



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI DOMATES ÇEŞİTLERİNDE DOMATES BAKTERİYEL BENEK HASTALIĞI (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)'NA KARŞI DAYANIKLILIK REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

ÖZNUR EKİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Haziran-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Öznur EKİCİ

04/06/2012

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bazı Domates Çeşitlerinde Domates Bakteriyel Benek Hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)'na Karşı Dayanıklılık Reaksiyonlarının Belirlenmesi

Öznur EKİCİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ

Yıl, 2012 Sayfa, 56

Jüri
Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Doç. Dr. Levent ÜNLÜ
Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ

ÖZET

Bu çalışmada, domateste bakteriyel benek hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST)'ya karşı dayanıklılık reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla 50 farklı domates çeşidi incelenmiştir. İki farklı Pst izolatı(YA-1 ve YA-2)'nın 10^8 hücre/ml yoğunluktaki süspansiyonu ile inokule edilen ve steril saf su ile muamele edilen kontrol bitkiler, 25^0C ve %60-70 nispi nemde tutulmuşlardır. Oluşan tipik yaprak lekeleri inokkulasyondan sonraki 21. günde sayılmışlar, bitkilerin dayanıklılık düzeyleri Chambers ve Merriman skalasına göre sınıflandırılmıştır. Sağlıklı domates bitkilerinde, patojene karşı dayanıklılık geninin (*pto*) 963 bp'lik fragmentinin varlığı SSP17 ve JCP32 spesifik primerleri kullanılarak PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Veriler varyans analizi (Anova ver. 14) ve MSTAT programında Duncan çoklu karşılaştırma testiyle değerlendirilmiş ve istatistiki olarak önemli bulunmuşlardır ($p<0,01$). İncelenen 50 farklı domates çeşidinden 15'inde pto geninin varlığı belirlenirken, çeşitlerin farklı bakteriyel izolatlara karşı verdikleri reaksiyonlar farklılıklar göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Dayanıklılık, domates bakteriyel benek hastalığı, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *pto.*

ABSTRACT

MS THESIS

Determination of the Resistance Reactions of Some Tomato Cultivars Against Tomato Bacterial Speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) Disease

Öznur EKİCİ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
PLANT PROTECTİON

Advisor: Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ

Year, 2012 Pages, 56

Jury
Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Doç. Dr. Levent ÜNLÜ
Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ

ABSTRACT

Pseudomonas syringae pv. *tomato* is the causative agent of the bacterial speck disease of tomato (*Lycopersicon lycopersicum*), a disease that occurs worldwide and causes severe reduction in fruit yield and quality. Disease resistance conferred by the pto gene, encodes a serine–threonine protein kinase, is one of the first R-genes to be cloned and sequenced. In this research, the resistance reactions of 50 popular tomato cultivars which are grown commonly in Turkey against *P. s.* pv. *tomato* causal agent of bacterial speck disease were determined. Six-week-old plants were inoculated by spraying of *P. s.* pv. *tomato* YA-1 and YA-2 strains (10^8 cfu ml-1) with an airbrush until leaf surfaces were uniformly wet. After inoculation, the plants were incubated at 25±1 °C in 60-70% relative humidity with a 12 h photoperiod and the disease progress occurred on the seedling leaves by *P. s.* pv. *tomato* was followed by counting the dark brown-black leaf necroses in 21st days after inoculation of the seedlings. Each experiment was performed at least three times and control plants were sprayed with sterile distilled water. The results of resistance reactions on plants were evaluated according to Chambers and Merriman scale. The resistance levels of the cultivars were statistically determined by using ANOVA variance analyze and Duncan multiple, range tests. Presence of pto gene (963 bp) in the tomato cultivars was verified by using the primers SSP17 and JCP32 by PCR and the gene was determined in 15 different tomato cultivars.

Keywords: Resistance, Tomato bacterial spot disease, Polimeraz Chain Reaction (PCR), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *pto*.

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde beni cesaretlendiren ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren tez danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım bakteri izolatlarını göndererek tezime katkıda bulunan Prof. Dr. Yeşim AYSAN' a (Çukurova Üniversitesi), Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN'a (Ege Üniversitesi), Doç. Dr. Recep KOTAN'a (Atatürk Üniversitesi) çok teşekkür ederim.

Tezim kapsamında tüm deneysel çalışmalarımı Bitki Koruma Bölümü-Bakteriyoloji laboratuarında gerçekleştirdim. Başta Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Özdemir ALAOĞLU olmak üzere bölümün değerli hocalarına, Prof. Dr. Haydar HACISEFEROĞULLARI'na Araştırma Görevlisi Ahmet ŞAHBAZ'a, çalışmalarımda maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan arkadaşlarıma, yüksek lisans arkadaşlarım Şerife ÇETİN, Esra KARACİF ve Ahmet YAŞA'ya teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her anında ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Öznur EKİCİ

KONYA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

ÖNSÖZ ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vi**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **vii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **17**

3.1. MATERYAL 17
3.1.1. Bitki materyali 17
3.1.2 Bitkilerin yetiştirilme koşulları 18
3.1.3 Referans *P. s.* pv. *tomato* izolatları 19
3.1.4 Çalışmada kullanılan kimyasallar, alet ve ekipmanlar 19
3.2 YÖNTEM 19
3.2.1 Sağlıklı domates bitkilerinden DNA izolasyonu 19
3.2.2 Domates bitkisine *P. s.* pv. *tomato*'nun inokulasyonu 21
3.2.3 Domates bitkisinden *P. s.* pv. *tomato*'nun re-izolasyonu ve tanılanması 21
3.2.4. Domates çeşitlerinde *Pto* geninin varlığının PCR ile belirlenmesi 23
3.2.5. Domates bitkilerinin yapraklarında *P. s.* pv. *tomato* yaprak lekelerinin belirlenmesi 24

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA **25**

4.1. Sağlıklı Domates Bitkisinden DNA İzolasyonları 25
4.2. Domates Bitkilerine *P. s.* pv. *tomato*'nun İnokulasyonu 26
4.3 *P. s.* pv. *tomato*'nun Re-izolasyonu ve Tanılanması 27
4.4. Domates Çeşitlerinde *Pto* Geninin Varlığının Belirlenmesi 27
4.5 *P. s.* pv. *tomato* Lekelerinin Belirlenmesi 30

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER **39**

KAYNAKLAR **41**

EKLER **55**

ÖZGEÇMİŞ **56**

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Pv. :	Patovar
Pto:	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
DNA:	Deoksiribonucleicacid (Deoksi Ribonükleik Asit)
rpm:	Dakikada devir sayısı
subsp. :	Subspecies
Avr geni:	Avirulence (Avirülens) geni
HR:	Hypersensitive response (Hipersensitif yanıt)
R geni:	Resistance (Direnç) geni
P. s. pv. *tomato*:	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Kısaltmalar

EtOH :	Ethanol
TÜİK :	Türkiye İstatistik Kurumu
EDTA:	Etilendiamin tetra asetikasit
FAO:	Food and Agriculture Organization of United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
µI:	Mikrolitre
cfu/ml :	Mililitredeki canlı hücre sayısı
Kb :	Kilo baz (1000 baz çifti)
µm :	Mikrometre
mg :	Miligram ((1/100 gr)
ml :	Mililitre
TBE :	Tris-Borik Asit-EDTA
UV :	Mor Ötesi (Ultra Viyole)
°C :	Santigrat derece
King B :	King's medium B
NA :	Nütrient agar
g :	Gram
pH :	Asitlik-baziklik faktörü

1. GİRİŞ

Domates (*Lycopersicon lycopersicum*), insan beslenmesinde önemli yere sahip, vitamin ve mineral açısından zengin, kanı temizleme özelliği olan, *Solanaceae* familyasının üyesi bir sebzedir. Ayrıca lif açısından zengin olan domates bitkisinin, sindirimi kolaylaştırma, kanı temizleme ve yaşlanmayı geciktirme yönünden de önemli faydaları vardır (Bayraktar, 1981).

Ülkemizde değişik yerlerde domates için kullanılan bazı yerel isimler vardır. Domates için Muğla'da, günümüzden 60 yıl önceleri 'tomati' ismi kullanılırdı. İzmir'de bugün bile hala 'domat' denilmektedir. Adana ve Mersin şeridinde bir kısım halk domatese 'banadura' demekte, Ermenek'te 'kırmızı patlıcan', Konya'da 'gavata' ve Erzincan'da 'al patlıcan', Şanlıurfa'da ise 'Frenk' ismini kullanmaktadırlar (Günay, 2005).

Domates üretiminin en fazla gerçekleştiği ülkeler arasında Çin ilk sırada yer alırken bunu Amerika ve Hindistan izlemekte, Türkiye ise üretim miktarı bakımından 4. sırada yer almaktadır (Anonim, 2010).

Türkiye'de yetiştirilen yaklaşık 11 milyon ton domatesin yaklaşık %20'si sanayi sektöründe işlenmekte, kalan miktar taze tüketilmektedir (Anonymus, 2004). İşlenen toplam miktarın %80 i salça, %15 i domates konservesi imalatı için, kalan kısmı ketçap, domates suyu vd. için kullanılmaktadır (Baran, 2001).

Domateste görülen bakteriyel hastalıklar, önemli miktarda kalite ve kantite zararına neden olmaktadır (Smith ve ark., 1988). Başlıca domates bakteriyel hastalıkları; bakteriyel kanser ve solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis ve ark., 1984), bakteriyel benek (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young ve ark., 1978), bakteriyel leke (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Gardner ve Kendrick, 1923), bakteriyel gövde ve meyve çürüklüğü (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Bergey ve ark., 1923), bakteriyel solgunluk (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi ve ark., 1995), domates öz nekrozu (*Pseudomonas corrugata* (Roberts ve Scarlett) Scarlet ve ark., 1978), yaprak lekesi (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (van Hall) Bradburry, 1986), yaprak ve gövde lekesi (*Pseudomonas cichorii* (Swingle) Wilkie ve Dye, 1974), *Pseudomonas marginalis* ((Brown) Stevens, 1925), *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Wilkie ve ark., 1973)'dır.

Bakteriyel benek hastalığına sebep olan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun, 1933 yılında Tayvan ve Amerika Birleşik Devletleri'nde tespit edildiği, hastalığın özellikle bitkinin meyvesinde beneklenmelere neden olarak ürünün pazar değerini düşürdüğü (Jones, 1991), yüksek rutubet ve düşük sıcaklıkla daha iyi geliştiği bildirilmiştir (Abak ve ark., 1990). Çiçek enfeksiyonları sonucu, meyve tutumu engelleneceğinden önemli ürün kayıpları ortaya çıkabilmektedir (Sherf ve Macnab, 1986). Ayrıca *P. s.* pv. *tomato*'nun neden olduğu bakteriyel benek hastalığı tohum kaynaklı olması nedeniyle de savaşımı güç ve tahripkâr bir hastalıktır (Eppo, 1982; Agrios, 1997).

Türkiye'de domates tarımının giderek yaygınlaşması ve çok sayıda çeşidin Türkiye'ye girmesi ile 1960'lı yıllardan itibaren, domates bakteriyel benek hastalığında bir artış görüldüğü bildirilmektedir (Öktem, 1985). Hastalığın ülkemizde 1970'li yıllardan sonra sorun haline geldiği (Aysan ve ark., 1995), Doğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan survey sonucunda %20 oranında ürün kaybına neden olduğu (Şahin, 2001), ayrıca Ege ve Marmara Bölgesi'nde de varlığının tespit edildiği ifade edilmektedir (Karaca ve Saygılı, 1982; Maden, 1989; Kahveci ve Gürcan, 1993; Tokgönül; 1995). Hastalıktan şiddetli etkilenen bir domates serasında %12-23'e kadar varan ürün azalışı olabilmektedir (Aysan ve ark., 2005).

Bakteriyel benek hastalığına karşı uygulanabilen kesin etkili bir ticari preparat bulunmamaktadır. Ancak tarla ve sera koşullarında bitkiler üzerinde yoğun miktarda bakır kullanımı söz konusudur. Bu da hem üründe hem de toprakta bakır metalinin birikimine yol açmaktadır (Benlioğlu ve Benlioğlu, 1998).

Fitopatoloji bilim dalındaki araştırmalar bitkilerin savunma mekanizmalarından sorumlu moleküler ve hücresel olayların anlaşılması yönündedir. Enfeksiyonun erken döneminde görülen ve bitkide 'aktif' savunmanın başlangıcı kabul edilen olaylar, patojenin tanınması ve ortaya çıkan sinyalin tüm hücreye ve komşu dokulara iletimi göz önüne alındığında, elde edilen bilgiler daha çok yenidir ve son birkaç yılda gerçekleştirilen çalışmaların ürünüdür. Bu bilgiler günümüzde yapılan ve gelecekte yapılacak olan moleküler çalışmalara, bitkilerin patojenleri nasıl tanıdıklarını, bulundukları ortamdaki canlıların zararlı mı yoksa zararsız mı olduğuna nasıl karar verdiklerini anlamada büyük faydalar sağlayacaktır (Tör, 1998). Yapılan moleküler çalışmalar R genlerinin işlevini ve bitkide tam olarak nerde bulunduğunu ortaya çıkarmak için yapılmıştır (Zhu ve ark., 2004; Janjuseviç ve ark., 2006; McHale ve ark.,

2006). R proteinleri ve sinyal iletimi üzerine yapılan araştırmalarda, hastalık kontrolü için R genlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Pink, 2002).

Bitki çeşitleri arasında hastalıklara karşı duyarlılık açısından farklılıklar bulunduğu dayanıklılığın ise bitkinin genetik yapısıyla ilişkili olup bazen bir veya birkaç gen (monogenik) ile yönetilirken, bazen de çok sayıda gen (poligenik) tarafından kontrol edilebildiği bilinmektedir (Roberts, 2002). Dayanıklılığın tek gen, birkaç gen ve çok gen tarafından idare edilmesinin bilinmesi ıslah çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. Tek gen tarafından idare edilen dayanıklılık ıslahı çalışmaları, diğerlerine göre oldukça basit ve sonuç elde edilmesi daha kolaydır. Çok gen tarafından yönetilen dayanıklılıkta genomda bir çok bölge etkili olduğundan genel olarak Mendel'in genetik açılım oranlarına uygun olmayabilmektedir (Geiger, 1989). Moleküler markörlerin uygulamaya aktarılabilmesi için ilk önce üzerinde çalışılan hastalık ve zararlı etmenine karşı dayanıklılıktan sorumlu gen kaynağının klasik yöntemlerle belirlenmesi gerekmektedir.

Dayanıklılık; hastalık ve zararlı etmeninin çoğalma ve gelişmesinin bitki tarafından engellenmesidir (Roberts, 2002). Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık genleri çoğunlukla bitkilerin yabani formlarında bulunmakta ve bu genler melezleme çalışmaları ile yabani bitkilerin kültür formlarına aktarılmaktadır (Boerma ve Hussey, 1992). Kimi durumlarda dayanıklılık geni veya genlerini taşıyan yabani türler ile bunların kültür formları arasındaki melezlemeler başarılı olmamakta ve istenilen dayanıklılık geni aktarılamamaktadır. Bu durum dayanıklılık ıslahı çalışmalarına sınırlama getirmektedir. Bu sınırlamalar, doku kültürü ve diğer gen aktarım yöntemleri (*Agrobacterium tumefaciens*, biyolistik, elektroporasyon, mikroenjeksiyon vb.) kullanılarak aşılmaya çalışılmaktadır (Boerma ve Hussey, 1992; Vrain, 1999). Hastalıklara dayanıklı çeşitlerin ekimi veya dikimiyle kimyasal uygulamalar azaltılmakta hatta bazı durumlarda ise tamamen ortadan kaldırılarak avantaj sağlamaktadır (Hammond-Kosack ve Jones, 1996).

Bazı domates çeşitlerinde bulunan *pto* geni, *P. s.* pv. *tomato* (Bakteriyel benek hastalığı)'ya karşı direnç geni olarak bilinmektedir. *Pto*, 321 aminoasitten oluşan, küçük, yoğun bir gendir. İşlevinde ise R genlerini karakterize eder. İkili özel etkiye sahip olup en küçük avirulens (avr) proteini ile etkileşim halindedir (Rose ve ark., 2006). Patojen, potansiyel bir konukçu ile karşı karşıya geldiğinde, konukçuyu başarılı bir şekilde kolonize eder ve hastalık oluşturabilirse, patojen virulent olarak ve konukçu da duyarlı olarak tanımlanır ve bu ilişkiye "uyumlu" ilişki denir. Alternatif olarak eğer

bir patojen potansiyel bir konukçu ile karşı karşıya geldiğinde, konukçunun savunma mekanizmasını hızlı bir şekilde uyarıp, gelişmesi engelleniyorsa ve hastalık gelişimi gözlenmiyorsa, patojene avirulent, konukçuya dayanıklı ve bu ilişkiye de "uyumsuz" ilişki denir (Ellingboe, 1984; Crute, 1986; Bennetzen ve Jones, 1992; Lindsay, 1993).

Pto geni domateste *P. s.* pv. *tomato* enfeksiyonu sırasında aktif hale geçmektedir. *Pto* geni 1970'lerin ortasından itibaren önem kazanmaya başlamıştır (Carland ve Staskawkz, 1993).

P. s. pv. *tomato*'nun 0 nolu ırkı, *pto* geni taşıyan domates bitkilerinde hastalığa neden olmamaktadır. AvrPto (Avr: avirülens)'dan yoksun olmasından dolayı bakterinin 1 nolu ırkı, *pto* geni taşıyan ya da taşımayan domates bitkilerinde hastalığa neden olmaktadır (Martin ve ark., 1993).

Yürütülen bu tez çalışmasında, ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan domates çeşitlerinde, *P. s.* pv. *tomato* etmenine karşı dayanıklılık sağladığı bildirilen *pto* geninin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında, *pto* geni içeren çeşitleri belirlemenin yanısıra bu çeşitlerin ileriki ıslah çalışmalarında kullanılabilme olasılığı ile birlikte bu geni taşıyan çeşitlerle sağlıklı ve yüksek verimli yetiştiricilik yapılabileceği düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Domates (*Lycopersicon lycopersicum*) anavatanı Güney ve Orta Amerika olan, *Solanaceae* familyasına ait tek yıllık bir bitki olup, Amerika'dan Avrupa'ya, buradan da tüm dünyaya yayıldığı bilinmektedir (Kütevin ve Türkeş, 1987; Küçüker, 1994). Domates ılık ve sıcak iklimleri seven, seçici olmamakla beraber süzek, humus ve organik maddece zengin, su tutma kabiliyeti iyi, tınlı topraklardan hoşlanan bir bitkidir (Kaygısız, 2004). Eski dönemlerde domates meyvelerinin zehirli olduğuna dair inanç, domatesin uzun süre yetiştiriciliğinin yapılmasını ve insan beslenmesinde kullanılmasını engellemiştir (Günay, 2005). Domatesin 100 g'ında 0.55 mg vitamin B6, 1700 IU vitamin A, 0.10 mg vitamin B1 ve 21 mg vitamin C bulunmaktadır (Sevgican, 1999; Anonim 2004).

Çin, dünya domates üretiminin % 29'luk dilimi ile ilk sırada yer almaktadır. Bunu sırasıyla ABD ve Hindistan takip etmekte, Türkiye ise sahip olduğu 4. sıradaki yeri ile dünya domates üretiminin yarısından fazlasına (%53) sahiptir. Dünya'da ortalama domates verimi 348 ha/ton'dur (Anonim, 2010). FAO istatistiklerine göre dünya domates üretim miktarları Çizelge 1'de verilmiştir (Anonymus, 2010).

Çizelge 1. Ülkelere Göre 2010 Yılı Domates Üretim Miktarları

Ülke	Üretim miktarı (Ton)
Çin	41.864.750
ABD	12.902.000
Hindistan	11.979.700
Türkiye	10.052.000
İtalya	6.024.800
İran	5.256.110
İspanya	4.312.700
Brezilya	3.691.320

Domateste bakteriyel hastalık etmenleri önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu etmenler içerisinde domates bakteriyel benek hastalığına neden olan *P. s.* pv. *tomato*, ekolojik koşulların uygun olduğu birçok ülkede domates yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Schneider ve Grogan, 1977; Yunis ve ark., 1980; Goode ve Sasser, 1980). Bu hastalık etmeni ilk kez, 1929'da Amerika Birleşik Devletleri'nde Wisconsin'de, 1930'da Florida'da, 1933 yılında Formoza adasında (Japonya'da) görülmüştür (Okabe, 1933). 1978'de ABD'nin Georgia eyaletinde 1600 dekarlık fide üretim alanındaki tüm

bitkilerin bu hastalıktan dolayı imha edilmesinden sonra hastalık dikkat çekmeye başlamıştır (Smitley ve Mc Carter, 1982; Mc Carter ve ark., 1983).

Dünyada domates üretiminin yapıldığı pek çok alanda bu hastalık etmeni görülmektedir (Jones ve ark., 1993), Ülkemizde ise ilk kez etmenin varlığı 1970'li yıllarda Batı Anadolu Bölgesi'nde (Saygılı, 1975) ve Akdeniz Bölgesi'nde (Çınar, 1977) tarafından saptanmıştır.

P. s. pv. *tomato* özellikle, ilkbaharı yağışlı ve soğuk geçen Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde önemli bir sorun konumundadır (Karaca ve Saygılı, 1982; Maden, 1989; Kahveci ve Gürcan, 1993; Tokgönül, 1995).

Bakteriyel benek hastalığında, *P. s.* pv. *tomato* bakterisi bitki hücresine girdikten sonra, mezofil hücreleri ve hücre duvarı ile yakın ilişki kurar ve yaprak içinde mikrokoloniler oluşturarak çoğalmaktadır (Gautam, 2008).

Hastalık belirtileri önce fidelerde, yaprak ve sap kısmında görülmektedir. Zaman zaman tüm fidelerin kurumasına yol açar. Tarla döneminde çiçek sap ve meyvelerde belirti oluşturabilmektedir. Yapraklardaki lekeler oldukça belirgindir. 1-3 mm çapında olan bu lekelerin etrafı genellikle sarı hale ile çevrilmiştir. Bir yaprak üzerinde oldukça fazla lekenin görülmesi mümkündür. Bu lekeler birleşerek yaprağın deforme olmasına kısmen veya tamamen kurumasına yol açmaktadır. Ana gövde ve buna bağlı dallarla, yaprak ve çiçek saplarında da lekeler görülmektedir. Lekeler genelde uzunca ve yüzeyseldir (Jones ve ark., 1991).

Çiçeklerdeki lekeler yapraklardaki kadar belirgin değilse de çiçeklerdeki enfeksiyonlar oldukça önemlidir, özellikle ilk çiçeklerde görüldüğünde meyve tutumunu etkilemekte ve ürün kayıplarına neden olmaktadır (Karaca ve Saygılı, 1977). Meyvelerdeki lekeler önce çok küçüktürler, zamanla büyürler ve toplu iğne başını andıran kabarcıklar meydana getirirler, bu kabarcıklar yüzeyseldir ve kolayca kazınabilir, meyve içine pek ilerlemezler. Yalnız özellikle armut şeklindeki domateslerde bu kabarcıklar meyveye biraz girmiş durumdadırlar. Çok sayıda oluşan bu lekeler birleşince meyvenin şeklini bozarlar ve pazar değerini düşürmektedirler (Sherf ve Macnab, 1986). *P. s.* pv. *tomato*'nun erken dönem enfeksiyonlarında ortalama %75, mevsim sonu enfeksiyonlarında ise yaklaşık % 5 lik bir ürün kaybına yol açar (Sherf ve Macnab, 1986).

Bakteriyel benek hastalığı etmeni olan *P. s.* pv. *tomato* tohumla taşınmaktadır. Domates tohumlarında etmen 20 yıl yaşamını sürdürmektedir. Tohum kabuğu üzerinde yaşamını sürdüren etmen, tohumun çimlenmesi sırasında populasyonunu artırır ve

tohum kabuğundan fide apeksine veya kotiledon yapraklara geçerek fideyi hastalandırır. Hasta tohumdan gelişen fidelerin kotiledon yapraklarında kahverengi yapraklar ortaya çıkar (Bashan ve ark., 1982).

Patojen tohum dışında, bulaşık bitki artıkları üzerinde toprakta yaşamını devam ettirebilmektedir (Karaca ve Saygılı, 1982; Saygılı ve ark., 1985; Aysan ve Çınar, 1998). Bu patojen; etrafta bulunan, etmenin konukçusu olmayan bitkiler ve yabancı otlarda epifitik olarak bir mevsimden diğer mevsime kadar yaşamını sürdürmektedir (Jones ve ark., 1981; Bogatzevska ve Boneva, 1991). Bu etmen özellikle sıcaklık ve nem yönünden uygun koşulları bulduğunda hızla çoğalmakta ve 13-28 ^{0}C'de optimal gelişim göstermektedir. Bitkiye doğal açıklıklardan ve yaralardan giriş yapmaktadır. Yağmur ve rüzgâr, hastalığın bir bitkiden diğerine yayılmasında etkili olmaktadır. Özellikle fırtınalı bir yağmurdan sonra hastalık çok hızlı yayılır. Hastalık sistemik olmayıp lokal lezyon hastalığı olup bitkinin iletim sistemini etkilememektedir (Jones ve ark., 1991).

Bakteriyel benek hastalığının mücadelesi genellikle kültürel ve kimyasal olarak yapılmaktadır. Kültürel mücadele olarak hastalıklı bitkilerin yok edilmesi, hastalıksız ve sağlam fidelerin kullanımı, kapalı ve örtü altı yetiştiriciliklerde kapalı alanın havalandırılması, yağmurlama sulama sisteminden kaçınmak, temiz veya test olunmuş tohumların kullanımı ve münavebenin yapılması gibi işlemler sayılabilmektedir (Erkılıç ve ark., 1994; Aysan ve ark., 1997; Aysan ve Çınar, 2000).

Kimyasal mücadelede ise diğer bitki bakteriyel hastalıklarının kontrolünde olduğu gibi, bu hastalık için de antibiyotikler ve bakırlı preparatlar önerilmektedir. Türkiye'de antibiyotik kullanımı dayanıklılık sorunu, insan ve çevre sağlığı açısından zararlı olması ve ekonomik bir uygulama olanağının olmayışı nedenleriyle yasaklanmıştır (Benlioğlu ve Benlioğlu, 1998).

Hastalığın önlenmesinde bakırlı bileşikler ve ethylene-bis-dithio-carbamate (EBDC) grubu fungisitler yaygın olarak kullanılmaktadır (Colin ve Chafik, 1986; Conlin ve Mc Carter, 1983). Ancak, bakırlı fungisitlere karşı bu patojenin kısa sürede dayanıklılık kazanması (Bender ve Cooksey, 1986; Özaktan ve Bora, 1991; Benlioğlu ve Benlioğlu, 1998) ve bu dayanıklılığın plazmid kökenli olması (Cuppels ve Elmhirst, 1999) nedeniyle bakırlı fungisitler hastalığın önlenmesinde etkisiz kalmaktadır. EBDC grubu fungisitler ise, salçadaki kalıntı sorunu ve kanserojenik olmaları nedeniyle birçok ülkede sanayi domatesi yetiştiriciliğinde kullanımına izin verilmemektedir (Louws ve ark., 2001; Wilson ve ark., 2002).

Son dönemlerde, uygulamaya konulan, bazı biyolojik preparatlar (Wilson ve ark., 1997; Aysan, 1999) ve bitki aktivatörleri de bu hastalığın savaşımında önerilmektedir.

Bakterinin bitkiden izolasyonunda, hastalıklı bitki yaprağı örnekleri akan musluk suyuyla yıkandıktan sonra, fungal patojenler ve bazı saprofitik mikroorganizmalarla bulaşık olabileceği düşünülen örneklere %0.5 NaOCl'de 2 dk yüzey sterilizasyonu yapılmaktadır. Hastalıklı yapraklar fosfat buffer saline içerisinde ezilerek, elde edilen süspansiyon nütrient agar (NA) besiyerine drigalski spatula ile yayılmaktadır. 25^0C'de 24-48 saatlik inkübasyondan sonra krem renkli kolonilerden seçilerek, KB besiyerine çizgi ekim yapılarak gelişen bakterilerin UV lamba altında fluoresan özelliği incelenerek ve bunu takiben tanılama testleri yapılmaktadır (Schaad, 2001).

P. s. pv. *tomato*, aerobik, gram negatif, çubuk şekilli, 0.69-0.97 x 1,8-2,8 µm boyutlarında olup levan ve floresan özellikte bir bakteridir. Oksidaz, arjinin dehidrolase, nişastanın hidrolizasyonu testleri için negatif, β-glucosidase, jelatin testi için ise pozitif reaksiyon vermektedir. Karbon kaynağı olarak, D (-) tartrate'dan yararlanılmakta, fakat erythitol veya DL-lactate'ı kullanamamaktadır (Jones ve ark., 1986; Lelliott ve Stead, 1987; Hildebrand ve ark., 1988; Blancard, 1994; Schaad ve ark., 2001).

Domateste bakteriyel benek hastalığı etmeni olan *P. s.* pv. *tomato*'nun patojenite testlerinde 3-5 yapraklı dönemde olan duyarlı domates bitkileri kullanılmakta ve inokulasyondan 24 saat önce bitkiler nemli koşullarda muhafaza edilerek stomaların açılması sağlanmaktadır. 10^8 hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan süspansiyon duyarlı domates bitkilerinin alt yapraklarına küçük el pülverizatörüyle püskürtülmektedir. Bitkiler 24 saat içleri nemlendirilmiş polietilen torbalarda muhafaza edilir ancak polietilen torbaların yapraklara değmesi engellenir ve bitkiler 25 ^{0}C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odaları veya inkübasyon dolaplarında bekletildikten 5 gün sonra tipik olarak su emmiş lekelerin gelişimi gözlenmektedir. 21 gün sonra yapraklarda tipik hastalık belirtileri oluşmaktadır (Chambers ve Merriman, 1975).

Bereswill ve ark., (1994) yaptıkları çalışmalarda *P. s.* pv. *tomato*'nun moleküler olarak tanılanmasında PST1 ve PST2 primerlerini kullanarak, bakteriyel benek hastalığını teşhis etmişlerdir.

Günümüzde kimyasal savaş dışında hastalıklarla mücadelede kullanılan alternatif yollardan bazıları uzun süreli ürün rotasyonu ve hastalığa dayanıklı çeşitlerin ıslahıdır. Ürün rotasyonu ve toprak sterilizasyonları günümüz şartlarında yeterince

ekonomik ve pratik uygulamalar olmaması nedeniyle pek etkili olamazken, hastalığa dayanıklı bitki çeşitlerinin ıslahı genelde uzun yıllar araştırma gerektiren konulardır (Milligan ve ark., 1998; Rossi ve ark., 1998).

Patojene karşı dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında gelinen son nokta, *pto* geninin bazı domates çeşitlerine aktarılması çalışmalarıdır. *P. s.* pv. *tomato*'nun 2 ırkı bulunmaktadır (Lawton ve MacNeil, 1986; Bogatsevska, 1989). *P. s.* pv. *tomato*'nun 0 nolu ırkına dayanıklılık sağlayan *pto* geni (Pitblado ve ark., 1980), 1 nolu ırkına karşı dayanıklı değildir (Bounaurio ve ark., 1996; Arrendo ve Davis, 2000). Ülkemizde ise, sanayi domatesi ekiliş alanlarında *P. s.* pv. *tomato*'nun her iki ırkıda bulunmaktadır (Aysan ve ark., 1999).

Bitkide savunma genetik olarak kontrol altında tutulmakta ve patojen bitkiye saldırdığı anda savunma hemen aktif hale geçmektedir. Bitki hücrelerinde hastalığa direnç (R) genleri patojenlere karşı bitkiyi korumak için vardır (Dangl ve Jones, 2001; Jones, 2001). Konukçu bitkiler hastalıkların oluşturacağı zararlara engel olmak için dayanıklılık genlerini geliştirmişlerdir (Dixon ve ark., 1994; Parker ve Coleman, 1997). Dayanıklılık, hastalık ve zararlı etmeninin çoğalma ve gelişmesinin bitki tarafından engellenmesidir (Roberts, 2002). Dayanıklılık genleri, patojene karşı dayanıklılığı kontrol eden en önemli yapısal proteinlerdir (Staskawicz ve ark., 1995; Van der Biezen ve Jones, 1998; Feys ve Parker, 2000). Dayanıklılık geninin ürünü olan proteinler hastalık etmeninin bitkiye girmesi sırasında salgıladığı sinyal moleküllerini tanıma yeteneğine sahiptirler. Bu tanıma işlemi bitkinin savunma sisteminin harekete geçirilmesi bakımından zorunludur. Sonuçta bitki savunma mekanizmasının uyarılması antimikrobiyal etkiye sahip birçok proteinin bitkide üretilmesine neden olmaktadır (Ellingboe, 1984). Bitkinin hastalık ve zararlı etmenine karşı dayanıklılığı; düşük, orta ve yüksek düzeyde gerçekleşmektedir. Bitki yüksek düzeyde dayanıklı ise patojen hiç çoğalamamakta veya çok az düzeyde çoğalabilmekte, orta ve düşük dayanıklılıkta ise hastalık ve zararlı etmeni belli düzeyde çoğalabilmektedir. Buna karşın duyarlı bitkide dayanıklılığın tam tersi olaylar görülmektedir. Bu durumda hastalık ve zararlı etmeni tamamen çoğalmakta ve yoğun enfeksiyonlarda bitkinin ölümüne neden olmaktadırlar (Roberts, 2002).

Dayanıklılık (Resistance=R) geni ürünleri tarafından alınan sinyal, herhangi bir yolla hücre içerisinde gerekli yerlere iletildiğinde, bitkide aktif savunma sistemi ve tepki mekanizmasını çalıştırmakta ve sonuçta da dayanıklılık olgusu ortaya çıkmaktadır (Dixon ve ark., 1990; Lamb, 1994). Diğer taraftan patojenler hayatını devam ettirmek

isteyecek ve bitkileri tamamiyle istila edebilmek için konukçunun potansiyel dayanıklılık mekanizmasını kırmaya çalışacaktır. Bunu yapabilmek için, ya yeni bir ırkını oluşturacak (mutasyon, rekombinasyon, heterosis veya paraseksüel döngü yollarıyla ya da başka bir yolu deneyecektir. Böyle durumlar, doğal koşullarda sürekli devam etmektedir. Islahçının piyasaya sürdüğü dayanıklı çeşitler bir kaç yıl içerisinde patojenler tarafından aşılmaktadır (epidemik hastalıklarda boom ve bust döngüsü). Başarılı şekilde hayatını devam ettiren bir patojene bakıldığında, konukçu ile patojen arasındaki tanışmanın olmadığı ve hipersensitif reaksiyon (HR) ile diğer aktif savunma mekanizmalarının çalışmadığı görülmektedir (Heath, 1986; Mansfield, 1986; Mitchelmore ve ark., 1988; Vanderplank, 1989). Burada tanışmanın ve tepkinin baskı altında tutulduğu ve antimikrobiyal bileşiklerin detoksifike edildiği belirtilmektedir (Mansfield, 1990). Böyle bir mekanizma ile de konukçu-patojen ilişkileri uyumlu hale gelmektedir.

Bitkinin patojenden korunmak için mevcut biyokimyasal ve yapısal savunmalarını harekete geçirmesi için, bitki tarafından patojenin ilk tanınması çok önemlidir (Agrios, 1997). Konukçu-patojen ilişkilerinde ilk basamak, patojen ile konukçu bitki arasında fiziksel bir temasın kurulmasıdır (Romantschuk, 1992). Moleküler temas mikroorganizmaların dış yüzeyinde bulunan ve çoğunlukla glikoprotein karakterinde olan sinyal vericiler (elisitörler) ile bitki hücresi dış yüzeyinde bulunan ve elisitörleri bağlama yeteneğinde olan proteinler (lektinler) arasında olmaktadır (Thordall-Christensen ve ark., 1987). Bu temas, bitkinin toprak üstü kısmında (fillosfer) olabileceği gibi, bitkinin toprak altında kalan kısımlarında (rizosfer) da olabilir (De Wit, 1986; Callow ve ark., 1988; Lamb ve ark., 1989; Dangl, 1995). Patojen bitkiyle fiziksel temas kurar kurmaz bitki, bir patojenin varlığını bildiren sinyal molekülleri almaya başlar (Agrios, 1997). Bu ilk temas kurulduktan sonra, patojen ile konukçu arasında bir tanışma olayı gerçekleşir (De Wit, 1986; Callow ve ark., 1988; Lamb ve ark., 1989; Dangl, 1995).

Bitkinin patojeni tanıması olayında ırka özgü-dayanıklılık mekanizması görülmektedir. Burada, bitkide bulunan spesifik bir tanışma geninin (R-Recognition) patojenin avirülent (avr) geni tarafından üretilen bir antijeni tanıması olayı vardır (Mansfield, 1983, 1986; Day, 1986; Ellis ve ark., 1988; Crute, 1992; De Wit, 1992).

Konukçu-patojen arasında görülen böyle bir uyumsuz ilişki, uyarıcı reseptör modeline uygulanırsa, avr gen ürünleri uyarıcı olurken hücre duvarında bulunan R geni ürünleri de reseptör görevi görmektedir. R geni ürünleri tarafından alınan sinyal

herhangi bir yolla hücre içerisinde gerekli yerlere iletildiğinde, bitkide aktif savunma sistemi ve tepki mekanizmasını çalıştırmakta ve sonuçta da dayanıklılık olgusu ortaya çıkmaktadır (Dixon ve Lamb, 1990; Lamb, 1994). Konukçu açısından bakıldığında, olayların gelişme sırası şu şekilde olabilmektedir;

a) Patojen ile temas (bitki yüzey yapısı, patojenin bitki yüzeyine tutunabilirliği vb. faktörler).
b) Irka-özgü tanışma (patojendeki avr genleri ile konukçudaki R genlerinin ürünleri ilişkiye geçer).
c) Gen Aktivasyonu (avr ürününü tanıyan R geni ürünü diğer genleri aktif hale getirir).
d) Genel Tanışma (erken dönemde görülür ve konukçu veya patojenden açığa çıkan kütiküla ya da hücre duvarı parçacıkları, sinyal iletişiminde görev alırlar).
e) Sinyal iletişimi sonucu gen aktivasyonu olur ve tepki mekanizması çalışır. Her ne kadar iki farklı tanışma sistemi varsa da tanışmadan sonra gelen sinyal iletişim sistemleri aynı olabilir (Tör, 1998).

Geçmişteki 10 yıl içinde pek çok R geni (Dayanıklılık Genleri) tanımlanmış, klonlanmış, sequencelenmiş farklı bitkilerde (Arabidopsis, domates, marul, patates, keten ve tütünde) karakterize edilmiştir. R genleri geniş spektrumlu patojenlerin, virüs, bakteri ve funguslara dayanıklılığını ifade etmekte ve R genleri amino asit seviyesinde dizilim motiflerini paylaşmaktadır. PCR teknolojisi kullanılarak, dizilim homologları arasında hastalıklara dayanıklı genler, tanımlanır, klonlanır ((Zhang, 2002).

Mendel'in kalıtım üzerine yaptığı çalışmalarını yeniden değerlendiren bitki ıslahçıları, bu yüzyılın başlarında bitkilerde patojenlere karşı oluşan dayanıklılığın patojenin ırkına göre varyasyon gösterdiğini ve kalıtsal olduğunu bulmuşlardır. Bu ilk çalışmaları takip eden yıllar içerisinde, dayanıklılığın genelde tek bir gen (R geni) tarafından kontrol edildiği tespit edilmiş ve bu tip genlerden yüzlercesi tanımlanarak ıslah programlarında başarı ile kullanılmıştır. Daha sonraları, Flor'un keten ve keten pası üzerindeki öncül çalışmaları, bitkilerdeki dayanıklılığı sağlayan her bir gene karşı, patojende bu gene denk gelen ve virülensliği kontrol eden bir genin (gene-karşı-gen) bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (Flor, 1971).

Staskawicz ve ark., (1984) ilk avrülenslik geni soya fasulyesinde patojen olan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*'nın ırk-6'sından klonlanan avr geni vektör kozmid (PLAFR1) yardımı ile etmenin diğer ırklarına (ırk-5,4 ve 1) aktarılmıştır ve ırk-5,4 ve 1'in avirülenslik özelliklerinde artış gözlenmiştir.

Swanson ve çalışma arkadaşları (1988), biber bitkilerinde bakteriyel lekelenmeye yol açan *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* etmeni üzerinde yaptıkları çalışmalar patojenin avrBr1 avirülenslik geninin Bs1 dayanıklılık geni taşıyan biber bitkilerindeki ırka özgü dayanıklılıktan sorumlu olduğunu göstermiştir.

P. s. pv. *tomato*'nun avrPto avirülenslik geni ürünü ile domateslerde *pto* dayanıklılık geni ürünü (bir serin\threonine protein kinaz) interaksiyonunda domates bitkisinde etmenin yol açtığı bakteriyel lekelenmeye karşı dayanıklılığı belirlenmektedir (Zhou ve ark., 1995). İnteraksiyon üzerine yapılan çalışmalar moleküler bitki patolojisi açısından iki önemli sonuç ortaya koymuştur. Bunlardan birincisi gene karşı gen teorisindeki avr ve R genleri arasındaki interaksiyon sonucu dayanıklılığın tetiklenmesi tahmini doğrulanmıştır. İkinci olarak, gram negatif bakteriyel patojenlerde olduğu gibi proteinlerini direk olarak hücre içerisine salgıladıkları bir sisteme (Tip III salgılama sistemi) sahip oldukları tespit edilmiştir (Chang ve ark., 2002; Kim ve ark., 2002).

Klasik gene-karşı-gen ilişkilerine uyan ilk klonlanmış gen domates bitkisinin *pto* genidir (Martin ve ark., 1993). *Pto* geni *P. s.* pv. *tomato* (Pst; bakterinin ırkı avrPto genini taşımakta)'ya karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Bu genin klonlanması için, genetik haritalama tekniği kullanılmış ve önce RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) probları ile *pto* geninin 5 nolu kromozom üzerindeki yeri tespit edilmiştir. Daha sonra, bu genin olduğu yerdeki suni kromozomlar (YAC-Yeast Artificial Chromosome) belirlenerek, bu bölgedeki cDNA genleri izole edilmiştir. Takip eden çalışmalarla, *pto* genine denk gelen cDNA klonu saptanarak bu gen hakkında bilgi edinilmiştir. *pto* geni, serine-thronine protein kinase enzimini kodlamakta ve sinyal iletişiminde rol aldığı ileri sürülmektedir. Aynı gen hassas domates çeşitlerine transform edildiğinde, avrPto genini taşıyan bakteri ırklarına karsı da dayanıklılık sağlamaktadır (Martin ve ark., 1993; Pedley ve Martin 2003).

Pto geni domateste 5. kromozomun 60 kb bölgesinde kümelenmiş gen ailesinin küçük bir birimidir. *Pto* geni 1990 ların başında sıralı klonlanmış ilk R genlerinden biridir (Martin ve ark., 1993).

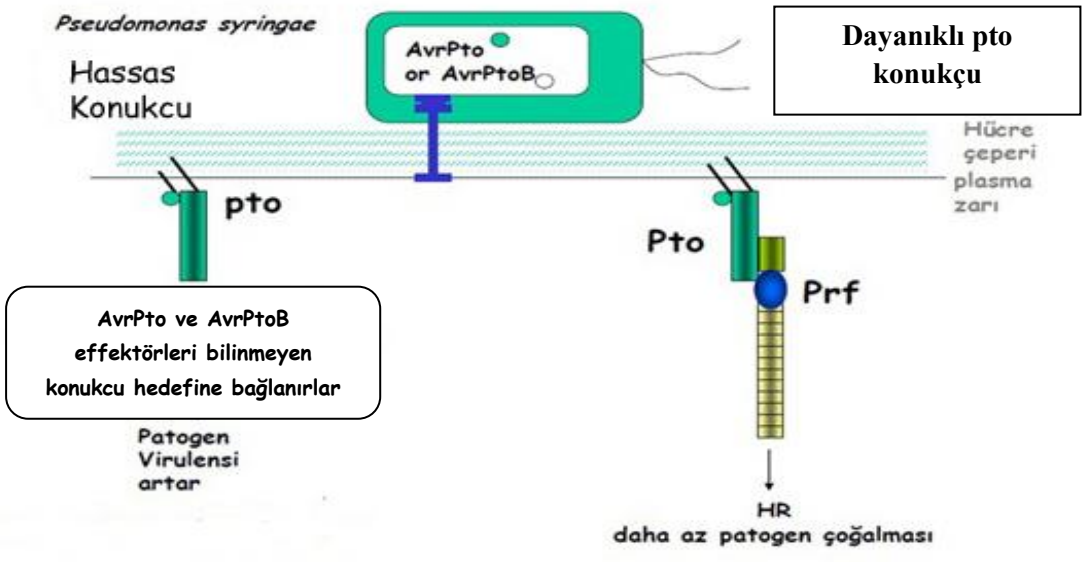
Pto ürünü Avrpto'nun ürününü algılamasından sonra diğer bir serine\threonine kinaz olan PtiI'in fosforilasyonuna neden olmuştur. Bu durum hipersensitif reaksiyonun tetiklemesine neden olmaktadır (Mudgett ve ark., 1992; Mudgett ve Staskawicz, 1998).

Pto geni içeren bitkiler *P. s. tomato* (AvrPto) ile enfekte olduklarında enfeksiyon yerinde hızlı lokalize bir şekilde doku çökmesi ile kendini gösteren tipik bir bağışıklık reaksiyonu (HR) geliştirir (Martin, 1993).

Patojene direnç geni olarak bilinen *pto*'nun, domatesin kültür ve yabani türlerinde bulunduğu yapılan çalışmalarla sonradan ortaya çıkmıştır. AvrPto; *P. s.* pv. *tomato*'da mevcut olup, Tip III sekresyon sistemi ile bitki hücresi içine teslim olan küçük bir hidrofilik proteindir (Collmer ve ark., 2000). *Pto* ve *AvrPto* proteinleri iki hibrid sistemden oluşmuştur. Her proteinin belirli bir aminoasitle etkileşiminde, proteinlerin birbirlerini tanıması açısından gerekli olan direnç sistemini etkin duruma getirmektedirler. İki proteinin fiziksel etkileşimi 2 hibrit maya sistemi ile gerçekleştirilmektedir (Scofield ve ark., 1996; Tang ve ark., 1996).

Pto geni, *P. s.* pv. *tomato*'ya duyarlı domates yapraklarında hastalığın ilerlemesini 1000 kata kadar engellemiştir. *Pto*; direnç ile ilişkili savunma yanıtlarında reaktif oksijen türlerini, HR ve indüksiyon PR genlerini içermektedir (Gu, 1998).

Bakteride mevcut, avirülens protein olan AvrPto aşırı duyarlılık (HR) reaksiyonuna cevap vermek için ligand olarak görev yapmaktadır. Ana direnç geni olan *pto* tarafından kodlanan protein domates bitkisinde AvrPto'yu tanınmak için kodlanmıştır. AvrPto-Pto etkileşimi en geniş çalışılan sistemdir (Jones ve Dangl, 2006). Bu durum Şekil 1'de görülmektedir**.**



Şekil 1. Domates bitkisindeki *pto* ve *P. s.* pv. *tomato*'daki AvrPto genleri arasındaki etkileşim (Jones ve Dangl, 2006)

Bazı bakteriyel patojenler için ikinci bir strateji kullanılmaktadır. R genlerini tanımlamak için, klonlanmış avr genler, virulent ırkların izojenik avirulent ırklara çevrilmesi için kullanılır. Bu yöntemin avantajı ise, sadece tek bir avr geninden dolayı

farklılık gösteren bir virulent ve bir de avirulent ırk elde etmiş olmaktır. Bu gibi ırkların gen-için-gen dayanıklılığında kullanılması, inokulasyon sonucunda konukçu bitkide görülen değişikliğin sadece tek bir R gen-avr gen ilişkisinden dolayı kaynaklandığını ve avr genlerinin varlığı veya yokluğu dışında, patojen ırklarında başka bir farklılıklardan dolayı kaynaklanmadığı garanti edilmiş olunmaktadır. Farklı bitki türlerinden elde edilen birçok *P. syringae* koleksiyonu *Arabidopsis thaliana* üzerinde denenmiş, birkaç virulent ve avirulent ırklar tespit edilmiştir (Debener ve ark., 1991).

Virulent ve avirulent izojenik çiftin varlığı ile avr genlerine karşılık gelen R genlerinin saptanması için iki strateji kullanılır. Birincisi bitkilerin farklı ekotiplerinde test edilerek karşılaştırılmanın, yukarıda değinildiği gibi yapılması, ikincisi ise mutajenik yaklaşımdır. İkinci stratejinin ana fikri şudur: Eğer tek bir avr genine karşılık konukçu bitkide tek bir dayanıklılık geni mevcutsa, konukçu bitkideki bu genin mutasyona uğratılması sonucu dayanıklılığın kırılacağı, yani yok olacağı düşüncesine dayanır. Bu şekilde birçok fungal ve bakteriyel patojenlere karşı dayanıklılık genleri izole edilmiştir (Holub ve ark., 1994).

Genetik haritalama yöntemi kullanılarak klonlanan bir başka gen ise *Arabidopsis thaliana*'nın RPS2 genidir. Bu gen bakteriyel patojenlerden, avrRpt2'yi taşıyan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *P. s.* pv *maculicola*'ya karsı dayanıklılık sağlamaktadır Bu genin ürünü, sinyal iletişiminde rol almakta, nükleotik trifosfat bağlanmasında ve protein-protein ilişkilerinde görev yapmaktadır. Ayrıca, avirulent patojen tarafından üretilen avr gen ürününü tanımada reseptör görevini yüklenmektedir. (Debener ve ark., 1991; Bent ve ark., 1994; Mindrinos ve ark., 1994).

Klonlanan bir başka Arabidopsis geni ise, RPMl genidir. Bu gen de tıpkı RPS2 gibi gene karşı- gen sistemine uymakta ve haritalama yöntemi ile klonlanmıştır. Yine aynı şekilde, *Pseudomonas syringae*'nin iki farklı avr genini (avrRpml ve avrB) tanımakta ve bu avr genlerini taşıyan bakterilere karsı dayanıklılık sağlamaktadır (Grant ve ark., 1995).

Hastalıkların kontrolünde kimyasal ilaçların kullanımı en kolay ve en etkili yol gibi görünmekle birlikte, kalıcı etkilerinin insan ve çevre sağlığı yönünden doğurduğu tehlike göz önünde tutulursa hastalıklara karşı dayanıklı çeşit kullanımının önemi kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda ıslahçıların hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık ıslahındaki başarısı sayesinde kimyasal ilaç kullanımı azalmaya başlamış, bu durum insan ve çevre sağlığı açısından olumlu sonuçlar doğururken, ekonomiye de

büyük katkıda bulunulmuştur (Ballvora ve ark., 1995; Bradshaw ve ark., 1998; Lu ve ark., 1999).

Hastalıklara dayanıklılık ıslahı çalışmalarında öncelikle dayanıklılık kaynağının bulunması ve ardından da kalıtımının açıklığa kavuşturulması gereklidir. Dayanıklılığın kalıtımı güçlü bir dominant gene dayanıyorsa, gerek açık tozlanan gerekse hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde başarı ile kullanılabilmektedir. Kompleks kalıtsal yapıya sahip dayanıklılık özelliklerinin ıslah proğramlarında kullanımı ise hem zorlaşmakta, hem de özel bazı yöntemler ve teknikler gerektirebilmektedir. Islah programı hazırlanmadan önce bitki ve patojenin hastalıkla ilgili karşılıklı ilişkilerinin ve dayanıklılığın kalıtımının incelenmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesi gereklidir, Dayanıklılık stratejilerini anlayıp kavradıktan sonra ise ıslah yoluyla dayanıklı bitkiler elde edilmeye başlanmıştır. Ancak ıslah yöntemleri zaman alıcı olduğu için artık gen transferi metotları üzerinde çalışılmaktadır (Ballvora ve ark., 1995; Bradshaw ve ark., 1998; Lu ve ark., 1999).

Dayanıklı çeşitlerin kullanımı, bitki hastalıklarıyla mücadelede oldukça önemli bir konudur. Dayanıklı çeşitler, günümüzde birçok bitki hastalıklarına karşı kullanılmakta ve başarı sağlamaktadır. Mevcut dayanıklı çeşitlerin kullanımının yanında ıslah ve gen transferi yoluyla elde edilen dayanıklı çeşitlerin kullanımı günümüzde yaygınlaşmıştır. Bilim adamları genetik mühendisliği tekniklerine kadar gelişen dayanıklı çeşit elde etme çabalarına ilk olarak bitkilerde patojenlere karsı bulunan dayanıklılık mekanizmalarını anlamak ve incelemek suretiyle başlamışlardır. Bu bağlamda patojenlere karsı bitkilerde hangi mekanizmaların etkili olduğunu ve moleküler olarak dayanıklılığın nasıl gerçekleştiğini anlamak oldukça anlamlıdır.

Bitkiden DNA izolasyon yöntemlerinde Johnstone ve Thompson (1991), MiniPrep DNA izolasyon yöntemini, Dellaporta ve ark., (1983), Do ve ark., (1991), Pich. ve ark., (1993), Rogers ve Bendich, (1994), Aka-Kaçar, (2001), Saghai- Maroof ve ark., (2001), 2XCTAB yöntemini modifiye ederek bitkiden DNA izolasyonu işlemini başarılı bir şekilde kullanmışlardır.

Rose ve ark., (2006) SSP17 (Pto, Pth3, Pth5) ve JCP32 (Pto, Pth3, Pth5), JCP5 (Pto), JCP6 (Pto), 3EcoPto (Pto, Pth3, Pth5), Q31 (Pto, Pth3, Pth5), Q34 (Pto, Pth3, Pth5), InterRe (Pto ve Pth2), InterRev2 (Pto ve Pth2), InterFor3 (Pto ve Pth2) primerlerini kullanarak *Pto* genini farklı domates çeşitlerinde tespit etmişlerdir.

Pilowsky ve Zutra (1982), Rose ve ark., (2006)'nın domates çeşitlerinde pto genini araştırdığı çalışmalarda *L. pennellii, L. parviflorum, L. hirsutum, L. chmielewskii, L. pimpinellifolium, L. chilense,* ve *L. peruvianum*'da *pto* genine rastlanılmıştır.

Son yıllardaki çalışmalarla patojenlerin avr genleri ve bitkilerin R genlerinin moleküler klonlaması süratle devam etmektedir. Bu güne kadar klonlanan genlerden elde edilen bilgiler, avr genlerinin ürünlerinin suni olarak üretilebileceğini ve bitkiler üzerine püskürtüldüğünde, savunma sistemini çalıştırabileceğini göstermektedir. Bu yolla da klasik pestisitlere alternatif bulunarak, bitkilerin genetik manipülasyonuna gerek kalmadan patojenlere karşı korunması sağlanabilecektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmamızın ana materyalini oluşturan 50 adet farklı domates çeşidi tohum ya da fideler Konya ve Antalya firmalarından temin edilmiştir. Denemelerde kullanılan farklı domates çeşitleri ve bazı fenotipik özellikleri Çizelge 2'te verilmiştir.

Çizelge 2. Denemede Kullanılan Domates Çeşitlerine Ait Özellikler

	ÇEŞİT ADI	MEYVE ÖZELLİKLERİ	BİTKİ YAPISI	YETİŞTİRİLME ORTAMI (SERA-TARLA)
1	**Kutlu**	Yuvarlak	Oturak	Tarla
2	**Gülhan**	Yuvarlak	Oturak	Tarla
3	**Aynaz**	Yuvarlak	Sırık	Tarla
4	**Erdem**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
5	**Mete**	Hafif basık, yuvarlak	Sırık	Sera
6	**TY13**	Hafif basık, yuvarlak	Sırık	Sera
7	**TY10**	Hafif basık, yuvarlak	Sırık	Sera
8	**T3**	Hafif basık, yuvarlak	Sırık	Sera
9	**TY9**	Beef	Sırık	Sera
10	**T6**	Hafif basık, yuvarlak	Sırık	Sera
11	**OD1106**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
12	**OD1112**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
13	**OD1105**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
14	**OD1111**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
15	**OD-1101**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
16	**OD-1102**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
17	**OD-1103**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
18	**OD-1104**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
19	**OD-1107**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
20	**OD-1108**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
21	**OD-1109**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
22	**OD-1110**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
23	**OD-1113**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
24	**H-2274**	Çok hafif uzun, yuvarlak	Oturak	Tarla
25	**Diamond**	Yuvarlak	Sırık	Tarla- sera
26	**M-16**	Yuvarlak	Sırık	Sera
27	**Rio grande**	Yuvarlak	Oturak	Tarla
28	**Tueza**	Yuvarlak	Sırık	Sera
29	**Falkon**	Yuvarlak	Oturak	Tarla-sera
30	**Konya**	Yuvarlak	Oturak	Tarla
31	**Kardelen**	Yuvarlak	Sırık	Tarla
32	**Marmara**	Hafif basık	Oturak	Tarla
33	**Oturak**	Yuvarlak	Oturak	Tarla
34	**Ebia**	Yuvarlak	Oturak	Tarla
35	**Hamlet**	Yuvarlak	Sırık	Sera
36	**Reyhan**	Yuvarlak	Sırık	Sera
37	**Çiğdem**	Yuvarlak	Sırık	Sera
38	**Verdi**	Yuvarlak	Sırık	Sera
39	**Natura sırık**	Hafif basık, yuvarlak	Sırık	Tarla
40	**Otranta**	Hafif basık, yuvarlak	Oturak	Tarla
41	**Süper standart**	Yuvarlak	Oturak	Tarla
42	**Gözde**	Yuvarlak	Oturak	Tarla
43	**144**	Yuvarlak	Sırık	Tarla
44	**İmpala**	Hafif basık, yuvarlak	Sırık	Tarla
45	**T-7**	Beef	Sırık	Sera
46	**Şimşek**	Hafif basık, yuvarlak	Sırık	Sera

Çizelge 2. Denemede Kullanılan Domates Çeşitlerine Ait Özellikler **(Devamı)**

47	**T-2**	Beef	Sırık	Sera
48	**Gümrük**	Yuvarlak	Sırık	Sera
49	**Kokpit**	Yuvarlak	Sırık	Sera
50	**4 F**	Beef	Sırık	Sera

3.1.2. Bitkilerin Yetiştirilme Koşulları

P. s. pv. *tomato*'ya karşı dayanıklılık testi denemelerinde kullanılan domates çeşitlerinden fide olarak temin edilemeyenler tohumdan yetiştirilmiştir. Tohumlar 3-4 saat ıslatıldıktan sonra içerisinde torf bulunan viyollere 1-2 cm derinlikte olacak şekilde ekilmişlerdir. Tohumların çimlenmesi için en uygun sıcaklık (12-15 ºC) sağlandıktan sonra tohumlar 5-13 gün içinde çimlenmiştir. Domates fideleri kotiledon yapraklarının tam gelişmelerini tamamladıkları, yere paralel ve boyları 10 cm olduğu dönemde saksılara şaşırtılmışlardır. Şaşırtma büyüklüğüne gelen domates çeşitleri 3 lt toprak karışımı (yanmış hayvan gübresi, kum, toprak karışımında 1:1:1) içeren saksılarda 3 haftalık oluncaya kadar, iklim odası şartlarında (16 saat aydınlık 8 saat karanlık) 25 ^{0}C %60-70 nemde büyütülmüşlerdir (Şekil 2). Fide olarak firmalardan alınan domates bitkileri, 3 lt'lik içerisinde toprak karışımı (yanmış hayvan gübresi, kum, toprak karışımında 1:1:1) bulunan saksılara dikilmişlerdir. Deneme süresince her saksıdaki bitkilere 5 g $CaNO_3$ ve 3 g Fe gübreleri uygulanmıştır (Günay, 2005).



Şekil 2. Denemede Kullanılan Domates Bitkileri

3.1.3. Referans *P. s.* pv. *tomato* izolatları

Denemelerde kullanmak üzere *P. s.* pv. *tomato* izolatları Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Prof. Dr. Yeşim AYSAN'dan (YA-1 ve YA-2 izolatları), Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN'dan (PST-2 izolatı) ve Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Doç. Dr. Recep KOTAN'dan (RK-351 izolatı) temin edilmiştir. Norelli ve ark., (1988)'e göre yapılan patojenisite testi sonucunda en yüksek virülenslik gösteren 2 izolat (YA-1 ve YA-2) denemelerde kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar, alet ve ekipmanlar

Denemede kullanılan kimyasallar; etil alkol, sodyum hipoklorid, Nutrient Agar (NA) ve King B (KB) besiyerleri, NaCl, EDTA (etilendiamin tetra asetik asitmagnezyum bromid, 100 gr Merck 108409) Tris HCl, CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), 2- mercaptoethanol, kloroform, izopropil alkol, proteose pepton, K_2HPO_4, KH_2PO_4, agar-agar, glycerol, RNAase enzimi, isoamyl alkol kullanılmıştır.

Hastalıklı bitkilerden patojen mikroorganizmaların izolasyonu ve tanılanmaları için laboratuar malzemeleri; petri kabı, beher, erlenmayer, drigalski spatula, cam tüp, pipet, piset, öze, çalışma esnasında ise santrifüj, otoklav, inkübatör, termal cycler (Eppendorf master cycler personal), elektroforez sistemi (Labnet E 0350), jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, E-box VX2/20 mx), ısıtıcılı çalkalayıcı, otomatik pipetler, magnetik karıştırıcı, pH metre, laminar kabin, derin dondurucu, hassas terazi, buzdolabı, saf su cihazı, mikrodalga fırın, buz makinesi, spektrofotometre, homojenizatör, mezür kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Sağlıklı domates bitkilerinden DNA izolasyonu

Moleküler tekniklerin uygulanabilmesi, uygun miktar ve kalitede DNA'ın izole edilmesiyle mümkün olmaktadır. Ancak yüksek polisakkarit içeriğine sahip bitki türlerinde kaliteli DNA elde edilmesi oldukça zordur. Bitki yapraklarında bulunan müsilaj maddeleri (polisakkaritler), DNA izolasyonu anında DNA sarmalına yapışarak, DNA ile birlikte çökmekte ve DNA'nın çözünmesini tamamen engellemektedir

(Kaufman ve ark., 1999). DNA çözünse dahi, polisakkaritlerin enzim aktivitesini durdurmaları nedeniyle, sonraki aşamalarda, DNA'ların enzimlerce işlenmesi engellenmektedir. DNA'nın polisakkaritlerle birlikte çökmesinin engellenmesinde kullanılan en yaygın metot, DNA hazırlığı aşamasında CTAB kullanılmasıdır. CTAB, özellikle nükleik asitlerin seçici çökelmesini sağlamaktadır. Denemelerde kullanılan 50 farklı çeşitteki sağlıklı domates bitkilerinde *pto* geninin aranması amacıyla, DNA izolasyonu CTAB yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Doyle ve Doyle, 1987). Aşağıda CTAB yönteminin yapım aşamaları verilmiştir.

- Bitkiden alınan parçalar terazide tartılmıştır (1 g yaprak).
- Steril havanların içine bir miktar sıvı azot dökülerek ve havanın soğuması için çok az bekletilmiştir.
- Havandaki azotun içinde bitki parçaları havaneliyle ezilerek toz haline getirilmiştir.
- Bu toz zaman geçirmeden 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine 1.25 ml kadar alınmıştır.
- Tüplere 750 µl , %1 v\v, CTAB+mercaptoethanol çözeltisi eklenmiştir (25ml CTAB'a, 250 µl 2-mercaptoethanol ilave edilerek hazırlanmıştır.).
- Tüplerin ağzı parafin ile sarıldıktan sonra 65°C bekleyen su banyosunda 30 dk bekletilmiştir.
- Parafin çıkarılarak tüplere 750 µl chloroform-izoamylalcohol (24:1) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe çalkalanmıştır.
- Tüpler 25°C' de 5 dk 7000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Tüplerin üzerindeki şeffaf sıvı kısım (400-600 µl) 1.5 ml'lik yeni tüplere aktarılmıştır.
- Şeffaf kısmı alınan ilk tüplerin üzerine 300 µl CTAB+mercaptoethanol çözeltisi eklenmiştir.
- Bu tüpler 15000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Şeffaf sıvı kısımdan 200-400 µl daha alınarak yeni tüplerin üzerine ilave edilmiştir.
- Yeni tüplere 0.6 v izopropil alkol (oda sıcaklığında bekletilmiş) eklenmiştir (Toplam 600 µl şeffaf sıvı için 360 µl izopropil alkol eklenmiştir).
- Tüpler hafifçe çalkalanmış, pellet oluşumu gözlenmiştir.
- Tüpler 25°C' de, 15000 rpm'de 3-5 dk santrifüj edilmiştir.
- Tüplerin içindeki izopropil alkol, dipte oluşan pelleti düşürmeden dökülmüştür.

- Peletin üzerine 1 ml %70'lik Et-OH (soğuk olmalı) ilave edilmiştir.
- Tüpler 25°C' de 5 dk 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Tüplerdeki etanol, pellet düşürmeden dökülmüş ve kurumaya bırakılmıştır.
- Etanol kuruyunca tüplere 100-400 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH: 7.4) çözeltisi ilave edilmiş ve elde edilen DNA +4°C'de saklanmıştır.

Bitkiden DNA izolasyonunda kullanılan CTAB ekstraksiyon buffer (100 ml) çözeltisinin stok konsantrasyon içerikleri aşağıda verilmiştir.

NaCl	28 ml 5 M
EDTA (pH=8) 4 ml	0.5 M (pH=8) 20 mM
Tris HCl (pH=8) 10 ml	1 M (pH=8) 20 mM
CTAB	2 gr % 2
2- Mercaptoethanol	2 ml % 2

3.2.2. Domates bitkisine *P. s.* pv. *tomato*'nun inokulasyonu

Stok kültürlerden NA'ya transfer edilmiş 48–72 saatlik YA-1 ve YA-2 (*P. s.* pv. *tomato*) izolatları steril destile su ile 10^8 hücre\ml yoğunluğundaki bakteri süspansiyonları, 8 haftalık domates bitkilerine küçük basınçlı el pülverizatörü ile püskürtülerek inoküle edilmiştir. Bitkiler etiketlenerek 24 saat içleri nemlendirilmiş polietilen poşetlerle kapatılmıştır. Bitkiler 25^0C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odasında 25 gün bekletilmişlerdir (Chambers ve Merriman, 1975). Negatif kontrol olarak ise steril saf su bitkilere püskürtülmüştür. Simptom gelişimi gözlenen yapraklardan reizolasyon ve bakteri tanısı yapılmıştır (Gu ve ark., 2000).

3.2.3. Domates bitkisinden *P. s.* pv. *tomato*'nun re-izolasyonu ve tanılanması

Bakterinin bitkiden re-izolasyonunda, hastalıklı bitki yaprağı örnekleri akan musluk suyuyla yıkandıktan sonra, fungal patojenler ve bazı saprofitik mikroorganizmalarla bulaşık olabileceği düşünülen örneklere %0,5 NaOCl'de 2 dk yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Hastalıklı yapraklar fosfat buffer saline içerisinde ezilerek elde edilen süspansiyon nutrient agara (NA besiyeri; beef extrakt 1 g, yeast ektrakt 2 g, bakteriyolojik pepton 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g\L saf su pH=7,2) drigalski spatula ile yayılmıştır (Schaad, 2001). 24-48 saatlik inkübasyondan sonra krem renkli

kolonilerden seçilerek, KB besiyerine (proteose peptone 20 g, $K_2HPO_4.3H_2O$ 1,5 g, $MgSO_4.7H_2O$ 1,5 g, agar 15 g, glyserol 10 g\L saf su pH=7.2) çizgi ekim yapılarak, gelişen bakterilerin UV lamba altında fluoresan özelliği incelenmiş ve bunu takiben tanılama testleri yapılmıştır (King ve ark., 1954).

Etmenin tanılanmasında morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik olarak levan oluşumu, oksidaz reaksiyonu (Kovacs, 1956), arginine dihiydrolase testi (Thornley, 1960), oksidaz, nişastanın hidrolizi, karbon kaynaklarının kullanımı, King B besi yerinde gelişim, arbutin hidrolizi, jelatin hidrolizi, nitrat indirgenmesi, arginine dehidrolaz aktivitesi, erytritol, D- tartrate, D-lactate, D-glucosidase, floresan özelliği, tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu (Klement, 1963; Lelliott ve Stead, 1987; Mohan ve ark., 1987; Klement ve ark., 1990) testleri aynı koşullarda her bir test için 3 kez tekrarlanarak yapılmıştır.

P. s. pv. *tomato*'nun re-izolasyonunda bakterinin teşhisi için yapılan biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik testlerin yanısıra PCR ile tanılama yapılmış bu amaçla

PST1 (GGCGCTCCCTCGCACTT),

PST2 (GGTATTGGCGGGGGTGC) spesifik primerleri kullanılmıştır (Bereswill ve ark., 1997).

PCR karışımı 0,2 ml ependorf tüplerde hazırlanmıştır. Karışımın içeriği aşağıda verilmiştir;

• Bakteri DNA	2,0 µl
• PCR Master Mix*	12,5 µl
• Forward primer	2,0 µl
• Revers primer	2,0 µl
• Steril saf su	6,5 µl
Toplam hacim	25 µl

*PCR Master Mix (0.05 ünite/ µl *Taq* DNA, 4 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP).

P. s. pv. *tomato*'nun termal cycler (Eppendorf master cycler personal) da programlanan PCR protokolü:

90 ^{0}C'de 2 dk inkübasyon

93 ^{0}C'de 2 dk denatürasyon
93 0C'de 2 dk primer bağlanması
67 ^{0}C'de 1 dk amplikan sentezi
} 37 döngü

72^{0}C'de 2 dk inkübasyon (1 döngü)

4 ^{0}C ∞+ ile tamamlanmıştır (Bereswill ve ark., 1997).

3.2.4. Domates çeşitlerinde *Pto* geninin varlığının PCR ile belirlenmesi

Sağlıklı domates bitkilerinden izole edilen DNA'lardan 963 bp'lik *pto* geninin amplifikasyonu için spesifik

SSP17 (GGTCACCATGGGAAGCAAGTATTC)

JCP32 (GGCTCTAGATTAAATAACAGACTCTTGGAG)

primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır (Rose ve ark., 2006).

PCR karışımı 0,2 ml ependorf tüplerde 25 µl olarak hazırlanmıştır. Karışımın içeriği aşağıda verilmiştir;

• Bitki DNA	2,0 µl
• PCR Master Mix*	12,5 µl
• Forward primer	2,0 µl
• Revers primer	2,0 µl
• Steril saf su	6,5 µl
Toplam hacim	25 µl

*PCR Master Mix (0.05 ünite/ µl *Taq* DNA, 4 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP)

Termal cycler'da programlanan PCR protokolü:

90 ^{0}C'de 2 dk inkübasyon (1 döngü)

93 ^{0}C'de 30 sn denatürasyon,
53 ^{0}C'de 45 sn primer bağlanması
68 ^{0}C'de 1 dk amplikan sentezi
} 35 döngü

70 ^{0}C'de 10 dk inkübasyon (1 döngü)

4 ^{0}C ∞+ ile tamamlanmıştır (Maes ve ark., 1994).

PCR ürünleri % 1’ lik agaroz jelde (100 ml 1X TBE buffer solüsyonu, 1 gr agaroz (SeaKem)) yaklaşık 50°C’ye kadar soğutulduktan sonra taraklar yerleştirilmiş agaroz jel tankına dökülmüştür. Agaroz jel donduktan sonra içinde 1X TBE buffer bulunan elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra tarak jelden dikkatlice çıkarılmış ve oluşan çukurlara 2 µl (yükleme boyası) loading dye ve 8 µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımıyla karıştırılarak çukurlara yüklenilmiştir. PCR ürünleri 75 volt elektrik verilerek yaklaşık 2 saat yürütülmüştür. Oluşan bantların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla 1 kb’lik moleküler işaretleyici (marker, Fermantas 1 kb Plus DNA Ladder SM 1153) kullanılmıştır. Bantların UV ışık altında görülebilmesi için etidyum bromür ile (0.5 mg etidyum bromür/L steril saf su) 10 dakika bekletilerek boyanmış ve jel steril saf su ile çalkalanmıştır. Etidyum bromür ile boyanan jeller üzerindeki bantlar transiliminatörde oluşan bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Sambrook, 2001).

3.2.5. Domates bitkilerinin yapraklarında *P. s.* pv. *tomato* yaprak lekelerinin belirlenmesi

İnokulasyondan sonra 21. günde bitkilerin yapraklarındaki tipik *P. s.* pv. *tomato* lekeleri sayılarak kaydedilmiştir. Testlemeler her çeşit için 3’er tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Domates bitkilerindeki yaprak lekeleri Chambers ve Merriman (1975) skalası araştırmamız için modifiye edilerek değerlendirilmiştir. Buna göre;

0= lezyon yok → Dayanıklı

1= 1-10 lezyon → Orta dayanıklı

2= 11-20 lezyon → Orta hassas

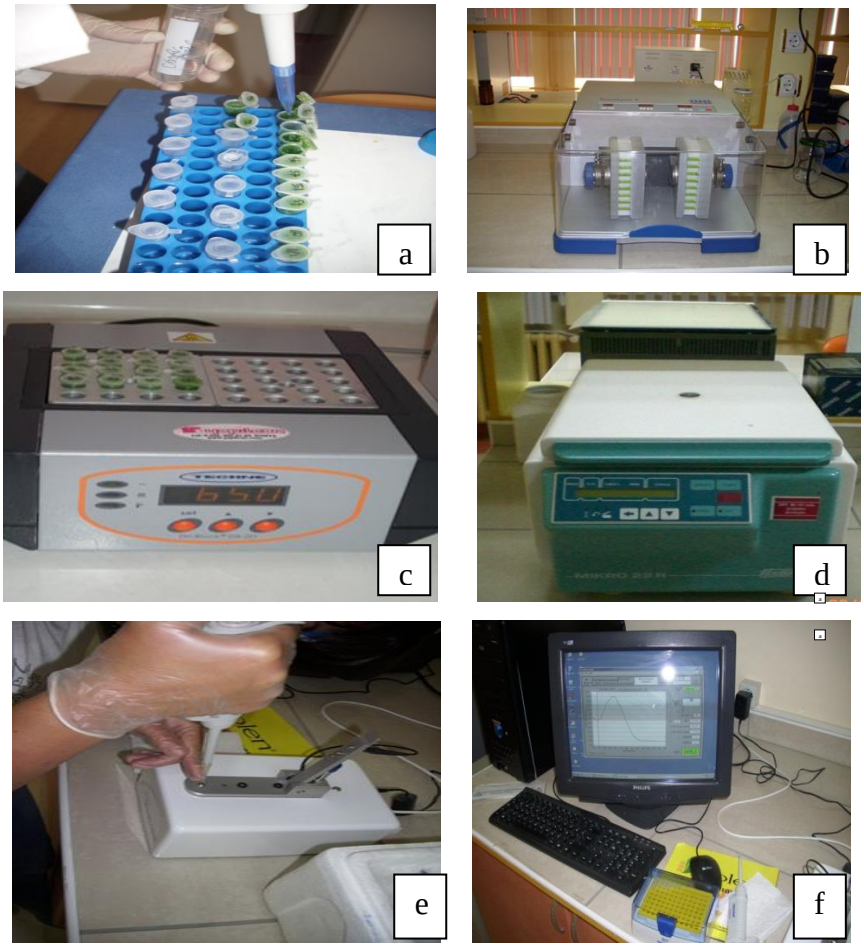
3= 21-40 lezyon → Hassas

4= 40 ve daha fazlası → Çok hassas

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sağlıklı Domates Bitkisinden DNA İzolasyonları

Denemeye alınan 50 farklı çeşit domates bitkisinden CTAB yöntemi kullanılarak bitkilerin DNA'ları izole edilmiştir. Yöntem başarılı bir şekilde uygulanmış tüm bitkilerden elde edilen DNA'lar araştırmamızda başarılı bir şekilde kullanılabilmiştir (Şekil 3). CTAB yöntemini kullanan Doyle ve Doyle (1987), Simpson ve ark., (1992), Stewart ve Via, (1993), De La Cruzet ve ark., (1997), Barnwell ve ark., (1998), Jan ve ark., (1999), Huang ve ark., (2000), Echevarría-Machado ve ark., (2005) Rose ve ark., (2006), Cota-Sánchez ve ark., (2006) aynı yöntemi kullanarak başarılı DNA izolasyonları yaptıklarını ifade etmişlerdir.



Şekil 3. Domates Bitkisinden DNA İzolasyonunun Yapım Aşamaları

a) Ependorf tüplerin içinde bulunan yaprakların üzerine CTAB+Mercaptoethanol çözeltisinin eklenmesi, b) Ependorf tüpte bulunan yaprakların çözelti eklendikten sonra homojenizatörde parçalanması, c) Homojenizatörden çıkan tüplerin blok ısıtıcıda 65 ^{0}C'de 30 dk bekletilmesi, d) Tüplere chloroform-ısoamylalcohol ilave edildikten sonra santrifüj edilmesi, e) İzole edilen DNA'nın TE çözeltisi eklendikten sonra yoğunluklarının nanodropta ölçülmesi, f) Nanodropta ölçülen DNA'ın yoğunluk görüntüsünün alınması.

4.2. Domates Bitkilerine *P. s.* pv. *tomato*'nun İnokulasyonu

Sekiz haftalık domates bitkilerine püskürtme yöntemiyle *P. s.* pv. *tomato* inokule edilmiş (Şekil 4), bu yöntemle Elliot (1951), Çınar (1977)'da elde ettiği gibi çalışmamızda da tipik yaprak lekeleri tespit edilmiştir (Şekil 5). Yöntemin başarısı, bizim çalışmamızda ve diğer araştırıcıların elde ettiği tipik hastalık simptomları oluşturmasıyla da desteklenmiştir.



Şekil 4. Domates Bitkilerine *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun Püskürtme Yöntemi ile İnokulasyonu



Şekil 5. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun İnokulasyonundan 7 gün Sonra Oluşan Tipik Yaprak Lekeleri

4.3. *P. s.* pv. *tomato*'nun Re-izolasyonu ve Tanılanması

P. s. pv. *tomato*'nun inokulasyonu ile oluşan simptomların etmen tarafından oluşturulup oluşturulmadığının desteklenmesi ve Koah postulatlarının uygulanması amacıyla etmenin re-izolasyon ve biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik ve moleküler tanılama testleri yapılmıştır (Çizelge 5). Yöntem Breed ve ark., (1957), Fahy ve Lıody, (1983), Bereswill ve ark., (1997)'e göre yapılmış domates bitkilerinin bu etmenden dolayı hastalandığı belirlenmiştir.

Çizelge 5. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun Re-izolasyonu Sonucu Domates Bitkisinden Elde Edilen Bakteriler İçin Yapılan Testler ve Elde Edilen Bulgular

Testler	**Re-İzolasyon**	***P. s.* pv. *tomato* (Referans kültür YA-1)**	***P. s.* pv. *syringae***
KB'de Fluorescens	+	+	+
Gram reaksiyon	-	-	-
Oksidatif-fermantatif metabolizması	O	O	O
Levan oluşumu	+	+	+
Oksidaz aktivitesi	-	-	-
Patates testi	-	-	-
Arjinin dehidrolase	-	-	-
Nişasta hidrolizi	-	-	Nt
Jelatin	+	+	+
Esculin	+	+	+
Mannitol	+	+	+
İnositol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Erytritol	-	-	+
L-lactate	-	-	+
Ice nucletion	-	-	+
PCR	+	+	-

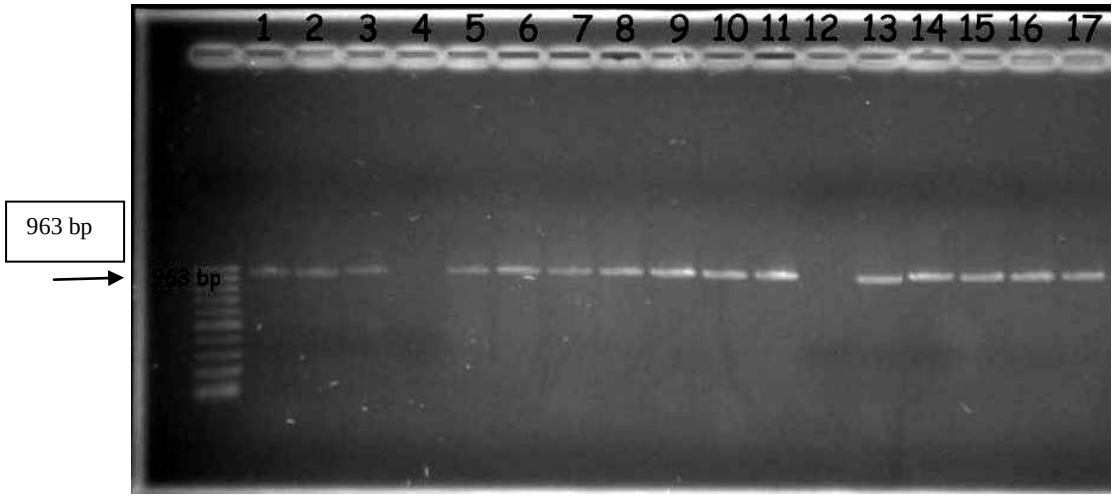
Nt: Test yapılmamış O: Oksidatif reaksiyon, +:Pozitif reaksiyon -: Negatif reaksiyon

4.4. Domates Çeşitlerinde *Pto* Geninin Varlığının Belirlenmesi

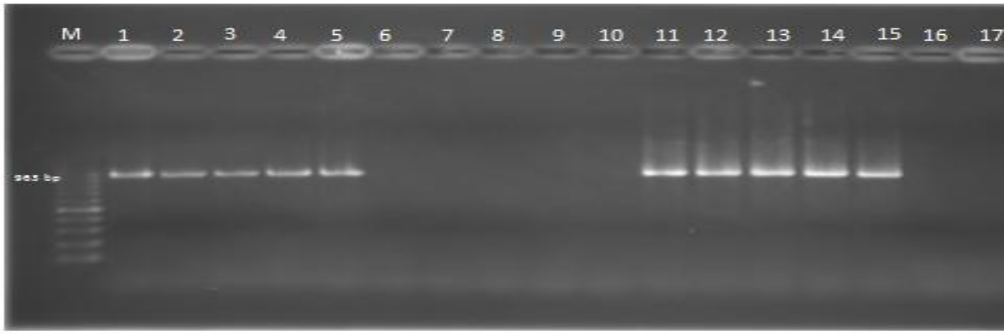
Elli adet domates çeşidinde yapılan DNA izolasyonu ile *pto* geninin varlığının tespiti, 963 bp'lik fragmenti amplifiye eden SSP17 ve JCP32 spesifik primerleri kullanılarak belirlenmiştir. Simpson ve ark., (1992), Rose ve ark., (2006) da aynı CTAB yöntemini ve SSP17 ve JCP32 primerlerini kullanarak *pto* geninin varlığını belirlemişlerdir. Denemeye alınan 50 farklı domates çeşidinde *pto* geninin varlığı Çizelge 6 ve Şekil 6, 7'de verilmiştir.

Çizelge 6. Farklı Domates Çeşitlerinde PCR Sonucu Gen Varlığının Araştırılması

ÇEŞİT	*Pto* GENİ		ÇEŞİT	*Pto* GENİ
GÜLHAN	**VAR**		VERDİ	YOK
OD-3	YOK		**NATURA SIRIK**	**VAR**
M-16	YOK		MARMARA	YOK
OD-4	YOK		T-13	YOK
OD-5	**VAR**		**EBİA**	**VAR**
OD-7	YOK		**ERDEM**	**VAR**
OTURAK	YOK		OTRANTA	YOK
KARDELEN	YOK		**T-3**	**VAR**
HAMLET	YOK		SUPER STANDART	YOK
REYHAN	YOK		**GÖZDE**	**VAR**
OD-12	YOK		**144**	**VAR**
OD-9	YOK		**İMPALA**	**VAR**
OD-10	YOK		T-7	YOK
H-2274	**VAR**		TY-10	YOK
TUEZA	YOK		ŞİMŞEK	YOK
KUTLU	**VAR**		T-2	YOK
OD-6	YOK		TY-9	YOK
OD-8	**VAR**		RİO GRANDE	YOK
OD-11	YOK		DİAMOND	YOK
ÇİĞDEM	**VAR**		GÜMRÜK	YOK
OD-13	YOK		KOKPİT	YOK
OD-2	YOK		4 F	YOK
OD-1	YOK		FALKON	YOK
T-6	**VAR**		AYNAZ	YOK
METE	YOK		**KONYA**	**VAR**



Şekil 6. Farklı Domates Çeşitlerinde PCR Yöntemi ve SSP17 ve JCP32 Spesifik Primerleriyle *Pto* Geninin Belirlenmesi Çeşitler 1) T-6, 2) Kutlu, 3-) OD-8, 4-) Kokpit, 5-) İmpala, 6-) H 2274, 7-) 144, 8-) Gülhan, 9-) OD5, 10-) Gözde, 11-) T-3, 12-) Mete, 13-) Erdem, 14-) Ebia, 15-) Konya, 16) Çiğdem, 17-) Natura sırık



Şekil 7. Farklı Domates Çeşitlerinde PCR Yöntemi ve SSP17 ve JCP32 spesifik primerleriyle *pto* geninin belirlenmesi Çeşitler M; Marker (1000bp), Çeşitler 1) T-6, 2) Kutlu, 3) OD-8, 4) İmpala, 5) H 2274, 6) Diamond, 7) Gümrük, 8) Falkon, 9) Marmara, 10) M-16, 11) OD-5, 12) Gözde, 13) T-3, 14) Erdem, 15) Ebia, 16) Kardelen, 17) Hamlet

PCR sonuçlarına göre 50 farklı domates çeşidinden 15 adedinde *pto* geninin varlığı belirlenmiştir (T-6, Kutlu, OD-8, İmpala, H 2274, 144, Gülhan, OD-5, Gözde, T-3, Erdem, Ebia, Konya, Çiğdem, Natura sırık).

Dünya literatüründe ise Pilowsky ve Zutra (1982), Rose ve ark., (2006)'nın domates çeşitlerinde *pto* genini araştırdığı çalışmalarda *L. pennellii*, *L. parviflorum*, *L. hirsutum*, *L. chmielewskii*, *L. pimpinellifolium*, *L. chilense*, ve *L. peruvianum*'da *pto* genini belirlediklerini bildirmişlerdir. Ülkemizde ise Turgut ve Basım, (2009) benzer bir

çalışma yürüttüklerinden bahsetmişler ancak şu ana kadar araştırma sonuçlarıyla ilgili detaylı bir yayına rastlanılmamıştır.

4.5. *P. s.* pv. *tomato* Lekelerinin Belirlenmesi

İnokulasyondan sonraki 21. günde domates bitkilerinin yapraklarındaki *P. s.* pv. *tomato* lekeleri sayılarak Chambers ve Merriman skalasına göre dayanıklılık sınıfları belirlenmiştir. Elde edilen bulguların ANOVA (ver. 14) programında varyans analizi ve MSTAT programında Duncan testi yapılmıştır. Üç tekerrürlü yürütülen denemelerden elde edilen sonuçlara göre her iki bakteriyel izolat, çeşitler ve leke sayıları içinde istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0,01$). Çizelge 7'de YA-1 izolatı ve YA-2 izolatı kullanılarak farklı domates çeşitlerindeki ortalama leke sayıları, standart sapmaları, istatistiki harflendirmeleri ve Chambers ve Merriman skalasının çalışmamızdaki modifiye şekline göre dayanıklılık sınıfları verilmiştir.

Çizelge 7. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun İki Farklı İzolatının (YA-1 ve YA-2) Farklı Domates Çeşitlerinde Oluşturdukları Ortalama Leke Sayıları ve Dayanıklılık Sınıfları ($p<0,01$)

Çeşitler	Leke sayısı (ortalama) YA-1	Hastalığa dayanıklılık sınıfı YA-1	Leke sayısı (ortalama) YA-2	Hastalığa dayanıklılık sınıfı YA-2
GÜLHAN	7±1 stu	Orta dayanıklı	3,33±0,577 qr	Orta dayanıklı
OD-3	8,33±0,577 qrstu	Orta dayanıklı	6,67±1,528 opq	Orta dayanıklı
OD-4	5±1 uv	Orta dayanıklı	2,33±0,577 r	Orta dayanıklı
OD-5	9,67±0,577 pqrst	Orta dayanıklı	2,33±1,155 r	Orta dayanıklı
KARDELEN	6±1 tuv	Orta dayanıklı	13±1 ıjklm	Orta hassas
HAMLET	5,33±0,577 uv	Orta dayanıklı	4,67±1,528 qr	Orta dayanıklı
OD-6	5,33±1,528 uv	Orta dayanıklı	5,67±1,528 pqr	Orta dayanıklı
OD-11	3±1 v	Orta dayanıklı	5±1 qr	Orta dayanıklı
OD-1	5±1 uv	Orta dayanıklı	12,33±1,155 jklm	Orta hassas
144	8±1 rstu	Orta dayanıklı	4,33±1,155 qr	Orta dayanıklı
İMPALA	5,67±1,528 uv	Orta dayanıklı	9,33±1,155 mnop	Orta dayanıklı
MARMARA	7,33±1,528 stu	Orta dayanıklı	10,33±1,155 lmno	Orta dayanıklı
M-16	13,33±2,082 lmnop	Orta hassas	4,33±0,577 qr	Orta dayanıklı
OD-7	12±2 nopq	Orta hassas	6,33±0,577 pq	Orta dayanıklı
REYHAN	13±1 mnop	Orta hassas	13,33±0,577 hıjkl	Orta hassas
OD-12	13±1 mnop	Orta hassas	5,67±1,528 pqr	Orta dayanıklı
TUEZA	11,67±1,528 nopqr	Orta hassas	22,67±1,528 cd	Hassas
KUTLU	17±1 hıjkl	Orta hassas	4,33±1,155 qr	Orta dayanıklı
ÇİĞDEM	18,67±3,055 ghıj	Orta hassas	15,33±2,309 ghıj	Orta hassas
OD-13	16±1 ıjklm	Orta hassas	9±1,732 nop	Orta dayanıklı
OD-2	18,33±1,528 ghıj	Orta hassas	12,33±1,528 jklm	Orta hassas
T-6	14±1 lmno	Orta hassas	51±1 a	Çok hassas
METE	18±1 ghıjk	Orta hassas	11,33±1,528 klmn	Hassas
GÖZDE	19±2 fghı	Orta hassas	16±2 ghıj	Orta hassas
KONYA	16,33±0,577 ıjklm	Orta hassas	11,33±1,155 klmn	Orta hassas
VERDİ	16,33±1,528 ıjklm	Orta hassas	14,67±1,155 hıjk	Orta hassas
NATURA SIRIK	14±2 lmno	Orta hassas	15,67±2,082 ghıj	Orta hassas
EBİA	13,67±0,577 lmno	Orta hassas	15±1hıjk	Orta hassas
OTRANTA	14,33±2,082 klmno	Orta hassas	15,33±2,082 ghıj	Orta hassas
T-3	13,33±1,528 lmnop	Orta hassas	15,67±2,082 ghıj	Orta hassas
T-7	15±1 jklmn	Orta hassas	13,33±1,528hıjkl	Orta hassas
TY-10	12±2 nopq	Orta hassas	12,67±1,155 jklmn	Orta hassas

Çizelge 7. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun İki Farklı İzolatının (YA-1 ve YA-2) Farklı Domates Çeşitlerinde Oluşturdukları Ortalama Leke Sayıları ve Dayanıklılık Sınıfları (p<0,01) **(Devamı)**

ŞİMŞEK	18,33±1,155 ghıj	Orta hassas	17±2 efgh	Orta hassas
T-2	20,33±1,528 efgh	Orta hassas	23±2 c	Hassas
RİO GRANDE	11,67±2,517 nopqr	Orta hassas	34,67±1,155 b	Hassas
4 F	10,67±2,517 opqrs	Orta hassas	19±3,606 defg	Orta hassas
KOKPİT	15±1,732 jklmn	Orta hassas	16±2,646 ghıj	Orta hassas
OTURAK	30,33±0,577 b	Hassas	21±1 cd	Orta hassas
OD-9	37,33±2,517 a	Hassas	16,67±1,528 fghı	Orta hassas
OD-10	21±1 efg	Hassas	14,33±2,082 hıjk	Orta hassas
H-2274	30±1 b	Hassas	31,33±1,155 b	Hassas
OD-8	34,67±2,309 a	Hassas	33±1 b	Hassas
AYNAZ	29,33±2,082 b	Hassas	23±2 c	Hassas
T-13	23,67±1,528 cde	Hassas	22±2 cd	Hassas
ERDEM	23±2,646 de	Hassas	20,67±1,528 cde	Hassas
SUPER STANDART	26,67±1,528 bcd	Hassas	22,67±1,528 cd	Hassas
TY-9	23,33±3,055 de	Hassas	20±2 cdef	Orta hassas
DİAMOND	22,67±7,767 ef	Hassas	12,67±1,528 jklmn	Orta hassas
GÜMRÜK	26,67±3,055 bcd	Hassas	11,33±3,512 klmn	Orta hassas
FALKON	27,33±2,517 bc	Hassas	16±2,646 ghıj	Orta hassas
Toplam leke sayısı ort. (YA-1 ve YA-2 izolat)	16,133 A	-	14,780 B	-

Çeşitler arasında ve izolatlar arasında istatistiksel olarak analiz yapılmış, YA-1 ve YA-2 izolatları arasında istatistiksel olarak farklılık belirlenmiştir (p<0,01). YA-1 izolatındaki leke sayısı ortalaması 16,133, YA-2 izolatındaki leke sayısı ortalaması ise 14,780'dir (Çizelge 7).

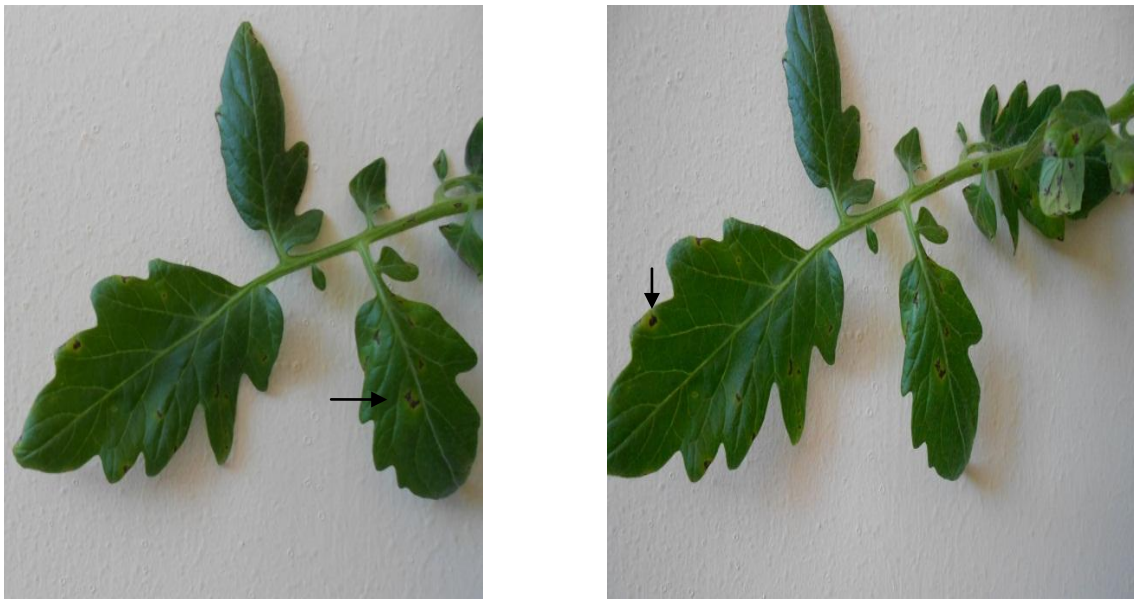
Farklı domates bitkilerinde *P. s.* pv. *tomato* enfeksiyonu sonucu yapraklarda oluşan leke sayıları istatistiksel olarak ele alındığında her iki bakteriyel izolata da en düşük tepkiyi T-6, OD-8 ve OD-9 vermişler ve en fazla sayıda leke oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca OD-11 nolu domates çeşidi her iki izolata karşı en yüksek dayanıklılık seviyesine sahip olmuş ve en düşük sayıda leke oluşumu belirlenmiştir.

YA-1 izolatına karşı, 12 orta dayanıklı (Gülhan, OD-3, OD-4, OD-5, Kardelen, Hamlet, OD-6, OD-11, OD-1, 144, İmpala, Marmara), 25 orta hassas (M-16, OD-7, Reyhan, OD-12, Tueza, Kutlu, Çiğdem, OD-13, OD-2, T-6, Mete, Gözde, Konya, Verdi, Natura Sırık, Ebia, Otranta, T-3, T-7, TY-10, Şimşek, T-2, Rio Grande, 4 F, Kokpit), 13 hassas çeşit (Oturak, OD-9, OD-10, H-2274, OD-8, Aynaz, T-13, Erdem, Super Standart, TY-9, Diamond, Gümrük, Falkon), **YA-2** izolatına karşı 15 orta dayanıklı (Gülhan, OD-3, M-16, OD-4, OD-5,OD-7, Hamlet, OD-12, Kutlu, OD-6, OD-11, OD-13, 144, İmpala, Marmara), 24 orta hassas (Diamond, Gümrük, Kokpit, 4 F, Falkon, Kardelen, Reyhan, OD-9, OD-10, Çiğdem, OD-2, OD-1, Oturak, Gözde, Konya, Verdi, Natura Sırık, Ebia, Otranta, T-3, T-7, TY-10, Şimşek, TY-9), 10 hassas

çeşit (H-2274, Tueza, OD-8, Mete, Aynaz, T-13, Erdem, Super Standart, T-2, Rio Grande), 1 tane de çok hassas çeşit (T-6) belirlenmişlerdir.

P. s. pv. *tomato*'nun YA-1 ve YA-2 izolatları ile testlemeler sonucu, dayanıklılık geni olan *pto* farklı domates çeşitlerinde ve domatesin yabani formlarında bulunmaktadır. Rose ve ark., (2006) farklı domates çeşitlerinde *pto* geninin belirlenmesi amacıyla yürüttükleri çalışmalarında SSP17 ve JCP32 spesifik primerleri kullanmışlardır. Araştırmamızda da aynı primerlerle 963 bp'lik *pto* gen fragmenti çoğaltılarak 50 farklı domates çeşidinde *pto* geni belirlenirken yine Rose ve ark., (2006) ve Milijašević ve ark., (2009)'nında çalışmalarında işaret ettikleri gibi patojenisite testi yapılarak domates yapraklarında leke sayısı tespit edilmiştir.

Elli farklı domates çeşidinde YA-1 ve YA-2 isimli *P. s.* pv. *tomato* izolatlarının oluşturdukları yaprak lekesi simptomları Şekil 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25'de verilmiştir.



Şekil 8. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen Aynaz Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 9. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-2) ile İnokule Edilen Aynaz Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 10. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen H-2274 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 11. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-2) ile İnokule Edilen H-2274 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 12. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen OD-8 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 13. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen OD-9 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 14. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-2) ile İnokule Edilen OD-9 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 15. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen OD-10 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 16. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen Oturak Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



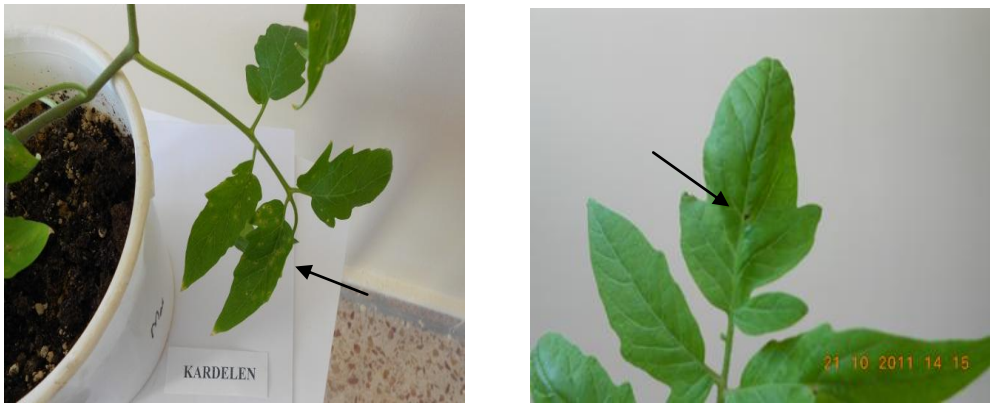
Şekil 17. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen Gülhan Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 18. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-2) ile İnokule Edilen Gülhan Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 19. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen Hamlet Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 20. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen Kardelen Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 21. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen OD-1 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 22. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen OD-4 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 23. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen OD-5 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 24. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen OD-6 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları



Şekil 25. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA-1) ile İnokule Edilen OD-11 Domates Çeşidinde Oluşan Yaprak Lekesi Simptomları

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Domates, dünyada en çok üretilen, tüketilen ve ticarete konu olan tarım ürünlerinin başında gelmesi, insan beslenmesinde vazgeçilmez ürünlerden olması ve gıda sanayinde dondurulmuş, konserve, salça, ketçap, turşu gibi çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olması nedeniyle önemli sebzelerin başında gelmektedir.

Pseudomonas syringae pv. *tomato* domateste bakteriyel etmenler arasında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'den sonra gelen önemli bir bakteriyel etmendir. Türkiye'de bu hastalık Akdeniz ve Ege Bölgeleri'nde yaygın olarak görülmektedir. Hastalığın kimyasal mücadelesinde çok başarılı sonuçlar elde edilememektedir.

Yürütülen bu çalışmada Akdeniz ve İç Anadolu Bölgeleri'nde yaygın olarak yetiştirilen 50 farklı domates çeşidinde, hastalığa dayanıklılık geni taşıyan domates çeşitleri araştırılmış, aynı zamanda yapılan patojenisite testleriyle bu çeşitlerin hastalığa karşı hassasiyetleri de doğrulanmıştır.

Elde edilen bulgulara göre 15 farklı çeşit (T-6, Kutlu, OD-8, İmpala, H 2274, 144, Gülhan, OD-5, Gözde, T-3, Erdem, Ebia, Konya, Çiğdem, Natura sırık) hastalığa karşı *pto* geni içerdikleri tespit edilmiştir. İki farklı *P. s.* pv. *tomato* izolatına karşı bitkiler farklı düzeylerde reaksiyonlar göstermişlerdir.

Çizelge 7'de YA-1 ve YA-2 nolu *P. s.* pv. *tomato* izolatlarına karşı *pto* geni içeren 15 farklı domates çeşidinin hassasiyet durumları verilmiştir.

Çizelge 8. YA-1 ve YA-2 nolu *P. s.* pv. *tomato* izolatlarına karşı *pto* geni içeren 15 farklı domates çeşidinin hassasiyet durumları

ÇEŞİT ADI	YA-1 İZOLATI	YA-2 İZOLATI
T-6	Orta hassas	Çok hassas
Kutlu	Orta hassas	Orta dayanıklı
OD-8	Hassas	Hassas
İmpala	Orta dayanıklı	Orta dayanıklı
H 2274	Hassas	Hassas
144	Orta dayanıklı	Orta dayanıklı
Gülhan	Orta dayanıklı	Orta dayanıklı
OD-5	Orta dayanıklı	Orta dayanıklı
Gözde	Orta hassas	Orta hassas
T-3	Orta hassas	Orta hassas
Erdem	Hassas	Hassas
Çiğdem	Orta hassas	Orta hassas
Ebia	Orta hassas	Orta hassas
Konya	Orta hassas	Orta hassas
Natura sırık	Orta hassas	Orta hassas

Pto geni içeren bazı domates çeşitlerinde patojenisite denemeleri sonucu, domates bakteriyel benek hastalığına karşı hassasiyet belirlenmiştir.

P. s. pv. *tomato*'nun 2 ırkı bulunmaktadır (Lawton ve MacNeil, 1986; Bogatsevska, 1989). *P. s.* pv. *tomato*'nun 0 nolu ırkına dayanıklılık sağlayan *pto* geni (Pitblado ve ark., 1980), 1 nolu ırkına karşı dayanıklı değildir (Bounaurio ve ark., 1996; Arrendo ve Davis, 2000). Ülkemizde ise, sanayi domatesi ekiliş alanlarında *P. s.* pv. *tomato*'nun her iki ırkınında bulunduğu bildirilmiştir (Aysan ve ark., 1999).

Bu bilgiler ışığında denemelerde kullanılan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatlarının 1 nolu ırk olduğu kanaatine varılmıştır.

Bitki ıslahçıları, dayanıklılık (R) genlerini kültür bitkilerine aktararak yeni çeşitlerin ıslahında kullanmışlardır. Bitkideki dayanıklılık geninin ürünü patojenin avirülens geninin ürününü algılayabilirse, bitkinin genel savunma mekanizması harekete geçirileceğinden enfeksiyon başarısız olacaktır. Bu kuramdan yola çıkılarak, günümüzde çok sayıda dayanıklılık geni değişik yöntemlerle klonlanmıştır.

Dayanıklı çeşitlerin kullanımı, bitki hastalıklarıyla mücadelede oldukça önemli bir konudur. Dayanıklı çeşitler, günümüzde birçok bitki hastalıklarına karşı dayanıklılıkta ıslah materyali olarak kullanılmaktadır. Mevcut dayanıklı çeşitlerin kullanımının yanında ıslah ve gen transferi yoluyla elde edilen dayanıklı çeşitlerin kullanımı günümüzde yaygınlaşmıştır. Bilim adamları genetik mühendisliği tekniklerine kadar gelişen dayanıklı çeşit elde etme çabalarına ilk olarak bitkilerde patojenlere karsı bulunan dayanıklılık mekanizmalarını anlamak ve incelemek suretiyle başlamışlardır. Bu bağlamda patojenlere karsı bitkilerde hangi mekanizmaların etkili olduğunu ve moleküler olarak dayanıklılığın nasıl gerçekleştiğini anlamak oldukça anlamlı olacaktır.

Bu çalışmada domates bakteriyel benek hastalığına karşı *pto* dayanıklılık geni içerdiği belirlenen 15 farklı domates çeşidimizin ileriki ıslah çalışmalarında potansiyel genetik materyal olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abak, K., Öktem, Y. E., Sakin, Ş., 1990, Domates bakteriyel kara leke hastalığına (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) dayanıklılık ıslahı, *Doğa-Turkısh Journal of Agriculture and Forestly*, 14: 289–249.

Agrios, G. N., 1997, Plant Pathology, *Fourth Edition, Academic Press*., San Diego, CA. USA 93-112, 192-193.

Agrios, G., 1997, Plant Pathology, *5th ed. Academic Press*, Inc. San Diego. CA, 635 p.

Aka-Kacar, Y., 2001, Türkiye'de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kod No: 640, Adana, TÜRKİYE.

Aldrich, J. and Cullis, C. A., 1993, RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using klentaq1 DNA polymerase, chelex 100 and gel purification of genomic DNA, *Plant Molecular Biology Reporter*, 11: 128-141.

Anonymus, 1995, Diagnostic protocols for regulated pests, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Eppo Bull., 34, 179-183.

Anonymus, 2004, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, World Horticultural Trade& U.S. Export Opportunities, DPT verileri. http://www.gidasanayii.com/modules.php?name=News&file=article&sid=2550.

Anonymous, 2004, http://www.veganaturel.com (4 Kasım 2004)

Anonim 2009, Food and Agriculture Organization (FAO). http://apps.fao.org

Anonim, 2010, www.tuik.gov.tr

Anonymus 2004, www.genetics.com.tr

Arredondo C. R. and Davis. R. M., 2000, First report of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 1 on tomato in California. *Plant Disease* 84 (3), 371-371.

Aysan, Y. N., Erkılıç, A., Çınar, Ö., Abak, K., 1995, Domates bakteriyel kara leke hastalığına karşı dayanıklı çeşit ile toprak solarizasyonunun hastalık gelişimi ve verim üzerine etkileri, *VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi 26-29 Eylül, Adana*. 418-422.

Aysan, Y., Çınar, O., and Rudolph, K., 1997, Effect of soil solarisation on the survival of bacterial speck on the tomato plant debris in soil, *Second Soil Solarisation and Integrated Managment of Soil Borne Pests. 16-21 March, 1997.*, Aleppo, Syria.

Aysan, Y. ve Çınar, Ö., 1998, Domates bakteriyel kara leke hastalığı etmeni (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) 'nin tohum, toprak ve bitki kalıntılarında yaşamı ve primer infeksiyonlarındaki rolü, *VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi 21-25 Eylül*, Ankara. 384-389.

Aysan, Y., 1999, Domates bakteriyel kara leke hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) tanımı, ırklarını tespiti, domates tohumlarında saptanması ve kimyasal savaşıma alternatif yöntemlerin araştırılması üzerine çalışmalar, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 106 s

Aysan, Y., ve Çınar, Ö., 2000, Çukurova Bölgesinde biberlerde bakteriyel leke, hastalığının (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) çıkışı ve kontrolü üzerine araştırmalar. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, Tekirdağ. S:549-554.

Aysan, Y., Mirik, M., Çetinkaya-Yıldız, R., Küsek, M., 2005, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 'nun yayılmasında tohum kökenli inokulumun rolü, *Türkiye II. Tohumculuk Kongresi 9-11 Kasım 2005*, Adana. 353 (özet).

Ballvora, A., J. Hesselbach, J. Niewöhner, D. Leister, F. Salamini, and C. Gebhardt. 1995, Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene Gro1. *Mol Gen*. Genet. 249: 82-90.

Baran, G., 2001, Tarım Ürünleri Dış Ticareti Değerlendirme Raporu, *Orta Anadolu İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, Ankara*, 43s.

Barnwell, P.; Blancard, A. N.; Bryant, J. A.; Smirnoff, N, And Weir, A. F. 1998, Isolation of DNA From The Highly Mucilagenous Succulent Plant Shape Sedum Telephium, *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 16, No, 2, P. 133-138.

Bashan, Y., Okon, Y., Henis, Y., 1982, Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds, *Phytopathology*, 72: 1143-1144.

Basım H., ve Turgut A., 2009, Akdeniz Bölgesi'nde Örtüaltı Domates Üretiminde Kullanılan Bazı Popüler Domates Çeşitlerinin Domates Bakteriyel Benek Hastalığı Etmeni *Pseudomonas tomato* (*syringae*) pv. *tomato* Strainlerine Karşı Dayanıklılık Reaksiyonlarının Belirlenmesi, Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, 15-18 Temmuz 2009, Van syf 246.

Bayraktar, K., 1981, Sebze Yetiştirme, 2.cilt, *E.Ü. Ziraat Fak. Yayınları*, Bornova-İZMİR, 169.

Bender, C. L., Cooksey, D. A., 1986, Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: Conjugative transfer and role in copper-resistance, *J. Bacteriol*, 165: 534-541.

Benlioğlu, K. ve Benlioğlu, S., 1998, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı bakır dayanıklılığı üzerinde çalışmalar, *8. Türkiye Fitopatoloji Kongresi 21-25 Eylül*, Ankara, 52-56.

Bennetzen, J.L., Jones, J.D.G., 1992, Approaches and progress in the molecular cloning of plant disease resistance genes. New York: Plenum Press.

Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B.J., 1994, RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeats class of plant disease resistance genes. Science, 265: 1856-1860.

Bereswill, S., Bugert, P., Völksch, B., Ulrıch, M,. Bender, Cl., Geıder, K., 1994, Identification and relatedness of coronatine producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (8), 2924-2930.

Bergey, D. H., Harrison F. C., Breed R. S., Hammer B. W., and Huntoon (ed.), F. M., 1923, Bergey's manual of determinative bacteriology, *The Williams & Wilkins Co., Baltimore,* 116 p.

Balncard, D., 1994, A Colour Atlas of Tomato Dıiseases Observation, Identıfıcation and Control, *INRA Vegetable Pathology Unit*, France. 210 p.

Boerma, H. R. and Hussey, R. S., 1992, Breeding plants for resistance to nematodes, *Journal of Nematology*, 24, 242-252.

Bogatzevska, S. N., and Boneva, K. P., 1991, Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in seeds of weeds, *Proceedings of Working Group Pseudomonas syringae pathovars in İtaly*. 209 p.

Bogatsevska, N. S., Sotirova, V., and L. D. Stamova 1989, Race *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. Dokl. Bolg. Akad. Nauk 42 (2), 129-130.

Boyacı, H. F., 2007, Patlıcanlarda *Fusarium* Solgunluğuna Dayanıklılık Kaynakları ve Dayanıklılığın Kalıtımı, Doktora Tezi (Yayınlanmamış), *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 97s

Bounaurio, R., Stravato, V. M., and Cappelli, C., 1996, Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 1 in Italy on *Pto* gene-bearing tomato plants, *J. Phytopathol*, 144, 437-440.

Bradbury, J. F., 1986, Guide to Plant Pathogenic Bacteria, *CAB International Mycological Institute*, Kew, UK.

Bradshaw, J.E., C.A. Hackett, R.C. Meyer, D. Milbourne, J.W.McNicol, M.S. Philips and R.Waugh. 1998, Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to Globodera pallida (Stone) in tetraploid potato (*Solonum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 97: 202-210.

Breed, R. S., Murray, E. G. D., and Smith, N. R., 1957, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, *The Williams and wilkins company*, Baltimore. 1094.

Bryan, M. K., 1933, Bacterial speck of tomatoe, *Phytopathology*, 23, 897-904.

Callow J. A., Ray, T., Estrade-Garcia, T. M., R, G.J., 1988, Molecular signals in plant cell recognition. In S. Scannerini, D.Smith, P. Bonfante-Fasolo, V. Gianinnazi-Pearson (Eds.), Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis (pp. 167). Berlin, *Springer-Verlag*.

Carland Francine M., John M. Salmeron, Susan J. Barker,' Anand Y. Mehta, and Brian J. Staskawicz, April 1994, American Society of Plant Physiologists Tomato Mutants Altered in Bacterial Disease Resistance Provide Evidence for a New Locus Controlling Pathogen Recognition, *The Plant Cell*, Vol. 6, 51 1-520.

Chambers, S. C., and Merriman, P. R., 1975, Perennation and control of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Victoria. Aust J Agric Res*., 26, 657–663.

Chang, J. H., Tai, Y.-S., Bernal, A. J., Lavelle, D. T., Staskawicz, B. J., 2002, Functional analyses of the *Pto* resistance gene family in tomato and the identification of a minor resistance determinant in a susceptible haplotype, *Mol. Plant-Microbe Interact*, 15, 281–291.

Chunwongse, J., Chunwongse, C., Black, L. and Hanson, P. 1998, Mapping of the Ph-3 gene for late blight from L. pimpinellifolium L 3708, Report of the Tomato Genetics Cooperative, Number 48- December, *Dept* of *Plant Breeding*, *Cornell University.*

Colın, J. E. and Chafik, Z., 1986, Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco, *Plant Disease*, 70, 1048-1050.

Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., van Schneewind, O. D. K. and Alfano, J. R., 2000, *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins, *Proc. Natl Acad. Sci*., USA, 97, 8770–8777.

Conlin, K.C and McCarter, S.M. 1983, Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in vitro and in controlling bacterial speck. *Plant disease* 67:639-644.

Cuppels, D. A., Elmhirst, J., 1999, Disease development and changes in the natural *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on field tomato plants, *Plant Disease*, 83, 759-764.

Crute, I. R., 1992. From breeding to cloning (and back again?): a case study with lettuce downy mildew, *Annual Review of Phytopathology*, 30: 485-506.

Crute, I. R., Investigaions of gene-for-gene relationships: the need for genetic analyses of both host and parasite. *Plant Pathology*, 35: 15-17, 1986.

Cota-Sánchez, J. H., Remarchuk, K. and Ubayasena, K., 2006, Ready-To-Use DNA Extracted With A Ctab Method Adapted For Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue, *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 24, No. 2, 161-167 p.

Çınar, Ö., 1977, Doğu Akdeniz Bölgesi domateslerinde görülen bakteriyel kara leke hastalığı etmeni (*Pseudomonas tomato* Okabe) 'nin biyokimyasal yöntemlerle tanımı, *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı*, 8 (4), 288-296.

Dangl, J. L., 1995, Piece de resistance: novel classes of plant disease resistance genes, *Cell*. 80: 363-366.

Dangl, J. L. and Jones, J. D. 2001, Plant pathogens and integrated defence responses to infection, *Nature*, 411, 826–833.

Davis, M.J., Gillaspie, A. G., Jr. Vidaver, A. K., Harris, R. W., 1984, *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic *Coryneform* bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause Ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease, *International Journal of Systemic Bacteriology*, 34, 107–17.

Day, P. R., 1986, Plant-parasite interactions: a genetical perspective, *Plant Pathology*, 35: 263-269.

Debener T, Lehnackers H, Arnold M, Dangl JL (1991) Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant* J 1:289–302.

Dellaporta, S. L.,Wood, J., Hicks, J.B., 1983, "A Plant DNA Mini Preparation Version II" *Plant Molecular Biology Reporter*, Voll 1, pp:19.

De La Cruzet, J.P, Martin-Romero M, Carmona JA, Villalobos MA, Sanchez de la Cuesta F. 1997, Effect of evening primrose oil on platelet aggregation in rabbits fed an atherogenic diet. *Thromb Res* 87(1):141-9.

De Wit, P. J. G. M., 1986, Elicitation of active resistance mechanisms, *In J. A. Bailey* (Ed.), *Biology and molecular Biology of plant pathogen interaction,*149 p.

De Wit, P. J. G. M., 1992, Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens, *Annual Review of Phytopathology*, 30, 391-418.

Dixon, R. A., Lamb, C. J., 1990, Molecular communications in interactions between plants and microbial pathogens, *Ann.Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol*, 41: 339-367.

Dixon, R. A., Harrison, M. J. and Lamb, C.J., 1994, Early events in the activation of plant defense responses, *Annu. Rev. Phytopathol*, 32, 479-501.

Do N. and Adams R.P., 1991, "A Simple Technique For Removing Plant Polysaccharide Contaminants From DNA" *BioTechniques* 10: 163–166.

Doyle, J. J. and Doyle., J. L., 1987, A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue, *Phytochem Bull*, 19, 11-5.

Echevarría-Machado, I., Sánchez-Cach, L. A., Hernández-Zepeda, C., Rıvera-Madrıd, R. and Moreno-Valenzuela, O. A., 2005, A Simple and Efficient Method For İsolation of DNA in High Mucilaginous Plant Tissues, *Molecular Biotechnology*, Vol. 31, No. 2, 129-135 p.

Ellingboe, A. H., 1984, Genetics of host-parasite relations: an essay, *Advances in Plant Pathology*, 2, 131-152.

Elliott, 1951, Manual of Bacterial Plant Pathogens (Second Edition), *Chronica Bolanica Company*, Waltham, Mass, USA, 186.

Ellis, J. G., Lawrence, G. J., Peacock, W. J., Pryor, A. J., 1988, Approaches to cloning plant genes conferring resistance to fungal pathogens, *Annual Review of Phytopathology*, 26: 245-263.

Eppo, 1982, Data Sheets on Quarantine Organism. *Corynebacterium michiganense* (E.F. Smith) H.L. Jensen. EPPO Bulletin, 12(1).

Erkılıç, A., Çınar, Ö., Aysan, Y., 1994, Effects of soil solarization and chemical methods on bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) on tomato, *9th Congres of the Mediterrenean Phytopathological Union September 18-24*, Kusadası-Aydın, Turkey, 397-399.

Fahy, P. C. and Lloyd A. B., 1983, *Pseudomonas* the fluorescent pseudomonads , in 'plant bacterial diseases, a diagnostic guide' (ed. P. C. Fahy and G. J. Persley), *Academic Press*, New York, 141-188.

Feys, B.J. and J.E. Parker. 2000, Interplay of signaling pathways in plant disease resistance, *TIG*., 16, 449-455.

Flor, H. H., 1971, Current status of the gene-for-gene concept, *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296.

Gardner, M. W., and Kendrick, J. B. 1923. Bacterial spot of tomato and pepper Phytopathology 13:307-315.

Gautam, P., 2008, Bacterial speck disease of tomato: An insight into host-bacteria interaction, *GRIN Publishing*, San Francisco, CA, ISBN: 978-3-656-00948-1.

Geiger, B. 1989, Cytoskeleton-associated cell contacts. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1:103-109.

Goode, M. J., and Sasser, M. 1980, Prevention–The key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Dis*. 64:831-834.

Gu, Y. Q., 1998, Molecular mechanisms involved in bacterial speck disease resistance of tomato, *Phil. Trans. R. Soc. Lond*, 353, 1455–1461.

Gu, Y. Q., Yang, C., Venkatappa, T. K., Zhou, J. and Martin, G. B., 2000, Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the *Pto* kinase, *Plant Cell*, 12, 771–785.

Günay, A., 2005, Sebze Yetiştiriciliği Cilt II syf 318-319, 531.

Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G., 1996, Inducible plant defense mechanisms and resistance gene function, *Plant Cell*, 8, 1773–1791.

Heath, M. C., 1986, Fundamental questions related to plant-fungus interactions: recombinant DNA technology provide the answers? *In J.A. Bailey (Ed.), Biology* and *molecular biology of plant pathogen interaction*, Berlin, Springer-Verlag, 15p.

Hildebrand, D.C., Schroth, M.N., Sand, D.C., 1988, *Pseudomonas*. In: Schaad, ND, ed. Labroratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, St. Paul, Minnesota, USA: *The American Phytopathological Society*, 60-80.

Huang XQ, Hsam SLK, Zeller FJ, 2000, Chromosomal location of two novel genes for resistance to powdery mildew in Chinese landraces (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). J Genet Breed 54:311–317.

Holub, E.B., J.L. Beynon, I.R. Crute. 1994. Phenotypic and genotypic characterisation of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Mic. Int*., 7: 223-239.

Janjusevic, R., Ambramovitch, R. B., Martin, G. B. and Stebbins, C. E., 2006, A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase, *Science*, 311: 222–226.

Jones, J.B., Gitaitis, R.D., McCarter, S.M., 1986, Fluorescence on single-carbonsources for seperation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* and *P. viridiflava* on tomato transplants, *Plant Disease*, 70, 151-153.

Jones, J. B., Stall, R. E., and Zitter, T.A., 1991, Compendium of Tomato Diseases, *APS Pres, Minnesota*, USA.

Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., Zitter, T. A., 1993, Compendium of Tomato Diseases. *APS Pres*., 71 p.

Jones, J.B., J.P. Jones, R.E. Stall and T.A. Zitter (Eds.). 1991. Compendium of Tomato Diseases. *APS Press*. St. Paul, MN. 73 pp.

Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., Jones, J.D.G., 1994, Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, 266: 789-793.

Jones, J. D., 2001, Putting knowledge of plant disease resistance genes to work, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 281–287

Jones JD, Dangl JL. 2006, The plant immune system. Nature 444: 323–329.

Johnstone, C., and C. Thompson. 1991, A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic* Acids Res. 19: 1349.

Kahveci, E. ve Gürcan, A., 1993, Antalya ilinde domateslerdeki bakteriyel hastalık etmenlerinin tespiti, *Bitki Koruma Bülteni*, 33 (3-4).

Karaca, İ., Saygılı, H., 1977, Domateslerde Bakteriyel Hastalıklar, *İzmir Bölge Zirai Mücadele ve Karantina Başkanlığı*, Yayın No:1.

Karaca, İ., ve Saygılı, H., 1982, Batı Anadolu'nun bazı illerinde domates ve biberlerde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri, belirtileri ve konulçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar. *III. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri 12-15 Ekim 1982*, Adana, 182-192.

Kaygısız, H. 2004, Domates Yetistiriciligi, Hasat Yayıncılık, İstanbul. s. 280.

Kim, Y. J., Lin, N.-C. and Martin, G. B., 2002, Two distinct Pseudomonas effector proteins interact with the *Pto* kinase and activate plant immunity, *Cell*, 109: 589–598.

King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. 1954, Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescin. J *Lab Clin Med* 44, 301–307.

Klement, Z., 1963, Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads, *Nature*, 199: 299-300.

Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C., 1990, Methods in Phytobacteriology, *Akademia Kiado*, Budapest, XIV+568s.

Kovacs, N., 1956, İdentification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction, *Nature*, London, 170, 173.

Küçüker, O., 1994, Tıbbi Biyologlar İçin Botanik Ders Kitabı, *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*, İstanbul, 183-184.

Kütevin, Z., Türkeş, T., 1987, Sebzecilik, Genel Sebze Tarımı Prensipleri ve Pratik Sebzecilik Yöntemleri, *İnkılâp Kitabevi*, İstanbul ,Sayfa 201, 294-295.

Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M., Dixon, R. A., 1989, Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack, *Cell*, 56, 215-224.

Lamb, C. J., 1994, Plant disease resistance genes in signal perception and transduction, *Cell*, 76: 419-422.

Lawton, M. B., and MacNeill, B. H., 1986, Occurrence of race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on field tomato in southwestern Ontario, *Can. J. Plant Pathol*., 8, 85-88.

Lelliot, R. A., and Stead, D. E., 1987, Methods for the diagnosis of bacterial diseases plants, *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, UK.

Lindsay, J.P., Lamb, C.J., Dixon, R.A., 1993, Microbial recognition and activation of plant defense systems. Trends in Microbiology, 4: 181-187.

Louws, F. J., Wilson, M. Campbell, H. L. Jones, J. B. Sahin, F. and Miller, S. A., 2001, Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator, *Plant Dis*. 85, 481-488.

Lu, Z.-X., K. Sossey-Alaoui, G.L. Reighard, Wm.V. Baird, and A.G. Abbott. 1999, Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstoc breeding. *Theor*. *Appl*. *Genet*. 99:115-122.

Maden, S., 1989, Bitki Bakteri Hastalıkları, *A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları* (Ders Kitabı), 1161. 213 s.

Maes, M. And Garbeva, P., 1994, Detection of bacterial phytopathogens based on nucleic acid technology, *Parasitica*, 50: 75-80.

Mansfield, J.W., 1983, Antimicrobial compounds. *In J.A. Callow (Ed.), Biochemical Plant Pathology*, Cichester, Wiley and Sons 237 p.

Mansfield, J. W., 1986, Recognition, elicitors and the hypersensitive reaction. In B. Lutenberg (Ed.), Recognition in microbe- plant symbiotic and pathogenic interactions (pp. 434). *Berlin, Springer-Verlag.*

Mansfield, J. W., 1990, Recognition and response in plant/fungus interactions, *In R.S.S. Fraser (Ed.), Recognition and Response in Plant-Virus Interactions* Berlin, *Springer Verlag*, 31-52 p.

Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganal, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D. and Tanksley, S. D., 1993, Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato, *Science*, 262, 1432–1436.

Mc Carter, S. M., Jones, J. B., Gitaitis, R. D., Smitley, D. R., 1983, Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue and epiphytic weed hosts in Georgia, *Phytopathology*, 73: 1393-1398.

McHale, L., Tan, X., Koehl, P. and Michelmore, R. W., 2006, Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards, *Genome Biol*., 7: 212.

Milligan, S.B., J. Bodeau, J., Yahoobi, I. Kaloshian, P. Zabel, and V.M. Williamson 1998, The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the Leucine Zipper, Nucleotide Binding, Leucine-Rich repeat family of plant Genes. *The Plant Cell.* 10: 1307-1319.

Milijašević S.,, BiljanaTodorović, E. Rekanović, Ivana Potočnik, and V. Gavrilović 2009, Races and hosts of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Serbia, Arch. *Biol*. *Sci*., *Belgrade*, 61 (1), 93-102.

Mindrinos, M., Fumiaki, K., Yu, G.-L., Ausubel, F.M., 1994, The A. *thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. Cell, 78, 23: 1089-1099.

Mohan, S. K. and Schaad N. W., 1987, Semiselective agar medium for isolating *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and phaseolicola from bean seed, *Phytopathology*, 77: 1390-1395.

Mudgett, R.E., Nash, J., Ruther , R., 1992, Controlled gas environment in solid state fermentations, *Dev Ind Microbiol*, 34, 1217–1233.

Mudgett, M. B. and Staskawicz, B. J., 1998, Protein signaling via type III secretion pathways in phytopathogenic bacteria, *Cur. Opin. Microbiol*, 1, 109-115.

Murray, M. G. And Thompson, W. F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.

Norelli, J.L., H.S. Aldwinckle, and S.V. Beer. 1988. Virulence of Erwinia amylovora strains to Malus sp. Novole plants grown in vitro and in the greenhouse. *Phytopathol*. 78:1292-1297.

Okabe, N. 1933, Bacterial diseases of plants occurring in Formosa. IV. Bacterial brown-stripe of Italian millet. J. *soct*. *rop*. *Agric*. (Taiwan) 6:54-63.

Öktem, Y. E., 1985, Studies on Determination of Susceptibility of Tomato Varieties Against *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense, IV. Türkiye Fitopatoloji Kongresi 8-11 Ekim 1995*, İzmir, Türkiye, 79-106.

Özaktan, H., Bora, T., 1991, Domates Bakteriyel Solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.,) ile savaşım olanakları üzerine Araştırmalar, Ege Üniversitesi Doktora Tezi, 99 s, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Parker, J. E. and Coleman, M. J., 1997, Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition, *TIBS*, 22: 291-296.

Pich, U. And Schubert, I., 1993, Minipep Method For İsolation of DNA From Plants With A High Contentof Polyfenols ", *Nüc*. *Acid*. *Res*., 21, 3328.

Pilowsky, M., and D. Zutra, 1982, Screening wild tomatoes for resistance to bacterial speck pathogen (*Pseudomonas tomato*). *Plant Dis*. 66: 46–47.

Pink, D. A. C., 2002, Strategies using genes for non-durable resistance, *Euphytica*, 1, 227–236.

Pitblado, R. E. and Kerr, E. A., 1980, Resistance to bacterial speck (*Pseudomonas tomato*) in tomato, *Acta Hort*., 100: 379-382.

Roberts, P. A., 2002, Consept and consequences of resistance in plant resistance to parasitic nematodes (e.ds J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge), *CAB International Pub*., UK.

Rogers SO, Bendich AJ 1994, Extraction of DNA from plant, fungal and algal tissues. In: , Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) Plant Molecular Biology Manual. Boston, MA: *Kluwer Academic Publishers*, D 1: 1-8.

Romantschuk, M., 1992, Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces, *Annual Review of Phytopathology*, 30: 225-243.

Rose Laura E., Richard W. Michelmore and Charles H. Langley, 2006, Natural Variation in the Pto Disease Resistance Gene Within Species of Wild Tomato (*Lycopersicon*). II. Population Genetics of *Pto*, *Genetics*, 175, 1307–1319.

Rossi, M., F.L. Goggin, S.B. Milligan, I. Kaloshian, D.E. Ullman, and V.M. Williamson 1998, The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc*. *Natl*. *Acad*. *Sci*. 95: 9750-9754.

Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW, 2001, Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dymnamics. *Proc Natl Acad Sci* USA 81:8014-8018.

Sambrook J, Russell DW, 2001, Molecular Cloning: A *laboratory manual*,. 3rd ed, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.

Saygılı, H., 1975, Investigation on new bacterial disease of tomatoes in Ege, *The Journal of Turkish Phytopathology*, 4: 83-88.

Saygılı, H., Köseoğlu, T., ve Demır, G., 1985. Batı Anadolu Bölgesi domates ekim alanlarında hastalık etmeni olan bakterilerin toprakta yaşam durumları ve kullanılan suni gübrelerin bu etmenlere etkileri üzerinde araştırmalar. Doğa Bilim Dergisi D2,(9):367-383 (Özgün Araştırma-TÜBİTAK Projesi).

Saygılı, H., 1995, Fitobakteriyoloji. *Doğruluk Matbaası,* İzmir, 203 s.

Sevgican A., 1999, Örtüaltı sebzeciliği, topraklı tarım, Cilt-1, *Ege Ünivesitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*,No:528, Bornova-İzmir, 287 s.

Simpson, P., Bourouis, M., Heitzler, P., Ruel, L., Haenlin, M., Ramain, P., 1992, Delta, Notch, and shaggy: elements of a lateral signaling pathway in Drosophila, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*., 57: 391-400. (Export to RIS).

Scarlett, C. A., Fletcher, J. T., Roberts P. And Lelliott, R. A., 1978, Tomato Pith Necrosis Caused by *Pseudomonas corrugata*, *Annalls App. Biol*., 88:105-114.

Schneider, R. W., and R. G. Grogan 1977, Tomato leaf trichomes, a habitat for resident populations of *Pseudomonas tomato*. *Phytopathology* 67, 898-902.

Schaad, N. W., Cheong, S. S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., and Panopoulos, N. J., 1995, A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts, *Phytopathology* 85: 243-248.

Schaad, N., Jones, J. B., and Chun W., 2001, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, *APS Press*, St. Paul, Minnesota, USA.

Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W. and Staskawicz, B. J., 1996, Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato, *Science*, 274, 2063–2065.

Scott, J. W., 2005, Perspective on Tomato Disease Resistance Breedig: Past, Present and Future. *Acta Hort* 695.

Sherf, A. F. and Machab, A. A., 1986, Vegetable Diseases and Their Control, *Second Edition*, 736 p.

Smıth, J. M., Dunez, D. H., Phıllıps, R. A., Lelliott and S. A. Archer, 1988, European handbook of plant diseases., Eds.Blackwell Scientific Publications: Oxford Sh: 583.

Smıtley D, R. & Mccarters, . M. 1982, Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and role of epiphytic populations and environmental conditions in disease development. *Plant Disease* 66, 71 3-71 7.

Staskawicz, B., F. M., Ausubel, B. J., Baker, J. G., Ellis and Jones, J.D.G., 1995, Molecular genetics of plant disease resistance, *Science*, 268:661-667.

Stewart CN Jr, Via LE (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 14:748-751

Stevens, F. L. 1925, Plant Disease Fungi. New York: MacMillan.

Swanson, J., Kearney, B., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J. 1988, Cloned avirulence gene of *Xantbomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race change mutant. MOI. *Plant-Microbe Interact*. 1, 5-9.

Şahin, F., 2001, Severe outbreak of bacterial speck, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, on field-grown tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey, *Plant Pathology*, 50 (6), 799.

Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y. and Martin, G. B., 1996, Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and *Pto* kinase, *Science*, 274, 2060–2063.

Thordal-Christensen H, Smedegaard-Petersen V. 1988, Comparison of resistance-inducing abilities of virulent and avirulent races of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* and a race of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* in barley. *Plant Pathol*. 37:20–27.

Thornley, M. J., 1960, J. *appl*. *Bact*., 23, 37.

Tokgönül, S., 1995, Akdeniz Bölgesinde örtü altında yetiştirilen domateslerde sorun olan bakteriyel hastalıklar. VII. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül 1995*, Adana, 7, 402-406

Tör, M., 1998, Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki Son Gelişmeler *Tr. J. of Biology, TÜBİTAK*, 22: 271-285.

Van der Biezen and Jones, J. D. G., 1998, Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept, *TIBS*., 23: 454-456.

Vrain, T. C., 1999, Engineering natural and synthetic resistance for nematode management, *Journal of Nematology*, 31: 424-436.

Wılkie, J. P., Dye, D. W. and Watson, D. R. W., 1973. Further host of *Pseudomonas viridiflava*, *New Zealand Journal Agricultural Research* 16, 315-323.

Wilson, M., Moss, W. P., Campell, H. L., Wang, S. Y., Ji, P., Byrne, J. M., Jones, J. B., 1997, Molecular approches involved in the development of biocontrol agents af bacterial speck and spot of tomato, *IOBC/OILB European Foundation for Plant Pathology, Biological Control Working Group, Molecular Approches in Biological Control 15-18 September*, Delemont, Switzerland.

Wilson, M., Campbell, H. L., Ji, P., Jones, J. B., and Cuppels, D. A., 2002, Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America, *Phytopathology*, 92: 1284-1292.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y., 1995, Transfer of two *Burkholderia* and an Alcaligenes species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov., *Microbiology and Immunology*, 39, 897-904.

Young, J . M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulosc, G. and Robbs, C. F., 1978, A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21, 153-1 77.

Yunıs, H., Bashan, Y., Okon, Y. Henıs, Y. (1980~). Two sources of resistance to bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. *Plant Disease* 64,85 1-852.

Zhang, L.P., Khan, A., Niño-Liu, D. and Foolad, M.R., 2002, A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon hirsutum* cross, *Genome*, 45: 133–146.

Zhu, M., Shao, F., Innes, R. W., Dixon, J. E., and Xu, Z., 2004, The crystal structure of *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB: a papain- like fold with a distinct substrate-binding site, *Proc. Natl. Acad. Sci*., USA 101: 302–307.

Zhou, M., Ma, Z. & Sly, W. S. (1995) Cloning and expression of the cDNA of the chicken cation-independent mannose-6-phosphate receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9762–9766.

EKLER

EK-1

Domates bitkilerine uygulanan izolatların oluşturduğu simptom lekelerinin varyans analizi

Source	DF	SS	MS	F	P
domates	49	16750,60	341,85	100,84	0,000
izola	1	137,36	137,36	40,52	0,000
domates*izola	49	5772,47	117,81	34,75	0,000
Error	200	678,00	3,39		
Total	299	23338,44			

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Öznur EKİCİ
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	KONYA-Ereğli 09.11.1986
Telefon	**:**	05426572397
Faks	**:**	
e-mail	**:**	oznurekici42@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	**:**	Atatürk Lisesi, Ereğli, KONYA	2003
Üniversite	**:**	Atatürk Üniversitesi, ERZURUM	2010
Yüksek Lisans	**:**	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, KONYA	Devam ediyor
Doktora	**:**	-	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2009	Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, İzmir Tarım İl Müdürlüğü, Bitki Koruma Şubesi	Stajyer

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER: İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR