T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE EKİMİ YAPILAN BAZI DOMATES TOHUMLARI İLE TAŞINAN BAKTERİYEL PATOJENLERİN BELİRLENMESİ VE EN YAYGIN PATOJENİN KARAKTERİZASYONU

Ayşegül GEDÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Temmuz-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DE EKİMİ YAPILAN BAZI DOMATES TOHUMLARI İLE TAŞINAN BAKTERİYEL PATOJENLERİN BELİRLENMESİ VE EN YAYGIN PATOJENİN KARAKTERİZASYONU

Ayşegül GEDÜK

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: **Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ**

2019, 88 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Prof. Dr. Nuh BOYRAZ
Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

Dünyada yaygın olarak yetiştirilen bir sebze olan domates (*Solanum lycopersicum* L.), insan sağlığı için önemli bir vitamin ve mineral kaynağıdır. Domatesin sera ve tarla koşullarında ciddi ekonomik kayıplara neden olan en önemli bakteriyel hastalıkları; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (bakteriyel benek), *Xanthomonas vesicatoria* (bakteriyel leke), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bakteriyel kanser ve solgunluk)'dir. Bu çalışmada, Türkiye'nin 6 bölgesini temsilen 10 farklı ilden 50 domates tohumu örneği toplanmıştır. Tohumlardaki patojenin varlığı HR, patojenite, biyokimyasal, fizyolojik, fenotipik ve moleküler testler kullanılarak belirlenmiştir. Genetik karakterizasyon, spesifik oligonükleotit primerleri, ISSR ve SRAP markerları kullanılarak PCR temelli analizlerle yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda 10 adet *Xanthomonas vesicatoria*, 6 adet *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve 5 adet *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatı elde edilmiştir. En yaygın patojen olarak belirlenen *X. vesicatoria* izolatları arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek için yedi ISSR ve dokuz SRAP markerı kullanılmıştır. Domates çeşitlerinde hastalığa dayanıklılık, her biri spesifik bir patojen veya patojen ırkına dayanıklılık gösteren tekli genlerle ilişkilidir. Bitki patojenlerinde genetik çeşitliliğin belirlenmesi, üreticiler için arzu edilen özelliklerde çeşitlerin geliştirilmesine ve özellikle hastalıklara karşı dayanıklı çeşitlerin elde edilmesine imkan sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: bakteri, genetik çeşitlilik, karakterizasyon, tohum

ABSTRACT

MSC THESIS

DETERMINATION OF SEED-BORNE BACTERIAL PATHOGENS AND CHARACTERIZATION OF THE MOST COMMON PATHOGEN FROM SOME TOMATO SEEDS CULTIVATED IN TURKEY

Ayşegül GEDÜK

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

2019, 88 Pages

Jury
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Prof. Dr. Nuh BOYRAZ
Assoc. Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.), a widely grown vegetable in the world, is an important source of vitamins and minerals for human health. The most important bacterial diseases of tomato which cause serious economic losses in greenhouse and field conditions; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (bacterial spot), *Xanthomonas vesicatoria* (bacterial spot), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bacterial Canker and wilt). In this study, 50 tomato seed samples representing the 6 regions of Turkey were collected from from 10 different provinces. Presence of pathogen on seeds was confirmed using HR, pathogenicity, biochemical, physiological, phenotypical and molecular tests. Genetic characterization was performed by PCR-based analysis using specific oligonucleotide primers, ISSR and SRAP markers. As a result of these studies, 10 *Xanthomonas vesicatoria*, 6 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and 5 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* isolates were obtained. Seven ISSR and nine SRAP markers were used to determine the genetic diversity among the most common pathogen identified *X. vesicatoria* isolates. Disease resistance in tomato cultivars is related by single genes, each conferring resistance to a specific pathogen or pathogen race, strain. Understanding of genetic diversity in plant pathogens provides opportunity for plant breeders to develop improved cultivars with desirable characteristics and especially resistant cultivars to diseases.

Keywords; bacteria, characterization, genetic diversity, seed,

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, varlığından her zaman destek aldığım kıymetli hocam Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ' a sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmam esnasında bölüm olanaklarından yararlanmama imkân sağlayan Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na ve tez projeme maddi olarak katkı sağlayan S.Ü. BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda emeği geçen Yüksek Lisans Öğrencisi Belgacem HATTAB, Doktora Öğrencisi Aysun ÖZTÜRK, Doktora Öğrencisi Tibebu BELETE, Doktora Öğrencisi Haris BUTT, Arş. Gör. İnci ŞAHİN, Arş. Gör. Badel UYSAL, Arş. Gör. Mustafa Alp Arslan UMARUSMAN, Yüksek Lisans Öğrencisi Öznur ERTAŞ'a ve bize laboratuvarını açan Gıda Mühendisliği bölümüne teşekkür ederim.

Manevi olarak destek ve yardımlarını esirgemeyen her daim yanımda olan Arş. Gör. Özden SALMAN, Arş. Gör Elif ŞAHİN, Arş. Gör. Dr. Ahmet ŞAHBAZ ve Öğr. Gör. Raziye KOÇAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doğduğum günden bugüne kadar maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen beni bugünlere getiren sevgili anne ve babam Hatice ve Zeki GEDÜK'e ve canım abim Hasan GEDÜK'e destekleri için teşekkür ediyorum.

Ayşegül GEDÜK
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **ii**

ÖNSÖZ ..... **iii**

İÇİNDEKİLER ..... **iv**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

2.1. Domates Bitkisinin (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Botaniksel Tanımı ve Tarihsel Süreci 4
2.2. Domates Bitkisinin Üretimi ve Ekonomik Önemi 5
2.3. Domates Hastalıkları 5
2.2. Bakteriyal Benek (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* "Okabe" Y. D. & W) 6
2.3.Bakteriyel Kanser ve Solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* "Smith" Davis et. al.) 11
2.4. Bakteriyel leke (*Xanthomonas vesicatoria* "Doidge " Dye) 14
2.5. Domates Tohumlarında Bakteriyel Patojenlerin Tespiti ve Tanılanması 16

3. MATERYAL ve METOT **19**

3.1. Materyal 19
3.1.1. Deneme Materyali 19
3.1.2. Denemede Kullanılan Kimyasal, Alet ve Ekipmanlar 20
3.1.3. Bakteriyel izolatlar 20
3.1.4. Denemelerde kullanılan PCR primerleri 21
3.2. Metot 22
3.2.1. Bakteriyel patojenlerin tohumlardan izolasyonu 22
3.2.2. Besiyerinde bakteriyel koloni sayısının belirlenmesi 24
3.2.3. Tohum çıkış oranının belirlenmesi ve simptomların gözlemlenmesi 24
3.2.4. Bakteriyel tanı testleri 24

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **35**

4.1. Domates Tohumlarından Bakteriyel Patojenlerin İzolasyonu 35
4.2. Bakteriyel koloni sayısının belirlenmesi 35
4.3. Tohum çıkış oranının belirlenmesi ve simptomların gözlemlenmesi 37
4.4. Bakteriyel Tanılama Testleri Sonuçları 39
4.4.1. Biyokimyasal testler 39
4.4.2. Tütünde aşırı duyarlılık testi (Hipersensitif reaksiyon, HR) 43
4.4.3. Patojenisite Testleri 43

4.4.3. Moleküler Tanı Testleri 52

5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 58

5.1 Sonuç 58
5.2 Öneriler 60

ÖZGEÇMİŞ 75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1.Ülkelere Göre 2017 Yılı Domates Üretim Miktarı 5

Çizelge 3. 1. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Temin Edilen ve Bakteriyel Hastalıklar Açısından İncelemesi Yapılan Domates Tohumlarına Ait Özellikler 19

Çizelge 3. 2. ISSR primerleri, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları 33

Çizelge 3.3. SRAP primerleri, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları 33

Çizelge 4. 1. Kullanılan tohumların çeşit adları ve bakteriyel popülasyonları 36

Çizelge 4. 2. Temin edilen domates tohumlarının bölgelere göre çıkış oranları 38

Çizelge 4. 3. Domates tohumlarından elde edilen izolatların biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testlere karşı göstermiş oldukları reaksiyonların oranları (%) 46

Çizelge 4. 4. Denemelerde kullanılan farklı domates çeşidi tohumlarından elde edilen bakteriyel izolat sayıları 48

Çizelge 4. 5. Farklı domates çeşidi tohumlarından izole edilen bakteriyel patojenler .. 48

Çizelge 4. 6. Türkiyenin farklı bölge ve illerinden elde edilen domates tohumlarından izole edilen bakteriyel patojenlerin oranları (%) 49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4. 1. a) Domates tohumların bakteriyel izolasyon çalışmaları b) ilk izolasyon sonucu NA üzerinde gelişen koloniler c) AH kodlu domates tohumunun izolasyonu sonucu petrilerde gelişen kolonilerin sayımı 35

Şekil 4. 2. Tohum çıkışları ve simptomların gözlemlenmesi 37

Şekil 4. 3. Bakteriyel izolatlara uygulanan Gram reaksiyon testleri a) Gram Reaksiyon Testine reaksiyona tepki veren AS1 izolatının ipliğimsi sünme görüntüsü (pozitif reaksiyon) b) KMYÇ2 izolatının görüntüsü (negatif reaksiyon)..... 39

Şekil 4. 4. Bakteriyel izolatlara uygulanan oksidaz testleri uygulamasında solda AS1 izolatının oluşturmuş olduğu görüntü (negatif reaksiyon), sağda AS11 izolatının 10 sn içerisinde mavi renk oluşturması (pozitif reaksiyon) 39

Şekil 4. 5. Bakteriyel izolatlara uygulanan katalaz testleri uygulamasında solda AS11 izolatının oluşturmuş olduğu görüntü (negatif reaksiyon), sağda KKÜAÇ11 izolatının 10 sn içerisinde mavi renk oluşturması (pozitif reaksiyon)..... 40

Şekil 4. 6. Bakteriyel izolatlara uygulanan levan testi uygulamasında solda AS11, KKÜAÇ15, AAB1, AZ2064 izolatlarının görüntüsü (negatif reaksiyon), sağda KKÜAÇ11, İF5, AN3, TM2 izolatının konveks, parlak ve kubbemsi levan görüntüsü (pozitif reaksiyon)..... 40

Şekil 4. 7. Bakterilerin arginin dehidrolaz ve eskulin testine verdikleri reaksiyonlar a) arginin dehidrolaz testine tepki veren AS2 nolu izolat pozitif, kontrol ve AN3, Aİ5 nolu izolatlar negatif reaksiyon b) eskulin hidrolizi testine tepki veren KKÜAÇ11, KKÜAÇ5, AS1, AN3 izolatlar pozitif, AS11 nolu izolat negatif reaksiyon 40

Şekil 4. 8. Bakteriyel izolatlara uygulanan, karbon hidratlardan asit üretimi ve sorbitol testlerinin görüntüsü a) erytritol testi uygulamasında Aİ3 izolatı pozitif, Aİ5, KSC, AN5 ve kontrol negatif reaksiyon b) sorbitol testi uygulamasında EZA1, EZA3 nolu izolatlar pozitif, kontrol negatif reaksiyon..... 41

Şekil 4. 9. Bakteriyel izolatlara uygulanan, H2S ve nitrat testinin görüntüsü a) AN11, KYÇ2, KF2, TM10 nolu izolatlar pozitif, kontrol negatif reaksiyon b) Nitrat Testine izolatların vermiş olduğu tepki, AS1 nolu izolatta negatif reaksiyon, AS1 ve ASC3 nolu izolatta pozitif reaksiyon..... 41

Şekil 4. 10. Bakteriyel izolatlara uygulanan jelatin eritme ve florasan pigment üretimi testi a) Cam tüplerdeki ortamın akıcı hale gelmesi pozitif, katı halde kalması ise negatif reaksiyon b) AP3 izolatının KB besiyerinde oluşturmuş olduğu yeşil floresan pigment üretimi (pozitif reaksiyon) 41

Şekil 4. 11. KH23 izolatının tween besiyerinde oluşturmuş olduğu görüntü a) petrinin genel görünüm b) yuvarlak, sarı ve çevresinde temiz haleli kolonilerin görüntüsü (pozitif reaksiyon)..... 42

Şekil 4. 12. KM2 ve SYÇ2 izolatları SCM besiyerinde oluşturmuş olduğu görüntü a) KM2 izolatının petrideki genel görünümü b) SYÇ2 izolatının oluşturmuş olduğu koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler (pozitif reaksiyon) 42

Şekil 4. 13. AS1 izolatının KBZ besi yerinde oluşturmuş olduğu küçük, yassı ve pembe renkli koloniler (pozitif reaksiyon) 42

Şekil 4. 14. Tütün bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu a) KM2 izolatının 48 saat sonra tütünde oluşturduğu reaksiyon, b)KM3 izolatının 48 saat sonra tütünde oluşturduğu reaksiyon 43

Şekil 4. 15. Patojenisite testi sonucunda SYÇ2 kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatının yaprak kenarlarında oluşturmuş olduğu nekrotik lekeler 44

Şekil 4. 16. Patojenisite testi sonucunda TF10 kodlu *Xanthomonas vesicatoria* izolatının yapraklarda oluşturmuş olduğu nekrotik lekeler 44

Şekil 4. 17. Patojenisite testi sonucunda AF2 kodlu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatının domates yapraklarında oluşturduğu ortası kahverengi, etrafı sarı haleli nekrotik lekeler 45

Şekil 4. 18. DNA izolasyonu sonucu %1'lik agaroz jelde bantların görüntüsü 52

Şekil 4. 19. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatlarının MM5F- MM5R primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerin %1'lik agaroz jelde oluşturdukları bantlar; 1: Marker (100bp, Simply), 2: Kontrol (distile su), 3: Pss (referans), 4: KKÜAÇ 13, 5: ADYÇ2, 6: MERYÇ1, 8: IF3 52

Şekil 4. 20. *Xanthomonas vesicatoria* izolatlarının RST9- RST10 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerin %1'lik agaroz jelde oluşturdukları bantlar: 1: kontrol, 2: TF11, 3: KF1, 4: TM10, 5: MRG1, 6: TF10, 7: TF9, 8: KYÇ2, 9: TH10, 10: ASC7, 11: KMYÇ2, 12: KH1, 13: Marker (100bp, Simply). 53

Şekil 4. 22. ISSR 880 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü., 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı 55

Şekil 4. 23. ISSR 834 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı 55

Şekil 4. 24. ISSR 809 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı 56

Şekil 4. 25. ISSR 827 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı 56

Şekil 4. 26. SRAP em7-me9 ve em4-me12 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü., 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı 57

SİMGELER VE KISALTMALAR

^{o}C : Santigrat Derece

dk : Dakika

µl : Mikrolitre

µg : Mikrogram

ml : Mililitre

bp : Baz Çifti

nm : Nanometre

ddH2O: Distile Saf Su

HR : Hipersensitif Yanıt

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

K_2HPO_4: Potasyum Di Fosfat

KOH : Potasyum Hidroksit

$MgSO_4.7H_2O$: Magnezyum Sülfat Yedi Sulu

NACI : Soydum Klolür

$NH_4H_2PO_4$: Amonyum Fosfat

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

TBE : Tris-Borik Asit-Edta

UV : Ultra Viyole

ISTA : International Seed Testing Association

ISSR : inter-simple sequence repeat /Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm

SRAP : Sequence-Related Amplified Polymorphism/ Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm

PBS : Fosfat buffer salin

rpm : Rounds Per Minute (Dakikada Dönüş Hızı)

1. GİRİŞ

Tohum, bitkilerin kültüre alınmalarından bu yana yararlanılan en önemli tarımsal girdilerin başında gelmektedir. Bu sebepten dolayı gelişmiş ülkeler tarımın bu önemli girdisi olan tohum ile ilgili geniş araştırma ve geliştirme çalışmalarına yönelmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sanayisi gelişmiş ülkeler tohum sanayilerini de geliştirerek dünya tohum ticaretinde önemli bir yere ulaşmışlardır. Tohum sektörünün çağdaş anlamda bir endüstri haline gelişi bütün dünya için oldukça yenidir. Yirminci yüzyılda dünya tarımının yaşadığı değişim ve gelişmelerle birlikte tohumculuk faaliyetleri de endüstrideki yerini almaya başlamıştır (Erkan, 1998; Geylani, 2004).

Kaliteli tohum kullanımı, verimi artırmasının yanı sıra daha dayanıklı, daha az maliyetli ve rekabet gücü yüksek ürünlerin elde edilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Bundan dolayı Türkiye'de tohumculuğun daha da gelişmesi için bazı kuruluşlar ile iş birliği yapılmaktadır. Bu kuruluşlardan biri de 1924 yılında kurulan Uluslararası Tohum Test Birliğidir (ISTA=International Seed Testing Association). Türkiye 1963 yılından bu yana ISTA üyesidir. Bu kuruluş Dünya çapında tohum kalitesinin değerlendirilmesi açısından bir standart sağlamak tohumların örneklenmesi ve test edilmesinde uluslararası kabul görmüş kuralları üretmek ve bu konu ile ilgili araştırmaları teşvik etmek amacıyla kurulmuştur (Erkan, 1998; Geylani, 2004).

Sebze tohumu üretimi, tarım sektörü içerisinde en dinamik ve gelişmeye açık alanlardan birisidir. Ülkemizde sebze üretimi 1970'li ve 1980'li yıllarda neredeyse tamamen küçük işletmelerde yapılırken 1990'lardan sonra ise daha büyük boyutlarda üretim yapan işletmeler doğmaya başlamıştır. Üretime bağlı olarak tohum üretimi de artış göstermiştir (Anonim, 2018). Domates, dünyada en çok üretilen, tüketilen ve ticarete konu olan tarım ürünlerinin başında gelmektedir. FAO'nun 2017 yılı verilerine göre dünyada 170 milyon ton domates üretilmektedir. Çin 59 milyon 626 bin tonluk üretimi ile birinci sırada yer alırken Türkiye 12 milyon 750 bin tonluk üretim ile üçüncü sırada yer almaktadır. Domates bitkisi aynı zamanda ülkemizde de sebze üretimi içersinde birinci sırada yer almaktadır. Domates üretimi 2001-2017 yılları arasında %51.33 artmıştır (Anonim, 2018).

Türkiye'de domatesin üretim amacı bölgelere göre farklılık göstermekte ve bu amaçlara göre üretim şekilleri de değişmektedir. Hem örtüaltında hem de açık alanda yetiştirilen domates, ülkemizde sofralık, salça, sos, ketçap, konserve yapımı ve kurutma

amaçlı üretilmektedir. Bu nedenle günümüzde üretimde kullanılan domates çeşitleri de sofralık ve sanayilik olarak iki ayrı grupta toplanmaktadır. Örtüaltında yetiştirilen domateslerin tamamını sofralık çeşitlerden oluşmaktadır. Tarla koşullarında yapılan üretimde ise hem sofralık çeşitler hem de sanayilik çeşitler kullanılmaktadır (Vural ve ark., 2000).

Bölgesel dağılımda Akdeniz Bölgesi %31 ile en büyük paya sahiptir. Bu bölgede serada üretim yaygın olduğu için ağırlıklı olarak sofralık üretim yapılmaktadır. Ege Bölgesi %25 ile ikinci sırada yer alırken, %22 ile Marmara Bölgesi üçüncü sırada gelmektedir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde GAP (Güneydoğu Anadolu Projesi)'tan sonra domates üretimi gelişmiş ve ülke üretiminin %9'unu üretir hâle gelmiştir. Bu üç bölgede ise ağırlıklı olarak açıkta üretim yapılmaktadır. Geri kalan bölgelerin tamamı üretime %13'lük katkı sağlamaktadır (Abak, 2017).

Vitamin ve mineral içeriği açısından zengin olan domates insan beslenmesinde oldukça önemli olmakla birlikte insan sağlığını koruyucu ve iyileştirici etkilere sahiptir (Durmus ve ark., 2018).

Kaliteli tohum, birçok bitkide olduğu gibi domateste de verimi etkileyen en önemli unsurlardan birini oluşturmaktadır. Tohumda bulunan patojenler tohumun kalitesini olumsuz yönde etkilemekte ve verimin azalmasına neden olmaktadır. Domateste tohum ile taşınan birçok fungal, viral ve bakteriyel etmen tespit edilmiştir. Bunlardan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata*, gibi birçok bakteriyel etmen domates tohumları ile bölgeler, ülkeler ve hatta kıtalar arasında bile kolaylıkla taşınabilmektedir (Krttzman, 1991). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* veya *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ile enfekte olmuş tohumlardan elde edilen domates bitkilerinde, hastalık belirtileri gözlemlenebilmekte ve çevresel koşulların uygun olması durumunda ciddi epidemilere yol açabilmektedir.

Bitki bakteri hastalıkları ile etkili ve uygun mücadele stratejilerinin geliştirilebilmesi için patojenin doğru tespit edilmesi gerekmektedir. Bitki hastalıklarının tanısında genellikle hastalık belirtileri, patolojik bulgular ve etmenlerin izolasyonları yanında daha çok immünolojik yöntemler ile teşhise yardımcı olan diğer testlerden faydalanılmaktadır. Ancak kullanılan klasik teknikler ile bazı patojenlerin tanısı uzun zaman almakta ve bazen kesin sonuç vermemektedir. Moleküler yöntemler doğruluk ve hızlılık gibi kriterler açısından diğer yöntemlere göre üstünlük

göstermektedir. Bu sebeple klasik tekniklerin yanı sıra moleküler tekniklerin kullanımı önem arz etmektedir (Baştaş ve ark., 2011).

Bu çalışma ile Türkiye'nin farklı bölgelerinden çeşitli firma ve yerli üreticilerden temin edilen domates tohumlarında bulunan bakteriyel patojenler ISTA'nın belirlemiş olduğu metodlar kullanılarak biyokimyasal ve moleküler olarak tanılanmıştır. Belirlenen en yaygın patojene ait genetik farklılıklar ISSR ve SRAP markerları ile bölgelerimiz ve bazı illerimiz düzeyinde araştırılarak bundan sonra yürütülecek çalışmalara, üreticilere ve araştırıcılara yol göstermesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Domates Bitkisinin (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Botaniksel Tanımı ve Tarihsel Süreci

Domates, Dünyada yetiştiriciliği yapılan en önemli sebzelerden biridir. *Solanaceae* familyası, *Lycopersicon* cinsi, *Solanoideae* alt familyası içerisinde yer alan tek yıllık bir bitkidir (Taylor ve ark., 1986). İsveçli botanikçi Linnaeus, 1753 yılında domates bitkisine *Solanum lycopersicon* adını vermiştir, ancak 15 yıl sonra Philip Miller Linnaean adını *Lycopersicon esculentum* ile değiştirmiştir (Taylor ve ark., 1986). Domatesin anavatanı, Orta ve Güney Amerikadır. İspanyollar 16. yüzyılın başlarında domatesleri Avrupa'ya tanıtmışlardır (Harvey ve ark., 2002). Avrupada domatesin ekili bir ürün olarak kabul edilmesi ve mutfağa dâhil edilmesi nispeten yavaştır. Başlangıçta meyveleri zehirli olduğu sanılarak peyzaj alanlarında süs bitkisi olarak yetiştirilmiştir. Güney Avrupa'da domates 16. yüzyılın ortalarından bu yana yetiştirilip tüketilmekteydi, ancak 18. yüzyılın sonlarına doğru Kuzey-Batı Avrupa'da yaygınlaşmıştır (Harvey ve ark., 2002). Avrupalılar domatesi 17. yüzyılda Çin, Güney ve Güneydoğu Asya'ya, 18. yüzyılda ise Japonya ve ABD'ye götürmüşlerdir (Siemonsma ve Piluek, 1993). ABD'de 19. yüzyılda domates üretimi ve tüketimi hızla artmış ve o yüzyılın sonunda çorbalar, soslar ve ketçap gibi işlenmiş ürünler düzenli olarak tüketilmiştir (Harvey ve ark., 2002). Türkiye'ye gelişi ise 19. yüzyılda Suriye üzerinden olmuş ve ilk olarak Adana ilinde yetiştirilmeye başlanmıştır (Şeniz, 1992; Kaya ve ark., 2018).

Domates, dünyanın en çok tüketilen sebzelerinden biridir. Popüleritesi, taze ve işlenmiş formda tüketilebilmesinden kaynaklanmaktadır (Harvey ve ark., 2002). İnsan beslenmesinde de önemli bir yere sahip olan domates, vücut sistemlerine çeşitli fayda sağlamaktadır. Kalp hastalığı ve kanser riskini azaltmak da dâhil olmak üzere sağlığa birçok faydası olan likopeni içermektedir. Ayrıca besin değeri açısından zengin bir üründür. C vitamini, potasyum, folik asit ve K vitamini kaynağıdır (Anonim, 2019a, 2019b).

Domates bitkisi ekolojik istekler yönünden uygun su tutma kapasitesine sahip ve mineral madde açısından zengin olan topraklarda yetişmektedir. pH aralığı 5,5 - 6,8 olan topraklarda iyi gelişmektedir. Yüksek verim ve birinci sınıf kalite için nispeten serin ve kuru bir iklim gereklidir. Optimum gelişme sıcaklığı 21 ile 24 °C arasındadır. Bitki dokuları 10 °C'nin altında ve 38 °C'nin üzerinde hasar görmektedir. Bu durum polen oluşumunu azaltarak meyve tutumunu olumsuz yönde etkilemektedir (Naika ve ark., 2005).

2.2. Domates Bitkisinin Üretimi ve Ekonomik Önemi

Dünyada 170 milyon ton domates üretilmektedir. Bu üretimin %35,07'lik dilimini Çin oluşturarak ilk sırada yer alırken, ikinci sırada Hindistan üçüncü sırada ise Türkiye bulunmaktadır. Domates üretimi her yıl artmakta olup 2001 yılında 8,5 milyon ton olan üretim 2017 yılında 12 milyon 750 bin tona yükselmiştir. Ayrıca sebze üretimi içersinde de birinci sırada yer almaktadır. Buradan da anlaşılacağı üzere domates ülkemizde üretilen sebzeler içerisinde stratejik bir öneme sahiptir. FAO'nun istatistiklerine göre dünya domates üretim miktarları Çizelge 2.1'de verilmiştir (Anonim, 2018, 2019a, 2019c).

Çizelge 2. 1.Ülkelere Göre 2017 Yılı Domates Üretim Miktarı

Ülke	Üretim miktarı (Ton)
Çin	59. 626. 900
Hindistan	20. 708. 000
Türkiye	12. 750. 000
ABD	10. 910. 990
Mısır	7. 297. 108
İran	6. 177. 290
İtalya	6. 015. 868
İspanya	5. 163. 466

Türkiye sebze üretimi iç pazar ihtiyacını fazlasıyla karşılamaktadır. Bu sebeple üretilen sebzeler dış pazarda değerlendirilmektedir. Akdeniz ihracatçılar birliğinin yayınladığı 2017 yılı raporlarına göre 1.268.000 ton sebze ihracat edilmektedir. Sebze üretiminde birinci sırada yer alan domatesin ihracattaki payı oldukça önemlidir. Ülke ekonomisinde çok önemli bir yere sahip olan domates ekonomiye yaklaşık 12,7 milyar liralık katkı sağlamaktadır (Anonim, 2019d). 2017 yılında 526.100 ton olarak gerçekleşen domates ihracatının toplam sebze ihracatı içerisindeki payı %50 iken, bu oran 1988-1990 yılları arasında %25 olarak gerçekleşmiştir (Alan ve Güvenç, 1992; Güvenç ve Alan, 1994). Bu durum domatesin ihracattaki payının her geçen yıl arttığını göstermektedir.

2.3. Domates Hastalıkları

Domateste hastalık oluşturan birçok fungal, bakteriyel ve viral etmen bulunmaktadır. Fungal etmenler içerisinde; Domates erken yaprak yanıklığı (*Alternaria solani*), Domates mildiyösü (*Phytophthora infestans*), Domates yaprak küfü (*Cladosporium fulvum=Fulvia fulva*), Domateste külleme (*Leveillula taurica*),

Domateste kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), Çökerten ve Kök çürüklüğü (*Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Sclerotinia* spp., *Phytophthora* spp.) bulunmaktadır (Anonim, 2019e).

Viral etmenler içerisinde; Domates mozaik virüsü (*Tomato mosaic tobamovirus ToMV*), Domates sarı yaprak kıvırcıklık virüsü (*Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV*), bulunmaktadır (Anonim, 2019e).

Bakteriyel etmenler olarak ise; Bakteriyel solgunluk (*Ralstonia solanacearum*), *Solanaceae* familyası kültür bitkilerinde stolbur, Domateste bakteriyel kanser ve solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), Domates öz nekrozu (*Pseudomonas corrugata, P. viridiflava, P. cichorii, P. mediterranea, Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora, P. c.* subsp. *atroseptica, Dickeya chrysanthemi*), Domateste bakteriyel benek (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), Bakteriyel leke (*Xanthomonas vesicatoria*) önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Anonim, 2019e).

Domateste tohum ile taşınan bakteriyel etmenler ise; *P. s.* pv. *tomato, P. corrugata, X. vesicatoria* ve *C. m.* subsp. *michiganensis*, *Bacillus polymxa*, *Ralstonia solanacearum*'dir (Krttzman, 1991).

P. syringae pv. *tomato* ve *X. vesicatoria* tohum kabuğunda bulunurken *C. m.* subsp. *michiganensis* tohum zarı veya tohum kabuğundan geçerek tohumun iç kısımlarına kadar ulaşmakta ve embriyoya girememektedir (Patino-Mendez, 1967; Bashan ve ark., 1982; Erkan, 1998).

2.2. Bakteriyal Benek (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* "Okabe" Y. D. & W)

Pseudomonas syringae pv. *tomato*, uygun koşullar olduğunda ekonomik anlamda ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır (Schneider ve Grogan, 1977; Goode ve Sasser, 1980; Yunis ve ark., 1980; Smitley ve McCarter, 1982). Ülkemizde bu hastalık 1970'li yıllardan sonra sorun oluşturmaya başlamıştır (Aysan ve ark., 1995). Yapılan araştırma sonucunda bu hastalığın Doğu Anadolu Bölgesi'nde %20 oranında ürün kaybına neden olduğu (Şahin, 2001), ayrıca Marmara ve Ege Bölgesi'nde de varlığının tespit edildiği bildirilmektedir (Kahveci ve Gürcan, 1993 ; Tokgönül, 1995). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* bir domates serasında %12-23'e kadar varan ürün azalışına neden olabilmektedir (Aysan ve ark., 2005). Bu etmenin uzun yıllar tohum ile taşınabildiği tespit edilmiştir (Devash ve ark., 1980).

Etmen, domates tohumlarının yüzeyinde 20 yıl canlılığını sürdürebilmektedir. Tohumun çimlenmesi sırasında populasyonunu artıran etmen, tohum kabuğundan kotiledon yapraklara geçerek fideyi hastalandırabilmekte ve kotiledon yapraklarda kahverengi lekelerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Bashan, 1982). Etmenin ekonomik anlamda önemli verim kayıplarına neden olan konukçusu domatestir. Ancak biberde de hastalık meydana getirebilmektedir (McCarter ve ark., 1983).

P. syringae pv. *tomato* ilk kez 1929 yılında ABD'de Wisconsin eyaletinde, 1930 yılında Florida'da, 1933'de Japonya'da görülmüştür (Okabe, 1933). 1970'lerin sonlarında hastalığın ilk ciddi epidemisinden bu yana bakteriyel benek hastalığına neden olan bu etmen ile ilgili birçok ekolojik ve epidemiyolojik çalışma yapılmıştır (Schneider ve Grogan, 1977 ; Bonn, 1980 ; Smitley ve McCarter, 1982 ; Bonn ve ark., 1985 ; Bashan, 1986 ; Henis ve Bashan, 1986 ; Lawton ve MacNeill, 1986). Hastalığın optimum gelişme sıcaklığı 13-28°C' dir. Hastalık etmeni yaralardan ve doğal açıklıklardan özellikle stomalardan bitkiye giriş yapmaktadır (Jones ve Pernezny, 1991). Yaprak yüzeylerindeki epifitik *P. syringae* pv. *tomato* populasyonları önemli bir inokulum kaynağıdır (Henis ve Bashan, 1986). Etmenin inokulum kaynakları; tohum, bulaşık toprak, enfekteli bitki kalıntıları ve yabani otlardır (Agrios, 2005).

Hastalığın simptomları, domates bitkisinin toprak üstü aksamlarında lezyonlar halinde olup, yere yakın yapraklardan bitkinin tepesine yakın genç yapraklara ve son olarak da meyveye doğru yayılır. Hastalığın tipik belirtisi 2-5 mm çapında sarı bir hale ile çevrili koyu kahverengi siyah lekelerdir (Schneider ve ark., 1975).

Ana gövde, dallarda ve yaprak saplarında kahverengi-siyah yüzeysel lekeler görülmektedir (Jones ve Pernezny, 1991). Çiçeklerdeki lekeler yapraklardaki kadar belirgin değildir. Ancak ilk çiçeklerde hastalık görülürse çiçek dökümünden dolayı meyve tutumu engellenir, ciddi ürün kayıplarına neden olur (Karaca ve Saygılı, 1977). Meyvenin üzerindeki lezyonlar biraz daha küçüktür, yaklaşık 1 mm büyüklüğünde ve koyu renkli olup, meyve eti içerisine pek girmezler. Meyve üzerinde oluşan lekeler meyvenin küçük kalmasına ve deformasyonuna neden olarak, ürünün pazar değerini düşürmektedir (Schneider ve ark., 1975). Erken enfeksiyonlar da, fideliklerde ciddi zararlara neden olabilmekte ve ayrıca verimde % 13'e varan kayıplara yol açabilmektedir (Schneider ve ark., 1975). İklim koşulları da ürünün verimini önemli ölçüde etkilemektedir. Erken dönem enfeksiyonlarında çevre şartları uygun olduğu takdirde enfekteli bitki oranı %75 iken, mevsim sonunda sıcaklıkların artmasıyla birlikte bu oran %5'e düşmektedir (Yunis ve ark., 1980).

ABD'nin Georgia eyaletinde 1978 yılında 1600 dekarlık bir fidelikte tüm bitkiler *P. syringae* pv. *tomato*'den dolayı imha edilmiştir ve bu olaydan sonra hastalık dikkat çekmeye başlamıştır. Hastalık etmeni domates yetiştiriciliği yapılan bütün ülkelere yayılmıştır (Jones ve ark., 1991). Çin'de 1990'ların sonlarında ortaya çıkan etmen kısa bir sürede ülkenin tamamına yayılmıştır. Tarladaki hastalığın şiddeti % 15 ile % 100 arasında değişmektedir. Genel olarak % 10 ile % 30 verim kayıplarına neden olmuştur (Zhao ve ark., 2001; Wang ve ark., 2015; Deng ve ark., 2008).

Ülkemizde ise ilk kez bu etmenin varlığı 1970'li yıllarda Batı Anadolu Bölgesi'nde ve Akdeniz Bölgesi'nde saptanmıştır (Saygılı, 1975; Çınar, 1977). Etmen Antalya'daki fideliklerde 2002 ve 2003 yıllarında sırasıyla yaklaşık % 20 ve % 25 kayba sebep olmuş ve 2003 yılında 142 ticari serada hastalık şiddeti yaklaşık % 5 olarak tespit edilmiştir. Sera bitkilerinde belirgin epidemiler oluşmadığı için domates üretimi bu etmenden pek etkilenmemiştir (Basım ve ark., 2004).

P. syringae pv. *tomato* gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteri olup, büyüklüğü ise 0.69-0,97 x 1.8-2.8 mµ'dır. KB besi yerinde floresan pigment oluşturan aerobik bir bakteridir. Biyokimyasal testler ile tanımlanması esas olarak, sakroz ortamında levan üretimi, oksidaz reaksiyonu, patates dilimleri üzerinde pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz aktivitesi ve tütün yaprakları üzerindeki aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR) dahil olmak üzere LOPAT(+---+) karakterlerine dayanmaktadır. Ayrıca Bglucosidase, D-sorbitol, D(-) tartrate testlerine pozitif sonuç verirken, Erytritol ve adonitol testine negatif sonuç vermektedir (Schaad ve ark., 2001).

Bereswill ve ark., (1994), bakteriyel benek hastalığının moleküler olarak tanılanmasında PST1 (GGCGCTCCCTCGCACTT) ve PST2 (GGTATTGGCGGGGGTGC) primerleri kullanmışlardır. Zaccardelli ve ark. (2005), $hrpZ_{Pst}$ geninin sekanslarına dayanan 532-bp fragmanı amplifiye eden MM5F (5'-GAACGAGCTGAAGGAAGACA-3') ve MM5R (5'-CAGCCTGGTTAGTCTGGTTA-3') primerlerini bakteriyel benek hastalığını moleküler olarak tanısını yapmak amacıyla kullanmışlardır. Bu gen ($hrpZ_{Pst)}$ hrp/hrc bölgesinin patojenisite ile ilgi bir operonu ile eşleşmektedir. hrp genleri, bazı fitopatojenik bakterilerin hastalığa neden olma ve dirençli bitkilerde aşırı duyarlılık reaksiyonunu (HR) meydana getirme kabiliyetini kontrol etmektedir. Bu genlerin ürünü, tip III salgı yolunu izleyen ve tütün gibi türlerin yaprak dokusunun apoplastına girdiğinde, HR benzeri bir tepki ortaya çıkaran, harpinler adı verilen protein sınıfıdır (Wei ve ark., 1992; He ve ark., 1993; Lindgren, 1997).

Yapılan bir çalışmada *P. syringae* pv. *tomato*'nun zamansal ve coğrafi çeşitliliğini temsil eden yirmi dokuz *P. syringae* pv. *tomato* straini, karbonhidrat kullanımı, bakteriyofaj duyarlılığı, yağ asidi bileşimi ve plazmid profili üzerinde patojenite açısından test edilmiştir. *P. syringae* pv. *tomato* gözlenen fenotipik çeşitliliğin derecesi incelenen özelliğe bağlı olarak; strainlerin patojenite, karbonhidrat kullanımı ve yağ asidi içeriği bakımından benzerdir, ancak bakteriyofaj duyarlılığında ve plazmid profillerinde daha fazla çeşitlilik bulunmuştur (Denny, 1988).

Çemen (2017), Mersin ve Adana illerinde belirti gösteren bitki örneklerinden *P. syringae* pv. *tomato*'nun bakteriyofajlarını izole etmişlerdir. Toplamda 47 adet bakteriyofaj izole edilip saflaştırılmıştır. Elde edilen CMN 33 ve CMN 34 kodlu bakteriyofajların bakteriyel benek hastalığına spesifik olduğunu belirlemiştir.

P. syringae pv. *tomato*'nun 0 ve 1 olmak üzere iki ırkı bulunmaktadır (Lawton ve MacNeill, 1986; Bogatsevska ve ark., 1989). *Pto* geni içeren domates çeşitleri, *P. syringae* pv. *tomato*'nun 0 nolu ırkına karşı dayanıklılık gösterirken (Pitblado ve Kerr, 1979), 1 nolu ırkına karşı dayanıklılık göstermemektedir (Buonaurio ve ark., 1996; Arredondo ve Davis, 2000). Bulgaristan'daki birçok bölgeden toplanan 208 izolatın analizinde, yaygın olarak *P. syringae* pv. *tomato*'nun 0 ırkı (205 izolat) bulunurken, sadece 3 izolatta *P. syringae* pv. *tomato*'nun 1 ırkı olduğu tespit edilmiştir (Stamova ve ark., 1990).

Dayanıklı çeşit geliştirmek amacıyla yapılan son çalışmalarda *Pto* geni domates çeşitlerine aktarılmaktadır ancak ülkemizde sanayi domatesi ekilen alanlarda bakteriyel benek hastalığına neden olan etmenin her iki ırkı da bulunmaktadır (Pitblado ve Kerr, 1979; Buonaurio ve ark., 1996; Aysan, 1999).

Pto geni, domateste bakteriyel benek hastalığının ilerlemesini 1000 kata kadar engellemiştir. *Pto* geni; direnç ile ilişkili olan savunmada rol oynayan reaktif oksijenleri, indüksiyon PR ve HR genlerini içermektedir (Gu ve Martin, 1998).

Ekici ve Bastas (2015) tarafından yapılan çalışmada, *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı dayanıklılık reaksiyonlarını belirlemek için sağlıklı 50 domates çeşidi üzerinde PCR yöntemini kullanarak, *Pto* geninin varlığı SSP17 ve JCP32 primerleri ile belirlenmiş ve 15 domates çeşidinde *Pto* (963 bp'lik fragment) geninin varlığı tespit edilmiştir.

Ünlü ve ark. (2017) Akdeniz Bölgesinde bakteriyel benek hastalık etmenini domates yetiştiriciliği yapılan alanlardan toplamışlardır. Elde edilen izolatlar biyokimyasal olarak tanılandıktan sonra MM5F ve MM5R primerleri kullanılarak

moleküler olarak tanısını yaparak, 10 adet izolat elde etmişlerdir. Elde edilen izolatların genetik farklılıklarını SRAP ve ISSR markırları ile belirlemişlerdir.

P. syringae pv. *tomato* ile mücadele kültürel ve kimyasal olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Kültürel mücadele kapsamında hastalıklı bitki artıklarının yok edilmesi, hastalıksız ve sağlıklı fidelerin kullanılması, sera alanlarının havalandırılması ve aşırı nem birikiminin önlenmesi, hastalıktan ari sertifikalı tohumların kullanımı ve en az bir yıllık ekim nöbetinin yapılması gibi işlemler sayılabilmektedir (Erkılıç ve ark., 1994; Aysan ve Çınar, 2000).

Kimyasal mücadelede ise *P. syringae* pv. *tomato*'nun kontrolü için bakırlı preparatlar ve antibiyotikler önerilmektedir. Türkiye'de bitki patojeni bakterilere karşı antibiyotik kullanımı sonucu dayanıklılık sorununun oluşması, ekonomik bir uygulama olmaması, insan ve çevre sağlığına olumsuz etkilerinden dolayı yasaklanmıştır (Benlioğlu ve Benlioğlu, 1998). Bu etmene karşı genellikle, EBDC (ethylene-bis-dithio-carbamate) grubu fungisitler ve bakırlı bileşikler kullanılmaktadır (McCarter ve ark., 1983; Colin ve Chafik, 1986). Ancak, *P. syringae* pv. *tomato* kısa sürede bakırlı fungisitlere dayanıklılık kazanabilmektedir (Bender ve Cooksey, 1986; Özaktan ve Bora, 1991; Benlioğlu ve Benlioğlu, 1998) ve kazanılan bu dayanıklılık plazmid kökenlidir (Cuppels ve Elmhirst, 1999). EBDC (ethylene-bis-dithio-carbamate) grubu fungisitlerin ise kanserojen olması ve salçada kalıntı sorunu oluşturması nedeniyle birçok ülkede kullanılmamaktadır (Louws ve ark., 2001; Wilson ve ark., 2002).

Bashan ve de-Bashan (2002), bitki büyümesini teşvik edici bir bakteri olan *Azospirillum brasilense*, streptomisin sülfat ve kemotermal tohum muamelesi kombinasyonlarının domateste bakteriyel benek hastalığını azalttığını bildirmişlerdir.

Chambers ve Merriman (1975), *P. syringae* pv. *tomato*'nun asitle fermente edilen tohumda canlı kalamayacağını bildirmiştir. Etmen, 24 saat fermente edilmiş tohumda canlı kalabilmesine rağmen 48 saat fermente edildiğinde hayatta kalmayı başaramamıştır.

Devash ve ark. (1980), tohumun 60 dakika boyunca 52 °C'de ısıl işlem ve 2 dakika boyunca %1 NaCIO ile yüzey sterilizasyonu uygulaması ile patojenden tamamen arındığını bildirmiştir. Tohuma NaCIO uygulaması etkili bir yüzey sterilizasyonu sağlamaktadır (Shoemaker ve Echandi, 1976; Neergaard, 1977; Devash ve ark., 1980). *P. syringae* pv. *tomato*, %70 etanol ve ardından %1 sodyum hipoklorit (NaCIO) ile 30 saniye bekletilip ve steril salinle iyice durulanan tohumdan izole edilememiştir (Bashan ve ark., 1978).

P. syringae pv. *tomato*'nun neden olduğu domateste bakteriyel benek hastalığının kontrolü için altı tohum uygulaması (asit ekstraksiyonu, sodyum hipoklrid, quinone bulamaçları, streptomisin sülfat, buharlı hava, sıcak su) yapılmıştır. Tüm uygulamalar yapay olarak inokule edilmiş domates tohumunun bulaşıklık oranını önemli ölçüde azaltmıştır, buna karşın sadece antibiyotik uygulaması patojenin tam kontrolünü sağlamıştır (Pyke ve ark., 1984).

Öcal (2015), *P. syringae* pv. *tomato* ile inokule edilen tohumlara uygulanan 12 tohum uygulamasının (sodyum hipoklorit, bakır asetat ve streptomisin sülfat) etkilerini belirlemiştir. 50 ^{0}C sıcak su uygulaması bulaşıklık oranını % 100'e kadar azaltmıştır. Diğer başarılı uygulamalar tohumların 1 veya 3 dakika % 0,2'lik bakırasetat, 5 dakika % 2'lik NaOCl'ye batırılması olarak belirlenmiştir.

2.3.Bakteriyel Kanser ve Solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* "Smith" Davis et. al.)

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, domates üretimini kısıtlayan en önemli bakteriyel etmenlerden biridir (Gleason ve ark., 1993). Erwin F. Smith, patojeni ilk olarak *Bacterium michiganense* olarak isimlendirmiş, daha sonra *Aplanobacter michiganense* olarak adlandırmıştır. *Pseudomonas michiganensis*, *Phytomonas michiganensis*, *Erwinia michiganensis* ve *Mycobacterium michiganense* dâhil olmak üzere çeşitli adlandırmalardan sonra, yaklaşık 50 yıl boyunca *Corynebacterium michiganense* ismi kabul edilmiştir (Smith, 1910). 1980'lerde patojenin hücre duvarı yapısı hakkında yeni bilgiler bulununca yeniden sınıflandırılmış ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak isimlendirilmiştir (Gleason ve ark., 1993). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, ilk olarak 1909 yılında ABD'de Michigan eyaletinde domates üretim alanlarında tespit edilmiştir (Gleason ve ark., 1993). 1909 yılından bu yana domates yetiştiriciliği yapılan birçok alanda bu etmenin bulunduğu bildirilmiştir (Strider, 1969). 1945 yılında Doğu Afrika ve 1960 yılında Kuzey Carolina'da %80'nin üzerinde, 1962'de de Kenya'da %60'ın üzerinde önemli ürün kayıplara neden olmuştur (Sherf ve MacNab, 1986). Ülkemizde ise bu etmenin varlığı İç Anadolu'da (Tokgönül, 1998) ve Güney Doğu Anadolu, Marmara ve Ege bölgelerinde tespit edilmiştir (Bremer ve Özkan, 1950; Karahan, 1965; Karaca ve Saygılı, 1977). Daha sonra Doğu Akdeniz, Batı Akdeniz ve Doğu Anadolu bölgelerinde yapılan çalışmalarda bu etmenin varlığı domates üretim alanlarında belirlenmiştir (Çınar, 1980; Şahin ve ark., 2002; Basim ve ark., 2004).

C. michiganensis subsp. *michiganensis*, hastalıklı toprak, bitki artıkları, bulaşık tohumlar, yabancı otlar, alet ve ekipmanlarda yaşamını sürdürebilmektedir (Blancard ve ark., 1993). Patojenin en önemli inokulum kaynağı ise tohumdur. Tohumda %0,01-0,05 bulaşıklık oranı bile tarlada ciddi epidemilerin oluşmasına neden olabilmektedir (Chang ve ark., 1991). Domates bitkisinin erken dönemi bu etmene karşı oldukça hassastır. Nemli ve sıcak havada hastalık şiddeti artabilmektedir (Chang ve ark., 1991). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, EPPO tarafından A2 karantina zararlıları olarak listelenmiştir (Anonim, 2019f).

Patiño-Méndez (1967), etmenin tohum zarı veya tohum kabuğundan geçerek tohumun iç kısımlarına kadar ulaştığını fakat embriyoya girmediğini saptamıştır. Ayrıca etmenin yüzeysel olarak tohuma bulaşabildiği ve buradan kotiledon yapraklara daha sonrada vasküler sisteme ulaşabildiği bilinmektedir (Özaktan ve Bora, 1991).

Bakteriyel kanser hastalığının belirtileri patojenin giriş yoluna göre farklılık göstermektedir. Patojen tohum veya bitki bünyesinde açılan yaralar aracılığı ile bitkiye girmişse sistemik enfeksiyonlara, doğal açıklıklardan bitkiye girmişse nekroz ve yaprak lekesi gibi lokal enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Lokalize enfeksiyonlar ayrıca vasküler demetlere ilerleyerek belirli koşullar altında sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Yaprak kenarlarındaki nekrozlar sıklıkla lokal enfeksiyonların erken bir belirtisidir. Alt yaprak kenarlarındaki nekrozlar 'Yanmış faz' olarak isimlendirilmektedir. Nekrotik sınır zamanla genişleyerek yaprak, yaprakcık ve tüm sapların kurumasına neden olabilimektedir (Gleason ve ark., 1993).

Etmenin tipik belirtisi tek taraflı sürgün ve yaprakçıklarının sistemik olarak solması veya renk değişimi şeklindedir. Bitkinin genç döneminde meydana gelen enfeksiyonlarda bitki solar ve çöker, yaşlı bitkilerde ise hastalık seyri daha yavaş ilerler ve iletim demetleri sarımsı bir hal alır daha sonra kahverengine döner ve çatlamalar meydana gelir (Gartemann ve ark., 2003).

Etmen, meyvelerin eşit şekilde olgunlaşmamasına ve olgunlaşmadan meyvelerin dökülmesine neden olmaktadır. Meyvelerde oluşturduğu belirti 'Kuş Gözü' olarak isimlendirilmiştir. Başlangıçta kabarık ve beyaz olan bu lekeler, zamanla merkezi açık kahverengi olan etrafı beyazımsı bir hale ile çevrelenir (Yıldız ve Aysan, 2007).

Etmenin optimum gelişme sıcaklığı 26 ^{o}C'dir. Beyaz, pembe veya sarı koloniler oluşturan etmenin en virülent olanları sarı renkli kolonilerdir (Sherf ve MacNab, 1986).

C. michiganensis subsp. *michiganensis*'in tanılanması ve karakterizasyonu için bir takım yöntemler geliştirilmiştir. Biyokimyasal testlerin yanı sıra, PCR, ELISA ve

BIOLOG'a dayanan daha hızlı yöntemler kullanılmaktadır (Kaneshiro ve ark., 2006). Biyokimyasal testler ile tanısında; gram reaksiyon, glukoz metabolizması, katalaz aktivitesi, oksidaz testi, levan oluşumu, aesculin hidrolizi, nişasta hidrolizi, kazein hidrolizi, H_2S üretimi, mannozdan asit üretimi ve mannitol ve karbon kaynağı olarak sodyum asetat kullanılmaktadır (Lelliott ve Stead, 1987; Schaad ve ark., 2001).

PCR testi ile *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının tanılanması amacıyla CMM-5 (GCGAATAAGCCCATATCAA) ve CMM-6 (CGTCAGGAGGTTCGCTAATA) primer çifti Louws ve ark. (1998) tarafından, CM3 (CCTCGTGAGTGCCGGGAACGTATC) ve CM4 (CCACGGTGGTTGATGCTCGCGAGAT) primer çifti Sousa ve ark. (1997) tarafından, PSA-4 (TCATTGGTCAATTCTGTCTCCC) ve PSA-R (TACTGAGATGTTTCACTTCCCC) Pastrik ve Rainey (1999) tarafından geliştirilmiştir.

Omer (2002), hastalığın simptomları görülmeden bile BİO-PCR testi ile patojenin varlığını tespit edebilmiştir. Hadas ve ark. (2005), BIO-PCR tekniği ile 10.000'de 1 enfekteli tohumun saptanabileceğini bildirmişlerdir.

Jahr ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'in patojenik özelliklerinin *pat*-1 (1500 nükleotitlik bölge) gen bölgesinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu gen bölgesine sahip olan izolatlar virülent olarak sahip olmayanlar ise avirülent olarak tanımlanmıştır.

Baysal ve ark. (2010), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarını biyokimyasal olarak tanıladıktan sonra spesifik bir primer olan PSA-4 ve PSA-R'yi kullanarak PCR amplifikasyonu ile de doğrulamışlardır. Tanısı yapılan *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* strainlerini yüksek polimorfizm gösteren ISSR markerları ile karakterize etmişlerdir.

Patojenin inokulum kaynakları hastalıklı bitki artıkları, yabancı otlar, bulaşık odun parçaları ve tohumlardır (Gitaitis ve ark., 1989). Patojen toprakta 2,5-5 yıl, bitki artıklarında ise 10 ay canlı kalabilmektedir (Sherf ve MacNab, 1986).

C. michiganensis subsp. *michiganensis*'e karşı uygulanabilecek herhangi bir kimyasal mücadele yoktur. Bakırlı preparatlar %50 oranında hastalığı azaltabilmektedir. Tohumların 54-56 ^{o}C'de 20 dk suda tutulması durumunda tohumdaki patojeni elemine edilebilmektedir (Özaktan ve Bora, 1991). Son dönemlerde yapılan çalışmalarda bazı maddelerin *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine bazı antibakteriyel etkileri belirlenmiştir. Polen ve propolis ekstraktı, kekik türlerinden elde edilen uçucu yağlar

patojene karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Kızıl ve ark., 2005 ; Basim ve ark., 2006).

C. michiganensis subsp. *michiganensis* ile doğal olarak enfekte olmuş domates tohumları, 5 saat boyunca 0,6 M HCI'de, 20 dakika boyunca %0,25 veya %0,50 asitlendirilmiş bakır asetat içinde, 52 °C'de 20 dakika ve 56 °C'de 30 dakika boyunca suda bekletilmiştir. İşlemlerin çoğu, domates tohumlarındaki saprofit bakteri florasını azaltmıştır. İşlem görmüş tohumun çimlenme yeteneği, çimlenme testine göre değişmiştir. Kurutma kâğıdı testinde, 56 °C'deki su hariç *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'yi ortadan kaldıran tüm bireysel tedaviler, çimlenmeyi önemli ölçüde azaltmıştır. Buna karşılık, sadece HCI uygulaması buharla sterilize edilmiş toprağa (UC toprak karışımı) ekilen tohumların çimlenmesini önemli ölçüde azaltırken sıcak su ile muamele edilmiş tohum (52 °C 20 dakika boyunca) herhangi bir uygulama görmemiş tohumlardan daha yüksek bir oranda çimlenmiştir (Fatmi, 1991).

Basim ve Basim (2013), içerisinde *Xanthomonas vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* bulunan 13 farklı patojene *Liquidambar orientalis* yağını domates tohumlarına %5, 10 ve 20 konsantrasyonlarında uygulamışlar ve hastalığı tamamen baskıladığını bildirmişlerdir.

2.4. Bakteriyel leke (*Xanthomonas vesicatoria* "Doidge " Dye)

Xanthomonas vesicatoria ticari olarak domates ve biber yetiştirilen birçok alan görülebilmektedir (Stall ve Civerolo, 1993). Sıcaklık ve nemin yüksek olduğu durumlarda domates ve biber yetiştirilen birçok alanda önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. İlk olarak Doidge (1921) tarafından Güney Afrika'da bulunan etmen *Bacterium vesicatorium* olarak tanımlamıştır. Gardner ve Kendrick (1923) ise ABD'de benzer bir organizma tanımlamış ve bunu *Bacterium exitiosu* olarak adlandırmıştır. Daha sonraki isimlendirmeler, Dowson (1939) tarafından *Xanthomonas vesicatoria* ve Dye (1978) tarafından *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* olarak adlandırılmıştır. Her iki konukçu bitkide yaprak lekesine neden olan etmenin sınıflandırılması zor olmuştur. İlk sınıflandırmalarda bir süre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Dye, 1978) olarak sınıflandırılarak fenotipik ve filogenetik açıdan gruplara (A,B,C,D grupları) dahil edilmişlerdir. A ve C gruplarına *Xanthomonas axonopdis* pv. *vesicatoria'*ya dahil edilirken, B grubuna *X. vesicatoria* dahil edilmiştir (Vauterin ve ark., 1995 ; Jones ve ark., 2000). Ülkemizde ise patojen Karaca ve Saygılı (1982) tarafından Çanakkale bölgesinde tespit edilmiştir.

Etmen, gram negatif, 0.6-1.0- 1.5 µm büyüklüğünde çubuk şeklindedir. Nutrient agarda sarı koloniler oluşturan etmen King B'de flouresan pigment oluşturmamaktadır. Katalaz testi, H_2S üretimi, levan oluşumu için pozitif, oksidaz testi, KOH ve nişasta hidrolizi için negatif reaksiyon vermektedir. Optimum gelişim sıcaklığı 25-30 ^oC'dir (Schaad ve ark., 2001).

Leite ve ark. (1994), *hrp* genleri için RST 9 (5'GGCACTATGCAATGACTG3') ve RST 10 (5'AATACGCTGGAACTGCTG3') primerleri kullanılarak *X. vesicatoria*' nın 355 bp'de spesifik bir bant elde etmişlerdir.

Beran ve Mráz (2013), *X. vesicatoria*'nın tespiti için bir PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Primer çifti XV1F (5'CAGTCCTCCAGCACCGAAC'3) ve XV1R (5'TCTCGTCGCGGAAGTACTCA'3), ATP sentez geninin *atpD* katalitik alt biriminin kısmi DNA dizisine dayanarak tasarlanmış ve özellikle domates ve biber için çeşitli bakteri koleksiyonu kullanılarak test edilmiştir. PCR koşullarının optimizasyonundan sonra, 365 bp büyüklüğünde bir fragment yalnızca *X. vesicatoria* bant oluşturmuştur.

X. vesicatoria bitkinin tüm toprak üstü organlarında belirti oluşturmaktadır. Yapraklarda oluşturmuş olduğu belirtiler nem oranın yüksek olduğu koşullarda meydana gelmektedir. Etmenin yapraklarda oluşturduğu belirtiler küçük kahverengi ve köşelidir. Genellikle *P. syringae* pv. *tomato*'nun simptomları ile karıştırılabilmektedir ancak *X. vesicatoria'*nnı oluşturmuş olduğu belirtiler daha büyük ve düzensizdir. Ağır nemli koşullarda tipik simtoplarından ziyade bitkilerde yanmış bir görünüm oluşturmaktadır. Meyvelerde oluşturmuş olduğu belirtiler başlangıçta suyla ıslanmış gibidir, sonrasında lekeler kahverengi uzunumsu, kabarık bir hal alır (Waddill ve ark., 1986 ; Cuppels ve ark., 2006; Anonim, 2019g).

X. vesicatoria bitki artıkları, toprak ve tohumda canlılığını sürdürebilmektedir. Domates tohumlarında 20 yıl canlı kalabilmektedir (Bashan, 1982). Etmen doğal açıklık (stoma, hidadot) ve yaralardan giriş yapmaktadır (Bonas ve ark., 2000).

X. vesicatoria'nın neden olduğu bakteriyel leke hastalığı, Hindistanın Karnataka eyaletinde yapılan tarla araştırması sırasında incelenmiştir. *X. vesicatoria*, %22 ile %50 oranlarında zarar meydana getirmiştir. Aynı çalışmada antagonistik *Pseudomonas fluorescens*'ın tohuma uygulanması laboratuar koşullarında tohum kalitesini iyileştirmiş ve tarladaki bakteriyel leke hastalığının miktarını azaltmıştır. 20 domates çeşitinde test edilmiş bazı çeşitlerde, herhangi bir uygulama yapılmamış kontroldeki hastalık oranı

%60 ile %70 iken uygulama yapılanlardaki oran %20-30'a kadar düşmüştür (Kavitha, and Umesha, 2007).

Biber ve domates tohumlarında *X. vesicatoria* ve *P. syringae* pv. *tomato*'nun tohum testlemesi için bir şema geliştirilmiştir. Sıvı zenginleştirme ve yaprak zenginleştirme tekniği kullanılarak sırasıyla her bir gram tohum başına 1000 ve 10-100 koloni tespit edilmiştir. Tohum yüzeylerindeki nispeten büyük miktarlardaki saprofit, patojenlerin saptanmasına müsaade etmemiştir (Bashan ve Assouline, 1983).

Domates tohumları, bakır asetat, asetik asit, pentakloronitrobenzen, 5-etoksi3 (triklorometil) -l, 2,4 tiadiazol ve Triton x içeren bir çözeltiye batırılmıştır. *P. syringae* pv. *tomato*, *X. vesicatoria* ve *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, tohumların 25 °C'de 30 dakika çözeltide bekletilmesinden sonra neredeyse yok edilirken, *Pseudomonas corrogata* ise 45 °C'de 1 saatlik bekletmeden sonra kontrol edilmiştir. Muamele tohum çimlenmesini veya fide canlılığını etkilememiştir (Kritzman, 1993).

2.5. Domates Tohumlarında Bakteriyel Patojenlerin Tespiti ve Tanılanması

Bryan (1930) domates tohumlarını direkt yarı katı besi ortamına ekerek test etmiştir. Ark (1944) ile Grogan and Kendrick (1953) tohumları sera veya tarla toprağına ekerek çıkış yapan fidelerdeki hastalık belirtilerini gözlemişlerdir.

Gitaitis (1989), ticari domates tohumlarındaki bakteriyel patojenleri belirlemek amacıyla yapmış olduğu bir çalışmada CNS besi yerini modifiye ederek 10^2 hücre/ml yoğunluğundaki bakterileri izole etmişlerdir.

Hadas ve ark. (2005), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 'in tespitinde kullanılan çeşitli tohum ekstraksiyon prosedürlerini değerlendirmişlerdir. Tohumların öğütülmesini içeren ekstraksiyon yöntemleri patojeni saptamada suda bekletme yönteminden daha iyi bulunmuştur. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'in belirlenmesi için CNS (semi-selective medium), mSCM (Modified Semiselective Medium) ve D2ANX yarı seçici besiyerlerini kullanmışlardır ve Bio-PCR ile doğrudan tespit etmişlerdir. 10 000 tohumdan bir tanesinin bile *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ile enfekteli olduğu numunelerde tespit edilebilmiştir. Beş tekerrürlü olarak gerçekleştirilen çalışmanın bir tekerrüründe *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* tespit edilmiştir. 10 000 tohumdan 5 ve 10 tane tohumun enfekteli olduğu durumda ise beş tekerrürden sırasıyla üç ve beş tanesinde *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* tespit edilmiştir.

Abdalla (2000), domates tohumlarındaki bakterilerin tespiti için sıvı tahlil yöntemini kullanmış ve tohum ekstraktlarını farklı yarı seçici besiyerlerine kaplamıştır. *Pseudomonas corrugata* ve *Xanthomonas vesicatoria* sırasıyla numunelerin %14,7 ve %12'sinde tespit edilmiştir. Bu patojenleri biyokimyasal, fizyolojik, patojenite testleri ve Biolog GN Mikroplaka Sistemi ile tanılamıştır. *Pseudomonas corrugata* ve *Xanthomonas vesicatoria*'yı Tween B ve CKTM ortamlarında diğer ortamlardan daha kolay tespit etmiştir.

Geylani (2004), Ege bölgesinde yapmış olduğu bir tez çalışmasında domates tohumu ile taşınan bakteriyel patojenleri tespit etmiştir. Çalışmada 12 gr domates tohumu örneğini 200 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) içerisine koyup 4 ^{o}C'de 4 saat bekletip ardından 3 saat süresince 20 ^{o}C'de çalkalamıştır. 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edildikten sonra pellet alınmıştır. Pellet 1 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) ile sulandırılıp 1:10 oranında iki kez seyreltmiştir. Süspansiyondan 50 µl alıp SCM (Semiselective Medium) besiyerine yaymıştır. Elde ettiği *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas vesicatoria* izolatlarını biyokimyasal testler, immunufluorescence boyama (IFAS) testi ve PCR ile tanısını yapmıştır.

Miller ve ark. (2017), domates tohumlarından *Xanthomonas* spp. tespit etmek için 10 000 tohum içeren numuneler kullanmışlardır. Her 1 g tohum için 3 ml PBS-tween (Phosphate Buffered Saline-Tween) solüsyonu kullanarak, min. 14 saat 4 ^{o}C bekletmişlerdir. En az 7 dk stomacher makinesinde bekletilmiştir. 10 kez seyreltme serisinden sonra 100 µl alınıp mTMB (modifiye edilmiş Tween B) ve CKTM besiyerlerine yaymışlardır. Elde edilen *Xanthomonas* spp. izolatlarını RST65/RST69 primerlerini kullanarak tanılamışlardır.

Randhawa ve ark. (2017), domates tohumlarında *P. syringae* pv. *tomato*'yu tespit etmek için 3 tekerrürlü olarak 10 000 tohum örneği kullanmışlardır. Tohum örneklerine 200 ml MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) buffer eklenerek gece boyunca 4 ^{o}C'de bekletmişlerdir. Daha sonra öğütülen örnekler 1:0 ve 1:10 oranında seyreltildikten sonra 100 µl alıp KB (King B) ve KBC (modifiye edilmiş King B) besiyerlerine yaymışlardır. Florasan parlama, oksidaz, HR, real time PCR ve BIO-PCR ile tanısını yapmışlardır.

Fatmi ve ark. (2017), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* izolasyonu için 24 gr domates tohumu örneği kullanmışlardır. Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen izolasyonda tohumlar plastik poşetlere yerleştirerek içerisine 150 ml 4 ^{o}C'de bekletilmiş 0,05M PBT (Phosphate Buffered Tween) eklemişlerdir. Daha sonra Stomacher

makinasında 15 dk bekletilmiştir. Her bir örnekten 60 ml toplanmış ve 10 000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Pellete 0.05 MPB (Column Preparation Buffer) eklenerek yeniden süspanse edilmiştir. Süspansiyondan 100 µl alıp SCM (Semiselective Medium) ve mSCM (Modified Semiselective Medium) besiyerlerine yaymışlardır. Her bir besi yerindeki izolasyonlar yıkanıp 1.5ml 'lik tüplere aktarmışlardır. Elde edilen izolatların biyokimyasal ve PCR testleri ile tanısı yapılmıştır.

Schaad ve ark. (2001)'a göre *P. syringae* pv. *tomato* KOH, oksidaz, KB, arginin dehidrolaz, 37 ^{o}C'de gelişim, buz çekirdeği, erytritol, L(+) tartarate ve adonitol testlerine negatif reaksiyon verirken, levan oluşumu, sorbitol, insitol, D-mannito testlerine pozitif reaksiyon vermektedir. *Xanthomonas vesicatoria* esculin hidrolizi, H_2S testi, 37 ^{o}C'de gelişim, YDC (Yeast extract-dextrose-$CaCO_3$) besiyerinde pozitif reaksiyon verirken, KOH ve oksidaz testine negatif reaksiyon vermektedir. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* KOH, katalaz, SCM (Semiselective Medium), TTC (Motility Agar) ve esculin testlerine pozitif reaksiyon verirken, sorbitol ve ınulin testlerine negatif reaksiyon vermektedir (Schaad ve ark., 2001).

Bu tez çalışmasında önceki çalışmalar ve ISTA'nın belirlemiş olduğu yöntemler göz önünde bulundurularak domates tohumu ile taşınan bakteriyel patojenlerin tespiti sağlanmıştır. Genellikle Türkiyede yapılan birçok çalışmada domates tohumları belirli bir bölge veya illerden elde edilerek patojenler tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden 10 farklı ilden temin edilen tohumlardaki patojenlerin tespiti sağlanarak daha geniş çapta bir araştırma yapılmıştır. Aynı zamanda elde edilen en yaygın patojen *Xanthomonas vesicatoria*'nın karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada domates tohumlarından elde edilen *Xanthomonas vesicatoria*'nın ISSR ve SRAP markırları ile genetik farklılıklarının belirlenmesi bir ilki oluşturmaktadır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme Materyali

Çalışmanın ana materylini oluşturan domates tohumları, Türkiye'nin farklı bölgelerini temsil eden 10 farklı ilimizden, çeşitli firmalardan ve yerli üreticilerden temin edilmiştir. Çalışmada 30 farklı çeşitten toplam 50 tohum örneği kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Temin Edilen ve Bakteriyel Hastalıklar Açısından İncelemesi Yapılan Domates Tohumlarına Ait Özellikler

	TOHUMUN TEMİN EDİLDİĞİ İL	No	ÇEŞİT ADI	ÇEŞİTLERİN KODLARI	MEYVE ÖZELLİKLERİ	KULLANIM ALANI	BİTKİ YAPISI
Akdeniz Bölgesi	Antalya	1	Z 2064 F1	AZ2064	Orta irilikte yuvarlak şekilli, kalın etli	Sanayi tipi	Sırık
		2	HEİNZ 9661	AH9661	Orta irilikte yuvarlak şekilli, kalın etli	Sanayi tipi	Sırık
		3	HEİNZ9780	AH9780	Meyvesi köşeli, sıkı, kalın etli	Sanayi tipi	Sırık
		4	21708 TASACO	AT21708	Meyve şekli silindirik elongate tipindedir	Sofralık	Oturak
		5	AB8058 F1	AAB	Kare-Oval	Salçalık	Oturak
		6	Falcon	AF	Yuvarlak	Sofralık	Oturak
		7	Cherry	AC	Kiraz	Sofralık	Sırık
		8	Rio Grande	ARG	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
		9	Köy Tipi- Yayla	AKTY	Kırmızı-pembe renkte, dilimli ve etli		Yarı sırık
		10	SC2121	ASC	Hafif basık, yuvarlak	Sofralık	Oturak
		11	Nuran	AN			
		12	H2274	AH	Çok hafif uzun, yuvarlak	Sofralık Salçalık	Oturak
		13	Sırık	AS	Kırmızı-pembe renkte, dilimli ve etli	-	Yarı sırık
		14	Pembe	AP	Kırmızı-pembe renkte, dilimli ve etli	Sofralık	Yarı sırık
	Adana	15	Yerli Çeşit	ADYÇ	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
	Mersin	16	Yerli Çeşit	MERYÇ	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
İç Anadolu Bölgesi	Konya	1	Kendi Üretim Aday Çeşit (KÜAÇ)	KKÜAÇ	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
		2	Yerli Çeşit	KYÇ	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
		3	Sevindik İlçesi- Yerli Çeşit	KSYÇ		Sofralık	-
		4	H2274	KH	Çok hafif uzun, yuvarlak	Salçalık	Oturak
		5	Meram-Yerli Çeşit	KMYÇ	Yuvarlak		Oturak
		6	Falcon	KF	Yuvarlak	Sofralık	Oturak
		7	Rio Grande	KRG	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
		8	SC2121	KSC	Hafif basık, yuvarlak	Sofralık	Oturak
		9	MSC50	KMSC	Meyveler iri, hafif basık, orta sertlikte ve kırmızı renkte	Sofralık	Oturak
		10	Köy Tipi	KKT	Kırmızı-pembe renkte, dilimli ve etli	Sofralık	Yarı sırık
		11	Yerli Çeşit	KYÇ	Yuvarlak	Sofralık	Sırık
Ege Bölgesi	İzmir	1	SC2121	İSC	Hafif basık, yuvarlak	Sofralık	Oturak
		2	H2274	İH	Çok hafif uzun, yuvarlak	Salçalık	Oturak
		3	Falcon	İF	Yuvarlak	Sofralık	Oturak
		4	Rio Grande	İRG		Salçalık	
Marmara Bölgesi	Balıkesir	1	H2274	BH	Çok hafif uzun, yuvarlak	Sofralık, Salçalık	Oturak
		2	İnvictus	Bİ	Yuvarlak	Sofralık	Oturak
		3	Narcan	BN	Yuvarlak	Sofralık	Oturak
		4	Sc2121	BSC	Hafif basık, yuvarlak	Sofralık	Oturak
		5	Rio Grande	BRG	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
		6	Ancon	BA	Yuvarlak	Sofralık	Oturak
		7	Toro F1	BT			
Doğu Anadolu Bölgesi	Malatya	1	H2274	MH	Çok hafif uzun, yuvarlak	Sofralık, Salçalık	Oturak
		2	Cherry	MC	Kiraz	Sofralık	Sırık
		3	Rio Grande	MRG	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
	Iğdır	4	Yıldız	IY	Basık | Dilimli Meyve	-	Yarı sırık
Karadeniz Bölgesi	Tokat	1	Didem	TD	İri yuvarlak meyveli, sert , parlak kırmızı renkte	Sofralık	-
		2	Menemen	TM	Hafif basık yuvarlak	Sofralık	-
		3	İnvictus	Tİ	Yuvarlak	Sofralık	Oturak
		4	H2274	TH	Çok hafif uzun, yuvarlak	Sofralık, Salçalık	Oturak
		5	SC2121	TSC	Hafif basık, yuvarlak	Sofralık	Oturak
		6	Rio Grande	TRG	Yuvarlak	Salçalık	Oturak
		7	Falcon	TF	Yuvarlak	Sofralık	Oturak
	Samsun	8	Yerli Çeşit	SYÇ	Yuvarlak	Sofralık	Sırık

3.1.2. Denemede Kullanılan Kimyasal, Alet ve Ekipmanlar

Denemede kimyasal olarak; N,N,N',N'- Tetrametilenetilendiamin (Merck), SDS (Sodyum Dodesil Sülfat-Sigma), Tris (Merck), HCI (Merck), EDTA (Ethylenediaminetetracetic- Merck) , Esculin (Merck), Borik Asit (Merck), Proteose Pepton (Oxoid), Ethidium Bromür (Fluka), PCR Master Mix (Fermantas), Glycerol (Merck), Agar (Merck), Peptone (Hımedia), Potasyum Broide (Merck), Tween 80 (Merck), K_2HPO_4 (Merck), $MgSO_4$ (Merck), Cycloheximide, Paraosanilin (Merck), Sucrose (Merck), Yeast Extract (Oxoid), KH_2PO_4 (Merck), $MgSO_4.7H_20$ (Merck), Potassium Tellurite (Aldrıich), NaOH (Merck), Nalidixic Asit (Sigma), KOH (Merck), NaCI (Merck), Ferric amonium citrate (Sigma), NH_4H_2PO (Merck), cystein hydrocloride (Merck), kurşun asetat (Merck), brom cresol purple (Sigma), PBS (Sigma), Agarose jel (SeaKem), TBE buffer, $MgCl_2$, dNTPs, PCR buffer, TaqDNA polymerase, DNA marker (100 bp-Simply), Erytritol (Fluka) ve Sorbitol (Fluka) kullanılmıştır.

Denemede alet ve ekipman olarak; pH metre (Sentix), Eppendorf Mikropipet (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl- Eppendorf), Hassas terazi (Precisa), Eppendorf tüpler (1.5 ml ve 2 ml), Qiagen DNA izolasyon robotu, NanoDrop (Eppendorf), BioPhotometer (Eppendorf), Pipet uçları (0.5 µl, 5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl), Termal Cycler (Eppendorf Mastercycler Personal), Yatay Elektroforez Tankı (Thermo), Termal Cycler (Eppendorf), Vorteks (WiseMix), Isı Bloğu (Techne), Jel Görüntüleme Sistemi (Priz,ma Quantum), Santrifüj (WiseSpin), inkübatör (Nüve), Laminar kabin (Nüve), Çalkalayıcı (Heidolph) ve Güç Kaynağı (Thermo) kullanılmıştır.

3.1.3. Bakteriyel izolatlar

Denemelerde kullanılan referans bakteriyel izolatlar S.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Bakteriyoloji Laboratuarı Kültür Koleksiyonundan elde edilmiştir. Bu amaçla; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (PssK26), *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (PspS2), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap31), *Xanthomonas vesicatoria* (RGS3), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (YA1- Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Prof. Dr. Yeşim AYSAN) denemelerde kullanılmıştır.

3.1.4. Denemelerde kullanılan PCR primerleri

Domates tohumlarından izole edilen bakteriyel patojenlerin tanılanması ve karakterizasyonunda kullanılan PCR primerlerinin baz dizilimi, oluşturdukları fragment büyüklükleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Domates tohumlarından izole edilen bakteriyel patojenlerin tanılanması ve karakterizasyonunda kullanılan PCR primerleri ve özellikleri

Patojen/Marker	Primer İsmi	DNA Dizilimi	Büyüklüğü (bp)	Referans
Pseudomonas syringae pv. *tomato*	MM5F MM5R	GAA CGA GCT GAA GGA AGA CA CAG CCT GGT TAG TCT GGT TA	532	Zaccardelli ve ark., 2005
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*	CMM-5 CMM-6	GCGAATAAGCCCATAATCAA CGTCAGGAGGTCGTAATA	614	Dreir ve ark., 1995; Sousa ve ark., 1997; Burokienė, 2006
Xanthomonas vesicatoria	Rst-9 Rst-10	GGC ACT ATG CAA TGA CTG AAT ACG CTG GAA CTG	355	Louws ve ark., 1999
ISSR	809	GAGGAGAGAGAGAGAGG	-	Ünlü ve ark., 2017
ISSR	827	ACACACACACACACACG	-	Ünlü ve ark., 2017
ISSR	834	AGAGAGAGAGAGAGAGCTT	-	Ünlü ve ark., 2017
ISSR	889	AGTCGTAGTACACACACACACAC	-	Ünlü ve ark., 2017
ISSR	731	CCCACACCAC	-	Ünlü ve ark., 2017
ISSR	112	AGAGGGCACA	-	Ünlü ve ark., 2017
ISSR	880	GGAGAGGAGAGGAGA	--	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em10-me4	GAC TGC GTA CGA ATT CAT TGA GTC CAA ACC GGA CC	-	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em10-me9	GAC TGC GTA CGA ATT CAT TGA GTC CAA ACC GGA GG	-	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em7-me9	GAC TGC GTA CGA ATT CAA TGA GTC CAA ACC GGA GG	-	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em7-me8	GAC TGC GTA CGA ATT CAA TGA GTC CAA ACC GGA CT	-	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em4-me12	GAC TGC GTA CGA ATT TGA TGA GTC CAA ACC GGA GA	-	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em10-me11	GAC TGC GTA CGA ATT CAT TGA GTC CAA ACC GGA AC	-	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em4-me11	GAC TGC GTA CGA ATT TGA TGA GTC CAA ACC GGA AC	-	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em4-me4	GAC TGC GTA CGA ATT TGA TGA GTC CAA ACC GGA CC	-	Ünlü ve ark., 2017
SRAP	em11-me12	GAC TGC GTA CGA ATT CTA TGA GTC CAA ACC GGA GA	-	Ünlü ve ark., 2017

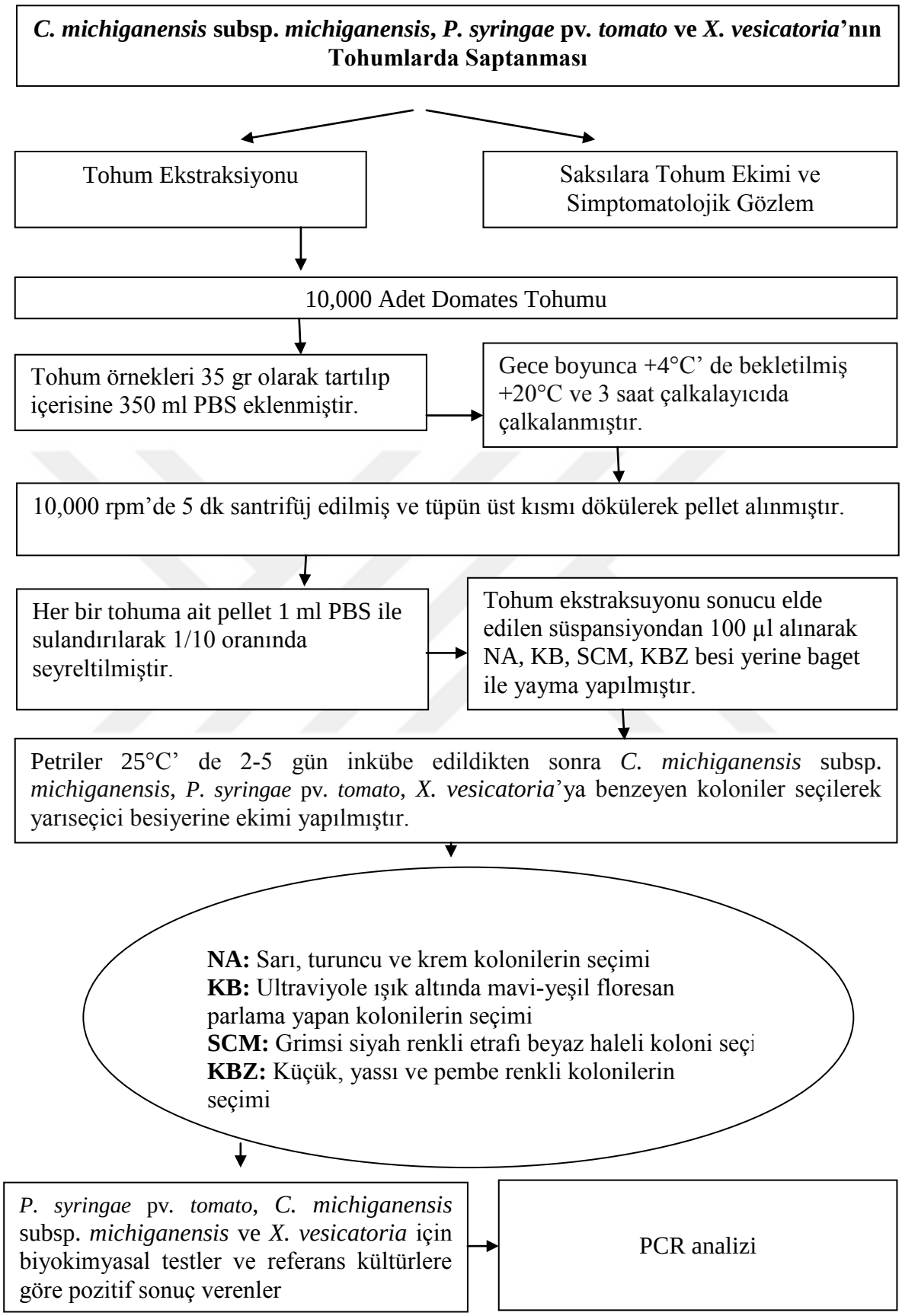
3.2. Metot

3.2.1. Bakteriyel patojenlerin tohumlardan izolasyonu

Tohumlardan *P. syringae* pv. *tomato*, *C. m.* subsp. *michiganensis*, ve *X. vesicatoria*'nin izolasyonu için ortak bir yöntem olarak Miller ve ark. (2017), Randhawa ve ark. (2017) ve Fatmi ve ark. (2017) göre bu araştırmada modifiye edilmiştir (Şekil 3.1). Buna göre;

1. Her çeşitten 10 000 tohum (35 gr) örneği kullanılmıştır.
2. Tohum örnekleri 35 gr olarak tartılıp içerisine 350 ml PBS (Na_2 HPO_4 2.7g/l, NaH_2PO_4 0.4g/l ve NaCl 8 g/l) eklenmiştir.
3. Gece boyunca +4 ^{0}C'de bekletilmiş, +20 ^{0}C'de 3 saat çalkalayıcıda çalkalanmıştır.
4. 10 000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
5. Tüpün üst kısmı dökülerek pellet alınmıştır.
6. Her bir tohuma ait pellete PBS eklenerek 10^{-2} oranında seyreltilmiştir.
7. Tohum ekstraksiyonu sonucu elde edilen süspansiyondan 100 µl alınarak NA besi yerine ekimi yapılmış ve 25 ^{0}C'de 2-5 gün inkübe edilmiştir.
8. NA'da gelişen kolonilerden koloni morfolojisi esas alınarak seçilen koloniler *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *X. vesicatoria* için yarı seçici besiyerlerine ekimi yapılmıştır.
9. Saflaştırılan koloniler için biyokimyasal ve moleküler testler yapılmıştır.

.



Şekil 3.1. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis, Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *X. vesicatoria*'nın domates tohumlarından izolasyonu ve tanılanmasında izlenen prosedürün şematik gösterimi

3.2.2. Besiyerinde bakteriyel koloni sayısının belirlenmesi

İlk izolasyona ait süspansiyon 10^{-2} oranında seyreltilip içerisinden 100 µl alınarak NA besiyerine drigalski spatula yardımıyla yayılmış ve 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. 25 ^{o}C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra petrilerde gelişen koloniler sayılarak ml'deki bakteri hücre sayısı hesaplanmıştır.

Hücre sayısı hesaplanmasında kullanılan formül (Klement ve ark., 1990);

ml'deki bakteri hücre sayısı= koloni sayısı x örneğin seyreltme serisi x 10 şeklindedir.

3.2.3. Tohum çıkış oranının belirlenmesi ve simptomların gözlemlenmesi

Tohum ekimi Selçuk Üniversite Ziraat Fakültesi Bakteriyoloji Laboratuvarındaki iklim odasında gerçekleştirilmiştir. Her çeşitten 30 adet tohum viyollere ekilmiştir. Tohum çıkış oranı belirlenmiş ve hastalık simptomları gözlemlenmiştir.

3.2.4. Bakteriyel tanı testleri

3.2.4.1. Biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testler

3.2.4.1.1. Nutrient Agar (NA) (Schaad, 1994)

Ortam içeriği:	g/L
Beef extract	% 0.1
Peptone	% 0.5
Yeast extract	% 0.2
NACI	% 0.5
Agar	% 1.5
Distile Su	1

pH 7.2-7.4'e ayarlanıp 121 ^{o}C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

3.2.4.1.2. King B besiyeri (Floresan Pigment Üretimi)

Ortam içerigi:	**g/L**
Proteose peptone	10
K_2HPO_4	1,5
$MgSO_4.7H_20$	1,5
Agar	15
Glycerol	15 ml
Distile Su	1

121 ^oC'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Hazırlanan besiyerine çizilen bakteriler 25 ºC'de 2 gün inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler, UV lamba altında incelenmiştir. Yeşil floresan pigment üreten izolatlar pozitif, diğerleri negatif olarak değerlendirilmiştir (King ve ark., 1954; Fahy ve Persley, 1983; Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4.1.3. Tween besiyeri

Ortam içeriği:	**g/L**
Peptone	10
Potasyum bromide	10
$CaCI_2$	0,25
Agar	15
Distile Su	1

121 ^oC'de 15 dakika otoklav edildikten sonra 45 °C–50 °C'ye soğutularak 10 ml tween 80 konulmuştur (McGuire ve ark., 1986).

3.2.4.1.4. KBZ besiyeri

Ortam içeriği:	**g/L**
Agar	15
K_2HPO_4	1,5
$CaCI_2$	0,25
$MgSO_4$ anhydrous	0,73
Proteose	20
Distile Su	1

Hazırlanan karışımın pH'ı 7.5' e ayarlanmıştır. İçerisine 30 ml %50'lik gliserol ve 1,5 gr borik asit (10 ml saf suda çözündürülür) eklenerek otoklav edilmiştir. 45°C–50°C'ye soğutularak aşağıdaki kimyasallar eklenmiştir.

	g/L
Cephalexin monohydrate	160 mg
Triphenyltetrazoliumchloride	1,4 mg
Paraosanilin	18 mg

Beş günlük inkübasyondan sonra küçük, yassı ve pembe renkli koloniler oluşturanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (King ve ark., 1954).

3.2.4.1.5. SCM besiyeri

Ortam içeriği:	**g/L**
Sucrose	10
Yeast extract	1,5
K_2HPO_4	2
KH_2PO_4	0,5
$MgSO_4.7H_20$	0,25
Boric asit	1,5
Distile Su	1

121 ^oC'de 15 dakika otoklav edildikten sonra 45 °C–50 °C'ye soğutulduktan sonra aşağıdaki kimyasallar eklenmiştir.

	g/L
Nicotinic asit	100 mg (20 ml steril distile suda çözülür)
Nalidixic asit	30 mg (sodyum tuzu, 1ml NaOH 'da çözülür)
Potassium tellurite	10 mg
Cycloheximide	200 mg (1ml saf methanolde çözülür)

Bakteri kültürü 2-3 gün 25 ^oC'de inkübe edildikten sonra koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Fatmi ve Schaad, 1988).

3.2.4.1.6. Potasyum hidroksit (KOH) ile gram reaksiyon testi

%3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir veya iki damla damlatıldıktan sonra 24 saat önce geliştirilmiş olan izolatlardan steril bir öze ile birkaç koloni alınarak KOH damlası içerisinde 5-10 sn karıştırılmıştır. Öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanımsı bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands ve ark., 1970).

3.2.4.1.7. Katalaz testi

24-48 saatlik kültürden bir öze dolusu alınıp lam üzerine konuldu ve üzerine %3'lük H_2O_2'den 1 damla damlatılmıştır. Kabarcık şeklinde gaz çıkışı olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.4.1.8. Levan oluşumu

%5 sukroz içeren NA ortamına çizim yapılmıştır. 3-5 günlük inkubasyondan sonra beyaz, mukoid, tümsek şeklinde koloni oluşturanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.4.1.9. Oksidaz testi

%1'lik Tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride (Sigma)'den hazırlanan solüsyon kurutma kağıdı üzerine bir damla damlatılıp bakteri kültüründen öze yardımı ile filtre kağıdına, sürülmüştür ve 60 sn içinde bir renk değişimi olmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956).

3.2.4.1.10. Arginin dehidrolaz aktivitesi

Arginin dehidrolaz testi için içerisinde 5.0 g NaCl, 1.0 g Peptone, 0.01 g Phenol red, 0.3 g K_2HPO_4, 10 g L (+) Arginin HCL, 3 g Agar 1000 ml saf su bulunan karışımın pH'sı 7.2'ye ayarlanmıştır. Tüplere 3 ml konularak 121 ^oC'de 15 dakika otoklav edilmiştir. 24 saatlik taze kültürden yarma aşılama yapılmıştır. Üzeri 2 ml steril %30'luk gliserol ile kapatılmıştır. Kontrol olarak 3 tüpe aşılama yapılmamıştır. 28 ^oC' de bir hafta inkübe edildikten sonra açık pembeden kırmızı renge dönen kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.4.1.11. Eskulin hidrolizi testi

Test için 5 g yeast extract, 0,2g $MgSO_4$, 5 g NACI, 0,5g K_2HPO_4, 50 mg Ferric amonium citrate, 0,5 g $NH_4H_2PO_4$, 1 g esculin içeren besi yeri hazırlanıp pH 6.8'e ayarlanmıştır. Tüplere 7 ml konulup otoklavda 121 ^oC'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Tüplere bakteri aşılanıp 28 ^oC'de bir hafta inkübe edildikten sonra besi yerinin rengi kahverengi-siyah olanlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Sneath, 1956; Schaad ve Stall, 1988).

3.2.4.1.12. 35 ^oC'de gelişim

NA besi yerine çizilen bakteriyel izolatlar ve referans kültürler 35 ^oC'de 48- 60 saat inkübe edildikten sonraki gelişimlerine göre değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.4.1.13. Hidrojen sülfid (H_2S) oluşumu

1 litreye 0.5 g $NH_4H_2PO_4$, 0.5 g K_2HPO_4, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 0.2 g yeast extract, 0.1g cystein hydrocloride hazırlanıp tüplere 5 ml konularak otoklavda sterilize edilmiştir. 5 mm genişlikte kesilen kurutma kağıtları %5'lik kurşun asetat içine batırılmış, kurutulmuş ve otoklavda sterilize edilmiştir. Kağıtlar bakteri aşılanan tüplere yukarıdan aşağıya doğru sarkıtılmıştır. Kurutma kağıdının siyah renk alması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Dye, 1968).

3.2.4.1.14. Karbonhidratlardan asit üretimi

Besi yeri içerisine 0,5 g $NH_4H_2PO_4$, 0,5 g K_2HPO_4, 0,2 g $MgSO_47H_2O$, 5g NaCI, 1 g yeast extract, 12 g agar, 900 ml damıtık su, 0,7 ml brom cresol purple (% 1.5 ethanol solüsyonu) hazırlanıp pH 6.8'e ayarlanarak tüplere 4.5ml aktarılmıştır. Daha sonra 121 ^oC'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Karbon kaynağı olarak erytritol ve sorbitol kullanılmıştır. Karbon kaynağından 10 g tartılıp 100 ml su içerisinde eritilip, pH ayarlanmıştır. Karbonhidratlar yüksek sıcaklıkta bozulduğu için bakteri filtreleri ile sterilize edilmiştir. Otoklavda sterilize edilen 4.5 ml besi yeri bulunan tüpler su banyosunda 50 ^oC'ye soğutulup sterilize edilen karbonhidratlardan 0,5 ml tüplere eklenmiştir. Hazırlanan tüplere bakteriler aşılanıp 24-27 ^oC'de inkübe edilmiştir. Sarıya dönmeyenler negatif olarak kabul edilmiştir. Referans kültürde ve *P. syringae* pv. *tomato* olduğu tahmin edilen izolatlarda renk değişimi olmamıştır (Dye, 1968).

.

3.2.4.1.15. Nitrat redüksiyon testi

Test için, 0.2 gr KCl, 3.0 gr KNO_3, 1.0 gr Noble Agar, 5.0 gr Yeast Extract 1.0 gr, $NH_4H_2PO_4$, 0.2 gr $MgSO_47H_2O$ hazırlanarak 1 litereye tamamlanmıştır. 121^oC'de 15 dakika otoklav edildikten sonra soğumaya bırakılmıştır. Bakteri inokule edildikten sonra 27 ^oC'de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra indirgemenin gerçekleşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Van Den Mooter ve ark., 1987).

3.2.4.1.16. Jelatini sıvılaştırma testi

Test için Peptone 5 g, Beef extract 3 g, Jelatin 120 g hazırlanarak 1 litreye tamamlanmıştır. Süspansiyon iyice karıştırılıp 6-8 µl cam tüplere konularak 121 ºC'de 15 dk otoklav edilmiştir. 24-48 saatlik kültürlerde steril bir öze yardımı ile koloniler alınarak tüplere bulaştırılmıştır. 20 ºC'de 7 - 14 gün inkübasyondan sonra 30 dakika +4 ºC'de buzdolabında bekletilmiştir. Tüpteki ortamın akıcı hale gelmesi pozitif, katı halde kalması ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.1.17. Tütünde aşırı duyarlılık testi (Hipersensitif Reaksiyon, HR)

Bakteriyel süspansiyon spektrometrede 10^8 hücre/ml konsantrasyonda hazırlandıktan sonra bir şırınga yardımıyla tütün (*Nicotiana tabacum* var. White Burley) yaprağının interselüler alanına enjekte edilmiştir. Dokunun 24-48 saat içinde nekroze olması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Klement ve Goodman, 1967).

3.2.4.1.18. Patojenisite testleri

Patojenisite testi için içerisinde yanmış hayvan gübresi, kum, toprak karışımı (1:1:1) bulunan saksılarda yetiştirilmiş 6 haftalık falcon çeşidi domates fideleri kullanılmıştır. Bitkiler iklim odası koşullarında (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) 25 ^0C'de %70 nemde muhafaza edilmiştir. Testlenecek izolatlar 24-48 saat NA'da geliştirilmiştir. Biophotometer plus (eppendorf) ile yoğunluğu (OD: 660 nm'de 0,15) ayarlanan bakteriyel süspansiyonların sağlıklı domates bitkilerine basınçlı el pülverizatörü ile inoküle edilmiştir. Kontrol bitkilere aynı şekilde su uygulanmıştır. İnokulasyondan sonra bitkiler polietilen poşetlerle 24 saat için kapatılmış ve hastalık simptomları beklenilmiştir (Braun - Kiewnick & Sands, 2001).

3.2.4.2. Moleküler tanılama

3.2.4.2.1. Bakteriyel DNA izolasyonu

P. syringae pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *X. vesicatoria* izolatlarından DNA izolasyonu Qiagen DNA izolasyon kiti ve Tam Otomatik İzolasyon Robotu (Qiacube, Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NA ortamında 23-25 °C'de 48 boyunca geliştirilen bakteri kültürlerinden bir öze dolusu alınarak içerisinde 2 ml PBS bulunan satrifüj tüplerine konulmuştur. Daha sonra bakteriyel süspansiyon 10 000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak dibe çöken pellet kullanılmak üzere tüpler cihaza yerleştirilmiştir. Cihazdan elde edilecek toplam DNA miktarı 50 µl olucak şekilde ayarlanmıştır.

Qiagen DNA izolasyon kitinin (Qiamp DNA mini kit) protokolüne göre: Tüm santrifüj adımları oda sıcaklığında (15-25 °C) gerçekleştirilmiştir. Bufer AW1 ve Bufer AW2'ye şişede belirtilen konsantırasyonlarda etanol eklenmiştir ve numuneler oda sıcaklığına kalibre edilmiştir. Diğer işlemler aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

1. 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne 1 ml bakteriyel kültürü konulup 5 dakika 5000 x g'de (7500 rpm) santrifüjlenmiştir.
2. Pelet veya konsantre hacmini hesaplanarak ve 180 µl Buffer ATL eklenmiştir.
3. 20 µl proteinaz K ilave edilerek vortekslenmiştir.
4. 56 °C'e inkübe edilmiş (1-3 saat) ve arada bir vortekslenmiştir.
5. 200 µl Buffer AL eklenerek 15 sn vortekslenmiştir.
6. 70 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
7. 200 µl etanol (% 90-100) eklenmiş ve 15 sn vortekslenerek kapakta damla kalmaması için santrifüjlenmiştir.
8. QIAamp Mini döndürme kolonunda (2 ml'lik bir toplama tüpünde) karışım pipetlenmiş, 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
9. QIAamp Mini döndürme kolonu temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirilmiştir ve süzüntüyü içeren tüp atılmıştır.
10. Yeni 2 ml toplama tüpüne QIAamp Mini döndürme kolonu yerleştirilmiş ve 500 µl Buffer AW1 eklenerek 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüjlenmiş, süzüntüyü içeren tüp atılmıştır.
11. 500 ul buffer AW2 eklenip 3 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

12. QIAamp Mini döndürme kolonunu yeni bir 2 ml'lik tüpe yerleştirilmiş ve 1 dk boyunca tam hızda tavsiye edildiği gibi santrifüjlenmiştir. Bu işlem buffer AW2 taşıma ihtimalini ortadan kaldırmıştır.
13. QIAamp Mini döndürme kolonu temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir ve süzüntüyü içeren toplama tüpü atılmıştır. 200 µl buffer AE veya distile su eklenmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip ve sonra 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüjlenmiştir.

Daha sonra DNA'lar %1'lik hazırlanan agarose jelde yürütülerek izolasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Hazırlanan agaroz jelde yarım saat 80 V elektrik verilerek yürütülmüştür. UV ışık altında bantların görülebilmesi için etidyum bromür (0.5 µg / ml) ile 10 dakika bekletilerek boyama yapılmıştır Jel üzerinde oluşan bantlar transiliminatörde incelenmiştir (Sambrook, 2001).

3.2.4.2.2. PCR reaksiyonunun kurulması

PCR reaksiyonları 0,2 ml'lik ependorf tüplere hazırlanmıştır. PCR reaksiyonunun içeriği 25 µl olacak şekilde Çizelge 3.1. 'de görüldüğü gibi hesaplanmıştır;

Çizelge 0.1. PCR Reaksiyon Karışımının İçeriği (Dreier ve ark., 1995)

Madde Adı	**Miktar (µl)**
Bakteri DNA	2.0
PCR Master Mix*	12.5
Forward primer	2.0
Revers primer	2.0
$MgCl_2$	0.5
Steril saf su	6.0
Toplam	25

* 0.05 ünite/ µl Taq DNA, 0.4 mM dATP, 4 mM MgCl2, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dCTP, ve 0.4 mM dTTP (ThermoFisher Sciencetific PCR master mix (2X))

3.2.4.2.3. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun PCR ile saptanması

P. syringae pv. *tomato*'nun PCR yöntemi ile tanılanmasında MM5F ve MM5R primerleri için Termal cyclerda programlanan PCR protokolü:

- 1 döngü 94°C'de 5 dak.
- 94°C'de 1 dak.
- 55°C'de 50 sn
- 72°C'de 1 dak

} 35 döngü

- 1 döngü 72°C'de 5 dak. şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Amplifiye edilen bölge için 532 bp bant oluşturması beklenilmiştir.

3.2.4.2.4. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in PCR ile saptanması

C. michiganensis subsp. *michiganensis*'in PCR yöntemi ile tanılanmasında CMM5 ve CMM6 primerleri için Termal cyclerda programlanan PCR protokolü:

- 93 ^{0}C'de 2 dk
- 94 ^{0}C'de 1 dk
- 55 ^{0}C'de 1.5 dk
- 72 ^{0}C'de 1 dk

} 30 döngü

- 72 ^{0}C'de 10 dk şeklinde tamamlanmıştır (Dreier ve ark., 1995).

Amplifiye edilen bölge için 614 bp bant oluşturması beklenilmiştir.

3.2.7.5. *Xanthomonas vesicatoria*'nın PCR ile saptanması

X. vesicatoria'nin PCR yöntemi ile tanılanmasında RST9 ve RST10 primerleri için Termal cyclerda programlanan PCR protokolü:

- 94 ^{0}C'de 3 dk
- 94 ^{0}C'de 1 dk
- 50 ^{0}C'de 1 dk
- 72 ^{0}C'de1 dk

} 30 döngü

- 72 ^{0}C'de 4 dk şeklinde tamamlanmıştır (Dreier ve ark., 1995).

Amplifiye edilen bölge için 355 bp bant oluşturması beklenilmiştir.

3.2.7.3. *X. vesicatoria* izolatları arasındaki genetiksel farklılığın tespiti

İzolatlar arasındaki genetiksel farklılıklar belirlemek amacıyla ISSR (Baysal ve ark., 2008 ; Baysal ve ark., 2010 ; Baysal ve ark., 2011 ; Polat ve ark., 2014) ve SRAP (Devran ve Baysal, 2012 ; Polat ve ark., 2014) primerleri kullanılmıştır. Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3 'de görüldüğü gibi 7 ISSR, 9 SRAP primeri kullanılmıştır.

Çizelge 3. 2. ISSR primerleri, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları

ISSR Primerleri	Baz dizilimi	Bağlanma sıcaklığı (°C)
809	GAGGAGAGAGAGAGAGG	55
827	ACACACACACACACACG	50
834	AGAGAGAGAGAGAGAGCTT	50
889	AGTCGTAGTACACACACACACAC	45
731	CCCACACCAC	45
112	AGAGGGCACA	45
880	GGAGAGGAGAGGAGA	55

Çizelge 3.3. SRAP primerleri, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları

SRAP Primer kombinasyonları	Reverse primer	Forward primer	Bağlanma sıcaklığı (°C)
em10-me4	GAC TGC GTA CGA ATT CAT	TGA GTC CAA ACC GGA CC	55
em10-me9	GAC TGC GTA CGA ATT CAT	TGA GTC CAA ACC GGA GG	55
em7-me9	GAC TGC GTA CGA ATT CAA	TGA GTC CAA ACC GGA GG	55
em7-me8	GAC TGC GTA CGA ATT CAA	TGA GTC CAA ACC GGA CT	55
em4-me12	GAC TGC GTA CGA ATT TGA	TGA GTC CAA ACC GGA GA	55
em10-me11	GAC TGC GTA CGA ATT CAT	TGA GTC CAA ACC GGA AC	55
em4-me11	GAC TGC GTA CGA ATT TGA	TGA GTC CAA ACC GGA AC	55
em4-me4	GAC TGC GTA CGA ATT TGA	TGA GTC CAA ACC GGA CC	55
em11-me12	GAC TGC GTA CGA ATT CTA	TGA GTC CAA ACC GGA GA	55

ISSR primerleri için PCR reaksiyon içeriği;

- 1.0 µl DNA (20 ng DNA)
- 1.5 µl $MgCl_2$ (2.5 mM $MgCl_2$),
- 1.0 µl dNTP (0.1 mM dNTPs),
- 2.0 µl primer (0.3 µM),
- 0.2 µl Taq (0.6 U TaqDNA polymerase),
- 1.5 µl (1 X) PCR buffer
- 7.8 µl ddH_2O olarak toplamda15 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir.

ISSR PCR protokolü;

- 1 döngü 94°C'de 5 dak.
- 94°C'de 1 dak.,
- 45-55°C'de 45 sn,
- 72°C'de 2 dak.

} 35 döngü

- 1 döngü 72°C'de 5 dak. şeklinde gerçekleştirilmiştir.

SRAP primerleri için PCR reaksiyon içeriği

- 1.0 µl DNA (20 ng DNA)
- 1.5 µl dNTP (0.1 mM dNTPs),
- 1.5 µl $MgCl_2$ (2.5 mM $MgCl_2$),
- 0.2 µl Taq (0.6 U Taq DNA polymerase)
- 2.0 µl her bir primer (0.3 µM her bir primer),
- 1.5 µl (1 X)PCR buffer
- 5.3 µl ddH_2O olarak toplamda 15 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir

SRAP-PCR protokolü

- 1 döngü 94°C'de 2 dak.,
- 5 döngü, 94°C'de 1 dak., 35°C'de 1 dak., 72°C'de 1 dak.,
- 94°C'de 1 dak,
- 50°C'de 1 dak,
- 72°C'de 1 dak.

} 35 döngü

- 1 döngü 72°C'de 10 dak. şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2.5. PCR ürünlerinin elektroforez sisteminde yürütülmesi

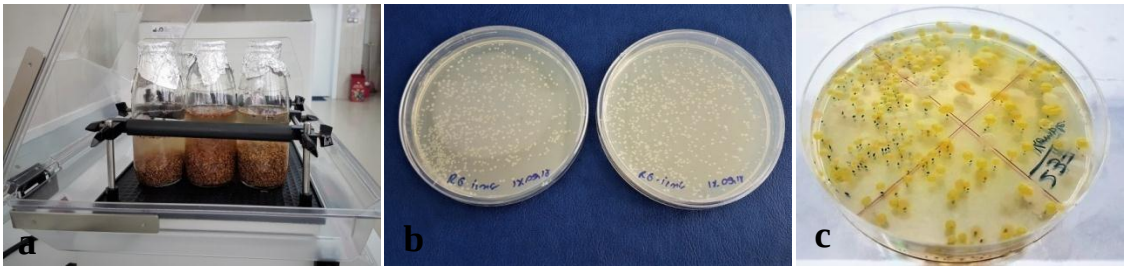
100 ml'lik 1X TBE buffer solüsyonu içerisine 1 gr agaroz (SeaKem) konularak mikrodalga fırında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra taraklar tanka yerleştirilmiş ve agaroz jel tankına dökülmüştür. Agarose jel donduktan sonra tankın içerisine jeli örtecek şekilde 1X'lik TBE (5X TBE: Tris 54 g, Borik asit 27.5 g, EDTA 20 ml 0.5 M, Steril destile su 500 ml) buffer konulmuştur. Daha sonra örnekleri koymak için dikkatlice taraklar çıkarılmıştır. 3 µl loading dye ve 20 µl PCR ürünü bromür (0.5 µg / ml) ile 10 dakika bekletilerek boyama yapılmıştır. Oluşan bantların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla 1 kb'lik moleküler işaretleyici (marker, Fermantas 1 kb Plus DNA Ladder SM 1153) kullanılmıştır. Jeller üzerinde oluşan bantlar UV ışığı yayan Prizma marka transiliminatörde incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Russell ve Sambrook, 2001).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Birçok bakteriyel patojenin domates tohumu ile taşındığı tespit edilmiştir. Bu patojenlerin neden olduğu ürün kayıplarını azaltabilmek ve yayılmasını önleyebilmek için tohumların kontrolü oldukça önemlidir. Ülkemizde Geylani (2004), Karabuyuk ve Aysan (2018) domates tohumları ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bitki bakteri hastalıkları ile etkili ve uygun mücadele stratejilerinin geliştirilebilmesi için patojenin tespiti oldukça önemlidir. Bu çalışmada toplam 50 tohum örneği ile çalışılmıştır. Tohumlar Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden 10 farklı ilden çeşitli firma ve yerli üreticilerden elde edilmiştir.

4.1. Domates Tohumlarından Bakteriyel Patojenlerin İzolasyonu

Domates tohumlarından bakteriyel patojenlerin izolasyonları Miller ve ark. (2017), Randhawa ve ark. (2017) ve Fatmi ve ark. (2017)'dan bu çalışmada modifiye edilerek yapılmıştır (Şekil 4.1).Elde edilen tohum örneklerinden 110 adet izolat elde edilmiş, bunlardan 57 adedinin koloni morfolojisi, biyokimyasal, patojenisite testler sonucunda domates bitkisinde patojen olduğu saptanmıştır. Genel ve semi selektif besiyerinde koloni morfolojisi ve rengine göre ilk sınıflandırılması yapılan izolatların patojenik olup olmadıklarını belirlemek için tütünde aşırı duyarlılık testi yapılmıştır. Pozitif reaksiyon gösteren izolatlar ilk olarak biyokimyasal ve fizyolojik testlere tabi tutulmuştur.



Şekil 4. 1. a) Domates tohumların bakteriyel izolasyon çalışmaları b) ilk izolasyon sonucu NA üzerinde gelişen koloniler c) AH kodlu domates tohumunun izolasyonu sonucu petrilerde gelişen kolonilerin sayımı

4.2. Bakteriyel koloni sayısının belirlenmesi

İlk izolasyona ait süspansiyon 10^{-2} oranında seyreltilip içerisinden 100 µl alınarak kaynak NA besi yerine bir baget yardımıyla yayılmıştır (Rudolph ve ark., 1990). Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan besi yerleri 23-25^{o}C'de

24-48 saat inkübe edildikten sonra petrilerde gelişen koloniler sayılarak ml'deki bakteri hücre sayısı (koloni sayısı x örneğin seyreltme serisi x 10) hesaplanmıştır (Klement ve ark., 1990) (Şekil 4.1.c) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. Kullanılan tohumların çeşit adları ve bakteriyel popülasyonları

	Çeşit adları	Bakteriyel popülasyon (hücre/ml)
1	KKÜAÇ	$1.0x10^{10}$a
2	KYÇ	$1.6x10^{4}$defg
3	KSYÇ	$1.1x10^{3}$g
4	KH2274	$2.1x10^{3}$g
5	KMYÇ	$1.0x10^{10}$a
6	KF	$1.0x10^{10}$a
7	KRG	$3.2x10^{4}$cdefg
8	KSC2121	$5.0x10^{4}$cde
9	KMSC	$5.0x10^{4}$cd
10	KKT	$2.4x10^{4}$cdefg
11	KLM	$3.3x10^{3}$fg
12	AZ2064	$1.8x10^{3}$g
13	AH9661	$4.0x10^{4}$g
14	AH9780	$5.0x10^{4}$g
15	AT21708	$7.0x10^{4}$g
16	AAB	$5.0x10^{4}$g
17	AF	$1.7x10^{4}$defg
18	ARG	$1.3x10^{4}$defg
19	AKTY	$1.0x10^{10}$a
20	ASC	$1.0x10^{10}$a
21	AN	$2.2x10^{4}$defg
22	AH	$1.0x10^{10}$a
23	AS	$4.8x10^{4}$ cde
24	AP	$1.0x10^{10}$a
25	İSC	$1.0x10^{10}$a
26	İH	$1.0x10^{10}$a
27	İF	$1.0x10^{10}$a
28	İRG	$3.6x10^{4}$ cdefg
29	BH	$7.1x10^{3}$fg
30	BN	$1.0x10^{10}$a
31	BSC	$1.0x10^{10}$a
32	BA	$1.0x10^{10}$a
33	BT	$6.3x10^{4}$bc
34	ADYÇ	$2.9x10^{2}$g
35	MERYÇ	$9.0x10^{4}$g
36	TD	$2.4x10^{4}$cdefg
37	TM	$4.4x10^{4}$cdef
38	Tİ	$3.7x10^{4}$cdefg
39	TSC	$1.1x10^{4}$defg
40	TH	$9.0x10^{4}$b
41	TRG	$1.0x10^{10}$a
42	TF	$2.0x10^{4}$defg
43	MH	$1.5x10^{4}$defg
44	MC	$1.2x10^{4}$defg
45	MRG	$1.5x10^{4}$defg
46	SYÇ	$1.0x10^{10}$a
47	Bİ	$5.2x10^{3}$fg
48	BRG	$5.2x10^{3}$fg
49	AC	$5.2x10^{3}$fg
50	IY	$9.7x10^{3}$efg

Ülkemizde ekimi yapılan bazı domates çeşidi tohumlarıyla taşınan total bakteriyel patojenlerin popülasyon yoğunlukları bu çalışmada belirlenmiştir. Buna göre; İç Anadolu, Akdeniz, Ege, Marmara ve Karadeniz bölgelerinden elde edilen KKÜAÇ, KF, KMYÇ, AKTY, ASC, AH, AP, İSC, İH, İF, BN, BSC, BA, TRG, SYÇ kodlu domates tohumlarındaki bakteriyel popülasyonlar en yüksek oranda belirlenirken, İç Anadolu ve Akdeniz bölgelerinden elde edilen KSYÇ, KH2274, AZ2064, AH9780, AH9661, AT21708, AAB, ADYÇ, MERYÇ kodlu domates tohumlarındaki bakteriyel popülasyonlar en düşük düzeyde bulundukları tespit edilmiştir.

Mevcut literatür bilgilerine göre; çalışmamızda elde edilen domates tohumlarındaki bakteriyel popülasyonların ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen tohumlar düzeyinde ilk kez ortaya konulmuştur.

4.3. Tohum çıkış oranının belirlenmesi ve simptomların gözlemlenmesi

Tohum ekimi Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü iklim odasında gerçekleştirilmiştir. Her çeşitten 30 adet tohum viyollere ekilmiştir. Tohum çıkış oranı belirlenmiş ve hastalık simptomları gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Tohum çıkışları ve simptomların gözlemlenmesi

Çizelge 4. 2. Temin edilen domates tohumlarının bölgelere göre çıkış oranları

Çeşit No	Akdeniz Bölgesi	İç Anadolu Bölgesi	Ege Bölgesi	Marmara Bölgesi	Doğu Anadolu Bölgesi	Karadeniz Bölgesi
1	86,67 ab	70,00 bc	50,00 b	73,33 b	23,33 c	50,00 b
2	100,00 a	0,00 e	63,33 c	50,00 c	50,00 b	66,67 a
3	66,67 bd	100,00 a	83,33 a	60,00 bc	50,00 b	33,33 c
4	66,67 bd	60,00 cd	73,33 b	70,00 b	90,00 a	33,33 c
5	66,67 bd	66,67 bd		73,33 b		50,00 b
6	100,0 a	60,00 cd		100,00 a		66,67 a
7	40,00 e	66,67 bd		66,67 b		50,00 b
8	63,33 cd	53,33 cd				36,67 bc
9	76,67 bc	56,67 cd				
10	100,00 a	40,00 d				
11	100,00 a	90,00 ab				
12	53,33 de					
13	100,00 a					
14	100,00 a					
15	100,00 a					
16	50,00 de					

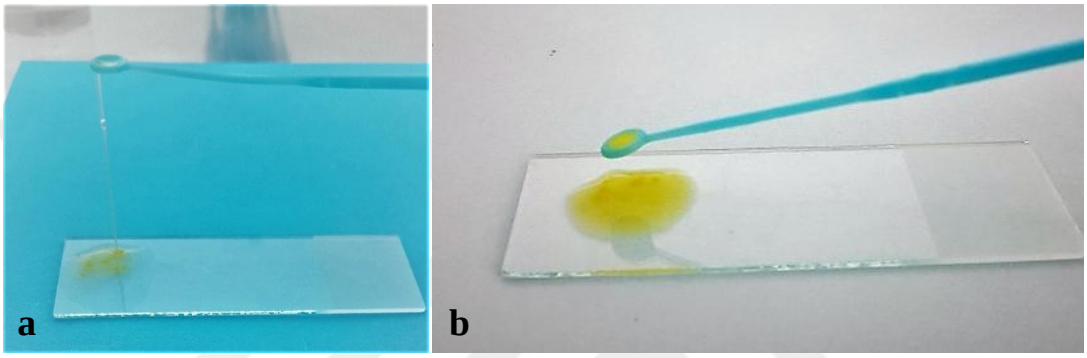
Elde edilen bulgulara göre; Akdeniz Bölgesinde AH9661, AF, ASC, AN, AS, AP, ADYÇ, İç Anadolu Bölgesinde KSYÇ, Ege Bölgesinde İF, Marmara Bölgesinde BA, Doğu Anadolu Bölgesinde IY, Karadeniz Bölgesinde TM, TRG kodlu çeşitler en yüksek tohum çıkış oranına sahiptir. Hastalık simptomları ise KM, SYÇ, KH, AP, KYÇ kodlu çeşitlerde gözlemlenirken, diğer çeşitlerde herhangi bir belirti gözlemlenmemiştir.

Mc Carter ve ark. (1983) steril toprak içeren saksılara 100' er adet tohum ektiklerinde çıkıştan 7 gün sonra ilk gerçek yapraklarda *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* lezyonlarını gözlemişlerdir. Yüksek nem sağlamak amacıyla bitkiler polietilen torbayla kaplandığı zaman ancak simptomların oluştuğunu bildirmişler ve nemin önemini vurgulamışlardır. Bu test te *Xanthomonas* ve *Pseudomonas* genusuna ait olduğu düşünülen bakterilerin, herhangi bir belirti vermediği saptansa da nem, sıcaklık etkisi düşünüldüğünde sonuca varabilmek için tek başına bu yöntemin yeterli olmadığı anlaşılmaktadır. Söz konusu bakteriler istekleri dışındaki ortam koşullarında maskelenmektedirler. Öte yandan *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'in yapraklarda oluşturmuş olduğu yanıklık belirtisi 5 çeşitte görülmüş olmakla birlikte ön ekimlerde SCM gibi yarı seçici ortamlar da yapılan incelemede *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kolonilerine benzer gelişim gösteren 6 adet izolat bulunmuştur.

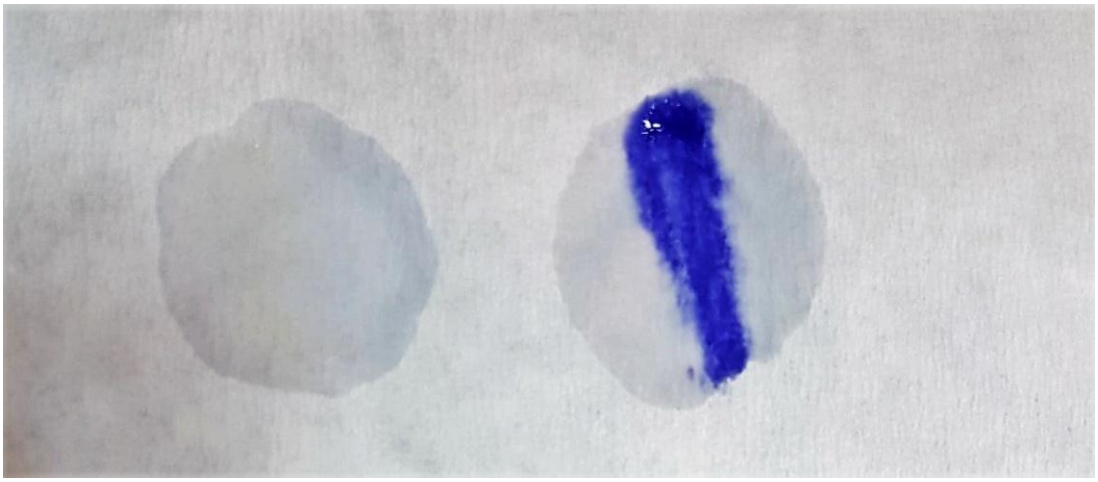
4.4. Bakteriyel Tanılama Testleri Sonuçları

4.4.1. Biyokimyasal testler

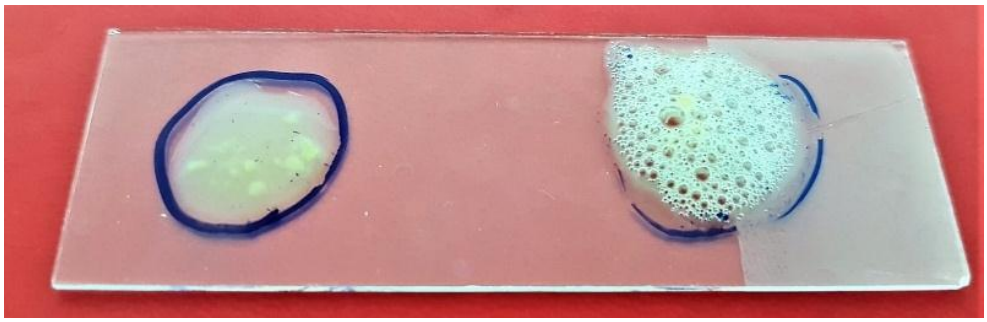
30 farklı domates çeşidinden elde edilen toplam 110 adet izolattan birbirine benzer özellikler gösteren izolatlar gruplandırılmış 50 bakteriyel izolat farklı biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik ve moleküler tanılama testlerine tabi tutulmuştur. Kullanılan testler Schaad ve ark. (2001)'e göre yapılmıştır. Test sonuçlarına ait görüntüler ve veriler Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13'de ve Çizelge 4.3, 4.4, 4.5, 4.6'da sunulmuştur.



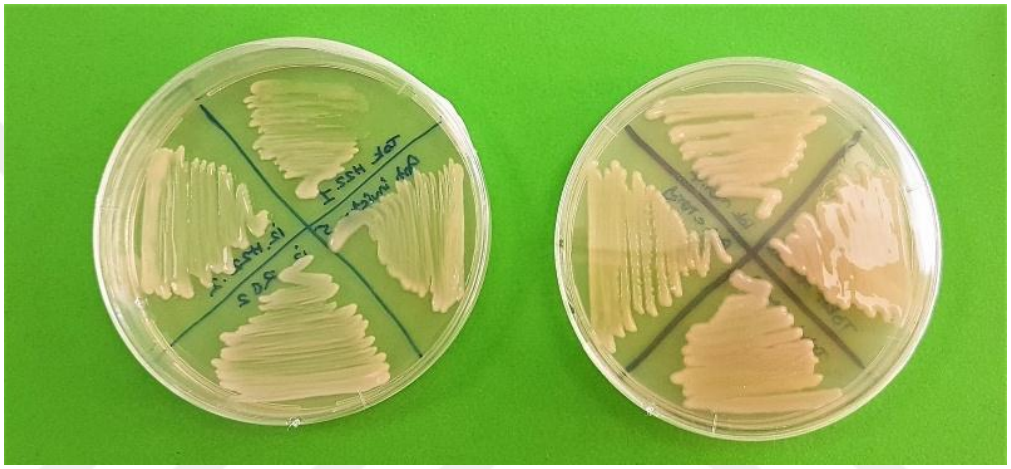
Şekil 4. 3. Bakteriyel izolatlara uygulanan Gram reaksiyon testleri a) Gram Reaksiyon Testine reaksiyona tepki veren AS1 izolatının ipliğimsi sünme görüntüsü (pozitif reaksiyon) b) KMYÇ2 izolatının görüntüsü (negatif reaksiyon)



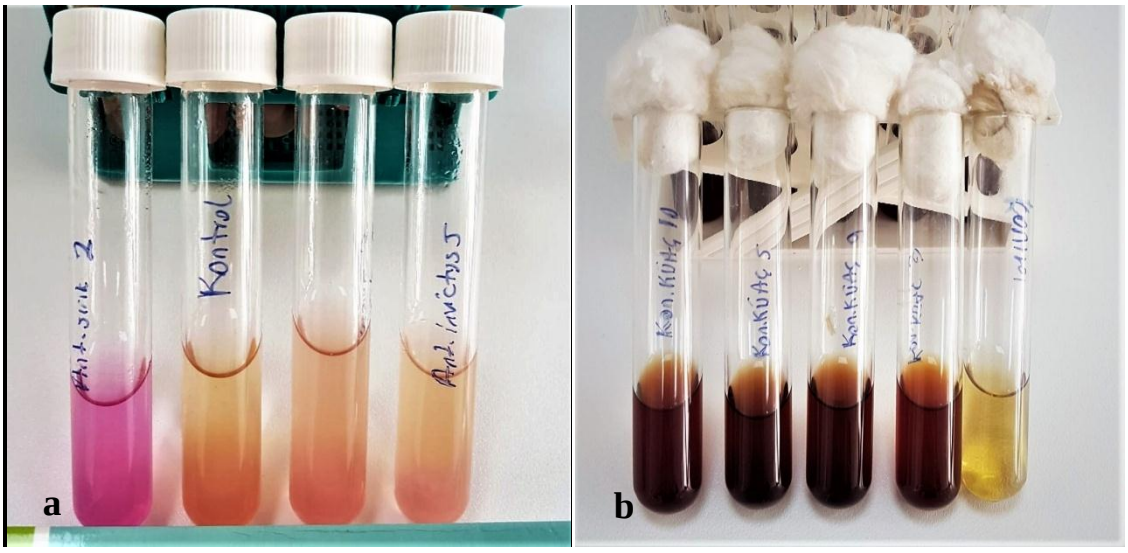
Şekil 4. 4. Bakteriyel izolatlara uygulanan oksidaz testleri uygulamasında solda AS1 izolatının oluşturmuş olduğu görüntü (negatif reaksiyon), sağda AS11 izolatının 10 sn içerisinde mavi renk oluşturması (pozitif reaksiyon)



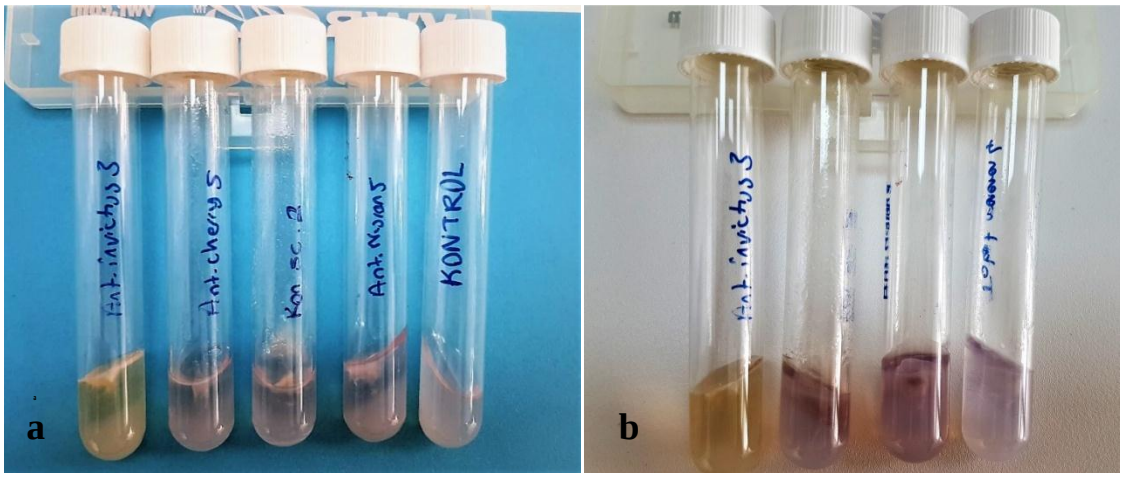
Şekil 4. 5. Bakteriyel izolatlara uygulanan katalaz testleri uygulamasında solda AS11 izolatının oluşturmuş olduğu görüntü (negatif reaksiyon), sağda KKÜAÇ11 izolatının 10 sn içerisinde mavi renk oluşturması (pozitif reaksiyon)



Şekil 4. 6. Bakteriyel izolatlara uygulanan levan testi uygulamasında solda AS11, KKÜAÇ15, AAB1, AZ2064 izolatlarının görüntüsü (negatif reaksiyon), sağda KKÜAÇ11, İF5, AN3, TM2 izolatının konveks, parlak ve kubbemsi levan görüntüsü (pozitif reaksiyon)



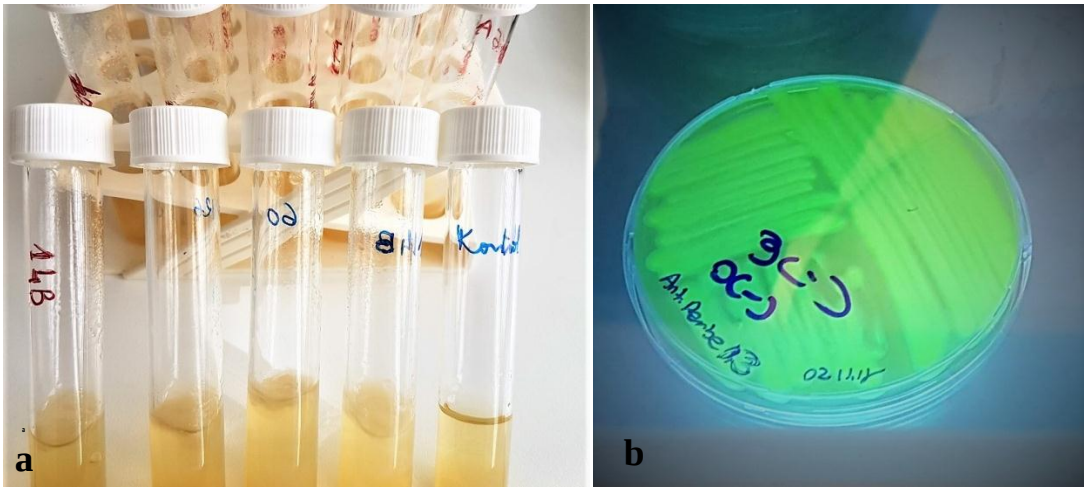
Şekil 4. 7. Bakterilerin arginin dehidrolaz ve eskulin testine verdikleri reaksiyonlar a) arginin dehidrolaz testine tepki veren AS2 nolu izolat pozitif, kontrol ve AN3, Aİ5 nolu izolatlar negatif reaksiyon b) eskulin hidrolizi testine tepki veren KKÜAÇ11, KKÜAÇ5, AS1, AN3 izolatlar pozitif, AS11 nolu izolat negatif reaksiyon



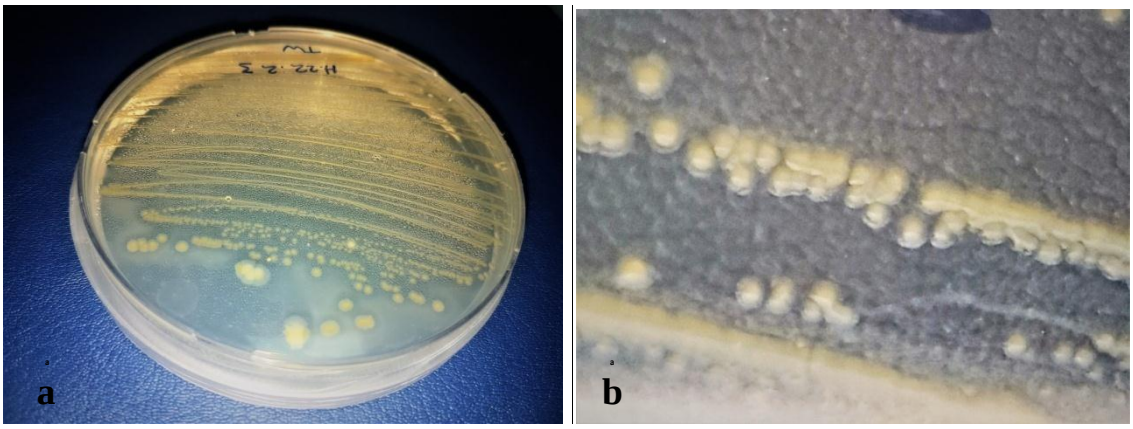
Şekil 4. 8. Bakteriyel izolatlara uygulanan, karbon hidratlardan asit üretimi ve sorbitol testlerinin görüntüsü a) erytritol testi uygulamasında Aİ3 izolatı pozitif, Aİ5, KSC, AN5 ve kontrol negatif reaksiyon b) sorbitol testi uygulamasında EZA1, EZA3 nolu izolatlar pozitif, kontrol negatif reaksiyon



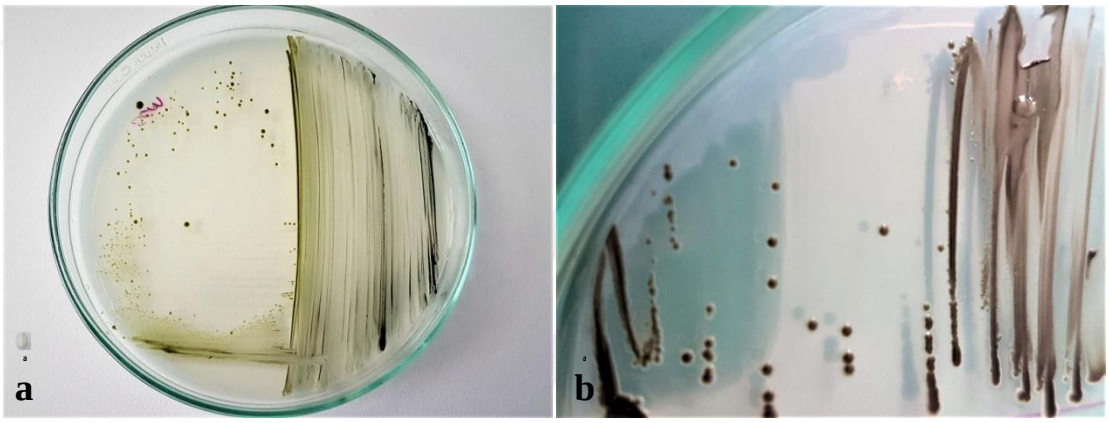
Şekil 4. 9. Bakteriyel izolatlara uygulanan, H2S ve nitrat testinin görüntüsü a) AN11, KYÇ2, KF2, TM10 nolu izolatlar pozitif, kontrol negatif reaksiyon b) Nitrat Testine izolatların vermiş olduğu tepki, AS1 nolu izolatta negatif reaksiyon, AS1 ve ASC3 nolu izolatta pozitif reaksiyon



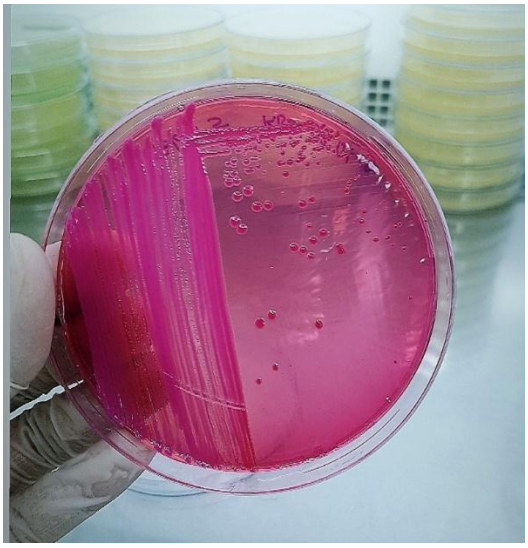
Şekil 4. 10. Bakteriyel izolatlara uygulanan jelatin eritme ve florasan pigment üretimi testi a) Cam tüplerdeki ortamın akıcı hale gelmesi pozitif, katı halde kalması ise negatif reaksiyon b) AP3 izolatının KB besiyerinde oluşturmuş olduğu yeşil floresan pigment üretimi (pozitif reaksiyon)



Şekil 4. 11. KH23 izolatının tween besiyerinde oluşturmuş olduğu görüntü a) petrinin genel görünüm b) yuvarlak, sarı ve çevresinde temiz haleli kolonilerin görüntüsü (pozitif reaksiyon)



Şekil 4. 12. KM2 ve SYÇ2 izolatları SCM besiyerinde oluşturmuş olduğu görüntü a) KM2 izolatının petrideki genel görünümü b) SYÇ2 izolatının oluşturmuş olduğu koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler (pozitif reaksiyon)



Şekil 4. 13. AS1 izolatının KBZ besi yerinde oluşturmuş olduğu küçük, yassı ve pembe renkli koloniler (pozitif reaksiyon)

4.4.2. Tütünde aşırı duyarlılık testi (Hipersensitif reaksiyon, HR)

Bakteriyel süspansiyon spektrometrede 10^8 hücre/ml yoğunluğunda hazırlandıktan sonra bir şırınga yardımıyla tütün yaprağının interselüler alanına enjekte edilmiştir. Bakteriyel inokulasyondan sonra dokunun 24-48 saat içinde nekroze olması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Klement ve Goodman, 1967).



Şekil 4. 14. Tütün bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu a) KM2 izolatının 48 saat sonra tütünde oluşturduğu reaksiyon, b)KM3 izolatının 48 saat sonra tütünde oluşturduğu reaksiyon

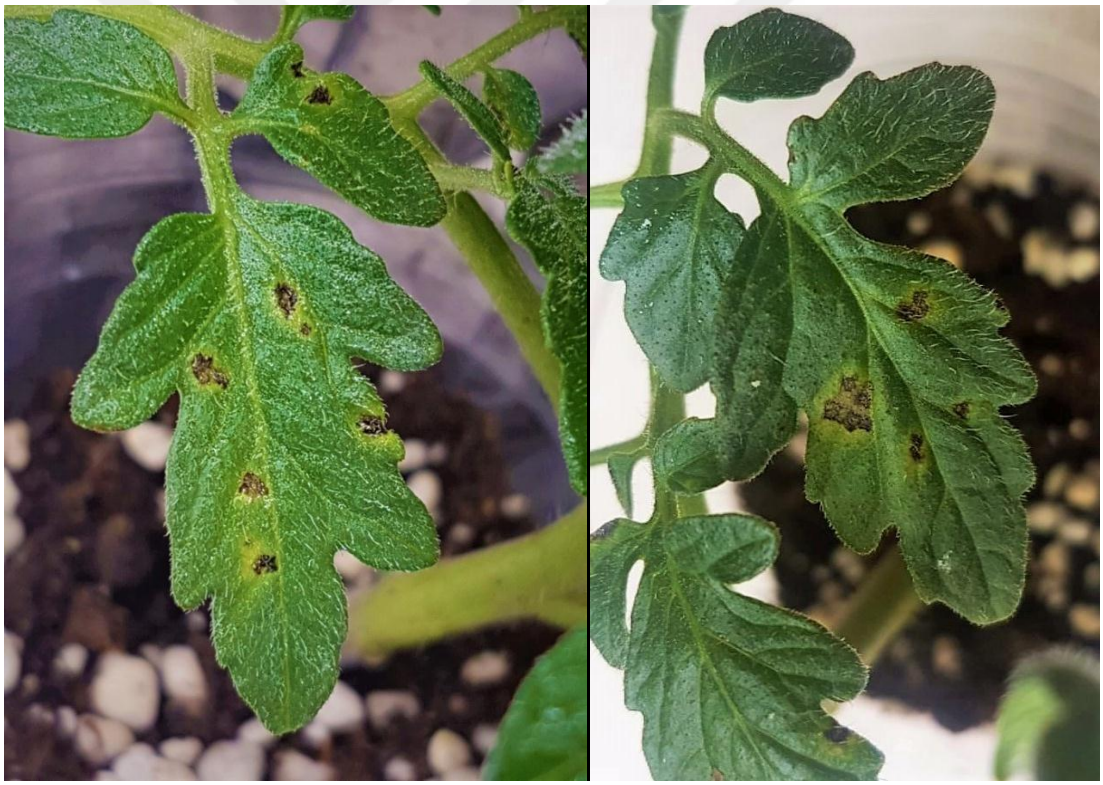
HR testinden elde edilen sonuçlara göre; 20 adet *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatından 6 adedi, 14 *P. syringae* pv. *tomato* izolatından 5 adedi, 16 *X. vesicatoria* izolatından 10 adedi pozitif reaksiyon vererek doku nekrozuna neden olmuştur. Buna göre denemeye alınan 50 bakteriyel izolatın % 42'si patojenik olarak belirlenirken %68'inin nonpatojen olduğu tespit edilmiştir.

4.4.3. Patojenisite Testleri

Biophotometer plus (eppendorf) ile yoğunluğu 10^8 hücre/ml olacak şekilde ayarlanan bakteriyel süspansiyonların sağlıklı domates bitkilerine inokulasyonu sonucu domates bitkilerinde hastalık belirtileri görülmüştür. Su uygulanan kontrol bitkisinde ise herhangi bir hastalık oluşumu görülmemiştir (Şekil 4.15; 4.16; 4.16). patojenite test sonuçlarında elde edilen *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *X. vesicatoria* izolatlarının 21 tanesi patojen, 29 tanesinin non patojen olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 15. Patojenisite testi sonucunda SYÇ2 kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatının yaprak kenarlarında oluşturmuş olduğu nekrotik lekeler



Şekil 4. 16. Patojenisite testi sonucunda TF10 kodlu *Xanthomonas vesicatoria* izolatının yapraklarda oluşturmuş olduğu nekrotik lekeler



Şekil 4. 17. Patojenisite testi sonucunda AF2 kodlu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatının domates yapraklarında oluşturduğu ortası kahverengi, etrafı sarı haleli nekrotik lekeler

Patojenite testlerinden elde edilen bulgular HR testleri ile paralellik göstermişlerdir. HR testi sonuçlarına göre patojen olarak belirlenen *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *X. vesicatoria* izolatları falcon çeşidi 8 haftalık domates bitkilerinde tipik hastalık belirtileri oluşturmuşlardır. Elde edilen sonuçlar Geylani (2004), Randhawa ve ark. (2017) ve Fatmi ve ark. (2017)'nın sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Çizelge 4. 3. Domates tohumlarından elde edilen izolatların biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testlere karşı göstermiş oldukları reaksiyonların oranları (%)

Testler	Denemelerde Kullanılan Domates Çeşitlerinin Kodları																							
	AZ2064	AH9661	AH9780	AT21708	AAB	AF	AC	ARG	AKTY	ASC	AN	AH	AS	AP	ADYÇ	MERYÇ	KKÜAÇ	KYÇ	KSYÇ	KH	KMYÇ	KF	KRG	KSC	KMSC
Oksidaz testi	-	-	-	-	-	100	-	100	100	33	50	100	100	100	-	-	100	100	-	-	-	75	-	-	-
Gram reaksiyon	100	-	-	-	-	100	-	100	100	33	50	100	100	100	-	-	100	100	-	-	100	75	-	-	-
KB	-	-	-	-	-	100	-	100	100	-	25	-	100	100	-	-	66	-	-	-	-	25	-	-	-
Levan oluşumu	-	-	-	-	-	100	-	100	100	33	50	100	100	100	-	-	100	100	-	-	-	75	-	-	-
Arjinin testi	-	-	-	-	-	100	-	100	100	-	25	-	100	100	-	-	66	-	-	-	-	25	-	-	-
Nitratın nitrite indirgenmesi	-	-	-	-	-	100	-	100	100	-	25	-	100	100	-	-	66	-	-	-	-	25	-	-	-
Esculin testi	100	-	-	-	-	100	-	100	100	100	100	100	100	100	-	-	100	100	-	-	100	100	-	-	-
Sorbitol testi	100	-	-	-	-	-	-	-	-	66	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	25	-	-	-
SCM besiyeri	100	-	-	-	-	-	-	-	-	66	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	25	-	-	-
Pektolitik aktivite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 ^{O}C'de Gelişim	-	-	-	-	-	100	-	100	100	33	25	100	100	100	-	-	33	100	-	-	-	100	-	-	-
Jelatin Sıvılaştırma	-	-	-	-	-	100	-	100	100	-	25	-	100	100	-	-	66	-	-	-	-	25	-	-	-
Cysteinden hidrojen sülfit oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	25	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	50	-	-	-
Erytritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-
Hipersesitif reaksiyon testi	100	-	-	-	-	100	-	100	100	100	100	100	100	100	-	-	100	100	-	-	100	100	-	-	-
KBZ besiyeri	-	-	-	-	-	100	-	100	100	-	25	-	100	100	-	-	66	-	-	-	-	25	-	-	-
Tween besi yeri	-	-	-	-	-	100	-	100	100	33	25	100	-	-	-	-	33	100	-	-	-	50	-	-	-
Katalaz testi	-	-	-	-	-	100	-	100	100	100	100	100	100	100	-	-	100	100	-	-	-	100	-	-	-

Testler	Denemelerde Kullanılan Domates Çeşitlerinin Kodları																								
	KKT	KYÇ	İSC	İH	İF	İRG	BH	Bİ	BN	BSC	BRG	BA	BT	MH	MC	MRG	IY	TD	TM	Tİ	TH	TSC	TRG	TF	SYÇ
Oksidaz testi	-	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	40	-	-	100	-	100	66	-	100	-	-	100	100
Gram reaksiyon	-	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	40	-	-	100	-	-	66	-	100	-	-	100	-
Florasan pigment üretimi	-	-	50	100	100	100	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-
Levan oluşumu	-	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	40	-	-	100	-	-	66	-	100	-	-	100	-
Arjinin testi	-	-	50	100	100	100	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-
Nitratın nitrite indirgenmesi	-	-	50	100	100	100	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-
Esculin testi	-	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	100	-	-	100	-	100	100	-	100	-	-	100	100
Sorbitol testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	100	33	-	-	-	-	-	100
SCM besiyeri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	100	33	-	-	-	-	-	100
Pektolitik aktivite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-
37 ^{O}C'de Gelişim	-	100	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	33	-	100	-	-	100	-
Jelatin Sıvılaştırma	-	-	50	100	100	100	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-
Cysteinden hidrojen sülfit oluşumu	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-
Erytritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-
Hipersesitif reaksiyon testi	-	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	100	-	-	100	-	100	100	-	100	-	-	100	100
KBZ besiyeri	-	-	50	100	100	100	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-
Tween besi yeri	-	100	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	33	-	100	-	-	100	-
Katalaz testi	-	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	100	-	-	100	-

Çizelge 4. 4. Denemelerde kullanılan farklı domates çeşidi tohumlarından elde edilen bakteriyel izolat sayıları

| | Denemelerde Kullanılan Domates Çeşitlerinin Kodları | | |

Çizelge 4. 6. Türkiyenin farklı bölge ve illerinden elde edilen domates tohumlarından izole edilen bakteriyel patojenlerin oranları (%)

Bakteriyel Patojenler	Bölgeler ve İller									
	Akdeniz Bölgesi			İç Anadolu Bölgesi	Ege Bölgesi	Marmara Bölgesi	Doğu Anadolu Bölgesi		Karadeniz Bölgesi	
	Antalya	Adana	Mersin	Konya	İzmir	Balıkesir	Malatya	Iğdır	Tokat	Samsun
Pst	8	100	100	9	25	0	0	0	0	0
Cmm	21,4	0	0	18,2	0	0	0	0	0	100
Xv	8	0	0	27,3	25	0	33,3	0	43,3	0

Abdalla (2000), *Pseudomonas corrugata* ve *Xanthomonas vesicatoria*'yı sırasıyla %14,7 ve %12 oranında test numunelerinde tespit etmiştir. Bu patojenleri biyokimyasal, fizyolojik, patojenite testleri ve Biolog GN Mikroplaka Sistemi ile tanılamıştır. *X. vesicatoria*'yı tespit etmek için Tween besiyerini kullanmıştır.

Yine aynı şekilde *Xanthomonas campestis* pv. *vesicatoria* şüpheli kolonileri bulup ortaya çıkarmak üzere mXV ve Tween B ortamları kullanılmıştır. Bu ortamlarda *X. vesicatoria* sarı-beyaz etrafı kristalize bir hale ile çevrili tipik koloniler oluşturmakta ve bu besiyerleri teşhiste kolaylık sağlamaktadır. Özellikle mevcut yöntemlerle *X. vesicatoria*'nın tohumda tanılanması oldukça güçtür. Bu sebepten dolayı çok farklı besiyerleri kullanılmaktadır. Tween B % 90'ın üzerinde saptama oranına sahiptir. CKTM, ise Tween B besi yerinden daha yüksek oranda bakteriyi saptayabildiği halde non patojen *Xanthomonas*' ların ve *Xanthomonas campestris* patovarlarının gelişim yüzdesi daha yüksek olduğu için bu çalışmada tercih edilmemiştir (Gitaitis ve ark., 1991).

Fatmi ve Schaad (1988), domates tohumlarından *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'i tespit etmek için SCM besiyerini kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda da *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* için SCM besiyeri kullanılmış ve koyu gri etrafı açık renk haleli koloni oluşturdukları tespit edilmiştir.

Jones ve ark.(1989) domates fidelerinden elde ettikleri florasan pigment oluşturan izolatlar oksidaz testine negatif, arginin dehidrolaz ve tütünde hypersensitif reaksiyon testine pozitif sonuç verenlere erytrol, buz çekirdeği, DL –Lactate testlerini uygulamışlar ve bu testlere negatif sonuç verenleri *P. syringae* pv. *tomato* olarak belirlemişlerdir. Elde ettikleri bulgular çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla uygun olarak belirlenmiştir.

Fahy ve Lloyd (1983), *P. syringae* pv. *tomat*'nun King B besiyerinde UV ışık altında mavi-yeşil floresan pigment oluşturduğunu ve LOPAT (Levan testi, Oksidaz testi, pektolitik aktivite testi, Arjinin dehidrolaz testi, Tütünde aşırı duyarlılık testi) testlerine göre belirlenebileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar bu çalışmayı destekler yönde bulunmuştur.

Mensi ve ark. (2018), Tunus'un merkezinde, Kairouan'da fidanlıklarda yetişen domates fidelerinde *P. syringae* pv. *tomato* simptomlarını gözlemlemişlerdir. Biyokimyasal ve patojenite testleri sonucunda 16 izolat elde etmişlerdir.

Geylani (2004), RST9 ve RST10 primerlerini kullanarak 35 domates tohumu örneğinden elde edilen 43 izolattan 1'inde *X. vesicatoria* tespit etmişlerdir.

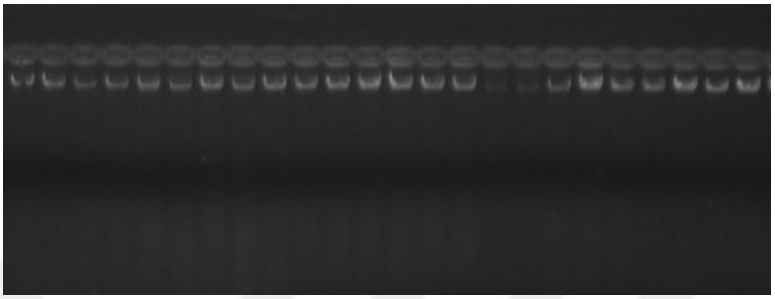
Çalışmamızda, 6 bölgemizden ve 10 farklı ilimizden temin edilen domates tohumlarından 110 adet bakteriyel izolat elde edilmiş 50 adedi HR ve patojenisite testlerine göre patojenik olarak belirlenmiştir. Yapılan biyokimyasal, morfolojik, fizyolojik testlere göre 10 adedi *X. vesicatoria*, 6 adedi *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ve 5 adedi *P. syringae* pv. *tomato* olarak tanılanmıştır.

Yukarıda belirtilen dünya genelindeki çalışmalar ve bizim çalışmamız göstermiştir ki; dünyanın farklı ülke ve bölgelerinde domates tohumlarıyla taşınan bakteriyel patojenler farklılık göstermektedir. Bu durumun domates yetiştirilen bölge ve ülkelerde patojenlerin dağılımı ve bulaşıklık durumu ile ilişkili olduğu, etmenlerle gerekli mücadele önlemlerinin alınmadığı durumda tohumlarla taşınmanın da önemli seviyelerde olabileceği durumunu kanıtlamıştır.

4.4.3. Moleküler Tanı Testleri

4.4.3.1. DNA İzolasyonu

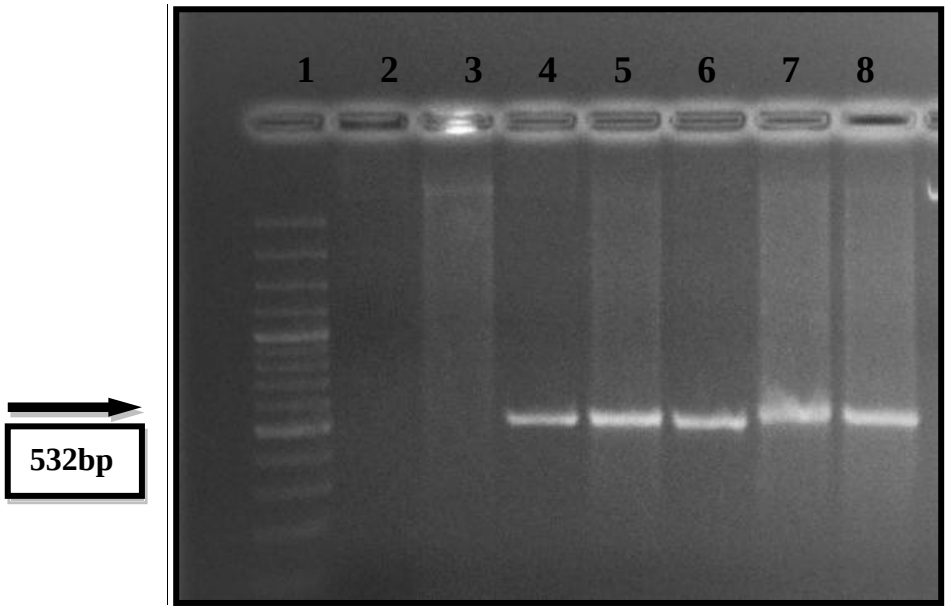
Qiagen kit ve Tam Otomatik İzolasyon Robotu (Qiacube) kullanımı ile yapılan DNA izolasyonundan sonra elde edilen genomik DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirilmiştir. Elde edilen bantlar Şekil 4.18'de görülmektedir.



Şekil 4. 18. DNA izolasyonu sonucu %1'lik agaroz jelde bantların görüntüsü

4.4.3.2. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatlarının PCR ile tanısı

Elde edilen genomik DNA'lar ile MM5F- MM5R primerleri kullanılarak yapılan PCR testleri sonucunda 5 izolat %1'lik agaroz jel üzerinde 532 bp büyüklüğünde bant oluşturmuş ve *P. syringae* pv. *tomato* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4. 19).



Şekil 4. 19. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* izolatlarının MM5F- MM5R primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerin %1'lik agaroz jelde oluşturdukları bantlar; 1: Marker (100bp, Simply), 2: Kontrol (distile su), 3: Pss (referans), 4: KKÜAÇ 13, 5: ADYÇ2, 6: MERYÇ1, 8: IF3

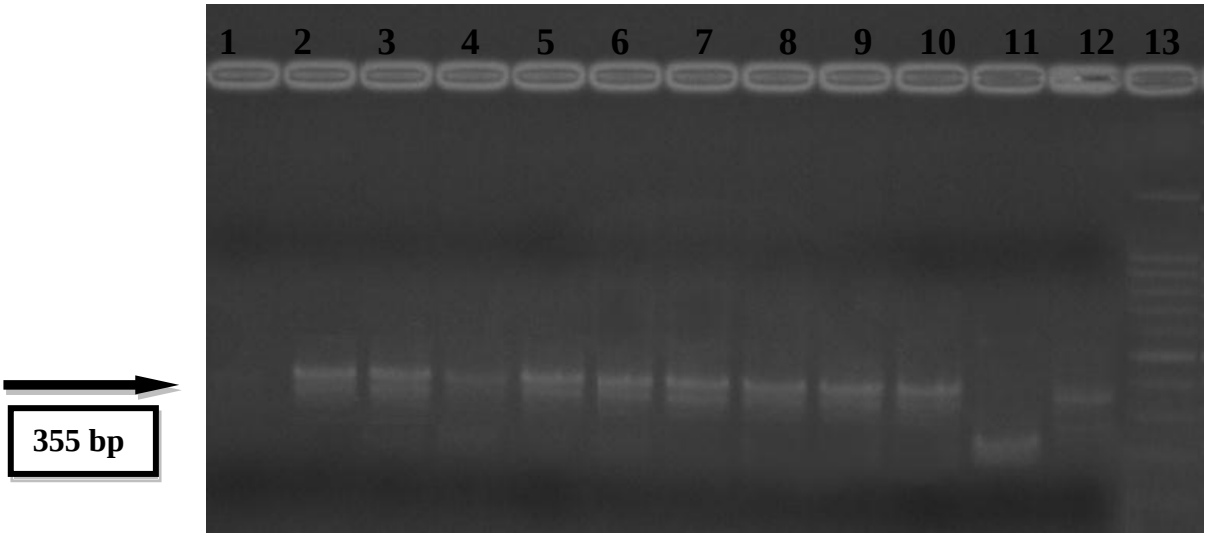
Zaccardelli ve ark. (2008), *P. syringae* pv. *tomato* ile enfekteli alandan toplanan cherry domates lerden izole edilen patojeni $hrpZ_{Pst}$'den bir 532-bp fragmanı amplifiye eden MM5F ve MM5R primerlerini kullanarak tanısını yapmışlardır. Çalışmamızda da biyokimyasal testler ile *P. syringae* pv. *tomato* olarak tanılanan izolatlarımızın PCR ile teşhisi araştırıcıların önerdiği spesifik primerler kullanılarak desteklenmiştir. Ayrıca aynı spesifik primerleri kullanan Shenge ve ark. (2008), Félix-Gastélum ve ark.(2012), Campanile ve ark.(2010), Kubiak ve Oszako (2010), Wen ve ark. (2013)'larda aynı bulguları elde etmişlerdir.

Ünlü ve ark. (2017), Batı Akdeniz Bölgesi'nde domates yetiştiriciliği yapılan alanlardan 10 tane *P. syringae* pv. *tomato* izolatı elde etmişlerdir. MM5F ve MM5R primerlerini kullanarak izolatların tanısını yapmışlardır.

Mensi ve ark. (2018), Tunus'un merkezinde, Kairouan'da fidanlıklarda yetişen domates fidelerinde *P. syringae* pv. *tomato* simptomlarını gözlemlemişlerdir. Biyokimyasal ve patojenite testleri sonucunda 16 izolat elde etmişlerdir. Patojen, $hrpZ_{Pst}$ geninden spesifik primerler (MM5F ve MM5R) kullanılarak doğrulamışlardır ve 16 izolatın tamamında 532 bp'lik bir bant elde etmişlerdir.

4.4.3.2. *Xanthomonas vesicatoria* İzolatlarının PCR Testiyle Tanısı

Elde edilen genomik DNA'lar ile RST9- RST10 primerleri kullanılarak yapılan PCR testleri sonucunda 10 izolat %1'lik agaroz jel üzerinde 355 bp büyüklüğünde bant oluşturmuş ve *X. vesicatoria* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4. 20).



Şekil 4. 20. *Xanthomonas vesicatoria* izolatlarının RST9- RST10 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerin %1'lik agaroz jelde oluşturdukları bantlar: 1: kontrol, 2: TF11, 3: KF1, 4: TM10, 5:

MRG1, 6: TF10, 7: TF9, 8: KYÇ2, 9: TH10, 10: ASC7, 11: KMYÇ2, 12: KH1, 13: Marker (100bp, Simply).

Leite Jr (1995), hrp-genleri için RST 9 ve RST 10 primerleri kullanılarak *X. vesicatoria*'yı 355 bp'de spesifik bir bant elde ederek belirlemişlerdir. Çalışmamızda da biyokimyasal testler ile *X. vesicatoria* olarak tanılanan izolatlarımızın PCR ile teşhisi araştırıcıların önerdiği spesifik primerler kullanılarak desteklenmiştir. Ayrıca aynı spesifik primerleri kullanan Pohronezny ve ark. (1990), Basım ve ark. (2007), Mirik ve Aysan (2009) 'larda aynı bulguları elde etmişlerdir.

4.4.3.3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* İzolatlarının PCR Testiyle Tanısı

Elde edilen genomik DNA'lar ile CMM5 ve CMM6 primerleri kullanılarak yapılan PCR testleri sonucunda %1'lik agaroz jel üzerinde herhangi bir bant elde edilememiştir. HR, patojenite ve biyokimyasal testler bu izolatların *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* olduğunu göstermektedir. Farklı primerlerle çalışma tekrarlanacaktır.

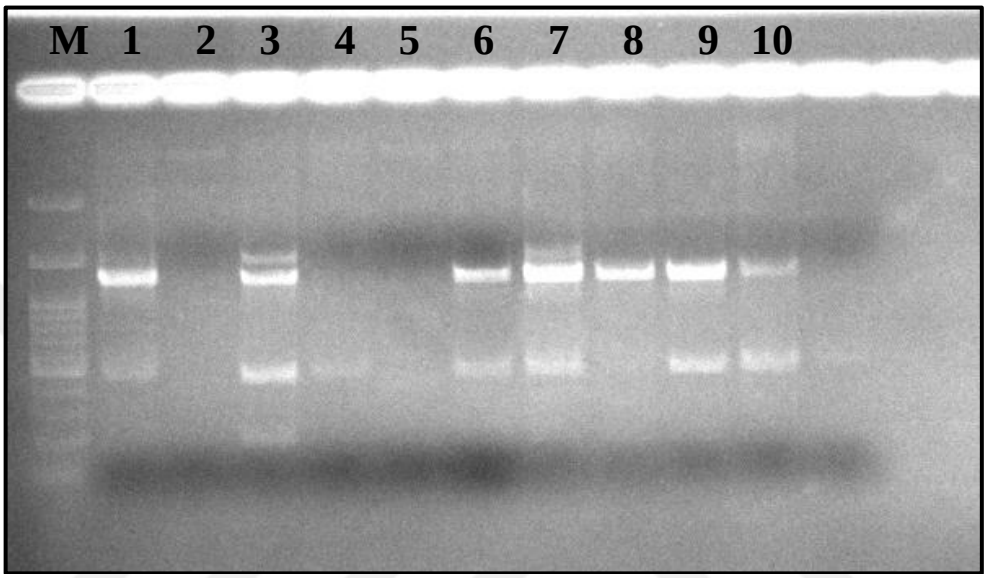
Dreier ve ark. (1995), *Pat*-1 bölgesinden türetilmiş CMM5 ve CMM6 primerlerine dayalı bir polimeraz zincir reaksiyonu geliştirmişledir. 23 izolatta 614 bp'de bant elde etmişlerdir.

Burokienė (2006), enfekteli domates fidelerindeki *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'i BIO-PCR yöntemi ile belirlemişlerdir. Spesifik primer olan CMM5 ve CMM6 kullanarak bir ile iki kolonin bile tespit edilebildiği belirlenmiştir.

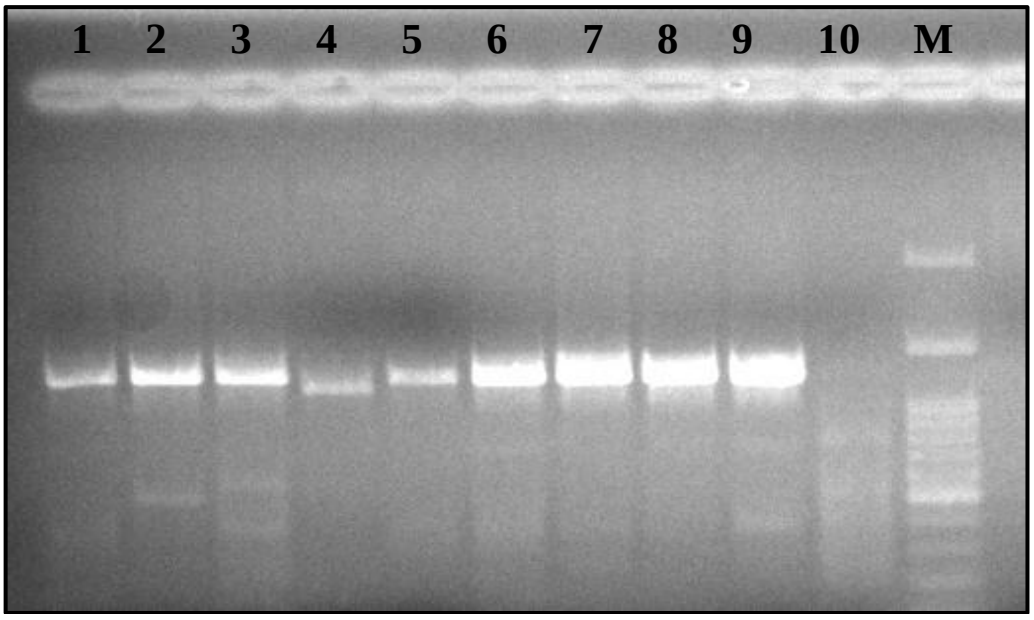
Geylani (2004), domates tohumlarında yapmış oldukları tez çalışmasında 43 izolattan 9'unda *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'i CMM5 ve CMM6 primerlerini kullanarak tespit etmişlerdir.

4.4.3.4. ISSR ve SRAP PCR Sonuçları

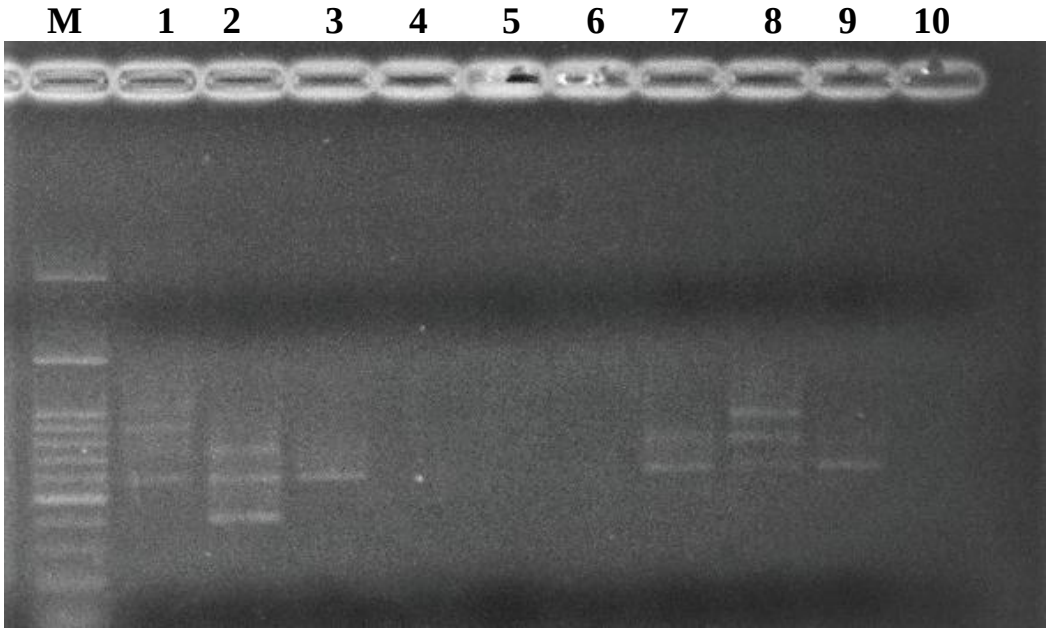
Çalışmada elde edilen *Xanthomonas vesicatoria* izolatları Çizelge 3.2'de belirtilen 7 farklı ISSR primerleri (731, 112, 809, 827, 834,880, 889) ve 9 farklı (em10-me4, em7-me9, em10-me9, em7-me8, em4-me12, em10-me11, em4-me11, em4-me4, em11-me12) SRAP primerleri kullanılmıştır. ISSR ve SRAP-PCR analizlerinden elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.22; 4.23; 4.24; 4.25; 4.26'da verilmiştir.



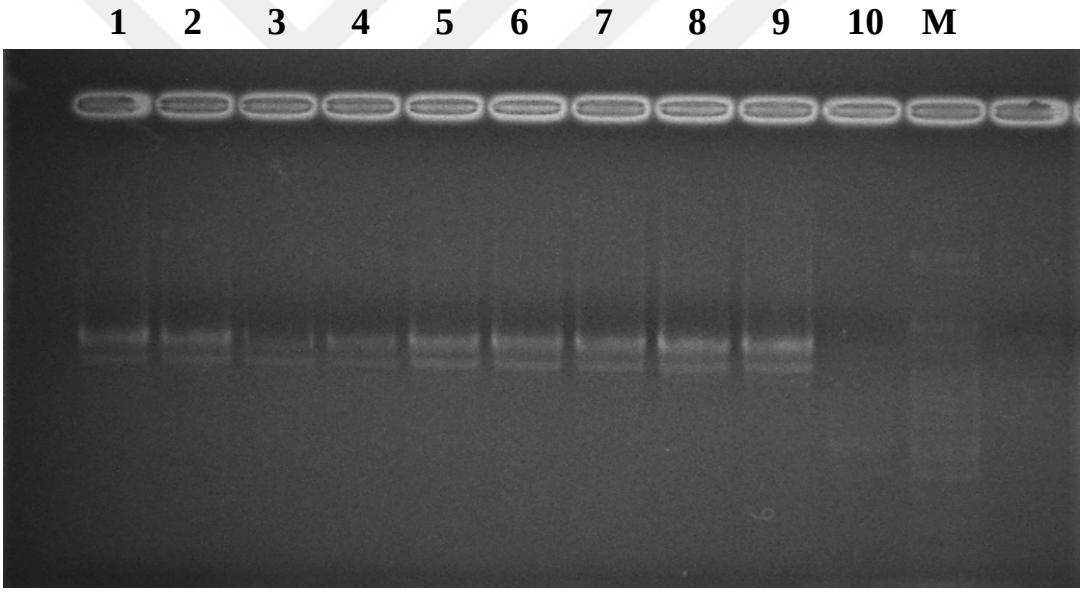
Şekil 4. 21. ISSR 880 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü., 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı



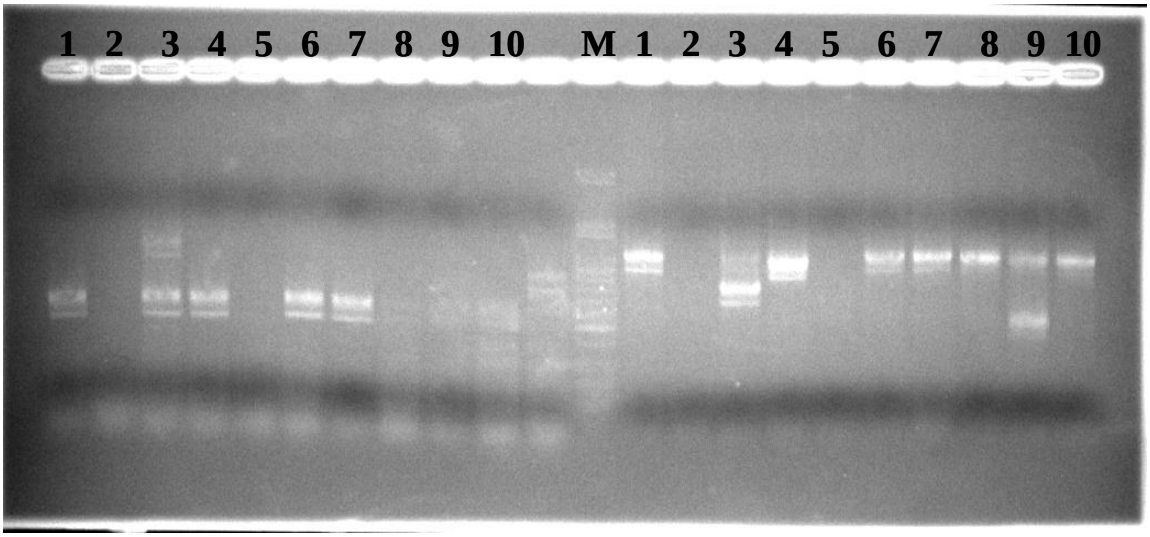
Şekil 4. 22. ISSR 834 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı



Şekil 4. 23. ISSR 809 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı



Şekil 4. 24. ISSR 827 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü, 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı



Şekil 4. 25. SRAP em7-me9 ve em4-me12 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü., 1-10: *Xanthomonas vesicatoria* izolatları, M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markırı

Çalışmamızda domates tohumlarından en fazla sayıda izole edilen patojen *X. vesicatoria* izolatlarının genetik farklılıklarını ortaya koymak için ISSR ve SRAP markerları kullanılmıştır. ISSR markerlarından 112, 731, 889, SRAP markerlarından em10-me4, em10-me9, em7-me8, em10-me11, em4-me11, em4-me4, em11-me12 sonuç vermemiştir. ISSR markerlarından 809, 827, 834, 880, SRAP markerlarından em7-me9, em4-me12 ile yapılan analizler sonucunda; SRAP markerları ile yapılan analizlerde 3 ve 9 nolu izolatlar (TM10 ve AS7) farklılık gösterirken diğer tüm izolatlar arasında genetik farklılık belirlenmemiştir. ISSR markerları ile yapılan analizlerde ise ISSR-809, 827, 880, 884 kullanılmış diğer markerların *X. vesicatoria*'nın analizinde başarısız oldukları belirlenmiştir.

Marker 827, 880 ve 884 ile yapılan analizler sonucunda *X. vesicatoria* izolatları arasında genetik farklılık belirlenememiş ancak 809 nolu primer kullanımı ile 2 ve 9 nolu izolatların (KF1 ve AS7) genetik farklılık gösterdikleri belirlenmiştir.

Bu konuda daha farklı ve daha fazla sayıda primer kullanımı ile *X. vesicatoria* izolatları arasında benzerlik ve farklılıkların detaylı bir şekilde ortaya konulabileceği kanaatine varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç

2018-2019 yıllarında yürütülen bu tez çalışmasında Türkiye'nin 6 bölgesinden ve 10 ilden temin edilen domates tohumlarından bakteriyel patojenlerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan çeşitli firma ve yerli üreticilerden temin edilen 30 domates çeşidinden en yoğun bakteriyel popülasyona sahip olan çeşitler; SC2121, H2274, Pembe, Kendi üretim aday çeşit, Yerli çeşit, Falcon, Köy tipi- yayla, Nuran, Ancon, Rio Grande olarak belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan 30 çeşide ait 50 tohum örneğinin tohum sağlığı ve çimlenme gücünü tespit etmek amacıyla tohumların çıkış oranı belirlenmiş ve hastalık simptomları gözlemlenmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi çıkış yapan çok az sayıda fidede hastalık simptomlarına rastlanmıştır ve bu tohumlardan yapılan izolasyonlar sonucunda daha önce izole edilmiş olan patojenler tekrar belirlenmiştir. Uygun koşullar oluştuğu takdirde elde edilen bu patojenler önemli sorunlar meydana getirebileceğinden bu sonuçlar önemlidir.

Bölgelere göre en yüksek tohum çıkış oranına sahip çeşitler; Akdeniz Bölgesinde AH9661, AF, ASC, AN, AS, AP, ADYÇ, İç Anadolu Bölgesinde KSYÇ, Ege Bölgesinde İF, Marmara Bölgesinde BA, Doğu Anadolu Bölgesinde IY, Karadeniz Bölgesinde TM, TRG olarak belirlenmiştir.

Bakteriyel patojenlerin teşhisinde öncelikle patojenisite testleri ve biyokimyasal testler yapılmıştır. Çalışmada toplam 110 izolattan tütünde HR reaksiyonu veren 57 izolat biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanıları yapılmış ve 10 izolat *X. vesicatoria*, 6 izolat *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, 5 izolat *P. syringae* pv. *tomato* olarak belirlenmiştir.

Patojenisite ve biyokimyasal testler sonucunda belirlenen patojenlerden sayısal olarak en fazla miktarda izolat elde edilen *X. vesicatoria*'dır. Bu nedenle *X. vesicatoria* izolatlarının farklılıkları araştırılmıştır. Domates tohumlarından elde edilen *X. vesicatoria*'nın ISSR ve SRAP markırları ile genetik farklılıklarının belirlenmesi ülkemiz için bir ilki oluşturmaktadır.

Bu çalışmadan çıkarılabilecek sonuçlardan biri de patojenlerin teşhisi için tek bir yöntemin kullanımının yeterli olmadığıdır. Teşhis için en doğru yolun klasik ve modern tekniklerin bir arada kullanılması gerektiğidir.

Bölgelere göre tohumlarda görülen patojen türleri ve bu patojenlerin yoğunlukları farklılık göstermektedir. Tohumdan elde edilen *X. vesicatoria* izolatlarının İç Anadolu Bölgesi (%27,3), Karadeniz Bölgesi (%21,65) ve Doğu Anadolu Bölgesi (%16,65), *P. syringae* pv. *tomato* izolatlarının Akdeniz Bölgesi (% 69,3) ve Ege Bölgesi (% 25), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarının Karadeniz Bölgesi (%50) ve İç Anadolu Bölgesi (%18,2) gibi bölgelerde daha yoğun olduğu belirlenmiştir. Tohumdan tespit edilen patojenlerin fidelerde ortaya çıkışında enfeksiyon zamanı, konukçu genotipi gibi faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerde (sıcaklık, nem vb.) önemlidir. Bu nedenle tohumda çok az yoğunlukta olan bakteriyel patojenler, bu koşulların uygun olmasıyla birlikte epidemilere neden olabilmektedir.

Toplam 30 çeşitten 17'sinde bakteriyel patojenlere rastlanmıştır. Tohumlarda belirlenen bu patojenler çevresel faktörlere bağlı olarak fidelere geçiş yaparak patojenin yayılmasına neden olacağından bu saptamalar oldukça önemlidir.

Domates tohumlarında bakteriyel patojenlerin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonuna yönelik çalışmalar oldukça azdır. Bu nedenle elde edilen bu bilgiler gelecek çalışmalara ışık tutması açısından önemlidir.

5.2 Öneriler

Tez çalışması sırasında yapmış olduğumuz gözlem ve bulgulara dayanarak önerilerimiz aşağıda belirtildiği gibidir.

1- Tohumda belirlenen patojenler primer inokulum kaynaklarını oluşturması için hastalıklardan ari tohum kullanılması bir bölgeden başka bir bölgeye hastalık dağılımını önleyecektir.

2-Hastalıktan ari tohum kullanımı bakteriyel patojenlerin mücadelesinin zor olması açısından da önemlidir. Bu nedenle özellikle tohum yetiştiriciliğinin yapıldığı tarlalarda kültürel mücadeleye de önem verilmelidir.

3- Tohum kökenli *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *X. vesicatoria* gibi bakteriyel patojenlerin yok edilmesi veya azaltılmasında etkili olabilecek fiziksel ve kimyasal tohum uygulamaları yapılmalıdır.

4- Bu çalışma sonucunda hiç bakteri görülmeyen çeşitlerin *C. michiganensis* subsp. *michiganensis, P. syringae* pv. *tomato* ve *Xanthomonas vesicatoria* gibi tohum kökenli patojenlere dayanıklılığı ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Domates ıslah çalışmalarında tohum kökenli hastalıklara dayanıklı ya da tolerant çeşitler kullanılmalıdır.

5- Bakteriyel patojenlerin moleküler karakterizasyonu ile etmenin teknik özelliklerinin tam olarak anlaşılması sağlanacaktır. Bu durum konukçu-patojen arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılmasının yanısıra yeni geliştirilecek domates çeşitlerine ıslah çalışmalarında temel sağlayacaktır.

6- Bakteriyel patojenlerin bölgeler arasında gösterebilecekleri genetik farklılık nedeni ile yeni mücadele teknikleri geliştirilmesi gerekebilecektir. Çalışmamızda elde edilen bulgular günümüzde bu farklılığın olmadığını göstermiş ancak olması durumunda alınabilecek önlemlere dikkat çekmesi açısından da önem oluşturmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Abak, K., 2017, Türkiye'de Domatesin Dünü, Bugünü ve Yarını, Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi (TURKTOB), 17, 8-13.

Abdalla, M. E., 2000, Detection and identification of seed- borne pathogenic bacteria of imported tomato seeds in Egypt. EPPO Bulletin, 30(2), 327-331.

Agrios, G. N., 2005, Plant pathology. Academic press, Fifth edition, London, p. 634-635.

Alan, R.ve Güvenç, İ., 1992, Türkiye'nin Sebze İhracatına Genel Bir Bakış. Tarımda Kaynak Dergisi, 1, 1-2, 15-7.

Anonim, 2018. Tomato production quantities. Erişim tarihi 30.08.2018. Erişim adresi, www.faostat.fao.org

Anonim,, 2019a, Everything you need to know about tomatoes. Erişim tarihi 10.04.2019. Erişim adresi, https://www.medicalnewstoday.com/articles/273031.php.

Anonim 2019b, Nutrition Facts and Health Benefits. Erişim tarihi 10.04.2019. Erişim adresi, https://www.healthline.com/nutrition/foods/tomatoes.

Anonim, 2019c, FAO. Erişim tarihi 23.05.2019. Erişim adresi, http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.

Anonim, 2019d, Erişim tarihi 21.03.2019. Erişim adresi, https://www.dunya.com/sektorler/tarim/domatesin-ekonomiye-katkisi-127-milyar-lira-haberi-352561.

Anonim, 2019e Erişim tarihi 21.03.2019. Erişim adresi, https://www.ta,rimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/Bitki%20Sa%C4%9Fl%C4%B1%C4%9F%C4%B1%20Hizmetleri/hastalik_zararlilari_ile_m%C3%BCadele_dokumanlari/domates.pdf .

Anonim, 2019f , EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. Erişim tarihi 21.03.2019. Erişim adresi, https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A1_list.

Anonim, 2019g, *Xanthomonas campestris* var. *vesicotoria* Bakteriyel Leke, Erişim tarihi 21.03.2019. Erişim adresi, http://www.bitkisagligi.net/Domates_Xanthomonas_campestris_vesicatoria.htm.

Ark, P.A., 1944. Studies on Bacterial Canker of Tomato . Phytopathology 33 (4):394-400.

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

Aysan, Y., 1999, Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığının (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) Tanımı, Irklarının Tespiti, Domates Tohumlarında Saptanması ve Kimyasal Savaşıma Alternatif Yöntemlerin Araştırılması Üzerine Çalışmalar. ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Tezi. Adana, IX.

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, 549-54.

Aysan, Y., Erkılıç, A., Çınar, Ö.ve Abak, K., 1995, Domates bakteriyel kara leke hastalığına karşı dayanıklı çeşit ile toprak solarizasyonunun hastalık gelişimi ve verim üzerine etkileri. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 26-9.

Aysan, Y., Mırık, M., Çetınkaya, R. Y.ve Küsek, M., 2005, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun yayılmasında tohum kökenli inokulumun rolü. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi, 353 (özet).

Bashan, Y., 1986, Field dispersal of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, and *Alternaria macrospora* by animals, people, birds, insects, mites, agricultural tools, aircraft, soil particles, and water sources. Canadian journal of botany, 64, 2, 276-81.

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

Bashan, Y.ve Assouline, I., 1983, Complementary Bacterıal Enrıchment Technıques For The Detectıon Of *Pseudomonas syrıngae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestrıs* pv. *vesıcatorıa* ın Infested Tomato and Pepper Seeds, Phytoparasitica, 11:3-4.

Bashan, Y. and de-Bashan, L. E., 2002, Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol., 68, 6, 2637-43.

Bashan, Y., Okon, Y. ve Henis, Y., 1978, Infection studies of *Pseudomonas tomato*, causal agent of bacterial speck of tomato. Phytoparasitica, 6, 3, 135.

Basim, E. and Basim, H., 2013, Antibacterial activity of Turkish endemic sığla (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) storax against agricultural plant pathogenic bacteria and its use as a seed protectant. Journal of Food, Agriculture & Environment, 11, 3&4, 2447-50.

Basim, E., Basim, H., Dickstein, E. and Jones, J., 2004, Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* o,n greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean region of Turkey. Plant disease, 88, 9, 1048.

Basim, E., Basim, H.ve Özcan, M., 2006, Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of food engineering, 77, 4, 992-6.

Basim, H., Basim, E., Jones, J. B., Minsavage, G. V. and Dickstein, E. R. 2004, Bacterial spot of tomato and pepper caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in the western Mediterranean region of Turkey. *Plant disease*, *88*(1), 85-85.

Baştaş K.K., Altınparmak S., Boyraz N., 2011, Yaygın Olarak Ekimi Yapılan Buğday Tohumlarında Bakteriyel Yaprak Çizgi Hastalığı‟nın (*Xanthomonas translucens*) Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 25(1):106-114.

Baysal, Ö., İkten, H., Çalışkan, M. and Zeller, W., 2008 An efficient method in genetical discrimination of biological control agents by molecular ISSR and RAPD markers. 2nd International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Disease, 27.

Baysal, Ö., Mercati, F., İkten, H., Yıldız, R. Ç., Carimi, F., Aysan, Y. and Silva, J. A. T., 2011, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganesis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. Physiological and molecular plant pathology, 75, 3, 113-9.

Baysal, Ö., Siragusa, M., Gümrükcü, E., Zengin, S., Carimi, F., Sajeva, M.veDa Silva, J. A. T., 2010, Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant. Biochemical genetics, 48, 5-6, 524-37.

Bender, C. L. and Cooksey, D. A., 1986, Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. Journal of Bacteriology, 165, 2, 534-41.

Benlioğlu, K.and Benlioğlu, S., 1998, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya Karşı Bakir Dayanıklılığı Üzerinde Çalışmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 21-5.

Beran, P. and Mráz, I., 2013, Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. Crop protection, 43, 213-5.

Bereswill, S., Bugert, P., Völksch, B., Ullrich, M., Bender, C. L.and Geider, K., 1994, Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. Appl. Environ. Microbiol., 60, 8, 2924-30.

Blancard, D., Abak, K., Sarı, N.ve Abak, M. F., 1993, Domates hastalıkları: gözlem, teşhis, mücadele, Hasad Yayıncılık, 112-117.

Bogatsevska, N., Sotirova, V. and Stamova, L., 1989, Race Of *Pseudomonas syrıngae* pv. *tomato* (Okabe) Young Et-Al. Dokladi Na Bolgarskata Akademiya Na Naukite, 42, 2, 129-30.

Bonas, U., Van den Ackerveken, G., Büttner, D., Hahn, K., Marois, E., Nennstiel, D., Noel, L., Rossier, O. ve Szurek, B., 2000, How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host. Molecular plant pathology, 1, 1, 73-6.

Bonn, W., 1980, Incidence and severity of bacterial speck of tomato in southwestern Ontario in 1979. Plant Disease, 64, 6, 586-7.

Bonn, W., Gitaitis, R. ve MacNeill, B., 1985, Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato transplants shipped from Georgia. Plant disease (USA), 0191-2917.

Braun - Kiewnick, A. and Sands D.C.,2001, II. Gram-negative bacteria: *Pseudomonas*. (Laboratory guide for ıdentification of plant pathogenic bacteria). Third edition, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, 84 - 120.

Bremer, H. and Özkan, M., 1950, Tomato wilt diseases. Mahsul Hekimi, 3, 5.

Bryan, M.K., 1930, Bacterial speck of tomatoes. Phytopathology 23:897-904.

Buonaurio, R., Stravato, V. and Cappelli, C., 1996, Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 1 in Italy on Pto Gene- Bearing Tomato Plants. Journal of Phytopathology, 144, 9- 10, 437-40.

Burokienė, D., 2006, Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. Agronomy Research, 4, 151.

Campanile, F., Perrone, D., Zaccardelli, M., and Parisi, M., 2010, Susceptibility, in Open Field, of Processing and Cherry Tomato Cultivars to Bacterial Speck. In *III International Symposium on Tomato Diseases 914* (pp. 469-472).

Chambers, S. and Merriman, P., 1975, Perennation and control of *Pseudomonas tomato* in Victoria. Australian Journal of Agricultural Research, 26, 4, 657-63.

Chang, R., Ries, S. and Pataky, J., 1991, Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. Phytopathology, 81, 10, 1276-81.

Colin, J.and Chafik, Z., 1986, Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco.

Cuppels, D. and Elmhirst, J., 1999, Disease development and changes in the natural *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on field tomato plants. Plant disease, 83, 8, 759-64.

Cuppels, D. A., Louws, F. J. and Ainsworth, T., 2006, Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. Plant disease, 90, 4, 451-8.

Çemen, A., 2017, Domates Bakteriyel Benek Hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)'nın Biyolojik Mücadelesinde Bakteriyofajların Kullanım Olanakları, Yüksek lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi.

Çınar, Ö., 1980, Bakteriyel Domates solgunluğu hastalığı (*Corynebacterium michiganense* (Erwin. F. Smith) Jensen)‟ nın tanımı, savaş yöntemleri ve etmene karşı dayanıklı domates çeşitleri üzerine araştırmalar, Bilimsel Araştırma ve İnceleme Tezleri, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi.

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, 288-96.

Deng, G., Qu, X., Chen, X. R., Yang, C. D., Xue, L., 2008, Pathogen identification of bacterial leaf speck of tomato based on 16S rDNA, physiology and biochemistry in Gansu Province. PlantProt, 34: 47–51.

Denny, T. P., 1988 Phenotypic diversity in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Microbiology, ,134, 7, 1939-48.

Devash, Y., Okon, Y.veHenis, Y., 1980, Survival of *Pseudomonas tomato* in soil and seeds. Phytopathologische Zeitschrift, 99, 2, 175-85.

Devran, Z. and Baysal, Ö., 2012, Genetic characterization of *Meloidogyne incognita* isolates from Turkey using sequence-related amplified polymorphism (SRAP). Biologia, 67, 3, 535-9.

Doidge, E. M., 1921 A tomato canker. Ann. Appl. Biol, 7, 7, 407-30.

Dowson, D., 1939. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 2, 100, 177-93.

Dreier, J., Bermpohl, A.and Eichenlaub, R., 1995, Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology, 85, 4, 462-8.

Durmus, M., Yetgin, O., Abed, M. M., Haji, E. K.ve Akcay, K., 2018, Domates Bitkisi, Besin İçeriği ve Sağlık Açısından Değerlendirmesi.

Dye DW, 1978. Genus IX. *Xanthomonas*. Dowson 1939. In: A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. Eds Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Panagopoulos CG and Robbs CF. New Zealand Journal of Agricultural Research, 21, 153–177.

Ekici, O., and Baştaş, K. 2015, Determination of the Resistance Reactions of Some Tomato Cultivars against Bacterial Speck Disease. Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences, 28(2), 42-51.

Erkan, S., 1998, Tohum Patolojisi. EÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir. Gözdem Ofis.

Erkılıç, A., Çınar, Ö. and Aysan, Y., 1994, Effects of soil solarization and chemical methods on bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) on tomatoin: 9^{h} Congress of the mediterraneam phytopathological union,, 18-24 September, Kuşadası, Aydın, Turkey, pp 397-399.

Fahy P. C. and Lloyd A. B., 1983, *Pseudomonas*: The flourescent pseudomonads, Plant Bacterial Dideases, Academics Press Australia, 141-188.

Fahy P.C., and Presley G.J., 1983, Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide. Academic Press, Sydney. 393.

Fatmi, M. and Schaad, N., 1988, Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. Phytopathology, 78, 1, 121-6.

Fatmi, M., N.W. Schaad, and H.A. Bolkan., 1991, Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. Plant Dis. 75:383-385.

Fatmi, M., Bolkan, H.A. and Schaad, N.W., 2017, 2, Fatmi, M., Walcott, R. , Schaad, N. W., Detection of Plant- Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Matrial, *The American Phytopathological Society*, U.S.A., 111-119.

Fatmi, M., N.W. Schaad, and H.A. Bolkan. 1991, Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. Plant Dis. 75:383-385.

Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E., Espinoza-Mancillas, M. G., Leyva-Lopez, N. E., Martínez-Valenzuela, C., Martínez-Álvarez, J. C., & Herrera-Rodríguez, G., 2012, Halo-spot and external stem necrosis of tomato caused by *Pseudomonas syringae* in Sinaloa, Mexico. *Phytoparasitica*, *40*(4), 403-412.

Gardner, M. W.ve Kendrick, J. B., 1923, Bacterial spot of tomato and pepper. Phytopathology, 13, 7, 307-15.

Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R.ve Burger, A., 2003, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the

understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. Journal of biotechnology, 106, 2-3, 179-91.

Geylani, E., 2004, Domates'te Tohumla Taşınan Bakterilerin Tanılanması Üzerinde Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Gitaitis, R. D. (1989). Survey of phytopathogenic bacteria recovered from commercial tomato seed and their secondary spread within tomato transplant fields. In Proc. Int. Conf. Plant Pathol. Bacteria, 7th. Budapest, Hungary, June 11–16 (pp. 293-98).

Gitaitis, R., Beaver, R. and Voloudakis, A., 1991 Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. Plant Disease, 75, 8, 834-8.

Gitaitis, R. D., Beaver, R. W. and Dhanvantari, B. N., 1989, Detection of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* in tomato transplants (A. W. Seattler, N. W. Schaad and D. A. Roth, Edts.). Minnesota, USA. . The American Phytopathological Society.

Gleason, M. L., Gitaitis, R. D.and Ricker, M. D., 1993, Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. Plant Disease, 77, 11, 1069-76.

Goode, M. J.and Sasser, M., 1980, Prevention-the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. Plant Disease, 64, 9, 831-4.

Grogan, R. G., Kendrick, J. B**.** 1953**,** Seed trnsmission, mode overwintering and spread of bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology* 43: 473 (Abstr.).

Gu, Y. Q.and Martin, G. B., 1998, Molecular mechanisms involved in bacterial speck disease resistance of tomato. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 353, 1374, 1455-61.

Güvenç, İ.ve Alan, R., 1994, Türkiye'nin Avrupa Topluluğu Ülkelerine Sebze İhracatı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25, 1.

Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefen, T. and Manulis, S., 2005 Comparison of extraction procedures and determination of the detection, threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. Plant Pathology, 54, 5, 643-9.

Harvey, M., Quilley, S.and Beynon, H., 2002, Exploring the Tomato: Transformations of Nature. Economy and Society, Cheltenham: Edward Elgar.

He, S. Y., Bauer, H. C., Collmer, A.,1993, *Pseudomonas syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. Cell 73, 1255±1266.

Henis, Y.ve Bashan, Y., 1986, Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens. Microbiology of the phyllosphere/edited by NJ Fokkema and J. van den Heuvel.

Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J.ve Eichenlaub, R., 1999, Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. Environmental microbiology, 1, 2, 113-8.

Jones, J., Bouzar, H., Stall, R., Almira, E., Roberts, P., Bowen, B. W., Sudberry, J., Strickler, P.ve Chun, J., 2000, Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 3, 1211-9.

Jones, J.and Pernezny, K., 1991 Bacterial spot. Compendium of Tomato Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 73.

Jones J B, Jones J P, Stall R E & Zitter T A , 1991. Compendium of tomato diseases. St Paul: APS Press. 73.

Kahveci, E.and Gürcan, A., 1993, Antalya ilinde domateslerdeki bakteriyel hastalık etmenlerinin tespiti. Bitki Koruma Bülteni.

Kaneshiro, W. S., Mizumoto, C. Y.and Alvarez, A. M., 2006, Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. European Journal of Plant Pathology, 116, 1, 45-56.

Karaca, İ. ve Saygılı H, 1977, Domateslerde bakteriyel hastalıklar. İzmir Bölge Zirai Mücadele ve Karantina Başkanlığı, Yayın No: 1, İzmir, 22.

Karaca, İ.ve Saygılı, H., 1982, Batı Anadolu'nun bazı illerinde domates ve biberde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar. III. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 12-5.

Karabuyuk, F., Aysan, Y., 2018, Aqueous plant extracts as seed treatments on tomato bacterial speck disease, ISHS Acta Horticulturae 1207: V International Symposium on Tomato Diseases: Perspectives and Future Directions in Tomato Protection, (pp. 193-196).

Karahan, O., 1965, Muhtelif sebzelerde zararlı hastalık amilleri ve mücadeleleri. TC Tarım Bakanlığı, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Müdürlüğü, 42.

Kavitha, R., and Umesha, S. (2007). Prevalence of bacterial spot in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop protection*, *26*(7), 991-997.

Kaya, Y., Al-Remi, F., Arvas, Y. E. and Durmuş, M., 2018, Domates Bitkisi Ve in Vitro Mikro Çoğaltımı (Tomato Plant and Its In Vitro Micropropagation). Journal of Engineering Technology and Applied Sciences, 3, 1, 57-73.

King, E. O., Ward, M. K.veRaney, D. E., 1954, Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. Translational Research, 44, 2, 301-7.

Kızıl, S., Uyar, F. ve Sagir, A., 2005, Antibacterial activities of some essential oils against plant pathogens. Asian Journal of Plant Sciences, 4: 225-228.

Klement, Z.ve Goodman, R., 1967, The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 5, 1, 17-44.

Klement, Z., Rudolph, K.ve Sands, D., 1990, Methods in phytobacteriology, Akademiai Kiado, p.112

Kovacs, N., 1956, Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178, 4535, 703.

Kritzman, G., 1993, A chemi-thermal treatment for control of seedborne bacterial pathogens of tomato. Phytoparasitica, 21, 2, 101.

Kubiak, K., and Oszako, T. 2010, Filtry piaskowe w ochronie roslin przed chorobami w szkolkach. *Leśne Prace Badawcze, 71*(4), 343-349.

Krttzman, G., 1991, A method for detection of seedborne bacterial diseases in tomato seeds. Phytoparasitica, 19, 2, 133.

Lawton, M.and MacNeill, B., 1986, Occurrence of race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on field tomato in southwestern Ontario. Canadian Journal of Plant Pathology, 8, 1, 85-8.

Leite Jr, R., 1995, Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. seed, 11, 24.

Leite, R., Minsavage, G. V., Bonas, U. and Stall, R. E., 1994, Detection and identification of phytopathogenic Xanthomonas strains by amplification of DNA sequences related to the hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Appl. Environ. Microbiol., 60, 4, 1068-77.

Lelliott, R. A. ve Stead, D. E., 1987, Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants (Methods in Plant Pathology). Oxford, U.K., 1-200 pp.

Lindgren, P. B., 1997, The role of *hrp* genes during plant bacterial interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 35, 129-152.

Louws, F., Rademaker, J.and De Bruijn, F., 1999, The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. Annual review of phytopathology, 37, 1, 81-125.

Louws, F., Wilson, M., Campbell, H., Cuppels, D., Jones, J., Shoemaker, P., Sahin, F.ve Miller, S., 2001, Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. Plant Disease, 85, 5, 481-8.

Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C., Smart, C., Opgenorth, D., Ishimaru, C., Hausbeck, M., De Bruijn, F.ve Fulbright, D., 1998, rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. Phytopathology, 88, 8, 862-8.

Mensi, I., Jabnoun-Khiareddine, H., Zarrougui, N. E., Zahra, H. B., Cesbron, S., Jacques, M. A., ve Daami-Remadi, M., 2018, First report of tomato bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Tunisia, New Disease Reports 38, 21.

McCarter, S., Jones, J., Gitaitis, R.ve Smitley, D., 1983, Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia. Phytopathology, 73, 10, 1393-8.

McGuire, R. G., Jones, J. B.ve Sasser, M., 1986, Tween Media for Semiseletive ve İsolation of *Xanthomonas campetris* pv. *vesicatoria* from Soil and Plant Material. Plant Disease, 70, 9, 887.

Miller, A.S., Jones, J. B. and Kurowski, C., 2017, 2, Fatmi, M., Walcott, R. , Schaad, N. W., Detection of Plant- Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Matrial, *The American Phytopathological Society*, U.S.A., 125-133.

Mirik, M., and Y. Aysan. 2009, Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in naturally infected pepper seeds in Turkey, *Journal of Plant Pathology* 433-436.

Naika, S., de Jeude, J. v. L., de Goffau, M.and Hilmi, M., 2005, AD17E Cultivation of tomato. Agromisa Foundation, p 17,

Neergaard, P., 1977, Seed pathology Vols. 1 and 2, The MacMillan Press., p.

Okabe, N., 1933, Bacterial diseases of plants occurring in Formosa II. Journal of the Society of Tropical Agriculture, 5.

Omer, M., 2002, Domates bakteriyel kanseri etmeninin (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) tanısında moleküler ve serolojik metotların kullanımı. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. Doktora Tezi.

Öcal, A., 2015, Farklı Tohum Uygulamalarının *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun Neden Olduğu Domates Bakteriyel Kara Leke Hastalığına Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

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

Pastrik, K. H., and Rainey, F. A., 1999, Identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. J. Phytopathol. 147:687-693.

Patiño-Méndez, G., 1967, Studies on the Pathogenicity of *Corynebacterium michiganense* (E.F.Sm) jensen and its transmission in tomato seed. Ph. D. Thesis. Univ. Calif, 70 pp.

Pitblado, R.and Kerr, E., 1979, Resistance to bacterial speck (*Pseudomonas tomato*) in tomato. Symposium on Production of Tomatoes for Processing 100, 379-82.

Polat, İ., Baysal, Ö., Mercati, F., Kitner, M., Cohen, Y., Lebeda, A. and Carimi, F., 2014, Characterization of *Pseudoperonospora cubensis* isolates from Europe and Asia using ISSR and SRAP molecular markers. European journal of plant pathology, 139, 3, 641-53.

Pohronezny, K., Moss, M. A., Dankers, W. I. L. B. U. R. and Schenk, J. A. M. E. S., 1990, Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* during thinning of direct-seeded tomato. *Plant Dis*, *74*, 800-805.

Pyke, N., Milne, K.and Neilson, H., 1984, Tomato seed treatments for the control of bacterial speck. New Zealand journal of experimental agriculture, 12, 2, 161-4.

Randhawa, P., Prandhannang, P., and Schaad W. N., 2017, 2, Fatmi, M., Walcott, R. , Schaad, N. W., Detection of Plant- Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Matrial, *The American Phytopathological Society*, U.S.A., 119-125.

Rudolph, K., Roy, M. A., Sasser, M., Stead, D. E., Davis, M., Swings, J.ve Gosselé, F., 1990, Isolation of bacteria. In: Methods in Phytobacteriology, p. 43-94.

Russell, D. W.ve Sambrook, J., 2001, Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.

Sands, D., Schroth, M. and Hildebrand, D., 1970, Taxonomy of phytopathogenic pseudomonads. Journal of Bacteriology, 101, 1, 9-23.

Sambrook J., Russell D.W., 2001, Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

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

Schaad N W (1994). Identification Schemes (Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria). Second Edition, The American Phytopathological Society., St. Paul, Minesota, 1-15 pp.

Schaad, N. W., Jones, J. B.ve Chun, W., 2001, Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. Ed. 3, American Phytopathological Society (APS Press), 91-102.

Schaad, N. W. and Stall, R. E., 1988, *Xanthomonas*, In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, St Paul, America, p. 81-94.

Schneider, R. and Grogan, R., 1977, Bacterial speck of tomato: sources of inoculum and establishment of a resident population. Phytopathology, 67, 3, 388-94.

Schneider, R., Hall, D. and Grogan, R., 1975, Effect of bacterial speck on tomato yield and maturity. Proc. Am. Phytopathol. Soc, 118.

Shenge, K. C., Stephan, D., Mabagala, R. B., Mortensen, C. N., and Wydra, K. 2008, Molecular characterization ofPseudomonas syringae pv. tomato isolates from Tanzania. *Phytoparasitica*, *36*(4), 338-351.

Sherf, A. F. and MacNab, A. A., 1986, Vegetable diseases and their control, John Wiley & Sons, p.

Shoemaker, P.ve Echandi, E., 1976, Seed and plant bed treatments for bacterial canker of tomato. Plant Disease Reporter, 60, 2, 163-6.

Siemonsma, J. and Piluek, K., 1993, Plant resources of South-East Asia. No. 8: Vegetables.

Smith, E., 1910, A new tomato disease of economic importance. Science, 31, 794-6.

Smitley, D. and McCarter, S., 1982, Spread of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and role of epiphytic populations and environmental conditions in disease development [Bacterial speck]. Plant Diseases (USA).

Sneath, P., 1956, Cultural and biochemical characteristics of the genus Chromobacterium. Microbiology, 15, 1, 70-98.

Sotirova, V. and Bogatsevska, N., 1990, Reaction of wild species and varieties of the Lycopersicon genus to race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences, 43, 2, 89-91.

Sousa, S., Cruz, L., Norskov, P.ve Rasmussen, O., 1997, A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. Seed Science and Technology, 25, 3, 581-4.

Stall, R.and Civerolo, E., 1993, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper, London Glasgow New York Tokyo Melbourne Madras: Chapman & Hall**:** 57-60.

Stamova, L., Bogatsevska, N. and Yordanov, M., 1990, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) in Bulgaria-races and sources of resistance. Proceedings of the XIth Eucarpia meeting on tomato genetics and breeding, 25-29.

Strider, D. L., 1969, Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*; a literature review and bibliography. NC Agr Exp Sta Tech Bull.

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

Şahin, F., Uslu, H., Kotan, R.ve Donmez, M., 2002, Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. Plant Pathology, 51, 3.

Şeniz, V., 1992, Domates, biber ve patlıcan yetiştiriciliği, Tarımsal Araştırmaları Destekl. ve Gel. Vakfı,

Taylor, I., Atherton, J.ve Rudich, J., 1986, Biosystematics of the tomato. The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement, Chapman and Hall.

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.

Tokgönül, S., 1998, Ticari Domates Tohumlarında Bakteriyel Solgunluk Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'nin Saptanması ve Etmene Karşı Mücadele Olanakları Üzerinde Araştırmalar. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 141-143.

Ünlü, A., Baysal, Ö., Polat, İ., Sülü, S., İkten, H., Devran, Z.ve Gümrükçü, E., 2017, Detection of genetic differences of isolates of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*" Okabe" YD & W) disease agent on tomato under protected cultivation using molecular methods in Western Mediterranean Region. Derim, 34, 2, 122-30.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. ve Swings, J., 1995, Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 45, 3, 472-89.

Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ., 2000, Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme) EÜ Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, E. Ü Basımevi, s, 440.

Van Den Mooter, M., Steenackeds, M., Maertens, F., Gossele, F., De Vos, P., Swing, J. Kersters, K ve De Ley, J., 1987, Differentation between *Xanthomonas campestris* pv. *graminis* (ISPP list 1980), pv. *phleipratensis* (ISPP list 1980) emend, pv. *poae* Egli and Schmidt 1982 and pv. *arrenatheri* Egli Schmidt 1982, by numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams. J. Phytopathol. 118:135-156.

Waddill, V., Schuster, D. and Sonoda, R., 1986, Integrated pest management for Florida tomatoes. Plant disease (USA).

Wang, Y.Y., Chai, A.L., Li, B.J., 2015, Diversity of symptoms and integrative management of tomato bacterial speck.ChinaVeg:1182–84.

Wei, B. J., Sneath, S. V. Beer, S. 1992,Expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in response to environmental stimuli. J. Bacteriol. 174, 1875-1882.

Wen, Z., Wang, J., and He, S., 2013, Identification and detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Gansu. *China Vegetables*, (6), 68-73.

Wilson, M., Campbell, H., Ji, P., Jones, J. and Cuppels, D., 2002, Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. Phytopathology, 92, 12, 1284-92.

Yıldız, R. ve Aysan, Y., 2007, Domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.)'nin tanılanması ve bitki büyüme düzenleyicisi rhizobacteriler ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana.

Yunis, H., Bashan, Y., Okon, Y. ve Henis, Y., 1980, Two sources of resistance to bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. Plant Dis, 64, 851-2.

Zaccardelli, M., Campanile, F., Moretti, C. and Buonaurio, R., 2008, Characterization of Italian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using primers based on DNA repetitive sequences. Journal of Plant Pathology, 375-81.

Zaccardelli, M., Spasiano, A., Bazzi, C. ve Merighi, M., 2005, Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of hrpZ Pst. European Journal of Plant Pathology, 111, 1, 85-90.

Zhao, T.C., Sun, F.Z., Song, W.S.,2001, Pathogen identification of bacterial speck of tomato. Acta Phytopathol Sin, 31:37–42.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Ayşegül GEDÜK
Uyruğu	**:**	TC
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Samsun, 4.10.1994
Telefon	**:**	05442450768
Faks	**:**	
e-mail	**:**	aysegul.geduk@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Terme lisesi, Terme, Samsun**	**2012**
Üniversite	:	**Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun**	**2016**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi**	**-**
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2017	Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı	Arş. Gör.

UZMANLIK ALANI : Fitopatoloji

YABANCI DİLLER : Ingilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

Gedük, A., Belete, T., Hattab, B., Baştaş, K.K., 2018. Bacterial Crown Gall Disease *Rhizobium radiobacter* (syn=A*grobacterium tumefaciens)* in Landscape Areas and Its Control. International Green Capitals Congress, Konya.

Gedük, A., Baştaş, K.K., 2018. Identıfıcatıon of Bacterıal Pathogens Isolated from Tomato Seeds ın Turkey. The Turkey 6. Seed Congress with Internatial Participation, 10-13 September 2018, Niğde.

Gedük, A., Baştaş, K.K., 2019. Eco-Frıendly Management Strategy for Plant Pathogenıc Bacterıa: Bacterıophages. International Symposium for Environmental Science and Engineering Research (ISESER2019), 16 Jun 2019, Konya.