan, steril enjektör yardımıyla 100 µl alınarak, 3-5 yapraklı domates bitkilerinin gövde kabuk altından inokule edilmiştir (Şekil 3.1.). Pozitif kontrol olarak YY-2 izolatu, negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak yürütölmüştür. İnokulasyon işleminden sonra bitkiler bir gün boyunca nemli naylon torba içerisinde tutulmuştur (Şekil 3.2.). İnokulasyondan bir gün sonra bitkiler nem çemberinden alınmış ve 15 gün boyunca günlük olarak bitkilerde symptom gelişimleri incelenerek gözlemler yapılmıştır.



Şekil 3.1. Patojenite testinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının bitkilere inokulasyonu



Şekil 3.2. Patojenite testinde nem çemberindeki bitkiler

Hastalık değerlendirmesi Francis ve ark. (2001) tarafından verilen 0-5 skolasına göre yapılmıştır. Bitki sağlıklı ise 0 skala değeri verilmiştir. Skala değerleri enfekteli bitkilerdeki solgunluk, yaprak yanıklığı ve kanser yarası oluşumuna göre belirlenmiştir. Bu üç belirti de bitkide orta düzeyde görülüyor ise her bir simptome 1 değeri verilmiştir. Buna göre bu 3 belirtiyi sergileyen bitkide hastalık şiddeti 3 olarak tanımlanmıştır. Bu belirtilerin her birinin şiddetli veya zayıf olması durumunda 0,5 birim artırma veya azaltma yapılmıştır. Yani her üç belirtide bitkide zayıf düzeyde görülüyor ise skala değeri 1,5 olarak tanımlanmıştır. Her üç symptomun şiddetli olması durumunda skala değeri 4,5 olarak tanımlanmıştır. Bitki ölmüş ise skala değeri 5 olarak verilmiştir.

Ayrıca bitkilerde sağlıklı ve hastalıklı yaprak sayımı yapılmış, çiçek oluşumu kaydedilmiş, iletim demetlerindeki nekroz uzunluğunun bitki boyuna oranı alınarak yüzde nekroz oranı elde edilmiştir. İzolatların virülenslik düzeylerini belirlemek için, yapılan gözlemlerde elde edilen veriler, SAS istatistik programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuştur ve ortalamalar arasındaki fark LSD testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Re-izolasyon için ölçümü yapılan bitkiler etiketlenerek gazete kağıdı içerisine sarılmış ve laboratuara getirilmiştir. Bu dokulardan re-izolasyon yapılarak re-izolatlar elde edilmiştir. Elde edilen re-izolatlara %3'lük Potasyum hidroksit solüsyonu kullanılarak Gram reaksiyon testi yapılmıştır. Gram (+) sonuç veren re-izolatlar diğer tanı çalışmalarında kullanılmak üzere Nutrient Broth içerisinde -20 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.5. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tanı testleri

Koloni gelişimi

Koloni gelişimi testinde, re-izolasyonlar sonucu seçilen 10 adet bölge izolatu (SB-6b (r), SB-23b (r), SB-26c (r), SB-3d (r), SB-12a (r), SB-9c (r), SB-30b (r), SB-28a (r), SB-1b (r), SB-35b (r)) kullanılmıştır. Bu 10 izolat, 2011 yılına ait patojenite ve virülenslik testi sonucu en virülens olarak belirlenen bölge izolatlarıdır. Referans izolat olarak ise YY-2 izolatu kullanılmıştır.

Pseudomonas Agar F (PSF) besi yerinde koloni gelişimi: PSF besi yerine çizilen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bölge izolatları ve referans izolat (YY-2) 72 saat 28 °C'de inkübe edildikten sonra açık sarı renkli koloni gelişimine göre pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Nutrient Agar (NA) besi yerinde koloni gelişimi: NA besi yerine çizilen 10 adet re-izolat ve YY-2 izolatu, 72 saat 28 °C'de inkübasyondan sonra açık sarı renkli koloni gelişimine göre pozitif olarak değerlendirilmiştir.

SCM besi yerinde koloni gelişimi: SCM besi yerine çizilen izolatlar 72 saat 28 °C'de inkübe edildikten sonra koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Bakteri yoğunluğunun belirlenmesi

PSF besi yerinde 72 saat geliştirilmiş *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bölge izolatından (YY-2) hazırlanan süspansiyon spektrofotometrede 600 nm'de 0,2 absorbans değerine ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan 1 ml alınarak 9 ml fizyolojik tuzlu su (%0,85'lik NaCl çözeltisi-saline buffer) bulunan tüplere konmuş ve altı kez seyreltilerek seyreltme serisi hazırlanmıştır. Her bir seyreltmeden 100 µl alınarak bir baget yardımı ile PSF besi yerine yayma ekim yapılmıştır. Her seyreltme için 3 adet petri kabı kullanılmıştır. 28 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılan petrilere gelişen koloniler sayılmış ve bakteri süspansiyonunun yoğunluğu belirlenmiştir.

3.2.6. Tanıyı destekleyici testler

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* izolatlarının ELISA testi ile tanısı

2011 ve 2012 yıllarında hasta domates bitkilerinden elde edilen izolatlar patojenite ve Gram reaksiyon testi ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak belirlenmiş olup, bu tanıyı desteklemek amacıyla da re-izolatlarla ELISA testi yapılmıştır. Çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı üretilen monoklonal antibody (Agdia marka ticari kit-AGD 44000) kullanılarak, Alkalın Fosfataz ile işaretlenmiş DAS ELISA testi yapılmıştır. Pozitif ve negatif kontrol olarak kit içerisinde hazır olarak gelen kontroller kullanılmıştır. Her bir uygulama 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. ELISA testi firma tarafından belirtilen prosedür esas alınarak uygulanmıştır.

ELISA çalışmalarında kullanılan prosedür aşağıda verilmiştir:

1. Coating Buffer (Kaplama Tampon Çözeltisi) ile 1:200 oranında seyreltilerek hazırlanan antibody'den (IgG) platedeki her bir çukura 100 µl eklenmiştir. Platelere 25 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir.
2. 4 saatlik inkübasyondan sonra plateler 6 kez PBST Buffer 1 X (Yıkama Tampon Çözeltisi) ile yıkanmıştır.
3. İnkübasyon süresinde testlemesi yapılacak örnekler hazırlanmıştır. PSF besi yerinde 72 saat geliştirilen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bölge izolatlarından steril kürdan yardımıyla alınmış ve 1 ml General Extract Buffer (GEB 1X) bulunan ependorf tüpleri içerisine konularak vortekslenmiştir. Çalışmada kitten çıkan pozitif ve negatif kontroller buna ilaveten yine negatif kontrol olarak GEB 1X kullanılmıştır.
4. Yıkama yapılan platelere hazırlanan örneklerden 100'er µl konulmuştur.
5. Platelere +4 °C'de buzdolabında 1 gece bekletilmiştir.
6. İnkübasyondan sonra plateler 7 kez PBST Buffer 1X ile yıkanmıştır.
7. Enzyme Conjugating Buffer (Konjugate Tampon Çözeltisi) ile 1:200 oranında seyreltilerek hazırlanan antibody'den (anti-IgG) platedeki her bir çukura 100 µl eklenmiştir. Platelere 25 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon süresi sonunda plateler 6 kez PBST Buffer 1X ile yıkanmıştır.

9. Yıkama yapılan platelere 100 µl PNP solüsyonu eklenmiştir.
10. Plateler karanlık ortamda 60-120 dakika inkübe edilmiştir.
11. EMPEROR M201 marka ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okuma yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* izolatlarının PCR tekniği ile tanısı

2011 ve 2012 yıllarında hasta domates bitkilerinden elde edilen ve klasik tanı, ELISA testi ile tanılanan 57 adet *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatının Genomik DNA izolasyonu Nejat ve ark. (2009)'a göre yapılmıştır. Bu yöntemde izlenen prosedür aşağıda verildiği gibidir:

1. Bakteri izolatları 9 ml Nutrient broth (EK-A) sıvı besiyerine aşılanarak 200 devir/dakika (dk) çalkalayıcıda gece boyu 27±1 °C'de geliştirilmiştir.
2. Bakteri süspansiyonundan 1ml steril ependorf tüpüne alınmış ve tüplerin ağırlıkları dengelenerek 15 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Pellet alınarak süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine 600 µl CTAB (pH:8,00) (EK-B) eklenerek vortekslenmiştir.
4. Tüpler 65 °C'deki su banyosunda 30 dk bekletilmiştir.
5. Bu sürenin sonunda her bir tüpe 600 µl cloroform isoamyl alkol eklenerek 1'er dk vortekslenmiştir.
6. 13 000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak süpernatant içinde DNA yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır.
7. Tüplere 600 µl derin dondurucuda soğutulmuş isopropanol eklenmiştir. Tüpler derin dondurucuda (-20 °C'de) 45 dk bekletilmiştir.
8. 12 000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
9. Üst sıvı kısım dökülmüş ve soğutulmuş %70'lik alkolden 1000 µl ependorf tüplerine eklenmiştir. 12 000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılarak alkolle yıkama yapılmıştır.
10. Ependorf tüpler ters çevrilerek alkol dökülmüş ve steril kabinde bir saat kurumaya bırakılmıştır.
11. Ependorf tüpler içerisine 30 µl TE Buffer (EK-B) konulmuştur. İzole edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

12. Daha sonra bu DNA'lar %1'lik hazırlanan agarose jele (EK-B) verilerek izole edildikleri tespit edilmiştir.

Bakteri izolatlarının DNA'sı ve PCR ürünleri %1'lik agarose jel üzerinde görüntülenmiştir. Patojene spesifik olan CMM5:5'- GCGAATAAGCCCATATCAA-3' ve CMM6:5'-CGTCAGGAGGTTCGCTAATA-3' primer dizilimleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında %1'lik agaroz jel üzerinde Dreier ve ark. (1995)'nın bildirdiği gibi 614 bp büyüklüğünde bant oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. PCR işleminin içeriği ve aşamaları aşağıda verilmiştir.

PCR çalışması için reaksiyon karışımının içeriği aşağıda verilen değerlere göre ayarlanmıştır:

Reaksiyon Karışımının İçeriği Miktarı	(μ l)
ddH ₂ O	22,5
Buffer	8,0
dNTP	3,2
MgCl ₂	3,2
Primer I (CMM5)	1,0
Primer II(CMM6)	1,0
Taq polimeraz	0,1
g-DNA	2,0
Toplam	40

Kullanılan primerlerin dizilişleri aşağıda verildiği gibidir:

Dreier ve ark. (1995) CMM5: 5'- GCGAATAAGCCCATATCAA-3'

Dreier ve ark. (1995) CMM6: 5'- CGTCAGGAGGTTCGCTAATA -3'

Thermalcycler cihazında (PEQLAB) kullanılan program aşağıda verildiği gibidir:

Program adımları	SSR55TD		
	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması	55	1,5	30
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	5	1
Bekleme	4	Süresiz	

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis izolatlarının yağ asit profillerinin belirlenmesi

Patojenite, ELISA ve PCR çalışmaları sonucu pozitif olarak kabul edilen 13 izolatın yağ asit profilleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN danışmanlığında yapılmıştır. Çizelge 3.3.'de yağ asit profilleri belirlenen izolatlar verilmiştir.

Çizelge 3.3. Yağ asit profilleri belirlenen izolatlar

Örnek No	İzolat Kodu	İzolatın Alındığı Yer
1	K-13/1a-1 (r)	Tatar/Pazar
2	K-11/1a-1 (r)	Güryıldız/Merkez
3	K-29/1a-2 (r)	Kat/Turhal
4	K-2/1a-1 (r)	Dökmetepe/Turhal
5	K-47/2-1 (r)	Büyük yıldız/Merkez
6	K-20/2a-1 (r)	Ulaş/Merkez
7	K-26/2a-1 (r)	Pazar
8	SB-6a/2 (r)	Değirmenli/Erbaa
9	E-2/1a-2 (r)	Çevresu/Erbaa
10	SB-13a-1 (r)	Şahinli/Niksar
11	SB-19a/1 (r)	Çerçi/Merkez
12	SB-21b/2 (r)	Dökmetepe/Turhal
13	SB-12a/1 (r)	Küçükbağlar/Merkez

İzolatların yağ asitlerinin izolasyonu aşağıda verilen prosedüre göre yapılmıştır (Chase ve ark., 1992):

1. Tryticase soy agar (TSBA) (EK-C) besiyerine 4 fazlı şekilde çizilen izolatlar 25 °C'de 24 saat geliştirilmiştir.
2. Geliştirilen bakterinin 3. ve 4. fazından toplanarak ağız teflon kapaklı steril cam tüplere konulmuştur.
3. Hücreleri parçalamak için her bir test tüpüne 1 ml çözelti 1'den (EK-C) eklenmiştir.
4. Tüpler 10 saniye çalkalandıktan sonra 100 °C'deki su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir.
5. Su banyosundan çıkartılan tüpler tekrar 10 saniye daha çalkalanmıştır.
6. Daha sonra 100 °C'deki su banyosunda 25 dakika bekletilmiştir. Bu işlemle bakteri hücreleri parçalanarak yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.

7. Test tüplerine 2 ml çözelti 2'den (EK-C) eklenip 10 saniye çalkalandıktan sonra tüpler 80 °C'deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir.
8. Bunu takiben tüpler -20 °C'de 10 dakika tutulmuştur. Bu işlem ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenerek yağ asitlerinden yağ asit metil esteri elde edilmesi sağlanmıştır. Bu durum yağ asitlerine yüksek sıcaklıkta buharlaşma özelliği kazandırmaktadır.
9. Soğutulmuş tüplere 2,5 ml çözelti 3 (EK-C) eklenerek 5 dakika tüpler çalkalanmıştır. Bu aşamada tüplerin alt kısmında asidik, üst kısmında da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluşmaktadır. Pastör pipet kullanılarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılıp, organik faz toplanmıştır.
10. En son aşamada ise her tüpe 3 ml çözelti 4 (EK-C) ilave edilerek 5 dakika çalkalanmıştır.
11. Daha sonra tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
12. Çözelti 4 bazik bir solüsyon olup serbest yağ metil esterlerinin daha fazla saf olarak elde edilmesini sağlamaktadır. Bu aşamadan sonra tüpler içerisinde oluşan iki farklı fazdan üst fazda toplanan yağ asit metil esterlerini içeren faz, pastör pipet ile alınarak 2 ml'lik gaz kromatografisi tüplerine aktarılmış ve ağızları sıkıca kapatılmıştır.

Tüpler Mikrobiyal Identifikasyon Sistemin (MIS cihazı-HP6890, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) üzerindeki örnek depolama birimine yerleştirilmiş ve daha sonra MIS bilgisayar paket programı kullanılarak (Shelock MIS version 4.5 Microbial ID. Inc. Newark, Delaware) her izolat program kütüphanesindeki bakteri izolatları ile benzerlik oranlarına göre tanımlanmıştır.

3.2.7. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tohum, toprak ve bitki artıklarındaki latent/epifitik yaşam süresinin saptanması ve ilk inokulum kaynaklarının belirlenmesi

Bu çalışmalarda kullanılacak olan bölge izolatının re-izolasyonunda yaşanabilecek bulaşmaları önlemek için öncelikle YY-2 izolatının rifampicine (100 mg/l) dayanıklılık kazanması sağlanmıştır.

Rifampicine dayanıklı bakteri izolatı, Tireng Karut (2011)'un belirttiği yöntemle göre elde edilmiştir. PSF besi yerinde 72 saat geliştirilen YY-2 bölge izolatından bir öze dolusu alınarak 20 ml Nutrient Broth Yeast Extract (NBY) sıvı besi yerine aktarılmış ve 150 rpm hızda çalışan çalkalayıcıda 72 saat geliştirilmiştir. %70'lik alkol kullanılarak hazırlanan 25 mg/l dozunda rifampicin soğuk sterilizasyon yapılarak bakteri süspansiyonuna eklenmiştir (Şekil 3.3.). 72 saat sonra bu süspansiyondan 25 mg/l rifampicin içeren PSF besi yerine çizim yapılmıştır. Gelişen kolonilerden alınarak 20 ml NBY besi yerinde tekrar geliştirilmiştir. Üç gün süreyle bu ortamda inkübasyona bırakılan bakteri süspansiyonu üzerine 50 mg/l rifampicin eklenmiş ve altıncı güne kadar inkübasyona devam edilmiştir. Altıncı günün sonunda buradan alınan bakteri süspansiyonu 50 mg/l rifampicin içeren PSF besi yerine aktarılmıştır. Bu işlemler 75 ve 100 mg/l rifampicin dozları için tekrarlanmıştır. Elde edilen 100 mg/l rifampicine dayanıklı izolat ile Gram reaksiyon testi ve patojenite testi yapılarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olup olmadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, 100 mg/l rifampicin'e dayanıklı izolat ile etmenin tohum, toprak ve bitki artıklarındaki yaşam süreleri ve bu yerlerdeki birincil inokulum kaynaklarını oluşturma yetenekleri araştırılmıştır.

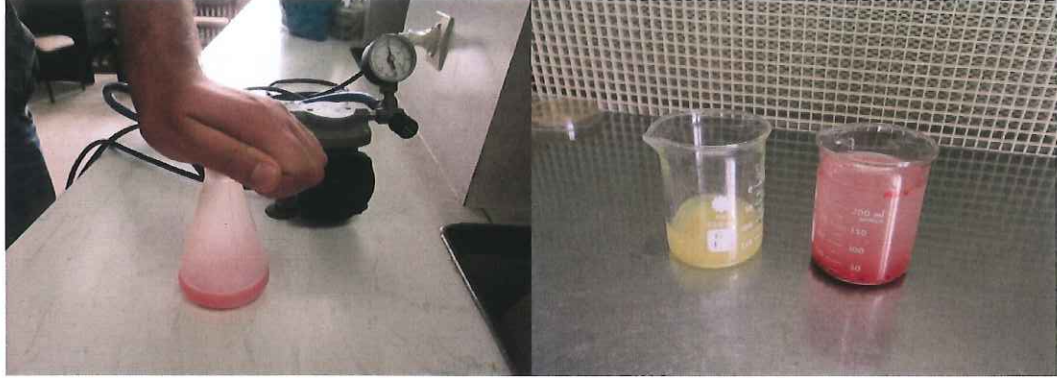


Şekil 3.3. Bakteri süspansiyonuna rifampicin antibiyotikinin eklenmesi

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in bulaşık tohumda yaşam süresinin belirlenmesi

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in tohumdaki yaşam süresinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada, Alsancak RN F1 çeşidi domates tohumları kullanılmıştır. İlk olarak tohumlar %1'lik NaOCl çözeltisinde yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra tohumlar, 100 mg/l rifampicin'e dayanıklı patojen izolatı ile inokule edilmiştir.

100 mg/l rifampicin'e dayanıklı izolat ile 600 nm'de 0,2 absorbans değerine ayarlanmış olup, tohumlar süspansiyonda 3 saat vakum yöntemi ve 1 saat daldırma yöntemi kullanılarak inokule edilmiştir (Şekil 3.4.). Enfekteli tohumlar bir gece boyunca steril kabinde kurutulduktan sonra, kese kağıtları içerisinde oda sıcaklığında saklanmıştır. Çalışma boyunca tesadüf olarak seçilen 100'er adet tohum ilk inokulasyon gününü takip eden 33, 66, 100, 129, 160, 193, 220, 249, 280, 310, 340, 370, 400 ve 430. günlerde 100 mg/l rifampicin içeren PSF besi yerine ekilmiş olup (Şekil 3.5.), besi yerinde tohum etrafında gelişen koloniler sayılarak enfekteli tohum %'si belirlenmiştir (Hankin ve Sands, 1977).



Şekil 3.4. Tohumlarda vakum ve daldırma yöntemleri kullanılarak bakteri süspansiyonu ile inokulasyonu



Şekil 3.5. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık tohumların rifampicin içeren besi yerine ekimi

Tohumlardaki inokulumun hastalığı başlatacak yeteneğe sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla tohumlar toprak, kum ve torf karışımı içeren viyollere ekilmiştir. Ekilen tohumlarda 7 gün sonra çıkışlar başlamıştır. Gelişen fidelerde domates bakteriyel solgunluk hastalığına ait belirtiler gözlenmiş olup, 100 mg/l rifampicin içeren PSF besi yerine izolasyon yapılmıştır.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in bulaşık toprakta yaşam süresinin belirlenmesi

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in topraktaki yaşam süresinin saptanması amacıyla yürütülen deneme Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parselinde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 100 mg/l rifampicin'e dayanıklı izolata ait inokulum 600 nm'de 0,2 absorbans değerine ayarlanmış olup, hazırlanan süspansiyon ile toprak inokule edilmiştir. 100 mg/l rifampicin'e dayanıklı *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatu ile

inokule edilen toprak 25 litrelik teneke kutular içerisinde konularak deneme alanına gömülmüştür (Şekil 3.6.). Çalışma 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. İnokulasyon tarihinden itibaren yaz ve kış ayları boyunca haftalık olarak, bulaştırılan toprağın 0-15 cm derinliğinden örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden seyreltme serileri hazırlanarak 100 mg/l rifampicin içeren PSF besi yerine yayma ekim yapılmıştır. Her seyreltme için 3 adet petri kabı kullanılmıştır. 28 °C’de 72 saat inkübasyona bırakılan petrilerde gelişen koloniler sayılmış ve bakteri yoğunluğu belirlenmiştir.



Şekil 3.6. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatu ile bulaştırılmış toprağın teneke kutular içerisinde gömülmesi

Topraktaki bitki artıklarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in yaşam süresinin belirlenmesi

Topraktaki bitki artıklarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in yaşam süresinin saptanması amacıyla yürütülen deneme, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parselinde gerçekleştirilmiştir. Sera koşullarında yetiştirilen 5-6 yapraklı domates bitkileri 100 mg/l rifampicin’e dayanıklılık kazandırılmış *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis izolatu ile inokule edilmiştir (Şekil 3.7.). İnokule edilen bitkiler sera koşullarında 15 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda solgunluk simptomu gösteren bitki gövdeleri 2-3 cm'lik parçalar halinde kesilmiş ve 10 g olacak şekilde tartılarak gövde parçaları tülbent (veya kalın kadın çorabı) içerisine konularak toprağın 15 cm derinliğine gömülmüştür (Şekil 3.8. ve Şekil 3.9.). Toprağa gömüldükten bir ay sonra örnekleme işlemi başlamıştır. Her ay içinde bitki artığı bulunan tülbent çıkartılmış, Nutrient Broth sıvı besi yerinde 150 rpm hızda 3 saat çalkalanmıştır. Bir tülbent veya süzgeç ile süzülen süspansiyon (Şekil 3.10.), 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir. %0,85'lik NaCl eriği içerisinde seyreltilen pelletten 100 mg/l rifampicin içeren PSF besi yerine ekim yapılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11.).



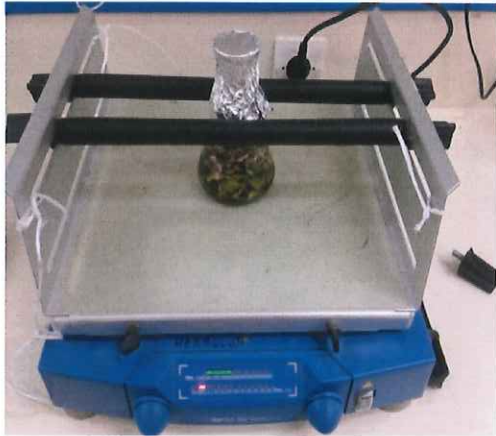
Şekil 3.7. Domates bitkilerinin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile inokulasyonu



Şekil 3.8. Bitki gövdelerinin kesilmesi ve tartılması



Şekil 3.9. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık bitki gövdelerinin gömülmesi



Şekil 3.10. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık bitki gövdelerinin NB'de çalkalanması ve süzülmesi



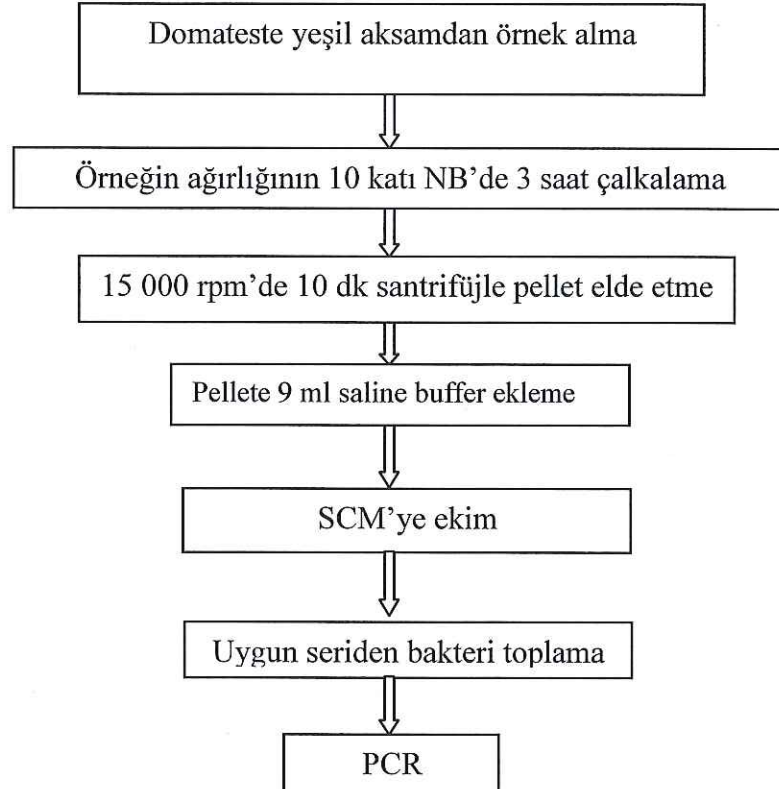
Şekil 3.11. Süspansiyonun santrifüj edilmesi ve PSF besiyerine ekimi

3.2.8. Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi

Tokat ve çevresinde domates üretimi tamamen Mersin ve Antalya'dan gelen hazır fidelerle gerçekleşmektedir. Bu nedenle fide kaynaklı enfeksiyonların hastalığın epidemi oluşturmada önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bağlamda, hastalık belirtisi göstermeyen, domates fidelerinde tarlaya şaşırtılmadan önce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi amacıyla yürütülen bu çalışmada, 30/04/2013-15/05/2013 tarihleri arasında Ziraî İlaç Bayilerine gidilerek Tokat Merkez, Turhal, Pazar ve Erbaa'dan toplam 104 domates fidesi örneği alınmıştır. Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının belirlenmesi için Belgüzar ve ark. (2014) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmış ve aşamaları Şekil 3.12'de verilmiştir.

Şekil 3.12. Domateste *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntem



Bayilerden alınan fideler naylon poşetlere konularak çeşit isimleri, fidelik isimleri, lot numaraları, fidenin alındığı bayinin ismi, örneğin alındığı tarih gibi bilgiler yazılarak etiketlenmiştir (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Zirai İlaç Bayilerinden alınan domates fideleri

Fideler kök boğazından kesilerek yeşil kısımları alınmıştır (Şekil 3.14.). Ağırlıkları tartılarak 10 katı Nutrient Broth sıvı besi yerinde 3 saat çalkalanmıştır. Bitki parçaları süzgeçten süzülerek uzaklaştırılmış ve kalan sıvı 15 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek pellet toplanmıştır. Elde edilen pelletler 9’ar ml saline buffer (%0,85 g NaCl) içinde tekrar süspanse edilmiştir. Süspansiyon 3 kez seyreltilerek elde edilen seyreltme serileri yarı seçici olan SCM besi yerlerine iki tekrarlı olarak yayılmıştır. 28 °C’de 5 günlük (120 saat) inkübasyondan sonra uygun seriden SCM besi yerlerinde gelişen tüm bakteri kolonileri steril bir öze yardımıyla toplanarak (Şekil 3.15.), 9’ar ml’lik NB sıvı besi yerine alınmış (Şekil 3.16.) ve DNA izolasyonunu takiben PCR çalışmasına tabi tutulmuştur (Şekil 3.17.).



Şekil 3.14. Fidelerin kök boğazından kesilmesi



Şekil 3.15. SCM besi yerinde gelişen bakteri kolonilerinin toplanması



Şekil 3.16. Toplanan bakteri kolonilerinin NB'a eklenmesi



Şekil 3.17. Fide çalışmasında DNA izolasyonu

DNA izolasyonu ve PCR çalışması *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının PCR tekniği ile tanısında verilen prosedürler doğrultusunda yapılmıştır (bkz 3.2.6.). Bakteri izolatlarının DNA'sı ve PCR ürünleri %1'lik agarose jel üzerinde görüntülenmiştir. Patojene spesifik olan CMM5 (Iontek marka) ve CMM6 (Iontek marka) primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında %1'lik agaroz jel üzerinde Dreier ve ark. (1995)'nın bildirdiği gibi 614 bp büyüklüğünde bant oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sürvey çalışmaları

Tokat ili Merkez ve ilçelerinde domates üretim alanlarında, Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranlarının belirlenmesi için 2011 yılı Temmuz-Eylül, 2012 yılı Haziran-Eylül aylarında sürvey çalışmaları yapılmıştır. 2011 yılında Tokat İli Merkeze bağlı Çerçi, Güryıldız ve Küçükbağlar köylerinde 9, Pazar İlçesine bağlı Üzümlören ve Tatar köylerinde 11, Turhal İlçesine bağlı Dökmektepe, Şenyurt ve Kalaycık köylerinde 13, Erbaa İlçesine bağlı Değirmenli, Kızılçubuk ve Çevresu köylerinde 21, Niksar İlçesine bağlı Buzköy, Direkli, Şahinli, Gürçeşme ve Gökçeli köylerinde 21 olmak üzere toplam 65 domates tarlasında sürvey yapılmıştır. 2012 yılında ise Merkeze bağlı Çerçi, Güryıldız, Küçükbağlar, Küçükyıldız, Yeşilyurt, Ulaş, Büyükyıldız, Gözova, ve Kızılköy köylerinde 70, Pazar İlçesine bağlı Erkilet, Beyçayır, Bağlarbaşı, Dereköy, ve Tatar köylerinde 18, Turhal İlçesine bağlı Dökmektepe, Necip, Kat, Tatlıca, Şenyurt ve Kalaycık köylerinde 44, Erbaa İlçesine bağlı Değirmenli, Kızılçubuk ve Çevresu köylerinde 21, Niksar İlçesine bağlı Şahinli ve Delicek köylerinde 10 olmak üzere toplam 163 domates tarlasında sürvey yapılmıştır.

Sürvey yapılan alanlarda tesadüfî olarak seçilen 100 adet bitki incelenerek hastalık belirtisi gösterip göstermediği kaydedilmiş ve hastalığın tarladaki bulunma oranı hesaplanmıştır. 2011 yılında Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı Çizelge 4.1.'de, 2012 yılına ait hastalığın bulunma oranı ise Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. 2011 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
1	Merkez	Çerçi (1)	Mahmut KILINÇ	Sırık	8	2	5
2	Merkez	Çerçi (2)	Şenay SOYER	Sırık	4	1	0
3	Merkez	Çerçi (3)	Özcan ÖNCÜ	Sırık	5	1,5	12
4	Merkez	Çerçi (4)	Bayram ÜN	Sırık	8	2	4
5	Merkez	Güryıldız	Yahya ÖZER	Sırık	40	2	6
6	Merkez	Küçükbağlar	Ahmet ÇELTEK	Sırık	20	2	35

Çizelge 4.1. (Devam) 2011 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
7	Merkez	Küçükbağlar	Mehmet BAYIN	Sırık	4	1	12
8	Merkez	Küçükbağlar	Mustafa PARLA	Sırık	13	2	16
9	Merkez	Küçükbağlar	Mehmet PEKER	Sırık	9	2	22
10	Pazar	Üzümlören	K40.2680932 D36.1592166	Sırık	2	0,5	0
11	Pazar	Üzümlören	Zeki DEMİRBAŞ	Sırık	6	1,5	13
12	Pazar	Üzümlören	Hüseyin ELÇİ	Sırık	3	1	0
13	Pazar	Üzümlören	K40.2683849 D36.1592166	Sırık	2	0,5	0
14	Pazar	Üzümlören	K40.2680932 D36.1636000	Sırık	8	2	0
15	Pazar	Üzümlören	Hulusi AKDAĞ	Sırık	2	0,5	0
16	Pazar	Üzümlören	Ömer DÖNMEZ	Sırık	4	1	0
1	Pazar	Üzümlören	Yüksel ÇOKOL	Sırık	8	2	28
18	Pazar	Üzümlören	K40.2683899 D36.1995733	Sırık	9	2	0
19	Pazar	Üzümlören	K40.2685916 D36.2115883	Sırık	8	2	0
20	Pazar	Tatar	Orhan YAŞAR	Sırık	10	2	0
21	Turhal	Dökmetepe	Şevki ELÇİN	Sırık	6	1,5	0
22	Turhal	Dökmetepe	Ali YILDIZ	Yer	15	2	38
23	Turhal	Dökmetepe	Taner SOMUNCU	Sırık	3	1	0
24	Turhal	Dökmetepe	Ergün SOMU C	Sırık	35	2	8
25	Turhal	Dökmetepe	Yusuf GÖZÜTOK	Sırık	20	2	0
26	Turhal	Dökmetepe	Ergül SOMUNCU	Sırık	5	1,5	35
27	Turhal	Dökmetepe	K40.3082800 D36.276916	Sırık	5	1,5	32
28	Turhal	Dökmetepe	Gökay SOMUNCU	Sırık	20	2	0
29	Turhal	Şenyurt	Abdullah ÇAKIR	Sırık	10	2	5
30	Turhal	Şenyurt	Nizamettin TÜRK	Sırık	25	2	0
31	Turhal	Şenyurt	Ahmet CANIKLI	Yer	13	2	0
32	Turhal	Şenyurt	Bahattin POLAT	Sırık	22	2	8
33	Turhal	Kalaycık	Fatih AL	Sırık	20	2	0
34	Erbaa	Kızılçubuk	290228E 4513003N	Sırık	3	1	0
35	Erbaa	Kızılçubuk	290227E 4513133N	Sırık	2	0,5	0
36	Erbaa	Kızılçubuk	290235E 4513120N	Yer	4	1	0
37	Erbaa	Kızılçubuk	290218E 4513211N	Sırık	5	1,5	0
38	Erbaa	Kızılçubuk	290210E 4513284N	Sırık	2	0,5	0

Çizelge 4.1. (Devam) 2011 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
39	Erbaa	Kızılçubuk	290183E 4513335N	Sırık	3	1	0
40	Erbaa	Kızılçubuk	290081E 4513348N	Sırık	3	1	0
41	Erbaa	Çevresu	289268E 4513711N	Yer	5	1,5	6
42	Erbaa	Değirmenli	Sıtkı SAĞ	Sırık	6	1,5	0
43	Erbaa	Değirmenli	286609E 4512056N	Sırık	7	2	34
44	Erbaa (11)	Değirmenli	286582E 4512072	Sırık	4	1	0
45	Erbaa(12)	Değirmenli	286534E 4512138N	Sırık	5	1,5	62
46	Erbaa	Değirmenli	286501E 4512138N	Yer	3	1	0
47	Erbaa (14)	Değirmenli	286378E 4512229N	Sırık	4	1	28
48	Erbaa (15)	Değirmenli	Bekir ÇOLAK	Sırık	5	1,5	25
49	Erbaa	Değirmenli	287656E 4510690N	Sırık	4	1	6
50	Erbaa	Değirmenli	287415E 4511000N	Sırık	3	1	5
51	Erbaa	Değirmenli	287350E 4511066N	Sırık	5	1,5	12
52	Erbaa	Değirmenli	287324E 4511080N	Sırık	4	1	14
53	Erbaa	Değirmenli	287236E 4511155N	Sırık	3	1	18
54	Erbaa (21)	Değirmenli	Sadi SOLAK	Sırık	5	1,5	15
55	Niksar	Buzköy	Yıldıray ŞENTÜRK	Yer	9	2	16
56	Niksar	Buzköy	Metin ÇELİK	Yer	6	1,5	18
57	Niksar	Buzköy	İbrahim DEMİREL	Yer	11	2	10
58	Niksar	Buzköy	316061E 4499707	Yer	5	1,5	0
59	Niksar	Buzköy	İbrahim YURDAKUL	Yer	8	2	12
60	Niksar	Buzköy	Mehmet GEZGEL	Yer	8	2	0
61	Niksar	Direkli	Sadettin ZENGİN	Yer	10	2	0
62	Niksar (8)	Şahinli	Mehmet SUŞEHRİ	Sırık	7	2	32

Çizelge 4.1. (Devam) 2011 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
63	Niksar(9)	Şahinli	Nurettin ERDOĞAN	Sırık	7	2	35
64	Niksar	Gürçeşme	Mehmet ÇITAK	Yer	8	2	0
65	Niksar	Gökçeli	Ahmet ÇOBAN	Yer	7	2	0
TOPLAM					543	99,5	9,64 (ort.)

Çizelge 4.2. 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
1	Merkez	Küçükbağlar	Halis PEKER 37307090D 4478238K	Sırık	5	1,5	0
2	Merkez	Küçükbağlar	Ahmet PEKEL 37274201D 4463794K	Sırık	5	1,5	0
3	Merkez	Küçükbağlar	Nuri PEKEL 37273984D 4463820K	Sırık	5	1,5	0
4	Merkez	Küçükbağlar	Talip PARLAK 37272114D 4463028K	Sırık	25	2	3
5	Merkez	Küçükyıldız	Celil ÇETİN	Sırık	5	1,5	0
6	Merkez	Küçükyıldız	Yücel YALÇIN	Sırık	3	1	40
7	Merkez	Yeşilyurt	Cemalettin TÜRKOZ 37275073D 4467132K	Sırık	10	2	5
8	Merkez	Yeşilyurt	Abdullah DEMİR 37275006D 4466830K	Sırık	5	1,5	10
9	Merkez	Yeşilyurt	Dursun TOPLAR	Sırık	4	1	0
10	Merkez	Yeşilyurt	Ahmet DİN	Sırık	5	1,5	5
11	Merkez	Yeşilyurt	Şuayip YÜCE	Sırık	10	2	5
12	Merkez	Yeşilyurt	Savaş DİNÇ	Sırık	10	2	10
13	Merkez	Ulaş	Nurhan GÜNEY 37282877D 4468425K	Sırık	22	2	0
14	Merkez	Ulaş	37282265D 4467067K	Sırık	5	1,5	5
15	Merkez	Ulaş	Sami VARAZLI 37282288D 4467045K	Sırık	8	2	0
16	Merkez	Büyükyıldız	Mustafa YARAR 37272231D 4465072K	Sırık	5	1,5	0

Çizelge 4.2. (Devam) 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
17	Merkez	Büyükyıldız	Mehmet DEMİRCAN 3727847D 4468469K	Sırık	5	1,5	0
18	Merkez	Büyükyıldız	Ali KARATAŞ 37278545D 4468520K	Sırık	2	0,5	0
19	Merkez	Büyükyıldız	Muhsin YURTSEVER	Sırık	4	1	30
20	Merkez	Büyükyıldız	Fevzi ÇELİK 37277783D 4468323K	Sırık	5	1,5	20
21	Merkez	Güryıldız	Mustafa ŞAHİN 37276718D 4469199K	Sırık	5	1,5	0
22	Merkez	Büyükyıldız	Celal YAKAR 37277773D 4468317K	Sırık	10	2	20
23	Merkez	Büyükyıldız	Hulusi TUNA 37277682D 4469496K	Sırık	5	1,5	5
24	Merkez	Büyükyıldız	Osman ÇELİK 37277174D 4469296K	Sırık	10	2	10
25	Merkez	Büyükyıldız	Yavuz ÖZER	Sırık	70	2	60
26	Merkez	Güryıldız	Mücahit YAMAN 37275468D 4466593K	Sırık	5	1,5	20
27	Merkez	Güryıldız	Ahmet YÜCE	Sırık	8,5	2	0
28	Merkez	Güryıldız		Sırık	3	1	0
29	Merkez	Güryıldız	Celal ASLAN 37276502D 4467751K	Sırık	10	2	8
30	Merkez	Güryıldız	Dursun KOŞ 37274181D 4466228K	Sırık	10	2	5
31	Merkez	Güryıldız	İlhan DEMİR 37274193D 4466338K	Sırık	5	1,5	0
32	Merkez	Güryıldız		Sırık	5	1,5	10
33	Merkez	Güryıldız		Sırık	5	1,5	0
34	Merkez	Güryıldız	M.Hüsnü ATEŞ 37276999D 4469123K	Sırık	5	1,5	0
35	Merkez	Güryıldız	Dursun MUTLU 37276346D 44699117K	Sırık	5	1,5	0
36	Merkez	Güryıldız	Abdullah TÜRK	Sırık	4	1	8

Çizelge 4.2. (Devam) 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
37	Merkez	Güryıldız	Ömer ALBAK 37276137D 4468915K	Sırık	5	1,5	0
38	Merkez	Güryıldız	Osman ŞAHİN 37276130D 4468957K	Sırık	2	0,5	0
39	Merkez	Güryıldız	Ali BİNBAŞI 37276129D 4468934K	Sırık	5	1,5	0
40	Merkez	Güryıldız	Mustafa ÖZDEMİR 37275892D 4467065K	Sırık	8	2	0
41	Merkez	Güryıldız	Vasfi ASLAN 37275884D 4467052K	Sırık	10	2	2
42	Merkez	Güryıldız	Kemal TÜRK 37275743D 446894K	Sırık	10	2	5
43	Merkez	Güryıldız	Ahmet Turan AKBAŞ	Sırık	15	2	15
44	Merkez	Güryıldız	Murat ÖZER	Sırık	3	1	10
45	Merkez	Güryıldız	Veysel TÜRK 37275670D 4466992K	Sırık	10	2	5
46	Merkez	Güryıldız	37275539D 4466830K	Sırık	5	1,5	3
47	Merkez	Güryıldız	Hüseyin ÖZER 37275444D 4466819K	Sırık	5	1,5	5
48	Merkez	Güryıldız	Abdullah ÖZER 37275482D 4466776K	Sırık	10	2	10
49	Merkez	Güryıldız	Ruhi ÖZER	Sırık	5	1,5	0
50	Merkez	Güryıldız	37275479D 4466737K	Sırık	6	1,5	15
51	Merkez	Güryıldız	İzzet TÜRK 37275469D 4466596K	Sırık	10	2	30
52	Merkez	Gözova	Ali MUTLU 37307978D 4479489K	Sırık	3	1	0
53	Merkez	Gözova	37306915D 4478148K	Sırık	3	1	0
54	Merkez	Gözova	37305015D 4476155K	Sırık	3	1	0
55	Merkez	Kızılköy	Salih İLK	Sırık	5	1,5	0
56	Merkez	Kızılköy	Veli DURSUN	Sırık	3	1	0

Çizelge 4.2. (Devam) 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırik veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
57	Merkez	Çerçi	Oktay ÖNCÜ 37273521D 4464782K	Sırik	5	1,5	1
58	Merkez	Çerçi	Şenay SOYER 37281121D 4467631K	Sırik	5	1,5	2
59	Merkez	Çerçi	Bayram ÜN 37281065D 4467662K	Sırik	5	1,5	1
60	Merkez	Çerçi	37281001D 4467642K	Yer	3	1	0
61	Merkez	Çerçi	Kenan YILDIRIM 37280927D 4467348K	Sırik	6	1,5	2
62	Merkez	Çerçi	Salih YÖNEN 37279837D 4467458K	Sırik	5	1,5	1
63	Merkez	Çerçi	Engin KALE 37279907D 4467460K	Sırik	5	1,5	0
64	Merkez	Merkez	Ali SÖNMEZ	Sırik	16	2	0
65	Merkez	Merkez	Ahmet YALÇIN	Sırik	3	1	10
66	Merkez	Merkez	Şevki DEMİRCİ	Sırik	5	1,5	0
67	Merkez	Merkez	Osman ELVAN	Sırik	5	1,5	10
68	Merkez	Merkez	Yunus GÖÇER	Sırik	3	1	50
69	Merkez	Merkez	Mustafa GÖÇMEN	Sırik	5	1,5	0
70	Merkez	Merkez	Güler AŞAR	Sırik	3	1	0
71	Turhal	Kalaycık	37268561D 4466250K	Sırik	5	1,5	0
72	Turhal	Kalaycık	Şükrü KOCAMAN 37268480D 4466153K	Sırik	11	2	0
73	Turhal	Kalaycık	Muzaffer GENÇ 37268520D 4466184K	Sırik	5	1,5	0
74	Turhal	Dökmetepe	Ahmet AKDAĞ 37269530D 4464346K	Sırik	20	2	0
75	Turhal	Necip Köyü	Abdulkadir İŞHAK 37271356D 4465546K	Sırik	6	1,5	10
76	Turhal	Necip Köyü	Mustafa İŞHAK	Sırik	6	1,5	10
77	Turhal	Necip Köyü	Mustafa ARSLAN 37271350D	Sırik	5	1,5	0

Çizelge 4.2. (Devam) 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırik veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
78	Turhal	Necip Köyü	Fatih İŞHAK 37271279D 4465423K	Sırik	10	2	10
79	Turhal	Kat Kasabası	Fatih ÖZALTIN 37265543D 4465104K	Sırik	10	2	2
80	Turhal	Kat Kasabası	İsmail ESİN	Sırik	6	1,5	0
81	Turhal	Kat Kasabası	37273480D 4465102K	Sırik	5	1,5	2
82	Turhal	Kat Kasabası	Veysel GEDİK 37273480D 4465491K	Sırik	5	1,5	5
83	Turhal	Kat Kasabası	Osman ÖZTÜRK	Sırik	5	1,5	40
84	Turhal	Kat Kasabası	Mehmet İKİKAT 37273785D 4465487K	Sırik	4	1	2
85	Turhal	Kat Kasabası	Osman ZENGİN 37273513D 4465666K	Sırik	7	2	0
86	Turhal	Kat Kasabası	Ahmet ZENGİN	Sırik	10	2	30
87	Turhal	Kat Kasabası	Fatih YİĞİT 37273102D 4466580K	Sırik	5	1,5	5
88	Turhal	Kat Kasabası	İhsan KOÇ	Sırik	3	1	2
89	Turhal	Kat Kasabası	37273088D 4466567K	Sırik	3	1	20
90	Turhal	Kat Kasabası	Murat ÖZSEVEN 37272881D 4466157K	Sırik	8	2	0
91	Turhal	Kat Kasabası	Ömer ESEN 37272723D 4466084K	Sırik	5	1,5	0
92	Turhal	Kat Kasabası	37272608D 4466028K	Sırik	5	1,5	3
93	Turhal	Kat Kasabası	Harun EREN 37272568D 4466038K	Sırik	11	2	0
94	Turhal	Kat Kasabası	Ahmet GENÇER 37272572D 4466089K	Sırik	7	2	0
95	Turhal	Kat Kasabası	Mustafa GENÇER 37272488D 4466107K	Sırik	6	1,5	0
96	Turhal	Kat Kasabası	37271495D 4466513K	Sırik	5	1,5	0

Çizelge 4.2. (Devam) 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
97	Turhal	Kat Kasabası	Turan YAMAN 37272241D 4466693K	Sırık	8	2	1
98	Turhal	Kat Kasabası	Dursun KILIÇ 37271495D 4466312K	Sırık	3	1	2
99	Turhal	Kat Kasabası	Osman YAMAN 37271048D 4466331K	Sırık	20	2	0
100	Turhal	Kat Kasabası	Necip YILMAZ HAN 37271878D 4464982K	Sırık	10	2	10
101	Turhal	Kat Kasabası	Necip YILMAZ HAN 37271760D 4465004K	Sırık	5	1,5	5
102	Turhal	Kat Kasabası	Ömer OKŞAR 37271917D 4464984K	Sırık	6	1,5	1
103	Turhal	Kat Kasabası	Necip YILMAZ HAN 37271980D 4465026K	Sırık	5	1,5	1
104	Turhal	Kat Kasabası	Aziz USLU 37273516D 4464790K	Sırık	30	2	10
105	Turhal	Tatlıca	Talip ARSLAN 37279908D 4467463K	Yer	8	2	0
106	Turhal	Tatlıca	Yüksel TEKELİ 37279908D 4467463K	Yer	12	2	0
107	Turhal	Tatlıca	37256392D 4464229K	yer	5	1,5	0
108	Turhal	Tatlıca	Hacı GERİKALAN 37256400D 4464257K	Yer	8	2	0
109	Turhal	Tatlıca	Duran AÇIKGÖZ 37256401D 4464254K	Yer	8	2	0
110	Turhal	Tatlıca	Sadık KALGAN 37255442D 4465647K	Yer	5	1,5	0
111	Turhal	Tatlıca	Dursun ADALI 37255414D 4465591K	Yer	10	2	0
112	Turhal	Şenyurt	İbrahim YÜCE	Sırık	8	2	0
113	Turhal	Şenyurt	Sabri SEÇKİN	Sırık	40	2	0

Çizelge 4.2. (Devam) 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
114	Turhal	Şenyurt	İsmail KOCAMAN	Sırık	30	2	60
115	Pazar	Erkilet	Saadettin DURAN 37272852D 4463877K	Sırık	5	1,5	10
116	Pazar	Erkilet	Cemalettin HAN 3727897D 4463871K	Sırık	6	1,5	0
117	Pazar	Beyçayır	Mehmet KESER 37267624D 4462013K	Sırık	10	2	0
118	Pazar	Tatar	Musa YURTTAŞ 37265889D 4461624K	Sırık	8	2	5
119	Pazar	Tatar	Orhan YAŞAR 37265576D 4461530K	Sırık	5	1,5	8
120	Pazar	Bağlarbaşı	Sinan ARUK 37263245D 4461413K	Sırık	5	1,5	0
121	Pazar	Bağlarbaşı	İsmail DURUR 37263244D 4461314K	Sırık	3	1	0
122	Pazar	Bağlarbaşı	Yusuf GÖZÜTOK 37268804D 4465852K	Sırık	40	2	0
123	Pazar	Bağlarbaşı	Taner SOMUNCU 37270069D 4464485K	Sırık	5	1,5	5
124	Pazar	Bağlarbaşı	Orhan GÜLTEKİN 3727002D 4464424K	Sırık	5	1,5	0
125	Pazar	Bağlarbaşı	Soner SOMUNCU 37269991D 4464425K	Sırık	5	1,5	0
126	Pazar	Bağlarbaşı	Fatih İPEK 37269911D 4464358K	Sırık	5	1,5	10
127	Pazar	Bağlarbaşı	37262497D 4460746K	Sırık	3	1	0
128	Pazar	Dereköy	Mehmet KALINER 37263799D 4461534K	Sırık	5	1,5	2

Çizelge 4.2. (Devam) 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
129	Pazar	Dereköy	37264411D 4461526K	Sırık	8	2	5
130	Pazar	Dereköy	Tuğrul ÖZLÜ 37264254D 4460618K	Sırık	5	1,5	20
131	Pazar	Dereköy	Mustafa ALTUN 37263623D 4461270K	Sırık	3	1	0
132	Pazar	Dereköy	Alim YARICI 37263820D 4461069K	Sırık	5	1,5	0
133	Niksar	Şahinli	Abdullah BAŞ 37321913D 4495359K	Sırık	5	1,5	0
134	Niksar	Şahinli	Tahsin SİVRİ 37322087D 4495181K	Sırık	5	1,5	0
135	Niksar	Şahinli	Fatih KESKİN 37321943D 4495151K	Sırık	5	1,5	0
136	Niksar	Şahinli	Şakir ERDOĞAN 37321905D 4495187K	Sırık	3	1	0
137	Niksar	Şahinli	37321553D 4495381K	Sırık	5	1,5	0
138	Niksar	Delicek	37317718D 4499602K	Yer	8	2	0
139	Niksar	Delicek	37317707D 4499627K	Yer	8	2	0
140	Niksar	Delicek	37317620D 4499627K	Yer	15	2	0
141	Niksar	Delicek	37317545D 4499635K	Yer	12	2	0
142	Niksar	Delicek	37316024D 4499728K	Yer	8	2	0
143	Erbaa	Değirmenli	İbrahim SOLAK	Sırık	5	1,5	5
144	Erbaa	Değirmenli	Baki KARAKOÇ	Sırık	5	1,5	7
145	Erbaa	Değirmenli	37 286666D 4510650K	Yer	2	0,5	3
146	Erbaa	Değirmenli	Mustafa EMİR	Sırık	5	1,5	2
147	Erbaa	Değirmenli	Sadi SOLAK	Yer	15	2	2
148	Erbaa	Değirmenli	Mustafa ÖZER	Sırık	3	1	0
149	Erbaa	Değirmenli	İbrahim KOÇ	Sırık	2	0,5	0
150	Erbaa	Değirmenli	Nafiz ÖZER	Sırık	5	1,5	2
151	Erbaa	Değirmenli	Ali ÖZER	Sırık	3	1	4
152	Erbaa	Değirmenli	37 287482D 4510961K	Sırık	3	1	0
153	Erbaa	Değirmenli	Bekir SOLAK	Sırık	5	1,5	3

Çizelge 4.2. (Devam) 2012 yılı Tokat yöresinde sürvey çalışması yapılan domates tarlalarında hastalığın bulunma oranı

S. No	İlçesi	Köy	Üretici Adı veya Tarla Koordinatı	Sırık veya Yer	Sürvey Alanı (da)	Örnekleme Alanı (da)	Hastalığın bulunma oranı (%)
154	Erbaa	Değirmenli	Duran ÖZER	Sırık	4	1	0
155	Erbaa	Değirmenli	Halis ÖZER	Sırık	5	1,5	15
156	Erbaa	Çevresu	Aslan ÖCAL	Sırık	8	2	2
157	Erbaa	Çevresu	Başar ÖCAL	Sırık	11	2	4
158	Erbaa	Çevresu	Ahmet CİNBAŞ	Sırık	16	2	0
159	Erbaa	Çevresu	Alaattin ÖCALAN	Sırık	10	2	10
160	Erbaa	Çevresu	37 289296D 4513698K	Yer	6	1,5	0
161	Erbaa	Kızılçubuk	Murat ÖZAYDIN	Sırık	6	1,5	0
162	Erbaa	Kızılçubuk	Kamil DEMİR	Sırık	5	1,5	0
163	Erbaa	Değirmenli	Ali AKAR	Sırık	5	1,5	2
TOPLAM					1246,5	255	4,98 (ort.)

Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2. incelendiğinde; 2011 yılında toplam 543 da'lık alanda 65 farklı üretici tarlasında sürvey yapılmış olup, ortalama hastalığın bulunma oranı %9,64 düzeyinde olmuştur. 14 adet tarlada yer domatesi üretiminin yapıldığı, diğer alanlarda ise sırık domates yetiştiriciliğinin yapıldığı görülmüştür. 65 tarlanın 33'ünde ise hastalık tespit edilmiştir. 2012 yılında ise daha fazla alanda sürvey yapılarak 1246,5 da'lık alanda ortalama hastalığın bulunma oranı %4,98 de kalmıştır. Sürvey yapılan 163 tarlanın 79'unda ise hastalık tespit edilmiştir. 2012 yılında da 16 alanda yer domates yetiştiriciliği, 147 alanda ise sırık domates yetiştiriciliği yapılmıştır.

Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.'de verilen bilgiler doğrultusunda genel anlamda 2011 yılında ilçe bazında hastalığın bölgedeki ve tarladaki bulunma oranı Çizelge 4.3.'de, 2012 yılına ait oranlar ise Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. 2011 yılında Tokat ilinde hastalığın bölgedeki ve tarladaki bulunma oranı

İlçe	Sürvey Alanı (da)	Hastalığın Bölgedeki Bulunma Oranı (%)	Hastalığın Tarladaki Bulunma Oranı (%)
Merkez	111	88,88	12,44
Niksar	86	54,54	11,18
Erbaa	85	52,38	10,71
Turhal	199	46,15	9,69
Pazar	62	18,18	3,72

Çizelge 4.4. 2012 yılında Tokat ilinde hastalığın bölgedeki ve tarladaki bulunma oranı

İlçe	Sürvey Alanı (da)	Hastalığın Bölgedeki Bulunma Oranı (%)	Hastalığın Tarladaki Bulunma Oranı (%)
Merkez	513,5	52,85	6,51
Pazar	131	44,44	3,61
Turhal	404	47,72	5,25
Erbaa	129	61,90	2,90
Niksar	74	0	0

Çizelge 4.3.'de görüldüğü üzere, 2011 yılında Tokat Merkez'de 111 da'lık sürvey alanında %12,44 bitkide, Pazar ilçesinde 62 da'lık alanda %3,72 bitkide, Turhal'da 199 da'lık alanda %9,69 bitkide, Erbaa'da 85 da'lık alanda %10,71 bitkide ve Niksar ilçesinde 86 da'lık alanda %11,18 bitkide hastalık belirtisine rastlanılmıştır. Diğer taraftan Merkez'de 9 araziden 8'inde hastalık görülmüş olup hastalığın bölgedeki bulunma oranı %88,88 olarak belirlenmiştir. Diğer ilçelerde ise bu oran sırasıyla Niksar'da %54,54, Erbaa'da %52,38, Turhal'da %46,15 ve Pazar'da %18,18 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3.).

2012 yılı verilerine bakıldığında ise, Merkez'de 513,5 da'lık alanda %6,51 bitkide, Pazar ilçesinde 131 da'lık alanda %3,61 bitkide, Turhal'da 404 da'lık alanda %5,25 bitkide, Erbaa'da 129 da'lık alanda %2,90 bitkide ve Niksar ilçesinde 74 da'lık alanda %0 bitkide hastalık belirtisine rastlanılmıştır. Yine bölgedeki hastalığın bulunma oranı hesaplandığında; Erbaa'da %61,90, Merkez'de %52,85, Turhal'da %47,72, Pazar'da %44,44 ve Niksar'da ise %0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4.).

2011 ve 2012 yıllarında yapılan sürveylerde elde edilen sonuçlar incelendiğinde; özellikle Merkez, Erbaa ve Niksar ilçelerinde hastalık yoğunluğunda bir düşüşün olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.). Bu düşüş üzerinde aylık mevsimsel değişmelerin çok fazla etkisinin olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.5.). Niksar ilçesinde ise özellikle yer domatesi yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu bölgede hastalığın epidemi yaptığı dönemlerde, domates üretiminin artık yapılmadığı sezon sonuna denk geldiği görülmüştür. Ayrıca 2010 ve 2011 yıllarında hastalık oranının yüksek olmasında, bölgede tek bir çeşidin yetiştiriciliğinin yapılması ve fide kaynaklı bir enfeksiyonun etkisinin olduğu, fide araziye dikilmeden önce enfeksiyonun başladığı görülmüştür.

2012 yılı itibariyle hastalık oranındaki düşüş üzerinde ise bölgede farklı çeşitlerin yetiştiriciliğinin yapılmasının, sulama sistemi olarak damlama sulama sistemini tercih etmelerinin ayrıca üreticilerin hastalığı tanıyarak mücadelesi konusunda bilinçlenmesinin de etkisinin olduğu kanaatine varılmıştır.

Çizelge 4.5. Tokat ili 2011 ve 2012 yıllarına ait iklim verileri

Aylar	2011		2012	
	Sıcaklık (Ortalama-°C)	Toplam Yağış (mm)	Sıcaklık (Ortalama-°C)	Toplam Yağış (mm)
Ocak	2,5	23,2	1,3	48,0
Şubat	3,7	22,4	-1,6	46,3
Mart	6,7	69,5	3,6	44,3
Nisan	10,9	73,5	16,1	14,8
Mayıs	15,5	59,1	17,9	114,7
Haziran	19,5	76,4	21,4	36,3
Temmuz	24,2	37,9	24,4	30,7
Ağustos	22,0	16,5	22,9	1,5
Eylül	18,4	14,8	20,6	5,1
Ekim	13,1	24,0	16,0	30,8
Kasım	3,3	29,5	9,8	97,0
Aralık	4,1	23,4	5,6	77,2

Bölgemizde Saygı (2010) tarafından domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in rastlanma sıklığını belirlemek amacıyla 2008 ve 2009 yıllarında iki yıllık sürveyler yapılmıştır. İlk yıl yapılan sürveylerden hastalık etmeni bulunamazken, ikinci yıl 55 tarlada gözlem yapılmış olup, 39 ayrı bölgeden toplanan özellikle solgunluk belirtisi gösteren bitkilerden 39 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Yapılan moleküler analizler sonucunda, izole edilen bakterilerden 3 adedinin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar Tokat ili domates üretim alanlarında 2009 yılı bakteriyel solgunluk hastalığının %1,65 gibi çok düşük bir oranda olduğunu göstermektedir. Ancak bu çalışma kapsamında yapılan sürveyler, 2011 ve 2012 yıllarında hastalık yoğunluğunda kayda değer bir artışın olduğunu göstermiştir. Özellikle ön çalışmaların yürütüldüğü 2010 yılında hastalığın hızlı bir şekilde artış gösterdiği ve %2-100 arasında değişen oranlarda ürün kayıplarına neden olduğu görülmüştür (Yazıcı ve ark., 2011).

Yukarıda da belirtildiği gibi 2010 yılı üretim sezonunda hastalığın bölgede epidemik boyutlara ulaşmasının ana nedeninin %90 oranında tek bir sırik domates çeşidinin bölgede hakim olması ve gelen fidelerin sağlıklı olmamasından kaynaklandığı

düşünülmektedir. Gelen fide partilerinin çoğunluğunda, viyollerdeki bitkilerin bazılarının enfeksiyon sonucu öldüğü ve ölü bitkiler uzaklaştırılarak sağlıklı gözükenlerin tarlalara dikildiği üreticilerle yapılan görüşmelerle belirlenmiş olup, bu tür tarlalar daha sonra sürülerek başka bir ürün (slajlık mısır) ekimi yapılmıştır. Diğer taraftan 2011 ve 2012 yıllarında hastalık yoğunluğunda görülen düşüşlerin hem üreticilerin hastalık konusunda bilgi sahibi olmalarının ve hem de bölgeye giren fidelerin büyük oranda hastaliksız olmasının kaynaklandığı düşünülmektedir.

Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar ile de elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermektedir. Öktem ve Benlioğlu (1993) tarafından yapılan ön çalışmada Afyon, Ankara, Bolu, Burdur, Çankırı, Eskişehir, Isparta, Kayseri, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Niğde, Yozgat ve Zonguldak'ı kapsayan 14 ilde domates ekim alanlarında 354 örnekleme noktasında domates bakteri hastalıkları sürveyi yapılmıştır. 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. Öktem (1984), Ankara ilinde hastalığın %0,5 ile %23 arasında bir yaygınlık gösterdiğini ve bazı ilçelerde %100 bulaşık tarlalara rastlanıldığını bildirmiştir. Batı Akdeniz Bölgesinde Basım ve ark., (2004) tarafından yapılan çalışmada seralarda hastalık yaygınlığı %26-65 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir. Çetinkaya-Yıldız (2007) Mersin ve Adana illerinde yaptığı sürvey çalışmaları sonucunda hastalık yaygınlığını %15-25 arasında değişen oranlarda belirlemiştir.

2010 yılında yaptığımız ön çalışmalarda da, domates üretim alanlarında bitkilerde solgunluk, iletim demetlerinde kahverengileşme, özde koflaşma, kuruma ve meyvelerde kuş gözü belirtileri tespit edilmiştir. Bu belirtilere *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olabileceği düşünülmüştür. Toplanan örneklerin Koch postulatı ile elde edilen re-izolatlarının, patojenisite, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre ve tanıyı desteklemek için yapılan PCR test sonuçlarına göre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanımlanması ile bölgedeki domates üretim alanlarının yoğun biçimde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* etmeni ile bulaşık olduğu saptanmıştır.

2011 ve 2012 yıllarında yapılan sürvey çalışmaları sonucunda da, domates üretimi yapılan alanlarda bitkilerde belirgin bir şekilde solgunluk ve yanıklık (şekil 4.1.), iletim demetlerinde kahverengileşme (şekil 4.2.), koflaşma veya zn boşalması (şekil 4.3.) simptomları görülmüştür. Özellikle meyve sapında çatlamalar (şekil 4.4.) ve meyvelerde kuş gözü simptomları (şekil 4.5.), enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında ise bitkilerde tamamen kurumalar görülmüştür. şekil 4.6.'da üretim alanındaki hastalığın şiddeti verilmiştir. Bölgede hastalığın yoğun olmasından dolayı artık üreticiler sulama, budama, yabancı ot temizliği gibi kültürel önlemlerden vazgeçmişlerdir. şekil 4.7.'de hastalıktan dolayı üreticinin arazi bakımından vazgeçtiği tarladan genel bir görüntü görülmektedir.



şekil 4.1. Domates bitkisinde görülen tek taraflı solgunluk ve yanıklık



Şekil 4.2. Domates bitkilerinde iletim demetlerindeki kahverengileşme



Şekil 4.3. İletim demetlerine koflaşma veya özün boşalması



Şekil 4.4. Domates bitkilerinde meyve saplarında görülen çatlamlar



Şekil 4.5. Meyvelerde görülen kuş gözü simptomsu



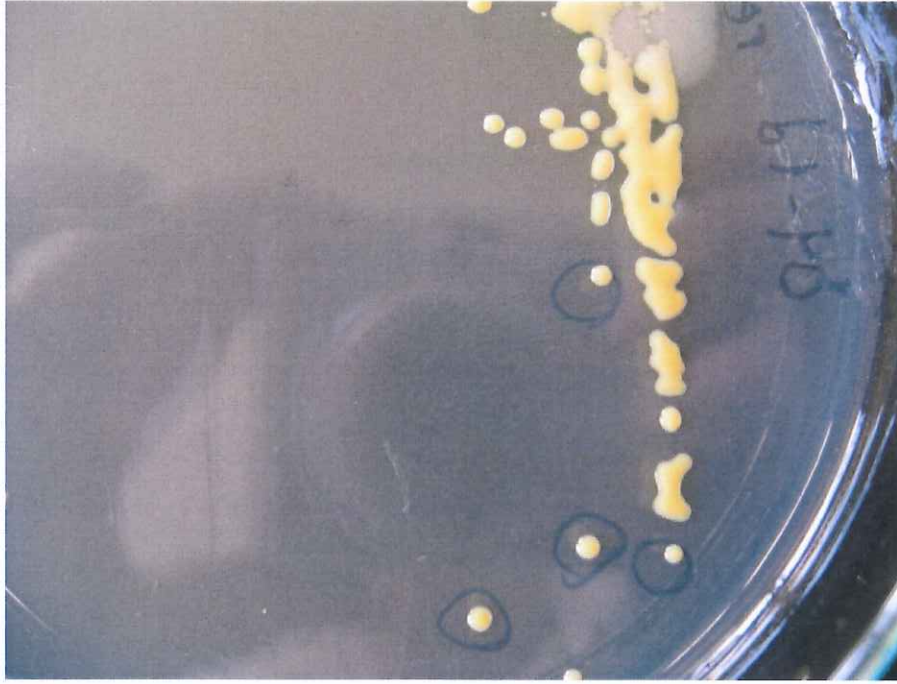
Şekil 4.6. Üretim alanındaki Domates bakteriyel solgunluk hastalığının şiddeti



Şekil 4.7. Hastalıktan dolayı üreticinin arazi bakımından vazgeçtiği tarladan genel bir görüntü

4.2. Domates bakteriyel solgunluk etmeninin izolasyonu

Sürveylerde toplanan ve üreticiler tarafından laboratuara getirilen hasta bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu 2011 yılında toplam 99 adet bakteri izolatu (Çizelge 4.6.), 2012 yılında ise toplam 163 adet bakteri izolatu (Çizelge 4.7.) elde edilmiştir. Yapılan izolasyonlarda PSF besi yerinde açık sarı renkte koloniler gelişmiştir (Şekil 4.8.). Besi yerinde sarı renkli kolonilerin oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiş olup buradan elde edilen izolatların *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olabilme olasılığını artırmıştır.



Şekil 4.8. PSF besi yerinde gelişen sarı renkte koloniler

Çizelge 4.6. 2011 yılında domateslerde yapılan izolasyonlarda elde edilen izolatlar ve izole edildikleri yerler

Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer	Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer
1	SB-1a	Üzümlören	15	SB-5a	Şenyurt
2	SB-1b	Üzümlören	16	SB-5b	Şenyurt
3	SB-1c	Üzümlören	17	SB-6a	Değirmenli
4	SB-1d	Üzümlören	18	SB-6b	Değirmenli
5	SB-2a	Üzümlören	19	SB-6c	Değirmenli
6	SB-2b	Üzümlören	20	SB-6d	Değirmenli
7	SB-2c	Üzümlören	21	SB-7a	Çevresu
8	SB-3a	Dereköy	22	SB-8a	Değirmenli
9	SB-3b	Dereköy	23	SB-8b	Değirmenli
10	SB-3c	Dereköy	24	SB-9a	Değirmenli
11	SB-3d	Dereköy	25	SB-9b	Değirmenli
12	SB-4a	Endiz	26	SB-9c	Değirmenli
13	SB-4b	Endiz	27	SB-10a	Değirmenli
14	SB-4c	Endiz	28	SB-10b	Değirmenli

Çizelge 4.6. (Devam) 2011 yılında domateslerde yapılan izolasyonlarda elde edilen izolatlar ve izole edildikleri yerler

Sıra no	İzolot kodu	İzole edildiği yer	Sıra no	İzolot kodu	İzole edildiği yer
29	SB-11a	Değirmenli	67	SB-27a	Çerçi/1
30	SB-11b	Değirmenli	68	SB-27b	Çerçi/1
31	SB-12a	Küçükbağlar	69	SB-27c	Çerçi/1
32	SB-12b	Küçükbağlar	70	SB-27d	Çerçi/1
33	SB-13a	Şahinli	71	SB-28a	Güryıldız
34	SB-13b	Şahinli	72	SB-28b	Güryıldız
35	SB-14a	Değirmenli	73	SB-28c	Güryıldız
36	SB-14b	Değirmenli	74	SB-28d	Güryıldız
37	SB-15a	Değirmenli	75	SB-29a	Büyük yıldız
38	SB-15b	Değirmenli	76	SB-29b	Büyük yıldız
39	SB-16a	Buzköy	77	SB-30a	Necip
40	SB-16b	Buzköy	78	SB-30b	Necip
41	SB-17a	Buzköy	79	SB-30c	Necip
42	SB-17b	Buzköy	80	SB-31a	Büyük yıldız
43	SB-18a	Şahinli	81	SB-31b	Büyük yıldız
44	SB-18b	Şahinli	82	SB-32a	Büyük yıldız
45	SB-19a	Çerçi/3	83	SB-32b	Büyük yıldız
46	SB-19b	Çerçi/3	84	SB-32c	Büyük yıldız
47	SB-19c	Çerçi/3	85	SB-33a	Küçükbağlar
48	SB-19d	Çerçi/3	86	SB-33b	Küçükbağlar
49	SB-20a	Çerçi/4	87	SB-34a	Küçükbağlar
50	SB-20b	Çerçi/4	88	SB-34b	Küçükbağlar
51	SB-20c	Çerçi/4	89	SB-35a	Küçükbağlar
52	SB-20d	Çerçi/4	90	SB-35b	Küçükbağlar
53	SB-21a	Dökmetepe	91	SB-36a	Küçükbağlar
54	SB-21b	Dökmetepe	92	SB-36b	Küçükbağlar
55	SB-22a	Büyük yıldız	93	SB-37a	Küçükbağlar
56	SB-22b	Büyük yıldız	94	SB-37b	Küçükbağlar
57	SB-23a	Pazar	95	SB-38a	Büyük yıldız
58	SB-23b	Pazar	96	SB-38b	Büyük yıldız
59	SB-24a	Dökmetepe	97	SB-39a	Büyük yıldız
60	SB-24b	Dökmetepe	98	SB-39b	Büyük yıldız
61	SB-25a	Şenyurt	99	SB-39c	Büyük yıldız
62	SB-25b	Şenyurt			
63	SB-25c	Şenyurt			
64	SB-26a	Şenyurt			
65	SB-26b	Şenyurt			
66	SB-26c	Şenyurt			

Çizelge 4.7. 2012 yılında domateslerde yapılan izolasyonlarda elde edilen izolatlar ve izole edildikleri yerler

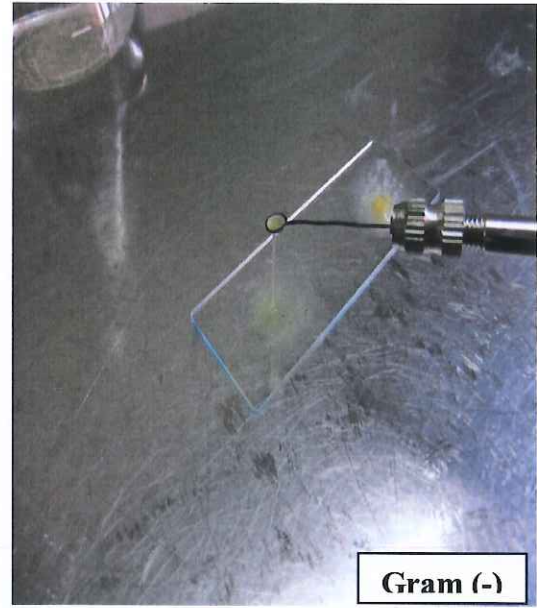
Sıra no	İzolot kodu	İzole edildiği yer	Sıra no	İzolot kodu	İzole edildiği yer
1	K-1/1a	Dereköy	51	K-22/1a	Güryıldız
2	K-2/1a	Dökmetepe	52	K-22/1b	Güryıldız
3	K-2/2a	Dökmetepe	53	K-22/2a	Güryıldız
4	K-3/1a	Dökmetepe	54	K-23/1a	Bağlarbaşı
5	K-3/1b	Dökmetepe	55	K-23/1b	Bağlarbaşı
6	K-3/2a	Dökmetepe	56	K-23/2a	Bağlarbaşı
7	K-4/1a	Dökmetepe	57	K-26/1a	Pazar
8	K-4/2a	Dökmetepe	58	K-26/2a	Pazar
9	K-5/1a	Necip	59	K-27/1a	Çerçi
10	K-5/2b	Necip	60	K-27/1b	Çerçi
11	K-6/1a	Tatar	61	K-28/2a	Necip
12	K-6/1b	Tatar	62	K-29/1a	Kat
13	K-6/2a	Tatar	63	K-29/1b	Kat
14	K-7/1a	Büyükyıldız	64	K-30/1a	Kat
15	K-7/1b	Büyükyıldız	65	K-30/1b	Kat
16	K-7/2a	Büyükyıldız	66	K-31/1a	Kat
17	K-8/1a	Büyükyıldız	67	K-33/1a	Büyükbağlar
18	K-9/1a	Büyükyıldız	68	K-33/1b	Büyükbağlar
19	K-11/1a	Güryıldız	69	K-33/2a	Büyükbağlar
20	K-11/1b	Güryıldız	70	K-33/2a	Büyükbağlar
21	K-11/2a	Güryıldız	71	K-34/1a	Kat
22	K-11/2b	Güryıldız	72	K-35/1a	Kat
23	K-12/1a	Dereköy	73	K-36/1a	Çerçi
24	K-13/2a	Tatar	74	K-36/1b	Çerçi
25	K-13/1a	Tatar	75	K-37/1a	Merkez
26	K-13/1b	Tatar	76	K-37/2a	Merkez
27	K-14/1a	Tatar	77	K-38/1a	Merkez
28	K-14/2a	Tatar	78	K-39/1a	Kat
29	K-14/2b	Tatar	79	K-40/1a	Necip
30	K-15/1a	Güryıldız	80	K-40/1a	Necip
31	K-15/1b	Güryıldız	81	K-41/1	Güryıldız
32	K-15/2a	Güryıldız	82	K-41/2	Güryıldız
33	K-16/1a	Güryıldız	83	K-42/1	Güryıldız
34	K-16/1b	Güryıldız	84	K-42/2	Güryıldız
35	K-16/2a	Güryıldız	85	K-43/1	Güryıldız
36	K-16/2b	Güryıldız	86	K-43/2	Güryıldız
37	K-17/1a	Dereköy	87	K-44/1	Güryıldız
38	K-17/1b	Dereköy	88	K-45/1	Yeşilyurt
39	K-17/2a	Dereköy	89	K-45/2	Yeşilyurt
40	K-17/2b	Dereköy	90	K-46/1	Küçükyıldız
41	K-18/1a	Güryıldız	91	K-46/2	Küçükyıldız
42	K-19/2a	Güryıldız	92	K-47/1	Büyükyıldız
43	K-19/1b	Güryıldız	93	K-47/2	Büyükyıldız
44	K-19/1a	Güryıldız	94	K-47/3	Büyükyıldız
45	K-20/1b	Ulaş	95	K-48/1	Güryıldız
46	K-20/2a	Ulaş	96	K-48/2	Güryıldız
47	K-20/2b	Ulaş	97	K-49/1	Güryıldız
48	K-21/2a	Yeşilyurt	98	K-49/2	Güryıldız
49	K-21/1a	Yeşilyurt	99	K-50/1	Güryıldız
50	K-21/1b	Yeşilyurt	100	K-50/2	Güryıldız

Çizelge 4.7. (Devam) 2012 yılında domateslerde yapılan izolasyonlarda elde edilen izolatlar ve izole edildikleri yerler

Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer	Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer
101	K-51/1	Yeşilyurt	133	T-15/1a	Pazar
102	K-53/1	Yeşilyurt	134	T-15/1b	Pazar
103	K-54/1	Yeşilyurt	135	E-1a	Değirmenli
104	K-55/1	Güryıldız	136	E-1b	Değirmenli
105	K-55/2	Güryıldız	137	E-1c	Değirmenli
106	K-56/1	Büyük yıldız	138	E-2/1a	Çevresu
107	K-57/1	Büyük yıldız	139	E-2/2a	Çevresu
108	K-58/1	Kat	140	E-3/1a	Değirmenli
109	K-59/1	Kat	141	E-3/2a	Değirmenli
110	K-60/1a	Merkez	142	E-4/2a	Değirmenli
111	K-61/1a	Pazar	143	E-4/1a	Değirmenli
112	K-62/1a	Necip	144	E-4/2b	Değirmenli
113	K-63/1a	Merkez	145	E-5/1a	Çevresu
114	K-64/1a	Şenyurt	146	E-6a	Değirmenli
115	K-66/1a	Kat	147	E-6b	Değirmenli
116	T-2d	Merkez	148	E-7/1a	Değirmenli
117	T-2c	Merkez	149	E-7/1b	Değirmenli
118	T-4b	Merkez	150	E-7/2a	Değirmenli
119	T-1a	Merkez	151	E-8a	Değirmenli
120	T-3b	Merkez	152	E-8b	Değirmenli
121	T-1d	Merkez	153	E-8c	Değirmenli
122	T-1b	Merkez	154	E-9/1a	Değirmenli
123	T-4a	Merkez	155	E-9/1b	Değirmenli
124	T-2a	Merkez	156	E-9/2a	Değirmenli
125	T-3a	Merkez	157	E-10/1a	Değirmenli
126	T-1c	Merkez	158	E-10/2a	Değirmenli
127	T-2b	Merkez	159	E-11a	Değirmenli
128	T-5/1a	Merkez	160	E-12/1a	Çevresu
129	T-5/2a	Merkez	161	E-12/1b	Çevresu
130	T-5/2b	Merkez	162	E-12/2a	Çevresu
131	T-5/1b	Merkez	163	E-13a	Değirmenli
132	T-2d	Merkez			

4.3. Potasyum hidroksit testi (KOH) ile Gram reaksiyon

Yapılan Gram reaksiyon testinde lam üzerinde sümüksü bir yapı oluşturmeyen izolatlar Gram pozitif olarak, sümüksü bir yapı oluşturarak sünmeye neden olan izolatlar ise Gram negatif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.9.). 2011 yılında elde edilen toplam 99 adet izolattan 86'sı, 2012 yılında elde edilen toplam 163 adet izolattan 111 adeti Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar izolatların çoğunluğunun *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olabileceği olasılığını artırmıştır. Çizelge 4.8.'de 2011 yılında yapılan, Çizelge 4.9.'de 2012 yılında yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen izolatların elde edildiği yerler ve Gram reaksiyon test sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.9. KOH testine göre Gram (+) ve Gram (-) değerlendirmesi

Çizelge 4.8. 2011 yılına ait izolatlar, izolatların elde edildiği yerler ve KOH testi ile Gram reaksiyon sonuçları

Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer	Gram reaksiyon	Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer	Gram reaksiyon
1	SB-1a	Üzümlören	+	29	SB-11a	Değirmenli	+
2	SB-1b	Üzümlören	+	30	SB-11b	Değirmenli	+
3	SB-1c	Üzümlören	+	31	SB-12a	Küçükbağlar	+
4	SB-1d	Üzümlören	+	32	SB-12b	Küçükbağlar	+
5	SB-2a	Üzümlören	+	33	SB-13a	Şahinli	+
6	SB-2b	Üzümlören	+	34	SB-13b	Şahinli	+
7	SB-2c	Üzümlören	+	35	SB-14a	Değirmenli	+
8	SB-3a	Dereköy	+	36	SB-14b	Değirmenli	+
9	SB-3b	Dereköy	+	37	SB-15a	Değirmenli	+
10	SB-3c	Dereköy	+	38	SB-15b	Değirmenli	+
11	SB-3d	Dereköy	+	39	SB-16a	Buzköy	+
12	SB-4a	Endiz	-	40	SB-16b	Buzköy	+
13	SB-4b	Endiz	-	41	SB-17a	Buzköy	+
14	SB-4c	Endiz	-	42	SB-17b	Buzköy	+
15	SB-5a	Şenyurt	-	43	SB-18a	Şahinli	+
16	SB-5b	Şenyurt	-	44	SB-18b	Şahinli	+
17	SB-6a	Değirmenli	+	45	SB-19a	Çerçi/3	+
18	SB-6b	Değirmenli	+	46	SB-19b	Çerçi/3	+
19	SB-6c	Değirmenli	+	47	SB-19c	Çerçi/3	+
20	SB-6d	Değirmenli	+	48	SB-19d	Çerçi/3	+
21	SB-7a	Çevresu	+	49	SB-20a	Çerçi/4	+
22	SB-8a	Değirmenli	+	50	SB-20b	Çerçi/4	+
23	SB-8b	Değirmenli	+	51	SB-20c	Çerçi/4	+
24	SB-9a	Değirmenli	+	52	SB-20d	Çerçi/4	+
25	SB-9b	Değirmenli	+	53	SB-21a	Dökmetepe	+
26	SB-9c	Değirmenli	+	54	SB-21b	Dökmetepe	+
27	SB-10a	Değirmenli	+	55	SB-22a	Büyük yıldız	+
28	SB-10b	Değirmenli	+	56	SB-22b	Büyük yıldız	+

Çizelge 4.8. (Devam) 2011 yılına ait izolatlar, izolatların elde edildiği yerler ve KOH testi ile Gram reaksiyon sonuçları

Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer	Gram reaksiyon	Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer	Gram reaksiyon
57	SB-23a	Pazar	+	80	SB-31a	Büyükyıldız	+
58	SB-23b	Pazar	+	81	SB-31b	Büyükyıldız	+
59	SB-24a	Dökmetepe	+	82	SB-32a	Büyükyıldız	+
60	SB-24b	Dökmetepe	+	83	SB-32b	Büyükyıldız	+
61	SB-25a	Şenyurt	+	84	SB-32c	Büyükyıldız	+
62	SB-25b	Şenyurt	+	85	SB-33a	Küçükbağlar	+
63	SB-25c	Şenyurt	+	86	SB-33b	Küçükbağlar	-
64	SB-26a	Şenyurt	+	87	SB-34a	Küçükbağlar	-
65	SB-26b	Şenyurt	+	88	SB-34b	Küçükbağlar	-
66	SB-26c	Şenyurt	+	89	SB-35a	Küçükbağlar	+
67	SB-27a	Çerçi/1	-	90	SB-35b	Küçükbağlar	+
68	SB-27b	Çerçi/1	-	91	SB-36a	Küçükbağlar	+
69	SB-27c	Çerçi/1	-	92	SB-36b	Küçükbağlar	+
70	SB-27d	Çerçi/1	-	93	SB-37a	Küçükbağlar	+
71	SB-28a	Güryıldız	+	94	SB-37b	Küçükbağlar	+
72	SB-28b	Güryıldız	+	95	SB-38a	Büyükyıldız	-
73	SB-28c	Güryıldız	+	96	SB-38b	Büyükyıldız	+
74	SB-28d	Güryıldız	+	97	SB-39a	Büyükyıldız	+
75	SB-29a	Büyükyıldız	+	98	SB-39b	Büyükyıldız	+
76	SB-29b	Büyükyıldız	+	99	SB-39c	Büyükyıldız	
77	SB-30a	Necip	+				
78	SB-30b	Necip	+				
79	SB-30c	Necip	+				

Çizelge 4.9. 2012 yılına ait izolatlara, izolatlara elde edildiği yerler ve KOH testi ile Gram reaksiyon sonuçları

Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer	Gram reaksiyon	Sıra no	İzolat kodu	İzole edildiği yer	Gram reaksiyon
1	K-1/1a	Dereköy	+	51	K-22/1a	Güryıldız	-
2	K-2/1a	Dökmetepe	+	52	K-22/1b	Güryıldız	-
3	K-2/2a	Dökmetepe	+	53	K-22/2a	Güryıldız	-
4	K-3/1a	Dökmetepe	+	54	K-23/1a	Bağlarbaşı	+
5	K-3/1b	Dökmetepe	+	55	K-23/1b	Bağlarbaşı	+
6	K-3/2a	Dökmetepe	+	56	K-23/2a	Bağlarbaşı	+
7	K-4/1a	Dökmetepe	-	57	K-26/1a	Pazar	-
8	K-4/2a	Dökmetepe	-	58	K-26/2a	Pazar	+
9	K-5/1a	Necip	+	59	K-27/1a	Çerçi	+
10	K-5/2b	Necip	+	60	K-27/1b	Çerçi	-
11	K-6/1a	Tatar	+	61	K-28/2a	Necip	+
12	K-6/1b	Tatar	+	62	K-29/1a	Kat	+
13	K-6/2a	Tatar	+	63	K-29/1b	Kat	+
14	K-7/1a	Büyükıldız	-	64	K-30/1a	Kat	+
15	K-7/1b	Büyükıldız	-	65	K-30/1b	Kat	+
16	K-7/2a	Büyükıldız	-	66	K-31/1a	Kat	+
17	K-8/1a	Büyükıldız	+	67	K-33/1a	Büyükbağlar	+
18	K-9/1a	Büyükıldız	+	68	K-33/1b	Büyükbağlar	+
19	K-11/1a	Güryıldız	+	69	K-33/2a	Büyükbağlar	+
20	K-11/1b	Güryıldız	+	70	K-33/2a	Büyükbağlar	+
21	K-11/2a	Güryıldız	-	71	K-34/1a	Kat	+
22	K-11/2b	Güryıldız	+	72	K-35/1a	Kat	+
23	K-12/1a	Dereköy	+	73	K-36/1a	Çerçi	-
24	K-13/2a	Tatar	+	74	K-36/1b	Çerçi	-
25	K-13/1a	Tatar	+	75	K-37/1a	Merkez	+
26	K-13/1b	Tatar	+	76	K-37/2a	Merkez	+
27	K-14/1a	Tatar	-	77	K-38/1a	Merkez	-
28	K-14/2a	Tatar	+	78	K-39/1a	Kat	+
29	K-14/2b	Tatar	-	79	K-40/1a	Necip	+
30	K-15/1a	Güryıldız	+	80	K-40/1a	Necip	+
31	K-15/1b	Güryıldız	+	81	K-41/1	Güryıldız	+
32	K-15/2a	Güryıldız	+	82	K-41/2	Güryıldız	+
33	K-16/1a	Güryıldız	-	83	K-42/1	Güryıldız	+
34	K-16/1b	Güryıldız	-	84	K-42/2	Güryıldız	+
35	K-16/2a	Güryıldız	-	85	K-43/1	Güryıldız	+
36	K-16/2b	Güryıldız	-	86	K-43/2	Güryıldız	+
37	K-17/1a	Dereköy	-	87	K-44/1	Güryıldız	+
38	K-17/1b	Dereköy	+	88	K-45/1	Yeşilyurt	+
39	K-17/2a	Dereköy	+	89	K-45/2	Yeşilyurt	+
40	K-17/2b	Dereköy	+	90	K-46/1	Küçükıldız	+
41	K-18/1a	Güryıldız	-	91	K-46/2	Küçükıldız	+
42	K-19/2a	Güryıldız	+	92	K-47/1	Büyükıldız	-
43	K-19/1b	Güryıldız	+	93	K-47/2	Büyükıldız	+
44	K-19/1a	Güryıldız	+	94	K-47/3	Büyükıldız	+
45	K-20/1b	Ulaş	+	95	K-48/1	Güryıldız	+
46	K-20/2a	Ulaş	+	96	K-48/2	Güryıldız	+
47	K-20/2b	Ulaş	+	97	K-49/1	Güryıldız	+
48	K-21/2a	Yeşilyurt	+	98	K-49/2	Güryıldız	+
49	K-21/1a	Yeşilyurt	-	99	K-50/1	Güryıldız	+
50	K-21/1b	Yeşilyurt	+	100	K-50/2	Güryıldız	+

Çizelge 4.9. (Devam) 2012 yılına ait izolatlar, izolatların elde edildiği yerler ve KOH testi ile Gram reaksiyon sonuçları

Sıra no	İzolot kodu	İzole edildiği yer	Gram reaksiyon	Sıra no	İzolot kodu	İzole edildiği yer	Gram reaksiyon
101	K-51/1	Yeşilyurt	+	133	T-15/1a	Pazar	-
102	K-53/1	Yeşilyurt	+	134	T-15/1b	Pazar	-
103	K-54/1	Yeşilyurt	+	135	E-1a	Değirmenli	-
104	K-55/1	Güryıldız	+	136	E-1b	Değirmenli	-
105	K-55/2	Güryıldız	+	137	E-1c	Değirmenli	-
106	K-56/1	Büyükyıldız	+	138	E-2/1a	Çevresu	+
107	K-57/1	Büyükyıldız	+	139	E-2/2a	Çevresu	+
108	K-58/1	Kat	+	140	E-3/1a	Değirmenli	-
109	K-59/1	Kat	+	141	E-3/2a	Değirmenli	-
110	K-60/1a	Merkez	-	142	E-4/2a	Değirmenli	-
111	K-61/1a	Pazar	-	143	E-4/1a	Değirmenli	-
112	K-62/1a	Necip	+	144	E-4/2b	Değirmenli	+
113	K-63/1a	Merkez	+	145	E-5/1a	Çevresu	-
114	K-64/1a	Şenyurt	+	146	E-6a	Değirmenli	+
115	K-66/1a	Kat	+	147	E-6b	Değirmenli	-
116	T-2d	Merkez	+	148	E-7/1a	Değirmenli	+
117	T-2c	Merkez	+	149	E-7/1b	Değirmenli	-
118	T-4b	Merkez	+	150	E-7/2a	Değirmenli	+
119	T-1a	Merkez	+	151	E-8a	Değirmenli	+
120	T-3b	Merkez	+	152	E-8b	Değirmenli	+
121	T-1d	Merkez	+	153	E-8c	Değirmenli	+
122	T-1b	Merkez	+	154	E-9/1a	Değirmenli	-
123	T-4a	Merkez	-	155	E-9/1b	Değirmenli	-
124	T-2a	Merkez	-	156	E-9/2a	Değirmenli	-
125	T-3a	Merkez	-	157	E-10/1a	Değirmenli	+
126	T-1c	Merkez	-	158	E-10/2a	Değirmenli	-
127	T-2b	Merkez	-	159	E-11a	Değirmenli	-
128	T-5/1a	Merkez	+	160	E-12/1a	Çevresu	+
129	T-5/2a	Merkez	+	161	E-12/1b	Çevresu	+
130	T-5/2b	Merkez	-	162	E-12/2a	Çevresu	-
131	T-5/1b	Merkez	-	163	E-13a	Değirmenli	-
132	T-2d	Merkez	+				

4.4. Patojenite ve virulenslik testleri

2011 ve 2012 yılında hasta domates bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen ve Gram reaksiyon testine göre Gram pozitif olarak değerlendirilen izolatlarla yapılan patojenite ve virülenslik testinde, yapılan uygulamalardan 20 gün sonra ilk belirtiler görülmeye başlanmış olup (Şekil 4.10.), hastalık değerlendirmesi uygulamadan 30 gün sonra yapılmıştır. Çizelge 4.10.'da 2011 yılına ait, Çizelge 4.11'da ise 2012 yılına ait *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının virülenslik düzeyleri verilmiştir.

Çizelge 4.10. 2011 yılına ait izolatların virülenslik düzeyleri

İzolat kodu	İzolatın alındığı yer	Hastalık şiddeti	Nekroz oranı (%)	Solgun yaprak oranı (%)
NK	-	0	0 r*	0 s*
PK (YY-2)	Şenyurt/Turhal	5	100 a	85,48 a-f
SB-32c	Büyükyıldız/Merkez	0	0 r	0 s
SB-18a	Şahinli/Niksar	0	0 r	0 s
SB-15a	Değirmenli/Erbaa	0,5	50 i-o	40,90 k-o
SB-13a	Şahinli/Niksar	0,5	27,71 o-q	21,66 n-s
SB-16b	Buzköy/Niksar	0,5	59,70 f-m	15,55 p-s
SB-20b	Çerçi-4/Merkez	0,5	21,62 q-r	3,12 rs
SB-31b	Büyükyıldız/Merkez	1	19,64 q-r	23,68 n-s
SB-1d	Üzümlören/Pazar	1	55,29 g-m	18,30 o-s
SB-10b	Değirmenli/Erbaa	1	24,63 o-q	17,85 n-s
SB-18b	Şahinli/Niksar	1	37,03 m-q	26,19 q-s
SB-19c	Çerçi-3/Merkez	1	53,84 h-o	20 n-s
SB-16a	Buzköy/Niksar	1,5	66,66 c-k	51,72 i-m
SB-19a	Çerçi-3/Merkez	1,5	38,80 m-q	32,43 l-p
SB-33a	Küçükbağlar/Merkez	2	37,33 m-q	26,22 n-r
SB-29a	Büyükyıldız/Merkez	2	27,65 o-q	31,25 m-p
SB-1a	Üzümlören/Pazar	2	91,37 abcd	59,32 i-m
SB-17a	Buzköy/Niksar	2	45 k-p	41,46 k-o
SB-17b	Buzköy/Niksar	2	53,84 h-o	58,62 i-l
SB-19b	Çerçi-3/Merkez	2	75,67a-h	37,50 l-p
SB-25a	Şenyurt/Turhal	2	50 i-o	68,75 c-h
SB-14a	Değirmenli/Erbaa	3	40,54 l-q	23,43 n-s
SB-19d	Çerçi-3/Merkez	3	70,49 a-i	48,21 i-m
SB-38b	Büyükyıldız/Merkez	3	93,93 ab	43,54 j-n
SB-31a	Büyükyıldız/Merkez	3	95,91 ab	64,06 f-k
SB-29b	Büyükyıldız/Merkez	3	43,58 k-q	63,82 e-k
SB-9a	Değirmenli/Erbaa	3	76,36 a-h	54 i-l
SB-11a	Değirmenli/Erbaa	3	73,07 b-j	95,65 k-o
SB-20a	Çerçi-4/Merkez	3	64,15 c-l	65,90 d-j
SB-7a	Çevresu/Erbaa	3	65,11 d-l	30,43 m-q
SB-35a	Küçükbağlar/Merkez	3	100 a	90,24 abc
SB-39a	Büyükyıldız/Merkez	3	89,04 a-e	87,5 a-e
SB-13b	Şahinli/Niksar	3	71,42 b-j	82,97 a-f
SB-20c	Çerçi-4/Merkez	3	64,91 e-m	75 b-h

Çizelge 4.10. (Devam) 2011 yılına ait izolatların virülenslik düzeyleri

İzolot kodu	İzolatin alındığı yer	Hastalık şiddeti	Nekroz oranı (%)	Solgun yaprak oranı (%)
SB-28c	Güryıldız/Merkez	3	100 a	89,09 abcd
SB-25c	Şenyurt/Turhal	3	92,06 abc	77,41 a-h
SB-22a	Büyük yıldız/Merkez	5	100 a	84,21 a-f
SB-32a	Büyük yıldız/Merkez	5	100 a	84,44 a-f
SB-1b	Üzümlören/Pazar	5	82,53 a-e	80 a-f
SB-2c	Üzümlören/Pazar	5	94,91 ab	78,18 a-f
SB-6a	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	80,24 a-g
SB-6d	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	98,46 a
SB-8b	Değirmenli/Erbaa	5	70,90 c-j	92,30 abc
SB-15b	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	85 abc
SB-10a	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	91,93 abc
SB-14b	Değirmenli/Erbaa	5	46,87 j-o	87,75 abcd
SB-28b	Güryıldız/Merkez	5	76,47 a-h	98,30 a
SB-24a	Dökmetepe/Turhal	5	100 a	76,92 a-h
SB-36b	Küçükbağlar/Merkez	5	100 a	92,98 ab
SB-1c	Üzümlören/Pazar	5	83,33 a-f	98,33 a
SB-20d	Çerçi-4/Merkez	5	94,44 abcd	90,62 ab
SB-2b	Üzümlören/Pazar	5	94,54 ab	100 a
SB-3a	Dereköy/Pazar	5	100 a	97,72 a
SB-3c	Dereköy/Pazar	5	80,95 a-g	100 a
SB-25c	Şenyurt/Turhal	5	92,06 a-h	77,41 a-h
SB-39b	Büyük yıldız/Merkez	5	100 a	100 a
SB-35b	Küçükbağlar/Merkez	5	100 a	100 a
SB-2a	Üzümlören/Pazar	5	100 a	100 a
SB-3b	Dereköy/Pazar	5	100 a	100 a
SB-3d	Dereköy/Pazar	5	100 a	100 a
SB-6b	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	100 a
SB-6c	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	100 a
SB-8a	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	100 a
SB-9b	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	100 a
SB-9c	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	100 a
SB-11b	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	100 a
SB-12a	Küçükbağlar/Merkez	5	100 a	100 a
SB-12b	Küçükbağlar/Merkez	5	100 a	100 a
SB-12c	Küçükbağlar/Merkez	5	100 a	100 a
SB-21a	Dökmetepe/Turhal	5	100 a	100 a
SB-21b	Dökmetepe/Turhal	5	100 a	100 a
SB-3b	Pazar	5	100 a	100 a
SB-23c	Pazar	5	100 a	100 a
SB-24b	Dökmetepe/Turhal	5	100 a	100 a
SB-25b	Şenyurt/Turhal	5	100 a	100 a
SB-26a	Şenyurt/Turhal	5	100 a	100 a
SB-26b	Şenyurt/Turhal	5	100 a	100 a
SB-26c	Şenyurt/Turhal	5	100 a	100 a
SB-28a	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
SB-28d	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
SB-30a	Necip/Turhal	5	100 a	100 a
SB-30b	Necip/Turhal	5	100 a	100 a
SB-30c	Necip/Turhal	5	100 a	100a
			LSD: 26,4	LSD: 23,9

* Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.10.'da görüldüğü üzere, hastalık şiddeti Negatif Kontrol'de 0 olarak belirlenmiş olup bitkide herhangi bir hastalık simptomsu gözlenmemiştir. Bunun yanında Büyükyıldız'dan elde edilen SB-32c ve Şahinli'den elde edilen SB-18a izolatlarının uygulandığı bitkilerde de hastalık şiddeti 0 olarak belirlenmiş olup, bu izolatların patojen olmayan izolatlar olduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrolde ise hastalık şiddeti 5 olarak kaydedilmiştir. Uygulama yapılan bitkilerde kanser belirtisi görülmemiş olup, belirgin bir şekilde solgunluk ve yaprak yanıklığı simptomlarına rastlanılmıştır. İzolatlardan 60'ında bitkide hastalık şiddeti 5 olarak kaydedilmiştir. Bu izolatların alındığı yerlere bakıldığında; Turhal, Pazar, Merkez ve Erbaa'ya bağlı arazilerden elde edildiği görülmektedir.

Uygulama yapılan bitkilerde iletim demetlerindeki kahverengileşme oranları % olarak ifade edilmiş olup, Negatif Kontrol'de nekroz oranı %0 iken, Pozitif Kontrol'de %100 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11). İzolatların uygulandığı bitkilerde ise nekroz oranları %0-100 arasında değişmektedir. SB-39b, SB-35b, SB-2a, SB-3b, SB-3d, SB-6b, SB-6c, SB-8a, SB-9b, SB-9c, SB-11b, SB-12a, SB-12b, SB-12c, SB-21a, SB-21b, SB-3b, SB-23c, SB-24b, SB-25b, SB-26a, SB-26b, SB-26c, SB-28a, SB-28d, SB-30a, SB-30b, SB-30c izolatlarının uygulandığı bitkilerde nekroz oranı %100 olup, Negatif kontrole göre istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (Şekil 4.12.). Bu izolatların hastalık şiddetine bakıldığında 5 olarak belirlendiği ve Turhal, Pazar, Merkez ve Erbaa'ya bağlı arazilerden elde edildiği görülmektedir.

Solgun yaprak oranı, bitkideki sağlıklı ve hastalıklı yaprak sayımı yapılarak, % olarak ifade edilmiştir. Negatif Kontrol'de bitkide hiç solgun yaprak görülmemiş olup 0 olarak kaydedilmiştir. Pozitif Kontrol'de ise solgun yaprak oranı %85,48 olarak belirlenmiştir. Uygulamaların yapıldığı bitkilerdeki solgun yaprak oranı incelendiğinde ise, %0-100 arasında değiştiği görülmektedir. SB-2b, SB-3c, ve nekroz boyu %100 olan SB-39b, SB-35b, SB-2a, SB-3b, SB-3d, SB-6b, SB-6c, SB-8a, SB-9b, SB-9c, SB-11b, SB-12a, SB-12b, SB-12c, SB-21a, SB-21b, SB-3b, SB-23c, SB-24b, SB-25b, SB-26a, SB-26b, SB-26c, SB-28a, SB-28d, SB-30a, SB-30b, SB-30c izolatlarının uygulandığı bitkilerdeki solgun yaprak oranı %100 olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.).

Hastalık şiddeti, nekroz oranı ve solgun yaprak oranı değerlendirildiğinde, izolatlar arasında önemli düzeyde farklılıklar olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, aynı

izolat için bu üç değerlendirme kriteri karşılaştırıldığında bir biri ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4.10. Patojenite testinde gözlemlenen solgunluk belirtileri



Şekil 4.11. Pozitif ve negatif kontrolde iletim demetlerindeki farklılıklar



Şekil 4.12. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (SB-9c) izolatının uygulandığı bitkilerde iletim demetlerindeki farklılıklar



Şekil 4.13. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (SB-20b) izolatının uygulandığı bitkilerdeki hastalık şiddetinin düzeyi



Şekil 4.14. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (SB-11b) izolatının uygulandığı bitkilerdeki hastalık şiddetinin düzeyi

Çizelge 4.11. 2012 yılına ait izolatların virülenslik düzeyleri

İzolat kodu	İzolatın alındığı yer	Hastalık şiddeti	Nekroz oranı(%)	Solgun yaprak oranı (%)
NK	-	0	0 j*	0 i*
PK (YY-2)	Şenyurt/Turhal	5	100 a	65,93 d-g
T-4b	Merkez	1	21,17 i	20,37 hı
T-1a	Merkez	1,5	65,90 fg	85,70 a-e
T-2c	Merkez	2	39,70 h	28,55 h
K-2/1a	Dökmektepe/Turhal	2	16,17 i	59,70 g
E-8a	Değirmenli/Erbaa	3	100 a	58,20 g
E-10/1a	Değirmenli/Erbaa	3	56,83 g	56,83 g
K-28/2a	Necip/Turhal	3	83,30 b-e	72,43 b-g
K-26/2a	Pazar	4	67,67 efg	60,90 fg
K-63/1a	Merkez	4	77,77 def	31,07h
K-53/1	Yeşilyurt/Merkez	4	100 a	62,40 fg
E-2/1a	Çevresu/Erbaa	4	100 a	63,85 fg
E-7/1a	Değirmenli/Erbaa	4	100 a	69,03 c-g
E-4/2b	Değirmenli/Erbaa	4	100 a	69,13 c-g
K-29/1a	Kat/Turhal	4	100 a	70,47 b-g
T-5/1a	Merkez	4	100 a	76,10 b-g
K-12/1a	Dereköy/Pazar	4	100 a	76,33 b-g
K-23/1a	Bağlarbaşı/Pazar	4	100 a	77,67 a-g
T-3a	Merkez	4	81,25 c-f	83,30 a-f
K-55/1	Güryıldız/Merkez	4	82,03 cde	87,70 a-d
K-13/1a	Tatar/Pazar	4	100 a	86,80 a-d
K-66/1a	Kat/Turhal	5	92,40 a-d	86,67 a-d

Çizelge 4.11. (Devam) 2012 yılına ait izolatların virülenslik düzeyleri

İzolat kodu	İzolatın alındığı yer	Hastalık şiddeti	Nekroz oranı(%)	Solgun yaprak oranı (%)
K-42/1	Güryıldız/Merkez	5	95,43 abc	68,83 c-g
K-19/1b	Güryıldız/Merkez	5	98,73 ab	100 a
K-47/2	Büyük yıldız/Merkez	5	96,67 abc	100 a
K-41/1	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-58/1	Kat/Turhal	5	100 a	66,97 d-g
K-46/1	Küçük yıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-49/1	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-44/1	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-48/1	Güryıldız/Merkez	5	100 a	72,37 b-g
K-64/1a	Şenyurt/Turhal	5	100 a	60,07 g
K-57/1	Büyük yıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-56/1	Büyük yıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-50/1	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-17/1b	Dereköy/Pazar	5	100 a	100 a
K-3/1a	Dökmetepe/Turhal	5	100 a	100 a
K-11/1a	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-59/1	Kat/Turhal	5	100 a	100 a
K-43/1	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-45/1	Yeşilyurt/Merkez	5	100 a	90,3 ab
K-27/1a	Çerçi/Merkez	5	100 a	100 a
K-15/1a	Güryıldız/Merkez	5	100 a	100 a
K-30/1a	Kat/Turhal	5	100 a	73,00 b-g
K-34/1a	Kat/Turhal	5	100 a	83,03 a-f
K-33/1b	Büyükbağlar/Merkez	5	100 a	90,03 abc
K-13/1a	Tatar/Pazar	5	100 a	100 a
K-5/1a	Necip/Turhal	5	100 a	100 a
K-6/1a	Tatar/Pazar	5	100 a	92,40 ab
K-20/2a	Ulaş/Merkez	5	100 a	100 a
K-40/1a	Necip/Turhal	5	100 a	100 a
E-12/1a	Çevresu/Erbaa	5	100 a	100 a
K-37/1a	Merkez	5	100 a	100 a
E-5/1a	Çevresu/Erbaa	5	100 a	100 a
E-6a	Değirmenli/Erbaa	5	100 a	100 a
K-21/2b	Yeşilyurt/Merkez	5	100 a	100a

* Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.11’da görüldüğü üzere, hastalık şiddeti Negatif Kontrol’de 0 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrolde ise hastalık şiddeti 5 olarak kaydedilmiştir. 2011 yılı verilerinde olduğu gibi, uygulama yapılan bitkilerde kanser belirtisi görülmemiş olup, belirgin bir şekilde solgunluk ve yaprak yanıklığı belirtilmelerine rastlanılmıştır. İzolatlardan 35’inde bitkide hastalık şiddeti 5 olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.15.). Bu izolatların alındığı yerlere bakıldığında; özellikle Merkez’e bağlı arazilerden elde edildiği görülmektedir. Ayrıca Turhal, Pazar ve Erbaa’ya bağlı arazilerden elde edilen izolatlarda da hastalık şiddeti 5 olarak kaydedilmiştir.

Nekroz oranı ise Negatif Kontrol'de nekroz görülmezken, Pozitif Kontrol'de %100 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16). İzolatların uygulandığı bitkilerde ise nekroz oranları %21,17-100 arasında değişmektedir. E-8a, K-53/1, E-2/1a, E-7/1a, E-4/2B, K-29/1a, T-5/1a, K-12/1a, K-23/1a, K-13/1a, K-41/1, K-58/1, K-46/1, K-49/1, K-44/1, K-48/1, K-64/1a, K-57/1, K-56/1, K-50/1, K-17/1b, K-3/1a, K-11/1a, K-59/1, K-43/1, K-45/1, K-27/1a, K-15/1a, K-30/1a, K-34/1a, K-33/1b, K-13/1a, K-5/1a, K-6/1a, K-20/2a, K-40/1a, E-12/1a, K-37/1a, E-5/1a, E-6a, K-21/2b izolatlarının uygulandığı bitkilerde nekroz oranı %100 olup, Negatif kontrole göre istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur. Bu izolatların çoğunun hastalık şiddetinin de 5 olarak belirlendiği ve Merkez, Turhal, Pazar ve Erbaa'ya bağlı arazilerden elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.17.).

Solgun yaprak oranı değerlendirmesinde ise, Negatif Kontrol'de bitkide hiç solgun yaprak görülmemiş olup 0 olarak kaydedilmiştir. Pozitif Kontrol'de ise solgun yaprak oranı %65,93 olarak belirlenmiştir. Uygulamaların yapıldığı bitkilerdeki solgun yaprak oranı incelendiğinde, %20,37-100 arasında değiştiği görülmektedir. K-19/1b, K-47/2, K-41/1, K-46/1, K-49/1, K-44/1, K-57/1, K-56/1, K-50/1, K-17/1b, K-3/1a, K-11/1a, K-59/1, K-43/1, K-27/1a, K-15/1a, K-13/1a, K-5/1a, K-20/2a, K-40/1a, E-12/1a, K-37/1a, E-5/1a, E-6a, K-21/2b izolatlarının uygulandığı bitkilerdeki solgun yaprak oranı %100 olarak kaydedilmiştir. Hastalık şiddeti, nekroz oranı ve solgun yaprak oranına bakıldığında izolatlar arasında önemli düzeyde farklılıklar olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, aynı izolat için bu üç değerlendirme kriteri karşılaştırıldığında bir biri ile paralellik göstermektedir.



Şekil 4.15. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (K-55/1) izolatının uygulandığı bitkilerdeki hastalık şiddetinin düzeyi



Şekil 4.16. Pozitif ve negatif kontrolde iletim demetlerindeki farklılıklar



Şekil 4.17. Uygulama yapılan bitkilerin iletim demetlerindeki kahverengileşme

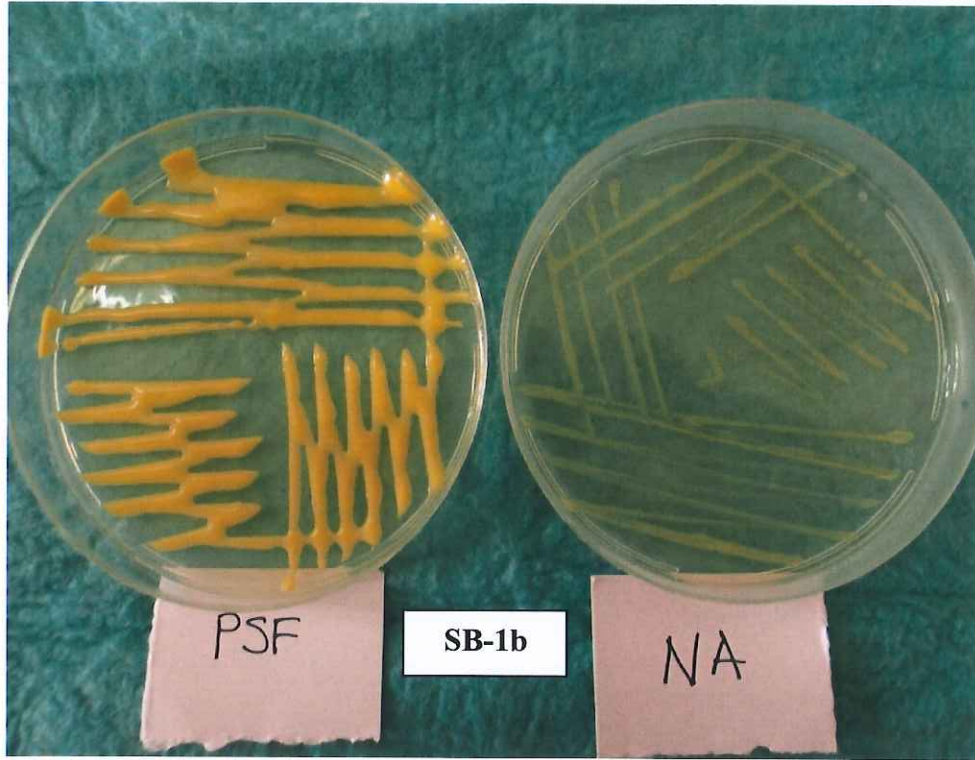
Patojenite testi sonrasında, re-izolasyon için ölçümü yapılan bitkiler etiketlenerek gazete kağıdı içerisine sarılmış ve laboratuara getirilmiştir. Bu dokulardan re-izolasyon yapılarak re-izolatlar elde edilmiştir. Elde edilen re-izolatlara %3'lük Potasyum Hidroksit solüsyonu kullanılarak Gram reaksiyon testi yapılmıştır. Gram (+) sonuç veren re-izolatlar diğer tanı çalışmalarında kullanılmak üzere Nutrient Broth içerisinde -20 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

4.5. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Tanı Testleri

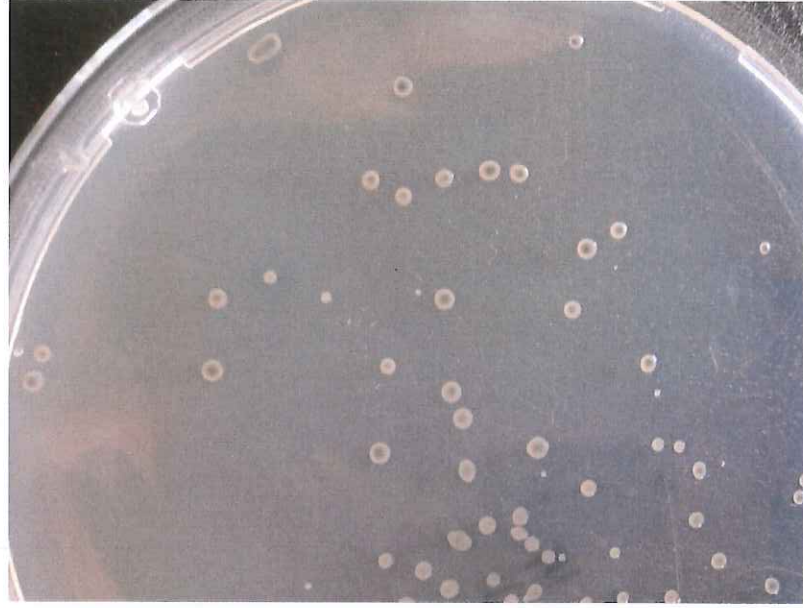
4.5.1. Koloni gelişimi

Koloni gelişimi testinde, 2011 yılı patojenite testi sonrasında yapılan re-izolasyonlar sonucu seçilen 10 adet bölge izolatı ve referans izolat YY-2 izolatı kullanılmıştır. İzolatlar PSF, NA ve SCM besi yerlerine ekilerek koloni gelişimlerine bakılmıştır. Bölge izolatlarının PSF besi yerinde daha yoğun, daha koyu sarı renkte oldukları, NA'da ise daha az yoğun ve açık sarı renkte oldukları görülmüştür (Şekil 4.18.). SCM besi yerinde ise pozitif olan petrilerde koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler gözlenmiştir (Şekil 4.19). Yapmış olduğumuz geleneksel koloni gelişimi testi sonuçları, çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.

Bakteri Nutrient Agar besi yerinde 5 gün içinde sarı renkli, düzgün kenarlı karakteristik koloniler oluşturmaktadır (Gitaitis, 1991). Fatmi ve Schaad (1988) tarafından yapılan çalışmada da, yarı seçici besi yeri olan SCM besi yerinde etmenin koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler oluşturduğu bildirilmektedir. Çetinkaya-Yıldız (2007) tarafından yapılan çalışmada da, elde ettikleri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının koloni gelişimleri incelenmiş olup, NA besi yerinde parlak sarı etrafı düz, YDC besi yerinde koyu sarı etrafı düz ve SCM besi yerinde koyu gri etrafı açık renk haleli koloni oluşturdıkları görülmüştür.



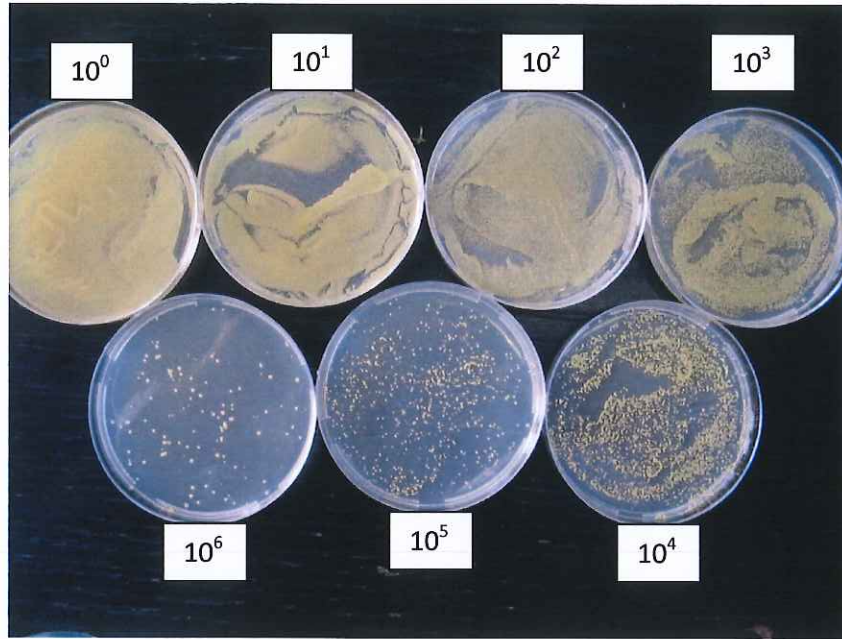
Şekil 4.18. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bölge izolatının (SB-1b) PSF ve NA besi yerlerindeki koloni gelişimi



Şekil 4.19. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatının SCM besi yerindeki gelişimi

4.5.2. Bakteri yoğunluğunun belirlenmesi

PSF besi yerinde 72 saat geliştirilmiş *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bölge izolatından (YY-2) hazırlanan süspansiyon spektrofotometrede 600 nm 0,2 absorbans değerine ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan hazırlanan seyreltme serilerinden PSF besi yerine yayma ekim yapılmıştır. Her seyreltme için 3 adet petri kabı kullanılmıştır. 28 °C’de 72 saat inkübasyona bırakılan petrilere gelişen koloniler sayılmıştır (Şekil 4.20.). Yapılan seyreltmelerden -4 seyreltmesinde ortalama 1080 koloni, -5 seyreltmesinde 395, -6 seyreltmesinde ortalama 118 koloni geliştiği görülmüştür. Yapılan hesaplamada 600 nm’de 0,2’ye ayarlanan bakteri süspansiyonunun yoğunluğu $1,18 \times 10^9$ hücre/ml olarak belirlenmiştir. Çetinkaya-Yıldız (2007) tarafından yapılan çalışmada da, patojenite çalışmalarında yüksek virülenslik gösteren bölge izolatının bakteri süspansiyon yoğunluğu $1,1 \times 10^8$ hücre/ml olarak belirlenmiş olup, bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.20. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatının seyreltme serilerindeki (10^0 - 10^6) koloni gelişimi

4.6. Tanıyı Destekleyici Testler

4.6.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının ELISA testi ile tanısı

2011 ve 2012 yıllarında elde edilen bölge izolatlarıyla yapılan ELISA testi sonuçları ve 405 nm’de okunan absorbands değeri ortalamaları Çizelge 4.12 ve 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. ELISA testi sonuçlarına göre 405 nm okumada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının absorbands değerleri (2011 yılı bölge izolatları)

İzolat Adı	İzolatın Alındığı Yer	Absorbans Değeri (ortalama)	Sonuç
Pozitif Kontrol		2,903	+
Negatif Kontrol		0,208	-
PBS		0,700	-
YY-2	Şenyurt/Turhal	2,556	+
YY-2 (r)	Şenyurt/Turhal	2,940	+
SB-1b/1 (r)	Üzümlören/Pazar	3,006	+
SB-1d/1 (r)	Üzümlören/Pazar	2,795	+
SB-2a/1 (r)	Üzümlören/Pazar	2,925	+
SB-2b/1 (r)	Üzümlören/Pazar	2,912	+
SB-2c/1 (r)	Üzümlören/Pazar	2,706	+
SB-3b/1 (r)	Dereköy/Pazar	2,807	+
SB-3c/1 (r)	Dereköy/Pazar	2,709	+

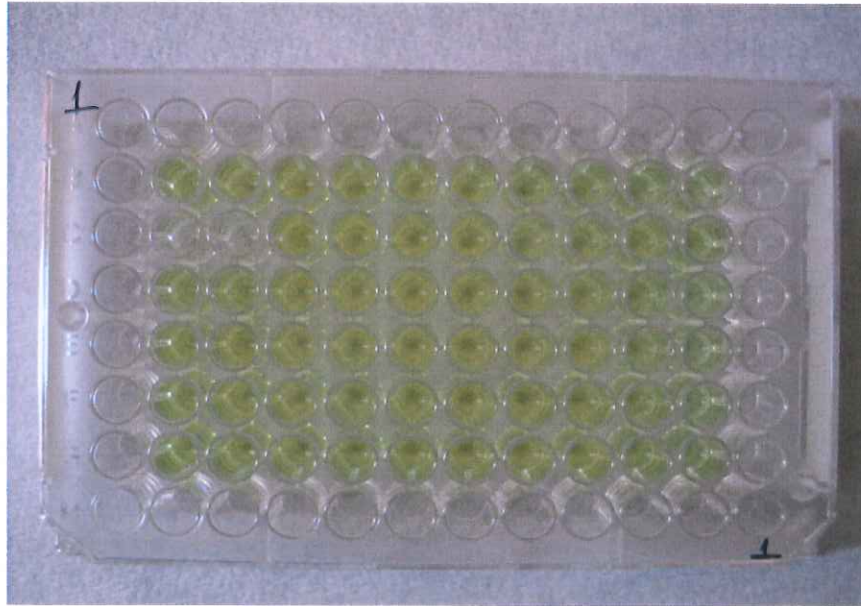
Çizelge 4.12. (Devam) ELISA testi sonuçlarına göre 405 nm okumada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının absorbens değerleri (2011 yılı bölge izolatları)

İzolat Adı	İzolatın Alındığı Yer	Absorbans Değeri (ortalama)	Sonuç
SB-3d/1 (r)	Dereköy/Pazar	2,671	+
SB-6a/2 (r)	Değirmenli/Erbaa	3,055	+
SB-6b/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,824	+
SB-6c/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,703	+
SB-6d/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,819	+
SB-7a/1 (r)	Çevresu /Erbaa	3,109	+
SB-7a/2 (r)	Çevresu /Erbaa	2,921	+
SB-8a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,457	+
SB-8a/2 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,018	+
SB-9a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,412	+
SB-9b/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,560	+
SB-9c/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,796	+
SB-10a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,908	+
SB-10b/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	1,989	+
SB-11a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	1,759	+
SB-12a/1 (r)	Küçükbağlar/Merkez	3,240	+
SB-12b/2 (r)	Küçükbağlar/Merkez	3,009	+
SB-13a/1 (r)	Şahinli/Niksar	2,762	+
SB-13b/1 (r)	Şahinli/Niksar	2,997	+
SB-14a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	1,719	+
SB-14b/2 (r)	Değirmenli/Erbaa	1,876	+
SB-15a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,531	+
SB-15b/2 (r)	Değirmenli/Erbaa	1,893	+
SB-17b/1 (r)	Şahinli/Niksar	3,225	+
SB-18a/1 (r)	Şahinli/Niksar	2,986	+
SB-18b/1 (r)	Şahinli/Niksar	3,010	+
SB-18c/1 (r)	Şahinli/Niksar	2,929	+
SB-19a/1 (r)	Çerçi-3/Merkez	2,773	+
SB-19b/1 (r)	Çerçi-3/Merkez	3,056	+
SB-19c/1 (r)	Çerçi-3/Merkez	3,392	+
SB-20a/1 (r)	Çerçi-4/Merkez	2,870	+
SB-20c/1 (r)	Çerçi-4/Merkez	3,126	+
SB-20d/1 (r)	Çerçi-4/Merkez	2,850	+
SB-21b/2 (r)	Dökmetepe/Turhal	2,804	+
SB-23a/1 (r)	Pazar	2,934	+
SB-24a/1 (r)	Dökmetepe/Turhal	3,369	+
SB-24b/1 (r)	Dökmetepe/Turhal	3,002	+
SB-25a/1 (r)	Şenyurt/Turhal	2,830	+
SB-25c/1 (r)	Şenyurt/Turhal	2,987	+
SB-26a/1 (r)	Şenyurt/Turhal	2,690	+
SB-26b/1 (r)	Şenyurt/Turhal	2,872	+
SB-26c/2 (r)	Şenyurt/Turhal	2,980	+
SB-28a/2 (r)	Güryıldız/Merkez	2,965	+
SB-28b/1 (r)	Güryıldız/Merkez	3,146	+
SB-28c/2 (r)	Güryıldız/Merkez	2,903	+
SB-28d/1 (r)	Güryıldız/Merkez	3,180	+
SB-30a/1 (r)	Necip/Turhal	2,782	+
SB-30b/1 (r)	Necip/Turhal	2,698	+
SB-30c/1 (r)	Necip/Turhal	3,109	+

Çizelge 4.12. (Devam) ELISA testi sonuçlarına göre 405 nm okumada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının absorbens değerleri (2011 yılı bölge izolatları)

İzolat Adı	İzolatın Alındığı Yer	Absorbans Değeri (ortalama)	Sonuç
SB-33a/1 (r)	Küçükbağlar/Merkez	2,883	+
SB-39a/1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	2,457	+
SB-39b/1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	2,718	+
SB-31b/1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	3,017	+
SB-35b /2 (r)	Küçükbağlar/Merkez	1,986	+
SB-38b/2 (r)	Büyükyıldız/Merkez	3,034	+
SB-36b /2 (r)	Küçükbağlar/Merkez	2,260	+
SB-29b/1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	2,831	+
SB-32a/2 (r)	Büyükyıldız/Merkez	2,776	+
SB-31a/2 (r)	Büyükyıldız/Merkez	2,913	+
SB-22a/2 (r)	Büyükyıldız/Merkez	3,012	+
SB-38b /1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	2,987	+

Elde edilen sonuçlara göre, Pozitif Kontrolde absorbens değeri 2,903, Negatif Kontrolde 0,208 olarak belirlenirken, izolatların 405 nm’de absorbens değerleri 1,719 ile 3,392 arasında değişmektedir. Absorbans değerleri negatif kontrolün iki katından fazla olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiş olup, testlenen 70 izolatın 70’i de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. ELISA testi sonucunda platen görünümü

Çizelge 4.13. ELISA testi sonuçlarına göre 405 nm okumada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının absorbens değerleri (2012 yılı bölge izolatları)

İzolat Adı	İzolatın Alındığı Yer	Absorbans Değeri (ortalama)	Sonuç
Pozitif Kontrol	-	3,179	+
Negatif Kontrol	-	1,348	-
PBS	-	1,193	-
YY-2 (r)	Şenyurt/Turhal	2,910	+
PK-2012 (r)	Şenyurt/Turhal	3,019	+
K-13/1a-1 (r)	Tatar/Pazar	3,430	+
K-13/1a-2 (r)	Tatar/Pazar	3,000	+
K-17/1a-2 (r)	Dereköy/Pazar	3,214	+
K-17/1a-1 (r)	Dereköy/Pazar	3,123	+
E-6a-2 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,918	+
E-6a-1 (r)	Değirmenli/Erbaa	3,109	+
E-4/2b-1 (r)	Değirmenli/Erbaa	3,500	+
E-4/2b-2 (r)	Değirmenli/Erbaa	3,078	+
T-2c/1 (r)	Merkez	3,221	+
E-5/1a-2 (r)	Çevresu/Erbaa	3,065	+
E-5/1a-1 (r)	Çevresu/Erbaa	3,097	+
K-53/1-2 (r)	Yeşilyurt/Merkez	1,687	-
K-26/2a-1 (r)	Pazar	2,993	+
T-3a-1 (r)	Merkez	3,485	+
T-3a-2 (r)	Merkez	3,469	+
K-30/1a-1 (r)	Kat/Turhal	3,133	+
K-30/1a-2 (r)	Kat/Turhal	3,065	+
K-48/1-1 (r)	Güryıldız/Merkez	2,938	+
K-48/1-2 (r)	Güryıldız/Merkez	3,219	+
K-29/1a-2 (r)	Kat/Turhal	3,462	+
K-29/1a-1 (r)	Kat/Turhal	2,982	+
K-29/2a-1 (r)	Kat/Turhal	3,577	+
E-2/1a-2 (r)	Çevresu/Erbaa	3,087	+
E-2/1a-1 (r)	Çevresu/Erbaa	3,057	+
K-47/2-1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	3,222	+
K-66/1a-2 (r)	Kat/Turhal	3,144	+
K-66/1a-1 (r)	Kat/Turhal	2,925	+
K-13/1a-1(r)	Tatar/Pazar	2,741	+
K-13/1a-2 (r)	Tatar/Pazar	3,405	+
T-4b/2 (r)	Merkez	1,603	-
T-5/1a-2 (r)	Merkez	3,152	+
T-5/1a-1 (r)	Merkez	3,405	+
K-5/1a-1 (r)	Necip/Turhal	3,059	+
K-50/3-2 (r)	Güryıldız/Merkez	2,838	+
K-28/2a-2 (r)	Necip/Turhal	3,055	+
K-28/2a-1 (r)	Necip/Turhal	3,416	+
K-21/2b-1(r)	Yeşilyurt/Merkez	2,962	+
K-12/1a-1 (r)	Dereköy/Pazar	3,116	+
K-6/1a-1 (r)	Tatar/Pazar	3,081	+
K-6/1a-2 (r)	Tatar/Pazar	2,867	+
T-2c/2 (r)	Merkez	3,145	+
K-11/1a-2 (r)	Güryıldız/Merkez	3,133	+
K-11/1a-1 (r)	Güryıldız/Merkez	3,087	+
K-46/1-2 (r)	Küçükyıldız/Merkez	3,172	+

Çizelge 4.13. (Devam) ELISA testi sonuçlarına göre 405 nm okumada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının absorbens değerleri (2012 yılı bölge izolatları)

İzolat Adı	İzolatın Alındığı Yer	Absorbans Değeri (ortalama)	Sonuç
K-37/1a-1 (r)	Merkez	2,868	+
K-33/1b-1 (r)	Büyükbağlar/Merkez	3,055	+
K-57/1-1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	1,518	-
K-57/1-3 (r)	Büyükyıldız/Merkez	1,273	-
K-56/1-1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	3,069	+
K-59/1-1 (r)	Kat/Turhal	2,828	+
K-49/1-1 (r)	Güryıldız/Merkez	3,085	+
E-8a-1 (r)	Değirmenli/Erbaa	3,376	+
E-8a-2 (r)	Değirmenli/Erbaa	3,163	+
K-42/1-1 (r)	Güryıldız/Merkez	3,085	+
K-42/1-2 (r)	Güryıldız/Merkez	3,084	+
K-2/1a-1(r)	Dökmetepe/Turhal	3,106	+
K-50/1-2 (r)	Güryıldız/Merkez	2,875	+
K-50/1-1 (r)	Güryıldız/Merkez	2,949	+
E-10/1a-1 (r)	Değirmenli/Erbaa	3,051	+
E-10/1a-2 (r)	Değirmenli/Erbaa	2,784	+
K-19/1b-1 (r)	Güryıldız/Merkez	3,005	+
K-19/1b-2 (r)	Güryıldız/Merkez	3,042	+
K-58/1-2 (r)	Kat/Turhal	2,811	+
K-7/1a-1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	3,381	+
K-15/1a-1 (r)	Güryıldız/Merkez	3,106	+
K-33/1b-2 (r)	Büyükbağlar/Merkez	3,023	+
K-3/1a-1 (r)	Dökmetepe/Turhal	2,749	+
K-23/1a-1 (r)	Bağlarbaşı/Pazar	3,130	+
K-64/1a-1 (r)	Şenyurt/Turhal	3,469	+
K-43/1-1 (r)	Güryıldız/Merkez	3,162	+
K-20/2a-1 (r)	Ulaş/Merkez	3,155	+
K-57/1-4 (r)	Büyükyıldız/Merkez	2,997	+
K-55/1-1 (r)	Güryıldız/Merkez	2,842	+
K-40/1a-1 (r)	Necip/Turhal	3,292	+
K-2/1a-2 (r)	Dökmetepe/Turhal	3,210	+
K-27/1a-1 (r)	Çerçi/Merkez	3,005	+
K-15/1a-2 (r)	Güryıldız/Merkez	3,159	+

Çizelge 4.13'deki sonuçlara göre, 2012 izolatlarının Pozitif Kontrolde absorbens değeri 3,179, Negatif Kontrolde 1,348 olarak belirlenmiştir. İzolatların 405 nm'de absorbens değerleri 1,273 ile 3,577 arasında değişmektedir. Absorbans değerleri negatif kontrolün iki katından fazla olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiş olup, testlenen 80 izolattan 76'sı *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılanmıştır

4.6.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının PCR tekniği ile tanısı

Hasta domates bitkilerinden elde edilen ve klasik tanı, ELISA testi ile tanılanan 57 adet *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatı ile CMM5 ve CMM6 primerleri kullanılarak PCR çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda 57 izolattan 34'ünün %1'lik agaroz jel üzerinde 614 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.22.). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatları ile yapılan PCR çalışmasının sonuçları Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatları ile yapılan PCR çalışması sonuçları

Örnek No	İzolat Kodu	İzolatın alındığı yer	Sonuç
1	PK-2012 (YY-2)	Şenyurt/Turhal	+
2	K-13/1a-1 (r)	Tatar/Pazar	+
3	K-11/1a-1 (r)	Güryıldız/Merkez	+
4	K-29/2a-1 (r)	Kat/Turhal	+
5	K-2/1a-1(r)	Dökmetepe/Turhal	+
6	SB-9a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	-
7	K-47/2-1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	+
8	K-20/2a-1 (r)	Ulaş/Merkez	+
9	E-10/1a-1 (r)	Değirmenli/Erbaa	-
10	K-26/2a-1 (r)	Pazar	+
11	SB-6a/2 (r)	Değirmenli/Erbaa	+
12	E-2/1a-2 (r)	Çevresu/Erbaa	+
13	E-4/2b-1 (r)	Değirmenli/Erbaa	+
14	SB-28c/2 (r)	Güryıldız/Merkez	-
15	SB-2a-1(r)	Üzümlören/Pazar	-
16	K-27/1a-1 (r)	Çerçi/Merkez	-
17	K-15/1a-2 (r)	Güryıldız/Merkez	+
18	E-5/1a-2 (r)	Çevresu/Erbaa	+
19	SB-18a/1 (r)	Şahinli/Niksar	+
20	SB-39a-1 (r)	Büyükyıldız/Merkez	+
21	K-17/1b-1 (r)	Dereköy/Pazar	+
22	K-5/1a-1 (r)	Necip/Turhal	+
23	K-23/1a-1 (r)	Bağlarbaşı/Pazar	+
24	SB-33a/1 (r)	Küçükbağlar/Merkez	-
25	K-49/1-1 (r)	Güryıldız/Merkez	+
26	SB-20a/1 (r)	Çerçi/Merkez	+
27	SB-10a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	-
28	SB-30b/1 (r)	Necip/Turhal	-
29	SB-7a/1 (r)	Çevresu/Erbaa	+
30	SB-13a/1 (r)	Şahinli/Niksar	+
31	K-40/1a-1 (r)	Necip/Turhal	+
32	SB-19a/1 (r)	Çerçi/Merkez	+

Çizelge 4.14. (Devam) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatları ile yapılan PCR çalışması sonuçları

Örnek No	İzolat Kodu	İzolatın alındığı yer	Sonuç
33	SB-8a/1 (r)	Değirmenli/Erbaa	+
34	K-30/1a-1 (r)	Kat/Turhal	-
35	K-21/2b-1 (r)	Yeşilyurt/Merkez	-
36	K-28/2a-2 (r)	Necip/Turhal	-
37	T-5/1a-2 (r)	Merkez	+
38	K-48/1-1 (r)	Güryıldız/Merkez	-
39	T-3a-1 (r)	Merkez	-
40	SB-29b/2 (r)	Büyük yıldız/Merkez	-
41	T-2c-1 (r)	Merkez	-
42	K-46/1-2 (r)	Küçük yıldız/Merkez	-
43	SB-21b/2 (r)	Dökmektepe/Turhal	+
44	SB-22a/2 (r)	Büyük yıldız/Merkez	+
45	SB-1b/1 (r)	Üzümlören/Pazar	-
46	K-6/1a-1 (r)	Tatar/Pazar	+
47	K-33/1b-1 (r)	Büyükbağlar/Merkez	+
48	K-53/1-2 (r)	Yeşilyurt/Merkez	-
49	SB-12a/1 (r)	Küçükbağlar/Merkez	+
50	SB-25c/1 (r)	Şenyurt/Turhal	+
51	SB-26/2 (r)	Şenyurt/Turhal	-
52	SB-3b/1 (r)	Dereköy/Pazar	-
53	K-19/1b-1 (r)	Güryıldız/Merkez	+
54	E-8a-2 (r)	Değirmenli/Erbaa	+
55	K-12/1a-1 (r)	Dereköy/Pazar	-
56	K-57/1-1 (r)	Büyük yıldız/Merkez	-
57	K-56/1-1 (r)	Büyük yıldız/Merkez	-



Şekil 4.22. PCR çalışması sonucu oluşan bantlar (PK: Pozitif Kontrol (YY-2); 1: T-5/1a-2 (r); 2: SB-8a/1 (r); 3: SB-19a/1 (r); 4: K-40/1a-1 (r); 5: SB-13a/1 (r); 6: SB-7a/1 (r); 7: SB-20a/1 (r); 8: K-49/1-1 (r); 9: K-23/1a-1 (r); 10: K-5/1a-1 (r))

4.6.3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının yağ asit profillerinin belirlenmesi

Patojenite, ELISA ve PCR çalışmaları sonucu pozitif olarak kabul edilen 13 izolatın yağ asit profilleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN danışmanlığında yapılmıştır. İzolatların içerdikleri yağ asit kompozisyonu ve bunların bulunma oranları (%) Mikrobiyal Identifikasyon Sisteminin Sherlock version 6.0B Mikrobial ID. Inc. Newark programı kullanılarak tanılanmıştır. Çizelge 4.15.'de yağ asiti profillerine göre tanılama yapılan izolatların içerdikleri yağ asiti çeşitleri ve bulunma oranları verilmiştir.

Çizelge 4.15. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının içerdikleri yağ asitleri ve izolatlarda bulunma oranları

		Bulunma oranları (%)											
Örnek Kodu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Yağ asitleri													
14:0 iso	0,51	0,47	0,42	0,45	0,53	0,38	0,46	0,30	0,45	0,44	0,45	0,52	0,44
14:0	0,45	0,29	0,24	0,21	0,14	0,26	0,18	0,29	0,31	0,21	0,31	0,47	0,38
15:1 iso G	-	-	-	0,10	-	0,08	0,10	-	-	-	0,08	0,09	-
15:1 anteiso A	1,92	1,52	1,72	3,70	1,59	2,77	2,34	3,28	1,84	2,01	2,78	2,30	2,10
15:0 iso	1,34	1,20	1,24	1,59	1,95	1,63	2,07	1,18	1,22	1,39	2,22	2,21	2,02
15:0 anteiso	46,47	47,76	48,83	48,02	48,23	47,27	47,70	49,86	48,88	50,82	50,20	49,32	48,49
16:0 N alcohol	0,12	-	-	-	-	-	0,11	9,74	-	-	-	-	-
16:0 iso	13,06	13,41	12,97	13,85	15,22	12,85	13,62	9,74	11,93	12,40	12,44	12,48	12,44
16:0	8,63	5,66	4,97	4,75	3,42	5,48	4,18	5,98	5,97	4,37	6,59	9,44	8,54
17:0 iso	0,77	0,68	0,69	0,88	0,99	0,97	1,16	0,68	0,68	0,71	1,00	0,98	0,97
17:0 anteiso	26,23	28,61	28,50	26,05	27,63	27,90	27,71	28,32	28,38	27,35	23,46	21,60	24,06
17:0 cyclo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-
17:0	0,27	0,15	0,16	0,18	0,15	0,17	0,12	0,17	0,12	0,11	0,21	0,33	0,26
18:0 iso	-	0,13	0,12	0,14	0,14	0,13	0,17	0,08	0,11	0,10	0,10	0,13	0,13
18:0	0,24	0,14	0,13	0,07	-	0,10	0,08	0,11	0,10	0,10	0,08	0,14	0,16

Çizelge 4.15.'de görüldüğü üzere, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarından 14:0 iso, 14:0, 15:1 iso G, 15:1 anteiso A, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 N alcohol, 16:0 iso, 16:0, 17:0 iso, 17:0 anteiso, 17:0 cyclo, 17:0, 18:0 iso, 18:0 yağ asitleri elde edilmiştir. Yağ asitlerinin bulunma oranları incelendiğinde izolatlar arasında büyük ölçüde benzerlik gösterdiği, 14:0 iso, 14:0, 15:1 anteiso A, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 16:0, 17:0 iso, 17:0 anteiso ve 17:0 yağ asitlerinin her izolatta bulunduğu görülmektedir. Özellikle izolatlarda 15:0 anteiso ve 17:0 anteiso yağ asitleri yüksek oranlarda bulunurken, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için karakteristik olan 15:1 anteiso A'nın (Gitatis ve Beaver, 1990) da ortalama % 2,29 oranında bulunduğu görülmüştür.

FAME testinde elde edilen değerler çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Gitatis ve Beaver (1990) yaptıkları çalışmada Kanada, Çin, Tayland, Tayvan, ABD'den izole edilen 45 izolatın yağ asit profillerini belirlemişlerdir. İzolatlar arasında yüksek oranda benzerlik bulunmuş olup C12-C17 doymuş dallanmış yağ asit zinciri varlığı ile karakterize edilmişlerdir. Diğer doymuş düz yağ asitleri 12:0 ve 16:0 olarak belirlenmiştir. Doymamış a15:1, anteisopentadecenoik asit'i *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için oldukça spesifiktir. a15:1 yağ asiti %2,56 oranlarında bulunmuştur. Yine, Çetinkaya-Yıldız (2007) Mersin ve Adana illerinde yaptıkları surveylerde elde ettikleri 6 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatının yağ asit profillerini belirlemişlerdir. Çalışmada 12 farklı yağ asiti izole edilmiştir. İzole edilen yağ asitleri, 10:0 OH (%0,58), 15:1 ANTEISO (%3,46), 15:0 ANTEISO (%48,6), 15:0 ISO (%1,83), 16:0 ISO (%11,59), 16:00 (%6,56), 17:0 ANTEISO (%28,45), 17:0 ISO (%1,29), 16:0 ISO 3OH (%0,49), 18:1 ISO H (%1,28), 18:1 w6c (%0,29), 18:00 (%0,65) olarak belirlenmiştir. Yağ asitlerinden 15:1 ANTEISO A yağ asidinin beş izolatta olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda izole ettiğimiz 13 adet izolat yağ asit metil ester analizi ile %58-82 oranında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılanmıştır (Çizelge 4.16.). Bu değerler yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Örneğin; Doğu Anadolu Bölgesinde Şahin ve ark., (2002) tarafından yapılan bir çalışmada Oltu, İspir ve Yusufeli'nde yapılan surveylerden elde edilen 16 izolatın yağ

asit metil ester analizleri yapılmış olup, izolatların %47-89 benzerlik oranıyla *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olduğu saptanmıştır. Yine, Çetinkaya-Yıldız (2007), Mersin ve Adana illerinden elde ettikleri 6 adet izolatı yağ asit analizlerine göre yaptıkları tanıda %41-81 oranında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılamışlardır.

Çizelge 4.16. Yağ asit profilleri belirlenen izolatlar ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e benzerlik oranları

Örnek No	İzolat Kodu	Benzerlik oranları (%)	
1	K-13/1a-1 (r)	78	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
		56	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
2	K-11/1a-1 (r)	91	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
		69	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
3	K-29/1a-2 (r)	94	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
		77	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
4	K-2/1a-1 (r)	80	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
		73	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
5	K-47/2-1 (r)	95	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
6	K-20/2a-1 (r)	83	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
		78	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
7	K-26/2a-1 (r)	90	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
		65	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
8	SB-6a/2 (r)	82	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
		66	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
9	E-2/1a-2 (r)	85	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
		74	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
10	SB-13a-1 (r)	88	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
		61	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
11	SB-19a/1 (r)	66	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>
		61	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
12	SB-21b/2 (r)	58	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
		54	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>
13	SB-12a/1 (r)	70	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
		57	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>

4.7. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tohum, toprak ve bitki artıklarındaki latent/epifitik yaşam süresinin saptanması ve ilk inokulum kaynaklarının belirlenmesi

4.7.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşık tohumda yaşam süresinin belirlenmesi

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ile bulaştırılan domates tohumlarında yapılan aylık izolasyonlarda 100 mg/l rifampicin içeren PSF besi yerinde tohumların etrafında yoğun, sarı renkte koloni gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.23.). Çizelge 4.17.'de bulaşık tohumlarda patojenin yaşam süresi verilmiştir.



Şekil 4.23. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık tohumlarında etrafında gelişen koloniler

Çizelge 4.17. Bulaşık domates tohumlarında patojenin yaşam süresi

Tarih	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ile bulaşık tohum %'si
0.gün	100
33. gün	89
66. gün	91
100. gün	89
129. gün	93
160. gün	85
193. gün	79
220. gün	63
249. gün	76
280. gün	46
310. gün	42
340. gün	30
370. gün	17
400. gün	0
430. gün	0
460. gün	0

Yapılan çalışmada, kullandığımız yöntemle göre, her ay *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaştırılmış 100 adet tohum tesadüfi olarak seçilerek 100 mg/l rifampicin içeren PSF besi yerine yerleştirilmiş ve tohumların etrafında gelişen koloniler gözlenmiştir. 460 gün boyunca yürütülen çalışmada, bulaştırmanın yapıldığı ilk gün (0. gün) tohumların hepsinin etrafında sarı renkli koloni gelişimi görülmüştür. Çizelge 4.17.'de görüldüğü gibi, ilk ay yani 33. günde yapılan izolasyonda 89 tohumda, 66. günde yapılan izolasyonda 91 tohumda, 100. günde 89 tohumda, 129. günde 93 tohumda, 160. günde 85 tohumda, 193. günde 79 tohumda, 220. günde 63 tohumda, 249. günde 76 tohumda, 280. günde 46 tohumda, 310. günde 42 tohumda, 340. günde 30 tohumda, 370. günde 17 tohumda koloni gelişimi görülmüştür. Daha sonraki günlerde yapılan izolasyonlarda ise koloni gelişimine rastlanılmamış olup patojen elde edilememiştir.

Yapılan çalışma doğrultusunda, tohumlardaki inokulumun hastalığı başlatacak yeteneğe sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık tohumlar toprak, kum ve torf karışımı içeren viyollere ekilmiştir. Ekilen tohumlarda ortalama 7 gün sonra çıkışlar başlamıştır. İlk 2 ayda (33. gün ve 66. gün) ekilen tohumlardan gelişen fidelerde domates bakteriyel solgunluk hastalığına ait belirtiler gözlenmemiş olup, 5-6 yapraklı dönemdeki fidelerden yapılan izolasyonlarda da bakteri elde edilememiştir. Daha sonraki aylarda ekilen tohumlardan

gelişen fidelerde ise solgunluk belirtileri belirgin bir şekilde görülmüştür (Şekil 4.24.). Yapılan izolasyonlarda elde edilen izolatın Gram pozitif olduğu belirlenmiş olup, etmenin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olduğu saptanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domates tohumlarında birincil inokulum kaynağı oluşturduğu ve hastalığın tohum kökenli olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.24. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık tohumlardan gelişen domates fideleri

Bilindiği gibi, tohum patojenlerin yaşamlarını devam ettirmeleri yönünden önemli bir kaynaktır. Diğer yandan, patojenlerin tohum aracılığı ile taşınmaları da dikkate alınması gereken bir olgudur. Patojenlerin tohumda, vegetatif bitki kısımlarına veya toprağa oranla daha uzun süre canlı kalabildikleri bilinmektedir. Örneğin, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* yonca tohumlarında 3 yıl yaşamını sürdürebilmektedir. Patojenler tohumla doğrudan temasta oldukları için oluşacak fidelerin de enfekte olma olasılığı yüksek olmaktadır. Tohum kökenli bir enfeksiyon inokulum için bir merkez görevini üstlenmekte ve epidemilere yol açabilmektedir (Erkan, 1998).

Yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Etmenin tohumda kalıcılığı ile ilgili yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde; Nedumaran ve Vidhyasekaran (1982, 1982a) Hindistan'ın farklı bölgelerinden elde ettikleri domates tohumları ile yaptıkları çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşıklılığın ciddi bir tehlike oluşturduğunu saptamışlardır. Yine, Tokgönül (1998)'ün bildirdiğine göre Grogan ve Kendrik'in 1953'de, Thyr'in ise 1969'da yaptıkları çalışmalarda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık domates tohumlarının hastalığın en önemli inokulum kaynağı olduğu ve etmenin tohumda taşınma oranının %0,25 ile %100 arasında değiştiği bildirilmiştir. Etmenin tohumdan fideye taşınmasının epidemi oluşumundaki öneminin belirlenmesi için yapılan diğer bir çalışmada ise tohumdan fideye %0,01 oranında taşınan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tarlada önemli bir epideminin başlangıcı olabileceği belirlenmiştir (Chang ve ark., 1991).

Bunlara ilaveten Byran (1930) etmenin iletim sistemi yardımı ile tohumları sistemik olarak enfekte ettiğini ve embriyoda bulunduğunu belirlemiştir. Ayrıca çalışmada doğal enfekteli tohumlarda bakterinin tohuma geçiş oranının %1-5, yapay enfekteli tohumlarda ise %21-40 oranında olduğu belirlenmiştir. Yine, Patino-Mendez (1964) yaptığı çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tohumları tohum kabuğu veya tohum zarından geçerek enfekte ettiğini, tohum zarının en içte bulunan hücrelerine doğru hareket ettiğini, ancak embriyoya giremediğini saptamıştır.

Günümüzde bir patojenin yeni üretim alanlarına tohumlar aracılığı ile kolayca yayılabildiği gözlenmektedir. Gelişen ve hız kazanan nakliye imkanları ile bir patojenin bir ülke içinde yeni alanlara ya da bir ülkeden diğer ülkelere tohumlar ile yayılma şansı çok artmıştır. Ülkeler arasındaki bitkisel materyal değişimi tohumlar ile yeni patojenlerin ortaya çıkış riskini de yükseltmiştir (Erkan, 1998). Bu yüzden tohum kökenli patojenlerin tohumlarda aranmasında kısa zamanda güvenilir sonuç verebilen, duyarlı, tekrarlanabilen, pratik uygulanabilen yöntemlerin olması önem taşımaktadır. Erkan ve ark. (1991), domates tohumlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığını ELISA ile test etmişler ve tohum örneklerinde hastalık etmeninin varlığının bu yöntemle saptanabileceğini bildirmişlerdir. Yine, Tokgönül (1998), yapay olarak inokule edilen domates tohumlarında *Clavibacter michiganensis*

subsp. *michiganensis*'in varlığını IFAS yöntemi ile saptamışlardır. Zhao ve ark. (2007) simptomsuz domates tohumlarından, TaqMan çalışması yaparak 2 saat içinde DNA ekstraksiyonu ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'i belirlemişlerdir.

Geylani ve ark. (2005), çeşitli firmalardan temin edilen 75 tohum örneğini ISTA (International Seed Testing Association) prosedürlerine göre testlemiş ve elde ettiği isolatları biyokimyasal testler, PCR testi ve Immunofloresan boyama testi ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak saptamıştır. Yine, Milijasevic ve ark. (2009a) tarafından yürütülen bir çalışmada ise öğütme ve ıslatma yöntemleri ve 4 farklı ekstraksiyon yöntemi (suni besi yerine izolasyon, tohumdan direkt PCR, NBY besi yerinde geliştirilen bakteri ile yapılan BIO-PCR, PCR) ile domates tohumlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığı belirlenmiştir. Benzer bir çalışma Mraz ve ark. (2011) tarafından 10 adet domates tohumunda ELISA, IF ve PCR yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Tohum çeşitlerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in belirlenmesinde en etkili yöntem PCR olmuştur.

4.7.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşık toprakta yaşam süresinin belirlenmesi

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*'in topraktaki yaşam süresinin saptanması amacıyla yürütülen denemede, 100 mg/l rifampicin'e dayanıklı *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatu ile inokule edilen toprak teneke kutular içerisine konularak deneme alanına gömülmüştür. İnokulasyon tarihinden itibaren yaz ve kış ayları boyunca haftalık olarak, bulaştırılan toprağın 0-15 cm derinliğinden örnekler alınarak izolasyonlar yapılmıştır.

Yaz ayları boyunca patojenin topraktaki yaşam süresini incelediğimiz bu çalışma Haziran ayında başlamış olup Eylül ayına kadar devam ettirilmiştir. İnokulasyonun yapıldığı gün patojenin $3,2 \times 10^6$ hücre/g populasyonunda toprağa kolonize olduğu belirlenmiştir. Haftalık izolasyonlarda 7. gün $2,1 \times 10^6$ hücre/g yoğunluğunda, 15. gün 1×10^6 hücre/g yoğunluğunda patojen elde edilmiştir (Şekil 4.25.). İnokulasyondan sonra 15. günden itibaren yapılan izolasyonlarda ise patojene rastlanılmamıştır (Çizelge 4.18.) (Şekil 4.26.).

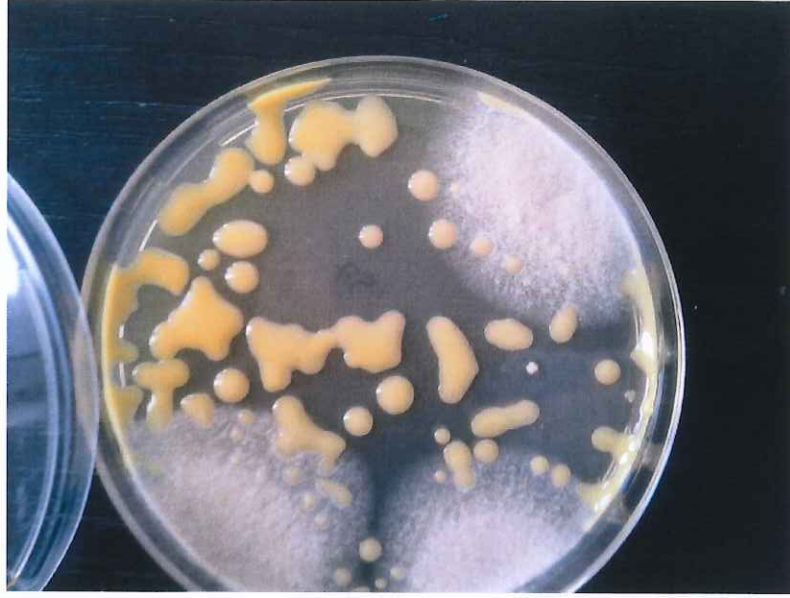
Çizelge 4.18. Yaz ayları boyunca *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşık topraktaki yaşam süresinin belirlenmesi

Tarih	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (hücre/g toprak)
0.gün	$3,2 \times 10^6$
7. gün	$2,1 \times 10^6$
15. gün	1×10^6
21. gün	0
28. gün	0
35. gün	0
42. gün	0
49. gün	0
56. gün	0
62. gün	0

Ekim 2012 tarihinde başlatılan çalışmada ise, patojenin kış ayları boyunca topraktaki yaşam süresi incelenmiştir. İnokulasyonun yapıldığı gün patojenin $7,5 \times 10^6$ hücre/g populasyonunda toprağa kolonize olduğu belirlenmiştir. Çalışma boyunca yapılan izolasyonlar sonucu, patojen toprakta 28. güne kadar canlı kalabilmiştir (Çizelge 4.19.) (Şekil 4.27.). Daha sonra yapılan izolasyonlarda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* elde edilememiştir.

Çizelge 4.19. Kış ayları boyunca *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşık topraktaki yaşam süresinin belirlenmesi

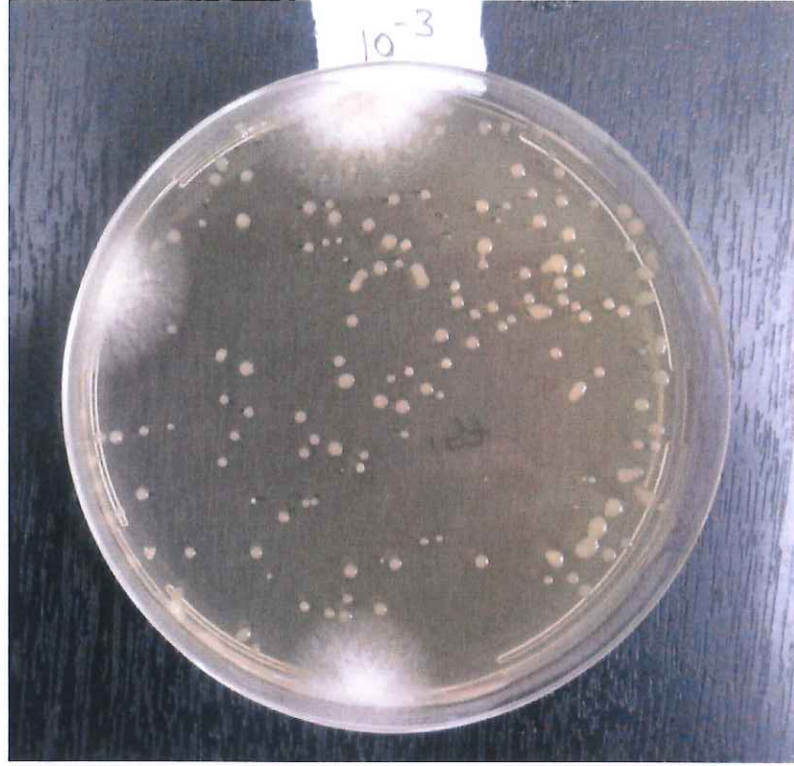
Tarih	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (hücre/g toprak)
0.gün	$7,5 \times 10^6$
7. gün	$2,3 \times 10^6$
15. gün	$0,3 \times 10^5$
21. gün	$0,16 \times 10^4$
28. gün	$0,3 \times 10^4$
35. gün	0
42. gün	0
49. gün	0
56. gün	0
62. gün	0



Şekil 4.25. Bulaşık topraktan yapılan izolasyonlarda petride gelişen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kolonileri



Şekil 4.26. 28. günde yapılan izolasyonlarda petrideki görünüm (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* elde edilememiştir.)



Şekil 4.27. 10^3 seyreltmesinde petride gelişen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kolonileri

Kullandığımız yöntemeye göre, etmen yaz aylarında yaklaşık 15 gün, kış aylarında ise yaklaşık 30 gün canlı kalabilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar Trevors ve Finnen (1990) tarafından yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmada, steril olmayan organik maddeler içeren kumlu, killi yapıdaki toprağa *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* inokule edilmiş, daha sonra yapılan izolasyonlarda 30. güne kadar patojen %90 elde edilirken, 30. günden sonra %10'dan daha az oranda elde edilebilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında ise etmenin toprakta daha uzun süre canlı kalabildiği çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (Bryan, 1930; Strider, 1967). Fakat yapılan çalışmalarda etmenin kalıcılığı üzerinde çeşitli faktörlerin etkili olabileceği de vurgulanmaktadır. Örneğin; Bryan (1930) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in inokulum kaynaklarından birinin toprak olduğunu ve patojenin toprakta belirli koşullarda yaşamını sürdürebildiğini saptamıştır. Yapılan çalışmada, Washington ve New York'da etmenin 11 ay boyunca enfekteli toprakta canlı kalabildiğini belirlemiştir. Çetinkaya- Yıldız (2007)'ın bildirdiğine göre, Ciccarone ve

Carili (1948)'de yaptıkları çalışmada İtalya'da etmenin toprakta dört yıl süreyle yaşayabildiğini belirlemişlerdir. Buna rağmen Grogan ve Kendrick (1953) ise yaptıkları çalışma sonucunda tarla toprağında yaşayan patojenin epidemi oluşumunda önemli olmadığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da elde edilen sonuçlara göre, etmenin toprakta kalıcılığı üzerinde sıcaklık ve nemin bunun yanında diğer saprofit mikroorganizmaların da etkisinin olabileceği düşünülmektedir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in topraktaki yaşam süresi üzerinde lokasyonun, pH'nın, mikrobiyal antagonizmin, sıcaklığın ve nemin etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla da belirlenmiştir (Bryan, 1930; Strider, 1967; Basu, 1970). Yapılan bir çalışmada, inokulasyondan 8 ay sonra hava ile kurutulmuş topraktan etmen geri izole edilemezken, 2 °C'deki nemli toprakta 18-30 ay süre ile canlı ve virulent kalabildiği saptanmıştır (Strider, 1967). Basu (1970), topraktaki %2,7 ile 21 arasındaki nem değişikliğinin patojenin canlılığını etkilediğini belirlemiştir.

Bunun yanında bazı araştırmacılar toprakta etmenin canlılığını devamlı sürdürdüğünü, topraktan izole edilmese bile daha sonraki üretim sezonunda oluşan bitkilerde hastalığa neden olabileceğini belirlemişlerdir (Bryan, 1930; Strider, 1967; Basu, 1970).

4.7.3. Topraktaki bitki artıklarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in yaşam süresinin belirlenmesi

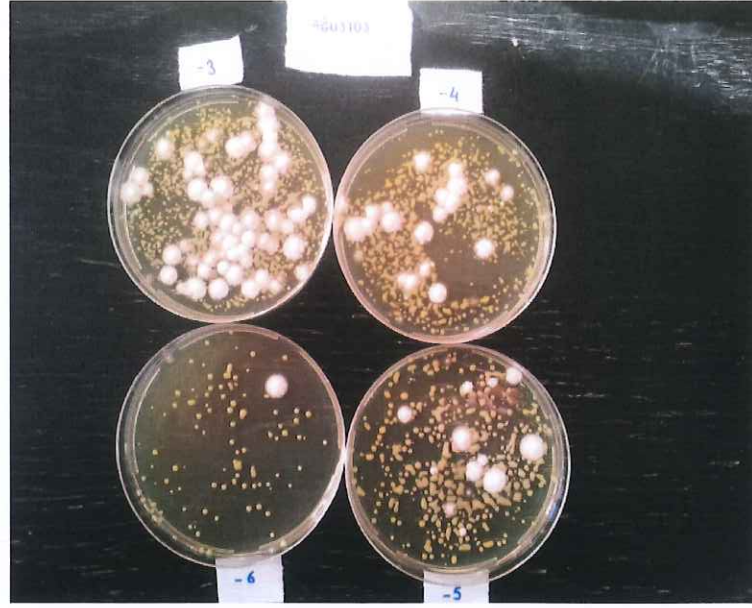
Toprakta bulunan bulaşık bitki artıklarında patojenin yaşam süresini belirlemek amacıyla yürütülen çalışma, Temmuz 2013'de başlamış olup 12 ay boyunca sürdürülmüştür. Çalışmada ilk olarak sera koşullarında yetiştirilen 5-6 yapraklı domates bitkileri 100 mg/l rifampicin'e dayanıklılık kazandırılmış *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatu ile inokule edilmiştir. Solgunluk symptomu gösteren bitki gövdeleri parçalar halinde kesilerek tülbent içerisine konulmuş ve toprağın 15 cm derinliğine gömülmüştür. Toprağa gömülen bitki artıklarından ilk gün yapılan izolasyonlarda bitki artığının patojenle $1,4 \times 10^9$ hücre/ml popülasyonu ile inokule olduğu saptanmıştır (Şekil 4.28.). Her ay içinde bitki artığı bulunan 1 adet tülbent topraktan çıkarılarak Nutrient Broth sıvı ortamında çalkalanmış, santrifüjlenerek pellet elde

edilmiştir. Seyreltilen pelletten rifampicin içeren King B besi yerine yapılan yayma ekimlerde koloni sayımı yapılarak patojenin bitki artıklarındaki yaşam süreleri saptanmıştır.



Şekil 4.28. Temmuz ayında yapılan izolasyonda King B besi yerinde gelişen koloniler

Temmuz ayından itibaren yapılan izolasyonlarda Ağustos ayında bitki artığının patojenin $7,9 \times 10^8$ hücre/ml populasyonu ile inokule olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29.). Kullandığımız yönteme göre, ilk ay patojenin elde edilmesine rağmen, daha sonraki günlerde Eylül, Ekim, Kasım, Aralık, Ocak, Şubat, Mart, Nisan, Mayıs, Haziran aylarında yapılan izolasyonlarda patojen izole edilememiştir (Şekil 4.30.). Tanıyı kuvvetlendirmek amacıyla yapılan izolasyonlarda elde edilen izolatin Gram pozitif olduğu belirlenmiş olup, etmenin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olduğu saptanmıştır. Bu durumda patojenin 30 gün canlı kalabildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.29. Ağustos ayında yapılan izolasyonda King B besi yerinde gelişen koloniler



Şekil 4.30. Ekim ayında yapılan izolasyonda King B besi yerinde herhangi bir koloni gelişimi görülmemiştir.

Tokat ili koşullarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in topraktaki bitki artıklarında yaşam süresini belirlemek amacıyla yürütölen bu çalışmada, elde edilen sonuçlar patojenin domates yetiştiriciliğinin yapılmadığı dönemlerde toprağı karıştırılan bitki artıklarında canlılığını sürdüremediğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde Ülke (2003) Adana'da yaptıkları çalışmada, domates öz nekrozu etmenleri *Pseudomonas cichorii* ve *Pseudomonas corrugata*'nın yaz ayları boyunca domatesin olmadığı dönemde yaşamlarını sürdüremediklerini ortaya koymuştur. Yine Yıldız (2002), çalışmasında Doğı Akdeniz Bölgesi'nde *Erwinia chrysanthemi*'nin konukçu bitkisi domatesin olmadığı yaz aylarında yaşamını toprakta sürdüremediğini, ancak kış aylarında etmenin toprakta yaklaşık 6 ay yaşamını devam ettirebildiğini saptamıştır.

Bakterilerin topraktaki yaşamında değışik sıcaklıkların ve toprak yapısının etkili olduğı Basu (1970) tarafından bildirilmiştir. Basu (1970) yaptığı çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşık domates yapraklarında toprak sıcaklığı -20 °C iken en az 36 hafta canlı kalabildiğini bildirmiştir. Patojen toprak sıcaklığı 5-35 °C iken 3 haftadan daha fazla canlı kalamamıştır. Bunun yanında, yapılan çalışmalarda çeşitli araştırmacılar *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bitki artıklarındaki yaşam süresinin coğrafik bölgeye, bitki artıklarının toprak yüzeyinde veya toprak içerisinde gömölü olmasına bağıli olarak değıştiğini bildirmişlerdir (Chang ve ark., 1992a; Gleason ve ark., 1991; Fatmi ve Schaad, 2002). Fatmi ve Schaad (2002) tarafından yapılan çalışmada, ABD'nin California, Ohio eyaletlerinde ve Fas'da çalışılan tüm lokasyonlarda toprak yüzeyine bırakılan domates gövdelerinde, gömülenlere oranla organizma daha uzun süre canlılığını korumuştur. Toprak yüzeyine bırakılan domates gövdelerinde patojen Ohio, California ve USA'da 314 gün, MelkZhar'da 194 gün, Ait Melloul ve Morocco'da 132 gün canlılığını sürdürmüştür. Toprağı gömülenlerde ise patojen Ohio'da 314., California'da 240., MelkZhar ve Ait Melloul'da 60. güne kadar canlılığını sürdürmüştür. Çalışma sonuçları, bitki artıklarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in yaşam süresinin oldukça uzun olduğunu ve coğrafik lokasyonun ve toprağı bırakılma pozisyonunun etkili olduğunu göstermektedir. Gleason ve ark. (1991) toprak yüzeyinde kalan bulaşık bitki artıklarında etmenin en az 24 ay boyunca canlı kalabildiğini fakat toprağı gömülen bulaşık bitki artıklarında sadece 7 ay boyunca canlılığını sürdürdüğünü belirlemişlerdir.

Ayrıca araştırmacılar kış bulaşık bitki artıklarında geçiren epifitik *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* popülasyonunun primer inokulum kaynağı olarak rol oynayabileceğini bildirmektedirler.

Bölgemizde yapılan gözlemlerde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in görüldüğü üretim sezonundan sonraki sezonlarda da hastalığın yeniden ortaya çıktığı saptanmıştır. Enfekteli bitki artıklarının bulunduğu üretim alanlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in ortaya çıkması, patojenin toprakta veya bitki artıklarında az yoğunlukta da olsa canlılığını sürdürebileceği durumunu düşündürmektedir. Bu durumda patojen kendisine toprakta veya bitki artıklarında yaşamını sürdürebilecek bir yer bulabilmektedir. Böylece etmen toprakta veya bitki artıklarında yaşamlarını sürdürerek bir sonraki üretim sezonunda inokulum kaynağını oluşturmaktadır.

4.8. Domates Fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Epifitik Popülasyonunun Belirlenmesi

Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada, 30.04.2013-15.05.2013 tarihleri arasında Ziraî İlaç Bayilerine gidilerek Tokat Merkez, Turhal, Pazar ve Erbaa'dan toplam 104 domates fidesi örneği alınmıştır. 104 fide örneğinin yeşil aksamı NB'de çalkalandıktan sonra santrifüjlenmiş, oluşan pellet seyreltilerek SCM besiyeri yerine ekim yapılmıştır. 28°C'de 5 günlük (120 saat) inkübasyondan sonra fide örneklerinin 92'sinde bakteri kolonisi gelişmiş olup (Şekil 4.31., Şekil 4.32., Şekil 4.33.), 12'sinde ise yapılan izolasyonlarda SCM besiyerinde herhangi bir koloni gelişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.34.). SCM besiyerlerinde bakteri kolonisinin geliştiği uygun seriden tüm bakteriler steril bir öze yardımıyla toplanarak 9'ar ml'lik NB sıvı besiyeri yerine alınmış ve DNA izolasyonunu takiben PCR çalışmasına tabi tutulmuştur.

Patojene spesifik CMM5 ve CMM6 primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışması sonucunda 104 fide örneğinin 19'unun Dreier ve ark., (1995)'nin bildirdiği gibi 614 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.35.). Domates fide örneklerine ait bilgiler ve PCR çalışması sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada kullanılan fidelere ait bilgiler ve PCR çalışması sonuçları

Örnek No	Çeşit Adı	Fidelik Kodu	PCR Çalışması Sonucu
F-1	Eden/Yerlikaya	2013-1	-
F-2	Yet Erva 216	2013-2	-
F-3	Alcapone	2013-3	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-4	Bona	2013-4	-
F-5	Alcapone	2013-5	-
F-6	Akarsu	2013-6	+
F-7	Şahmat F1	2013-7	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-8	Yerlikaya	2013-8	+
F-9	Mandiagon	2013-9	+
F-10	Ganimet	2013-10	+
F-11	Şahmat F1	2013-11	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-12	Esin	2013-12	+
F-13	Lagure	2013-13	-
F-14	Kero F1	2013-14	-
F-15	Troy F1	2013-15	-
F-16	Linda	2013-16	+
F-17	Şahmat F1	2013-17	-
F-18	TT3	2013-18	-
F-19	Durinta F1	2013-19	+
F-20	Olga (yer dom.)	2013-20	-
F-21	Yet Erva 216	2013-21	-
F-22	Lider	2013-22	-
F-23	Sümela RN F1	2013-23	-
F-24	Esin F1	2013-24	-
F-25	Esin F1	2013-25	-
F-26	Esin F1	2013-26	+
F-27	-	2013-27	+
F-28	Samba	2013-28	-
F-29	-	2013-29	-
F-30	Yerlikaya	2013-30	-
F-31	Egemen 216	2013-31	-
F-32	Depar	2013-32	-
F-33	Sümela	2013-33	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-34	Grando	2013-34	-
F-35	Alcapone	2013-35	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-36	Alsancak RN F1	2013-36	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-37	Bona	2013-37	-
F-38	Red	2013-38	-
F-39	Natura	2013-39	-
F-40	Durinta	2013-40	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-41	Esin	2013-41	-
F-42	Bona	2013-42	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-43	Temptra	2013-43	-
F-44	Sarıkavak	2013-44	-
F-45	Şahmat	2013-45	-

Çizelge 4.20. (Devam) Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada kullanılan fidelere ait bilgiler ve PCR çalışması sonuçları

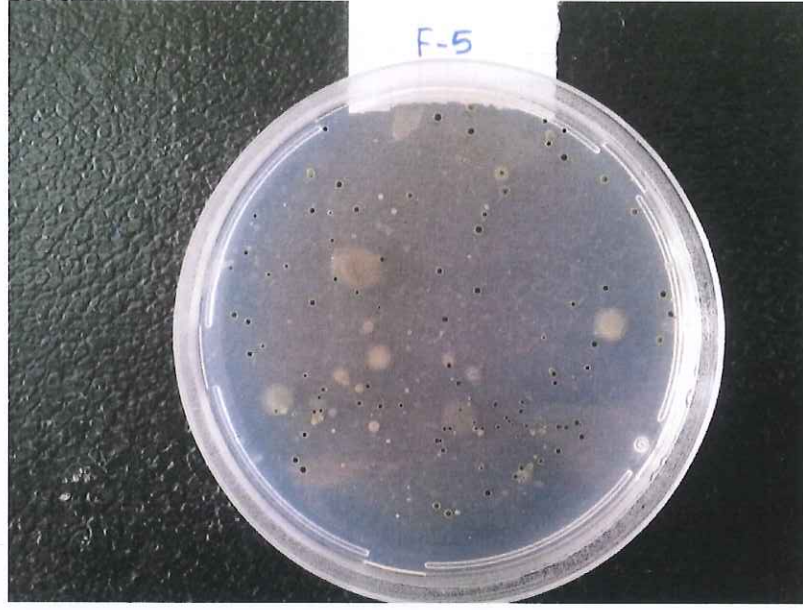
Örnek No	Çeşit Adı	Fidelik Kodu	PCR Çalışması Sonucu
F-46	Barbaros	2013-46	-
F-47	Plumer	2013-47	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-48	Lagure	2013-48	-
F-49	Alcapone	2013-49	-
F-50	Yerlikaya	2013-50	-
F-51	Tyfrane	2013-51	-
F-52	Sedir	2013-52	-
F-53	Tyfrane	2013-53	-
F-54	Lagure	2013-54	-
F-55	Duratan	2013-55	-
F-56	Alcapone	2013-56	-
F-57	Lagure	2013-57	-
F-58	Bona	2013-58	+
F-59	Şahmat	2013-59	+
F-60	Tyfrane	2013-60	+
F-61	Tyfrane	2013-61	+
F-62	Olga	2013-62	-
F-63	Bona	2013-63	-
F-64	Lagure	2013-64	-
F-65	Depar	2013-65	+
F-66	Tyfrane	2013-66	-
F-67	Tyfrane	2013-67	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-68	Troy	2013-68	-
F-69	Yerlikaya	2013-69	-
F-70	Sümela	2013-70	-
F-71	Barbaros 210	2013-71	-
F-72	Sedir	2013-72	+
F-73	Yet Yiğida	2013-73	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-74	Alcapone	2013-74	-
F-75	Alsancak RN F1	2013-75	+
F-76	Granda	2013-76	SCM'de koloni gelişimi gözlenmemiştir.
F-77	Şahmat	2013-77	-
F-78	Şahmat	2013-78	-
F-79	Alida	2013-79	-
F-80	Alsancak RN F1	2013-80	-
F-81	Sagora	2013-81	-
F-82	Bona	2013-82	-
F-83	Alcapone	2013-83	-
F-84	Kardelen	2013-84	-
F-85	Y-65 (yer dom.)	2013-85	-
F-86	Tyfrane	2013-86	-
F-87	Bona	2013-87	-
F-88	Yerlikaya	2013-88	-
F-89	Tyfrane	2013-89	-

Çizelge 4.20. (Devam) Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada kullanılan fidelere ait bilgiler ve PCR çalışması sonuçları

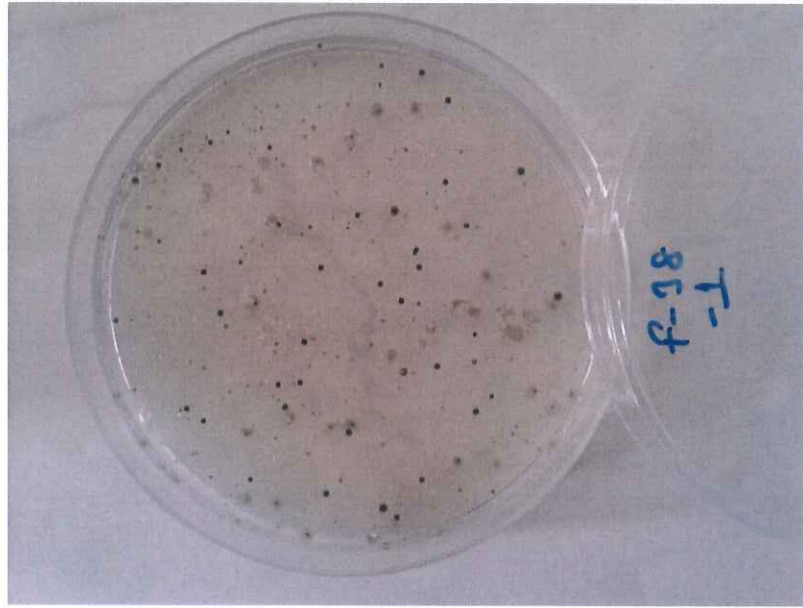
Örnek No	Çeşit Adı	Fidelik Kodu	PCR Çalışması Sonucu
F-90	Troy F1	2013-90	-
F-91	Tyfrane	2013-91	-
F-92	Alsancak RN F1	2013-92	-
F-93	Kocaman	2013-93	-
F-94	Bona	2013-94	-
F-95	Alcapone	2013-95	-
F-96	Esin	2013-96	-
F-97	Sedir	2013-97	-
F-98	Maya	2013-98	-
F-99	Yerlikaya	2013-99	-
F-100	Durinta	2013-100	-
F-101	Bona F1	2013-101	+
F-102	Bona F1	2013-102	+
F-103	Alsancak RN F1	2013-103	+
F-104	Alsancak RN F1	2013-104	-



Şekil 4.31. SCM besi yerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in gelişimi



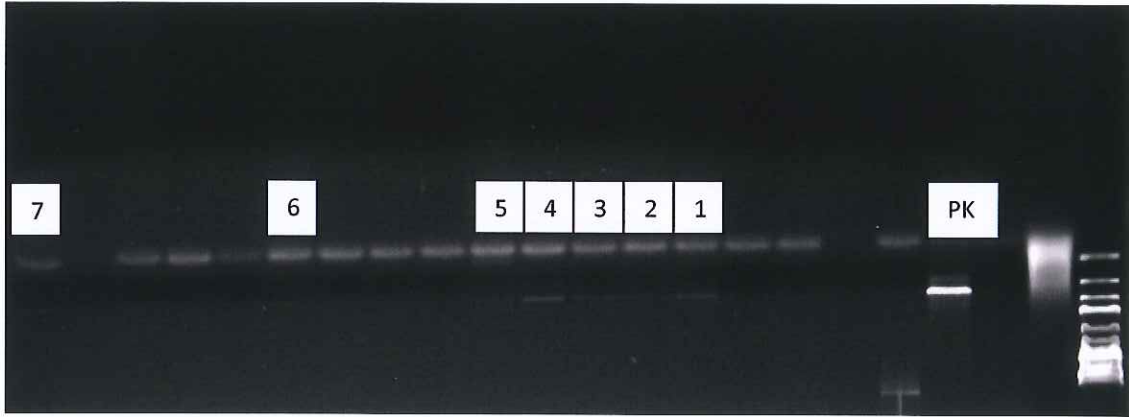
Şekil 4.32. SCM besi yerinde F-5 fidesinden gelişen koloniler



Şekil 4.33. SCM besi yerinde F-38 fidesinden gelişen koloniler



Şekil 4.34. F-35 fide örneğinde SCM besiyerinde koloni gelişimi görülmemiştir.



Şekil 4.35. Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının belirlenmesi çalışmasında PCR testi sonucu oluşan bantlar (PK: Pozitif Kontrol (YY-2); 1: F-6; 2: F-8; 3: F-9; 4: F10; 5: F12; 6: F-16; 7: F-19; PK Cmm: SCM'de gelişen Cmm)

Yapılan bu çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olduğu bakteriyel solgunluk hastalığı belirtisinin henüz domates fidelerinde görülmediği ancak patojenin iletim demetlerinde veya yeşil aksamda bulaşık olduğu dönemlerde, varlığının kanıtlanmasında yarı seçici besiyerine ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak total genomik DNA izolasyonunu takiben, etmene spesifik PCR testleriyle patojenin varlığı belirlenmiştir. Belgüzar ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, hastalık belirtisi göstermeyen, üreticiler tarafından Tokat yöresinde kullanılan domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığı belirlenirken kullanılacak en uygun yöntemi belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada, farklı *Clavibacter*

michiganensis subsp. *michiganensis* konsantrasyonları ile domates fideleri bulaştırılmış ve farklı zaman dilimlerinde (24, 48, 72 ve 96 saat sonra) örneklemeler yapılarak patojenin varlığı genel bir besi yeri olan King B, yarı seçici besi yeri olan SCM'ye ekim, serolojik (ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonunda, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in iletim demetlerinde ve yeşil aksamda bulaşık olduğu halde, hastalık belirtisi göstermeyen fidelerde belirlenmesinde, genel besi yerine ekim ve ELISA testi sonuç vermemiştir. SCM yarı seçici besi yerine ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak etmene spesifik PCR testleriyle patojenin varlığı 24 saat sonra başarılı bir şekilde belirlenmiştir.

Benzer şekilde Gitatis ve ark. (1991) simptomsuz domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığını belirlemişlerdir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolasyonu, fidelerden alınan örneklerin, %100 etanol ile yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulması ve yarı seçici (mCNS) besi yerinde geliştirilmesiyle yapılmıştır. Sera koşullarında yürütülen denemede, izolasyon, inokulasyondan 7 gün sonra inokulasyon noktasının 10 cm aşağısından gövde parçaları alınarak yapılmıştır. Güney Georgia'da 24 araziden toplanan 24 000 fideden yalnızca 3'ünde mCNS besi yerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e rastlanmıştır. Yapılan ELISA testi ile de bu 3 bakterinin varlığı teyit edilmiştir. Ayrıca Gaz kromatografisi ile de bakterilerin yağ asit profilleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmada bitki dokularından izolasyonda 1×10^8 CFU/ml bakteri yoğunluğunun yeterli olduğu ve inokulasyondan 7 gün sonra simptomsuz fidelerde ortalama *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* yoğunluğunun $1,7 \times 10^8$ hücre/cm olarak geliştiği görülmüştür.

Yapılan diğer bir çalışmada ise, domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığı BIO-PCR metodu kullanılarak yapılmıştır. Türe spesifik CMM5 ve CMM6 primerleri kullanılarak koloniler tespit edilmiştir. Çalışmada uygulamadan 3 gün sonra örneklerin %95'inde, inokulasyonun yapıldığı bölgeden 8 cm uzaklıkta bakterinin varlığı tespit edilebilmiştir. Yaklaşık 40 cm uzunluğundaki bitkiler 9 gün sonra tamamen etkilenmiştir. Çalışma sonuçları, enfeksiyonun ilk aşamasında bile patojenin varlığının tespit edilebileceğini ortaya koymuştur (Burokiene, 2006).

Çetinkaya-Yıldız (2007)'nin bildirdiğine göre, antiserum ile kaplanmış ELISA çukurlarına direkt bitki gövdesinden özsuynun sıkılması veya gövdenin batırılması yöntemleri kullanılarak simptomsuz bitkilerde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığı belirlenebilmektedir (Gleason, 1993). Benzer şekilde, Gitatis ve ark. (1995) simptomsuz bitkilerde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının ELISA testi ile belirlenebileceğini bildirmişlerdir (Çetinkaya-Yıldız, 2007).

Çalışmamızda uyguladığımız bu yöntem, bizlere Tokat yöresinde kullanılan domates fidelerinin bu patojenin varlığı yönünden incelenebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca hastalığın Tokat yöresindeki epidemiyolojisinde kullanılan fidelerdeki epifitik bulaşıklığın rolü de ortaya konulmuştur. Domates fidelerindeki bu patojenin epifitik bulaşmalarının saptanması hastalığın üretim alanında yayılmasının engellenmesi ve ekonomik kayıpların önüne geçilmesi açısından önemlidir. Simptomsuz fide testlemede kullandığımız bu yöntem, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* yanında diğer bakteriyel hastalıkların belirlenmesinde de kullanılabilir.

5. SONUÇ

Domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Tokat ilinde Domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranlarının belirlenmesi, hastalığa neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tanılanması, bölgemiz koşullarında epidemiyolojisi incelenerek hastalığı başlatma yeteneği olan ilk inokulum kaynaklarının tespit edilmesi ve hastalık belirtisi göstermeyen, üreticiler tarafından Tokat yöresinde kullanılan domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in varlığının belirlenmesi üzerine yapılan bu doktora çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Tokat ili Merkez ve ilçelerinde domates üretim alanlarında, Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığının bulunma oranlarının belirlenmesi için 2011 yılı Temmuz-Eylül, 2012 yılı Haziran-Eylül aylarında sürvey çalışmaları yapılmıştır. 2011 yılında toplam 65 domates tarlasında 2012 yılında toplam 163 domates tarlasında sürvey yapılmıştır. 2011 yılında toplam 543 da'lık alanda sürvey yapılmış olup, hastalığın tarladaki bulunma oranı ortalama %9,64, 2012 yılında ise 1246,5 da'lık alanda hastalığın tarladaki bulunma oranı ortalama %4,98 olarak belirlenmiştir. Bölgede hastalığın bulunma oranı ise 2011 yılında Merkez'de %88,88, Niksar'da %54,54, Erbaa'da %52,38, Turhal'da %46,15 ve Pazar'da %18,18 olarak, 2012 yılında ise Erbaa'da %61,90, Merkez'de %52,85, Turhal'da %47,72, Pazar'da %44,44 ve Niksar'da ise %0 olarak belirlenmiştir.

2. Sürveylerde toplanan ve üreticiler tarafından laboratuara getirilen hasta bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu 2011 yılında toplam 99 adet, 2012 yılında ise toplam 163 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Patojenite ve virülenslik testine tabi tutulan izolatlar, yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler ile tanıyı destekleyici ELISA, PCR ve FAME testleri ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılanmıştır.

3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in tohum, toprak ve bitki artıklarındaki epifitik yaşam süresinin saptanması ve ilk inokulum kaynaklarının belirlenmesi üzerine yaptığımız çalışmada, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domates tohumlarında birincil inokulum kaynağı oluşturduğu ve

tohumlardaki inokulumun hastalığı başlatacak yeteneğe sahip olduğu belirlenmiştir. Kullandığımız yöntemlere göre, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaştırılmış tohumlarda etmen 370. güne kadar canlılığını sürdürmüştür. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in topraktaki yaşam süresinin saptanması amacıyla yürütülen denemede ise, etmenin yaz aylarında yaklaşık 15 gün, kış aylarında ise yaklaşık 30 gün canlı kalabildiği saptanmıştır. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre, etmenin toprakta kalıcılığı üzerinde sıcaklık ve nemin bunun yanında diğer saprofit mikroorganizmaların da etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Toprakta bulunan bulaşık bitki artıklarında patojenin yaşam süresini belirlemek amacıyla yürüttüğümüz çalışmada ise, bulaşık bitki artıklarında etmen bir ay canlı kalabilmiştir. Bölgemizde yapılan gözlemlerde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in görüldüğü üretim sezonundan sonraki sezonlarda da hastalığın yeniden ortaya çıktığı saptanmıştır. Enfekteli bitki artıklarının bulunduğu üretim alanlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in ortaya çıkması, patojenin toprakta veya bitki artıklarında az yoğunlukta da olsa canlılığını sürdürebileceği durumunu düşündürmektedir.

4. Domates fidelerinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmada ise, kullandığımız yöntemle göre, Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan 104 fide örneğinin 19'unda etmene rastlanılmıştır. Çalışmada yarı seçici besi yerine ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak total genomik DNA izolasyonunu takiben, etmene spesifik PCR testleri şeklinde uygulanan yöntemle, bakteriyel solgunluk hastalığı belirtisinin henüz domates fidelerinde görülmediği ancak patojenin iletim demetlerinde veya yeşil aksamda bulaşık olduğu dönemlerde, etmenin varlığı başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Bu çalışma ile hastalığın Tokat yöresindeki epidemiyolojisinde kullanılan fidelerdeki epifitik bulaşıklığın rolü de ortaya konulmuştur. Domates fidelerindeki bu patojenin epifitik bulaşmalarının saptanması hastalığın üretim alanında yayılmasının engellenmesi ve ekonomik kayıpların önüne geçilmesi açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology. Fifth Edition Elsevier Academic Pres, London.
- Almeida, H.O., Teixeira, F.R., Romeiro, R.S., Silva, D.J.H., Pereira, P.R.G., Fontes, E.P.B. ve Baracat-Pereira, M.C., 2008. Antimicrobial activity of peptide extracts of eggplant leaves in the inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* growth. Summa Phytopathologica, v.34, n.1, p.62-64.
- Amkraz, N., Boudyach, E.H., Boubaker, H., Bouizgarne, B. ve Ait Ben Aoumar, A., 2010. Screening for fluorescent pseudomonades, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. World J Microbiol Biotechnol, 26:1059–1065.
- Anonim, 2013. Tokat İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Tarım İstatistikleri.
- Anwar, A., van der Zouwen, P.S., Ilyas, S., ve van der Wlof, J.M. 2004. Bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) of tomato in commercial seed produced in Indonesia. Plant Disease, 88 (6), 680-684.
- Basım, E., 2002. Isparta ve çevresindeki sera domateslerinde görülen bakteriyel patojenlerin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6:1- 8.
- Basım, E., Basım, H., Dickstein, E.R. ve 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, 88:1048.
- Basu, P.K., 1970. Temperature an important factor determining survival of *Corynebacterium michiganense* in soil. Phytopathology 60, 825-827.
- Baysal, Ö., Soylu, E., M. ve 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* subsp. *michiganensis*. Plant pathology, 52, 747-753.
- Baysal, Ö., Gürsoy, Y.Z., Örnek, H. ve Duru, A., 2005. Enhanced tomato resistance to bacterial canker by application of turtle oil. Journal of General Plant Pathology, 71:204–210.
- Belgüzar, S., Horuz, S., Aysan, Y. ve Yanar, Y., 2014. Domateste *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Epifitik Popülasyonunun Belirlenmesinde Bir Yöntem, Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya, s 218.
- Black, R., Seal, S., Abubakar, Z., Nono-Womdim, R. ve Swai, I., 1999. Wilt pathogens of *Solanaceae* in Tanzania: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata* and *Ralstonia solanacearum*. Plant Disease, 83 (11), 1070 p.
- Bora, T. ve Karaca, İ., 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, 43s.

- Boudyach, E.H., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E. ve Ait Ben Aoumar, A., 2001. Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 11, 141-149.
- Bryan, M.K., 1930. Studies on Bacterial Canker of Tomato. *Journal of Agricultural Research*, 41, 825-851.
- Burokiene, D., 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Agronomy Research*, 4:151-154.
- Carlton, W.M., Braun, E.J. ve Gleason, M.L., 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*, 88, 525-529.
- Chaldecott, M.A. ve Preece, T.F., 1983. The use of a tomato cotyledon test to identify *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. *Plant Pathology*, 32 (4), 441-448.
- Chalupowicz, L., Zellermann, E.M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., Savidor, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I. ve Manulis-Sasson, S., 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *The American Phytopathological Society*, 102 (1), 23-31.
- Chang, R.J., Ries, S.M. ve Pataky, J.K., 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81, 1276-1281.
- Chang, R.J., Ries, S.M. ve Pataky, J.K., 1992a. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology*, 82, 553-560.
- Chang, R.J., Ries S.M. ve Pataky, J.K., 1992b. Reduction in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. *Plant Disease*, 76:805-809.
- Chase, A.R., Stall, R.E., Hodge, N.C. ve Jones, J.B., 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from Aroids using physiological, pathological and fatty acid analysis. *Phytopathology*, 82, 754-759.
- Çetinkaya-Yıldız, R., 2007. Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.)'nin Tanılanması ve Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakteriler İle Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması. (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. Adana.
- Çetinkaya-Yıldız, R. ve Aysan, Y., 2008. Bitki Bakteri Hastalıkları, Editörler: Saygılı, H., Şahin, F. ve Aysan, Y. Meta Basım, İzmir.
- Çınar, Ö., 1980. Bakteriyel Domates Solgunluğu Hastalığı (*Corynebacterium michiganense* (Erwin. F. Smith) Jensen)'nin Tanımı, Savaş Yöntemleri ve Etmene Karşı Dayanıklı Domates Çeşitleri Üzerine Araştırmalar. Çukurova

Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 139- Bilimsel Araştırma ve İnceleme Tezleri.

- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. ve Polissiou, M.G., 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection, 22, 39-44.
- Dreier, J., Bermpohl, A. ve Eichenlaub, R., 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology, 85, 462-468.
- EPPO, 1996. European and Mediterranean Plant Protection Organization-IMI, 1996-www.eppo.int.
- Erkan, S., Özaktan, H. ve Yorgancı, Ü., 1991. Domates tohumlarında Domates Mozayığı ve Bakteriyel Solgunluk etmenlerinin varlığının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 7-11 Ekim 1991. İzmir.
- Erkan, S., 1998. Tohum Patolojisi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 9 s, İzmir.
- FAO, 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical database.
- Fatmi, M. ve Schaad, N.W., 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. Phytopathology, Ecology and Epidemiology, 78 (1): 121-126.
- Fatmi, M., Schaad, N.W. ve Bolkan, H.A., 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. Plant Disease, 75, 383-385.
- Fatmi, M. ve Schaad, N.W., 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stem under field conditions in California, Ohio and Morocco. Plant Pathology, 51:149-154.
- Francis, D.M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B. ve Clair, St.D., 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. Plant Disease, 85, 1171-1176.
- Ftayeh, R., Tiedemann, A., Koopmann, B., Abu-Ghorrah, M. ve Rudolph, K., 2010. Occurrence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of bacterial canker of tomato, in Syria. *Phytopathologia Mediterranea*. 49, 172-178.
- Ftayeh, R.M., Tiedemann, A., Klaus, W. ve Rudolph, E., 2011. A new selective medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seed. The American Phytopathological Society, 101 (11), 1355-1364.

- Gartemann, K.H., Kirchner, O., Engemann, J., Grafen, I., Eichenlaub, R. ve Burger, A., 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106, 179–191.
- Geylani, E., Saygılı, H., Aysan, Y., Cetinkaya-Yıldız, R. ve Şahin, 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.
- Girish, N. ve Umesha, S., 2005. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on bacterial canker of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38(3): 235-243.
- Gitaitis, R.D., 1991. Compendium of Tomato Diseases. Edited by: Jones, J.B., Stall, R.E. ve Zitter, T.A., 25-26.
- Gitaitis, R.D., 1990. Induction of a hypersensitivelike reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 74 (1), 58-60.
- Gitaitis, R.D. ve Beaver, R.W., 1990. Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 80, 318-321.
- Gitaitis, R.D., Beaver, R.W. ve Voloudakis, A.E., 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, 75 (8), 834-838.
- Gleason, M.L., Braun, E.J., Carlton, W.M. ve Peterson, R.H., 1991. Survival and disesemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81:519-1523.
- Gleason, M.L., Gitaitis, R.D. ve Ricker, M.D., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 77:1069-1076.
- Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefen, T. ve Manulis, S., 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology*, 54:643-649.
- Hankin, L. ve Sands, D.C., 1977. Microwave treatment of tobacco seed to eliminate bacteria on the seed surface. *Phytopathology*, 67, 794-795.
- Hausbeck, M.K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R. ve Fulbright, D.W., 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90:38-44.
- Ioannou, N., Psallidasans, P.G. ve Glynos, P., 2000. First record of bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*) on tomato in Cyprus. *Journal Phytopathology*, 148:383-386.

- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J. ve Eichenlaub, R., 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology*, 1(2):113-118.
- Kabaş, A., Ünlü, A., İlbi, H., Oğuz, A. ve Zengin, S., 2009. BATEM domates hatlarının Bakteriyel Kanseri ve Solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'a dayanıklılık durumlarının belirlenmesi.
- Kahveci, E. ve Gürçan, A., 1993. Antalya ilinde domateslerdeki bakteriyel hastalıkların tespiti. *Bitki Koruma Bülteni*, Cilt 33, Sayı: 3-4, 147-151.
- Karaca, İ. ve Saygılı, H., 1982. Batı Anadolu'nun 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.
- Kasselakia, A.M., Goumasa, D., Tammb, L., Fuchsb, J., Cooper, J. ve Leifert, C., 2011. Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 58, 145-147.
- Kokoskova, B., Mraz, I. ve Fousek, J., 2010. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiology*, 55 (3), 239-244.
- Leon, L., Siverio, F. ve Rodriguez, A., 2006. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 141-149.
- Leon, L., Siverio, F., Lopez, M.M. ve Rodriguez, A., 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for *in vitro* and *in vivo* activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection*, 27:1277-1283.
- Louws, F.J., Bell, J., Medina-Mora, C.M., Smart, C.D., Opgenorth, D., Ishimaru, C.A., Hausbeck, M.K., de Bruijn, F.J. ve Fulbright, D.W., 1998. rep-PCR-Mediated Genomic Fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88: 862-868.
- Medina-Mora, C.M., Hausbeck, M.K. ve Fulbright, D.W., 2001. Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 85 (1), 88-91.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I. ve Stepanovic, M., 2009a. Comparison of different methods in detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Acta Horticulturae*, 808, 103-109.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanovic, E. ve Stepanovic, M., 2009b. Effects of Copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*, 24, 19-27.

- Mraz, I., Beran, P. ve Kokoskova, B., 2011. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, IF and PCR with commercial and own primers. *Acta Horticulturae*, 914, 57-60.
- Nedumaran, S. ve Vidhyasekaran, P., 1982. Seed-borne infection of *Corynebacterium michiganense*. *Indian Phytopathology-Phytopathology Notes*, 35:510.
- Nedumaran, S. ve Vidhyasekaran, P., 1982a. Techniques to detect *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* infection in tomato seed. *Indian Phytopathology-Phytopathology Notes*, 35:143-144.
- Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S.N.A., Vadmalai, G. ve Dickinson, M., 2009. Molecular characterization of a phytoplasma associated with Coconut Yellow Decline (CYD) in Malaysia. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (7), 1331-1340.
- 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 Sempozyumu, 8-10 Şubat, s 27, Ege Üniversitesi, Atatürk Kültür Merkezi, İzmir.
- Öktem, Y.E. ve Benlioğlu, K., 1993. Orta Anadolu Bölgesi'nde domates ekim alanlarında bakteriyel hastalıklar üzerinde ön çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 33 (1-2).
- Özaktan, H., 1991. Domates Bakteriyel Solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) İle Savaşım Olanakları Üzerine Araştırmalar. (Doktora tezi). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. İzmir.
- Özdemir, Z., 2005. First report of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, on processing tomato in Turkey. *Plant Pathology Journal*, 4:143-145.
- Özyılmaz, Ü., 2001. Aydın İlinde Sera Domateslerinde Toprak Kaynaklı Bakteriyel Hastalıkların Saptanması. (Yüksek Lisans Tezi), Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın.
- Patino-Mendez, G., 1964. Studies on The Pathogenicity of *Corynebacterium michiganense* (E. F. Smith) Jensen and Its Transmission into Tomato Seed. (Doktora Tezi). Davis, CA, USA: University of California.
- Pradhanang, P.M. ve Collier, G., 2009. How effective is Hydrochlorid Acid treatment to control *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* contamination in tomato seed?. *Acta Horticulturae*, 808, ISHS, 81-85.
- Ricker, M.D. ve Riedel, R.M., 1993. Effect of secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on yield of northern processing tomatoes. *Plant Diseases*, 77:364-366.
- Santos, M.S., Cruz, L., Norskov, P. ve 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(1):581-584.

- Saygı, S., 2010. Tokat Domates Üretim Alanlarında Bakteriyel Kanser (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.) Hastalığının Rastlanma Sıklığı ve Bu Hastalığa Karşı Domates EBR3 Mutantlarının Reaksiyonlarının Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Tokat.
- Sherf, A.F. ve Macnab, A.A., 1986. Vegetable diseases and their control. AWiley Interscience Publication, New York, 711 p.
- Soylu, S., Baysal, Ö. ve Soylu, E.M., 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. Plant Science, 165, 1069-1075.
- Soykan, Ö., 2010. Bazı Bitki Aktivatörleri ile Organik ve İnorganik Gübrelerin Domateste Bakteriyel Solgunluk Hastalığına Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Strider, D.L., 1967. Survival studies with the tomato bacterial canker organism. Phytopathology, 67:1067-1071.
- Şahin, F., Uslu, H., Kotan, R. ve Dönmez, M.F., 2002. Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. Plant Pathology, 51, 399.
- Talibi, I., Amkraz, N., Askarne, L., Msanda, F., Saadi, B., Boudyach, E.H., Boubaker, H., Bouizgarne, B. ve Ait Ben Aoumar, A., 2011. Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker. Journal of Medicinal Plants Research, 5(17), 4332-4338.
- Tanovic, B., Milijasevic, S. ve Obradovic, A., 2007. In vitro effect of plant essential oils on growth of some soil-borne pathogens. Acta Horticulturae, 729, 467-470.
- Teixeira, F.R., Lima, M.C.O.P., Almeida, H.O., Romeiro, R.S., Silva, D.J.H., Pereira, P.R.G., Fontes, E.P.B. ve Baracat-Pereira, M.C., 2006. Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. J. Phytopathology 154, 418-421.
- Tireng-Karut, Ş., 2011. Organik Tarımda Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Etmenine (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) Karşı Kullanılabilecek Tohum Uygulamaları. (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tokgönül, S., 1998. Ticari Domates Tohumlarında Bakteriyel Solgunluk Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'nin Saptanması ve Etmene Karşı Mücadele Olanakları Üzerinde Araştırmalar. (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana.
- Trevors, J.T. ve Finnen, R.J., 190. Introduction and recovery of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from agricultural soil. Plant and Soil, 126:141-143.

- Türküsay, H. ve Tosun, N., 2005. Hidrojen Peroksit uygulamalarının Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığı (*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Smith) Davis et al)'na etkileri. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 42(2): 45-56.
- Utkhede, R. ve Koch, C., 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, 49: 305–313.
- Ülke, G., 2003. Domates Öz Nekrozu Etmenleri *Pseudomonas cichorii* ve *Pseudomonas corrugata*'nın Tanısı, Epidemiyolojileri ve Entegre Mücadelesi Üzerinde Araştırmalar. (Doktora tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. Adana.
- Xu, X., Rajashekara, G., Paul, P.A. ve Miller, S.A., 2012. Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. *Phytopathology*, 102 (2), 177-184.
- Yazıcı, S., Karamustafaoğlu, İ., Aysan, Y., Yanar, Y., 2011. Tokat yöresi domates alanlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olduğu domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş, s 331.
- Yıldız, R. 2002. Doğu Akdeniz Bölgesi Plastik Seralarında Gövde Nekrozuna Neden Olan *Erwinia chrysanthemi*'nin Tanısı, Biovarının Belirlenmesi ve Epidemiyolojisi Üzerinde Araştırmalar. (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. Adana.
- Yuan, H., Min, H., Lv., Z. ve Li, Z., 2009. Antimicrobial activity of isolate HL-12 against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the presence of cadmium. *Exotoxicology*, 18:447-454.
- Yüce, E.K., Yiğit, S. ve Tosun, N., 2011. Efficacy of solarization combined with metam sodium and hydrogen peroxide in control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouse. *Acta Horticulture*, 914, 385-392.
- Zainal, A., Anwar, A., Khaiul, U. ve Sudarsono, 2008. Distribution of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in various tomato production centers in Sumatra and Java. *Microbiology*, 2 (2), 63 – 68.
- Zanon, M.J. ve Jorda, C., 2008. Eradication of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by incorporating fresh crop debris into soil: Preliminary evaluations under controlled conditions. *Crop Protection*, 27, 1511–1518.
- Zhao, W.J., Chen, H.Y., Zhu, S.F., Xia, M.X. ve Tan, T.W., 2007. One-step detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato seeds using a taqman probe. *Journal of Plant Pathology*, 89 (3), 349-351.

EKLER

EK-A

Pseudomonas Agar F (PSF) Besi Yeri

Proteose Peptone	10 g
Tryptone	10 g
Gliserin	10 ml
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir	

Nutrient Agar (NA) Besi Yeri

Nutrient Agar	13 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.	

Nutrient Broth (NB) Sıvı Besi Yeri

Nutrient Broth	8 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.	

SCM Besi Yeri (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için yarı seçici besi yeri Selective *Clavibacter* Medium)

Yeast extract	0.1 g
Sucrose	10 g
H ₃ BO ₃ (Boric acid)	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml
Potassium tellurite (%1 Chapman tellurite solüsyonu Difco)	1.0 ml
121°C'de 15 dakika otoklav işleminden sonra soğuk steril edilen aşağıda verilen kimyasallar eklenir:	
Nalidixic acid	30 mg
Nicotinic acid	100 mg (20 mg/ml distile su)
Cycloheximide	200 mg (200 mg/ml metanol)

EK-A (Devam)

Nutrient Broth Yeast Extract (NBY) Besi Yeri

Nutrient Broth (Difco)	8,0 g
Yeast Extract	2,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Glucose	2,5 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir	

EK-B

CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide)

100 ml buffer için;	
1 M Trisbase pH:7,5	10 ml
5 M NaCl	14 ml
0,5 M Edta pH:8,0	10 ml
CTAB	1 g
14 M Beta Merkптоethanol (BME)	1 ml
dH ₂ O	65 ml

10XTE BUFFER

Tris-HCl pH:8,0	12,1 g L ⁻¹
Na ₂ EDTA.2H ₂ O pH:8,0	3,7 g L ⁻¹

%1'LİK AGAROSE JEL (Küçük Boy-37 ml)

Agarose	0,37 g
5xTBE	7,4 ml
dH ₂ O	29,6 ml
Ethidium bromide	4 ml

Ethidium bromide dışındaki tüm malzemeler karıştırılır, mikrodalgada eritilir, en son Ethidium bromide eklenerek tarakları ayarlanmış jel tepsisine dökülür.

EK-C

Trypticase Soy Broth Agar (TSBA) Besi yeri

Trypticase Soy Broth	30 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklav edilir.

Çözelti 1

Metil Alkol	150 ml
Sodyum Hidroksit	45.0 g
Distile su	150 ml

Sırası ile 150 ml metil alkol ve 150 ml H₂O bir litrelik renkli çözelti şişesine ilave edildikten sonra sodyum hidroksit eklenip iyice karıştırılmıştır.

Çözelti 2

Metil Alkol	225 ml
6 N Hidroklorik Asit	325 ml

Sırası ile 6N'lik hidroklorik asit ve metil alkol bir litrelik renkli çözelti şişesinde iyice karıştırılmıştır.

Çözelti 3

Methyl-tert-butyl Ether	200.0 ml
Hexane	200.0 ml

Renkli çözelti şişesi içerisinde Metil-tert-butil eter üzerine heksan ilave edilerek hazırlanır.

Çözelti 4

Sodyum Hidroksit	10.8 g
Distile su	900.0 ml

Sırası ile sodyum hidroksit, distile su içerisinde bir litrelik renkli çözelti şişesi içinde çözülünceye kadar karıştırılmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sabriye BELGÜZAR
Doğum Yeri ve Yılı : Tokat-21/02/1984
Yabancı Dili : İngilizce
Medeni Hali : Evli
TC Kimlik No : 38179542526
Telefon : 5447189082
e-mail : sabriye.yazici@gop.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lise	Tokat Anadolu İmam Hatip Lisesi	2002
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü	2006
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı	2009
Doktora	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı	