

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATES BAKTERİYEL KANSER ETMENİ
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ve DOMATES BAKTERİYEL
YAPRAK LEKESİ ETMENİ *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın LNA
PROBE' A DAYALI REAL TIME PCR İLE TANISI VE SAPTANMASI

DENİZ ÇAPLIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATES BAKTERİYEL KANSER ETMENİ
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ve DOMATES BAKTERİYEL
YAPRAK LEKESİ ETMENİ *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın LNA
PROBE' A DAYALI REAL TIME PCR İLE TANISI VE SAPTANMASI

DENİZ ÇAPLIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez 2009.02.0121.013 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOMATES BAKTERİYEL KANSER ETMENİ
***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve DOMATES BAKTERİYEL**
YAPRAK LEKESİ ETMENİ *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın LNA
PROBE' A DAYALI REAL TIME PCR İLE TANISI VE SAPTANMASI

DENİZ ÇAPLIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez .../.../2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (.....) not takdir edilerek
oybirliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman).....

Prof. Dr. Kenan TURGUT.....

Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU.....

ÖZET

DOMATES BAKTERİYEL KANSER ETMENİ

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ve DOMATES BAKTERİYEL YAPRAK LEKESİ ETMENİ *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nin LNA PROBE' A DAYALI REAL TIME PCR İLE TANISI VE SAPTANMASI

DENİZ ÇAPLIK

Yüksek Lisans Tezi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Aralık 2009, 90 sayfa

Bu çalışmada, Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ve Domates ve Biber Bakteriyel Yaprak Lekesi hastalık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*)' nin Real-Time PCR ile tanısı ve Real-Time Bio-PCR ile tohumdan ve hastalıklı bitki dokulardan tespitini gerçekleştirmek için hassas ve seçici bir Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir.

Geliştirilen Real-Time PCR yöntemine uygun yeni primer ve probe setinin hassasiyeti farklı *Cmm* ve *Xav* strainlerine, farklı cins ve türe ait bitki patojeni bakterilere ve domates ve biber genomik DNA' sına karşı test edilmiştir. 73 bp' lik PCR ürünü tüm *Cmm* strainlerinden, 69 bp'lik PCR ürünü ise tüm *Xav* strainlerinden çoğaltılabilirken, *Cmm* ve *Xav* olmayan diğer bakteri strainlerinden ve domates ile biber genomik DNA' sından çoğaltılamamıştır. Geliştirilen TaqMan Real-Time PCR yönteminin *Cmm* ve *Xav* için direkt bakteriyel süspansiyondan tespitindeki hassasiyet limitleri sırası ile 1 cfu/ml ve 2 cfu/ml , saf genomik DNA' dan ise her iki patojen için 10 pg olarak bulunmuştur. Real-Time PCR yönteminin *Cmm* ve *Xav*' nin tohumdan tespitindeki hassasiyet limitleri ise sırası ile 1 cfu/ml ve 2 cfu/ml olarak bulunmuştur. *Cmm* ve *Xav*' nin içsel dizi kontrolünün

sağlanması için LNA probu kullanılarak geliştirilen bu Real-Time PCR yöntemi seçici hassas ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Bu yöntem *Cmm* ve *Xav*' nin hastalıklı bitki dokularından ve tohumlardan hızlı ve hassas bir şekilde tanısında ve tespitinde yaygın olarak kullanılabilir.

ANAHTAR KELİMELELER : *Domates*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), Real-Time PCR (RT-PCR), Real-Time Bio-PCR, Tespit, Tanı

JÜRİ:

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU

ABSTRACT

LNA PROBE BASED REAL-TIME PCR FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF TOMATO BACTERIAL CANKER (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) and TOMATO BACTERIAL LEAF SPOT (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*)

DENİZ ÇAPLIK

M.Sc. in Plant Protection

Adviser: Prof. Dr. Hüseyin BASIM

December 2009, 90 pages

In this study, a sensitive and selective Real-Time PCR method was developed for identification and detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) causal agent of Tomato Bacterial Canker and Wilting Disease and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) causal agent of Bacterial Leaf Spot Disease of tomato and peppers.

The sensitivity of primer and prob sets developed in this study were tested against different *Cmm* and *Xav* strains, plant pathogenic bacteria from different genus and species, tomato and pepper total genomic DNA. Although 73 bp and 69 bp DNA fragments were amplified from all *Cmm* and *Xav* strains, respectively, no amplified product was obtained from bacterial genus and species except *Cmm* and *Xav*, and tomato genomic DNA. The detection limits of Real-Time PCR were found to be 1 cfu/ml and 2 cfu/ml from seeds, 1 cfu/ml and 2 cfu/ml from direct bacterial cell and 10 pg DNA from purified genomic DNA, for *Cmm* and *Xav*, respectively. This Real-Time method developed by using LNA probe providing internal control of the sequence is selective, sensitive and repeatable.

This method can be used for rapid and sensitive identification of *Cmm* and *Xav* strains from direct bacterial cell and detection of *Cmm* and *Xav* strains from seed and diseased plant tissues.

KEY WORDS : Tomato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), Real-Time PCR (RT-PCR), Real-Time Bio-PCR, Diagnosis, Detection

COMMITTEE :

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU

ÖNSÖZ

Bu çalışmada Dünyada ve Türkiye' de gerek örtü altı gerekse açık tarla domates yetiştiriciliğinde önemli ürün kayıplarına neden olan Domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığı etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) ile Domates ve Biber Bakteriyel Yaprak Lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın oldukça hassas ve güvenilir teknikler olan Real-Time PCR ve Real-Time Bio-PCR ile tohum ve hastalıklı bitki materyallerinden tespiti ve tanıları yapılmıştır. Çalışmanın tüm aşamaları Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalına ait Moleküler Bitki Bakteriyolojisi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Tez konumun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmalarının ve sonuçlarının değerlendirilmesinde, kullanılacak cihazların eğitiminde değerli katkılarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Hüseyin BASIM' a, yine bana bu tezi hazırlamada gerekli desteği sunan çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu tez çalışmasını 2009.02.0121.013 nolu proje kodu ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ayrıca teşekkür ederim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca her türlü zor koşullara rağmen vermiş oldukları maddi ve manevi destekten dolayı aileme özellikle sevgili ablam Şirin ÇAPLIK' a minnettarlığımı ifade etmeyi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| ÖNSÖZ | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xiii |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI | 7 |
| 2.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ile İlgili Bilgiler | 7 |
| 2.2. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ile İlgili Bigiler | 20 |
| 2.3. Bakteriyel Patojenlerin Tanı ve Tespitine Yönelik Metotlar | 28 |
| 3. MATERYAL ve METOD..... | 32 |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler | 32 |
| 3.2. Real-Time PCR Optimizasyonu..... | 34 |
| 3.3. Primer ve Prob Dizaynı..... | 35 |
| 3.4. Primer ve Probun Saf DNA' dan Hassasiyetinin Belirlenmesi..... | 37 |
| 3.5. Direkt Bakteriyel Hücreden Primer ve Probun Hassasiyetinin Belirlenmesi..... | 38 |
| 3.6. Primer ve Probun Seçiciliğinin Belirlenmesi | 39 |
| 3.7. Bakteriyel Patojenlerin (<i>Cmm, Xav</i>) Tohumdan Tespiti | 40 |
| 3.8. Real-Time Bio-PCR | 41 |
| 3.9. Hastalıklı Bitki Dokulardan Bakteriyel Patojenlerin (<i>Cmm, Xav</i>) Tespiti..... | 41 |
| 4.BULGULAR..... | 43 |
| 4.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ' in Real-Time PCR ile Tanısı | 43 |
| 4.2. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ' nın Real-Time PCR ile Tanısı | 43 |
| 4.3 Primer ve Probun Saf DNA' dan Hassasiyeti | 49 |
| 4.4. Direkt Bakteriden Primer ve Probun Hassasiyet | 51 |
| 4.5. Primer ve Probun Seçiciliği..... | 53 |
| 4.6. Bakteriyel Patojenlerin (<i>Cmm, Xav</i>) Tohumdan Tespiti..... | 56 |

| | |
|---|----|
| 4.7. Real-Time Bio-PCR..... | 59 |
| 4.8. Hastalıklı Bitki Dokulardan Bakteriyel Patojenlerin (<i>Cmm, Xav</i>) Tespiti | 61 |
| 5.TARTIŞMA..... | 64 |
| 6.SONUÇ | 71 |
| 7.KAYNAKLAR..... | 73 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|------------|------------------|
| µl | Mikrolitre |
| °C | Santigrat Derece |
| ha | Hektar |
| g | Gram |
| ml | Mililitre |
| pg | Picogram |
| bp | Baz Çifti |
| ng | Nanogram |
| dk. | Dakika |
| sn | Saniye |

Kısaltmalar

| | |
|----------------------|--|
| <i>avr</i> | Avirülens |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| FAO | Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü |
| GC | Guanin- Sitozin |
| <i>hrp</i> | Hipersensitif Reaksiyon ve Patojenisite |
| Mill. | Miller |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| <i>pv.</i> | Patovar |
| L. | Linne |
| <i>cfu/ml</i> | Mililitrede yer alan canlı bakteri sayısı |
| <i>vd.</i> | Ve diğerleri |
| <i>vb.</i> | Ve Benzeri |
| <i>subsp.</i> | Alttür |
| MQ | Milli Q |
| NA | Nutrient Agar |

| | |
|-----------------------|--|
| NSA | Nutrient Sucrose Agar |
| GYCA | Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Agar |
| PFGE | Pulsed Field Gel Electrophoresis |
| FAME | Fatty Acid Methyl Ester |
| ELISA | Enzym Linked Immuno Sorbent Assay |
| EPS | Ekzopolisakkarit |
| LNA | Locked Nucleic Acid |
| Ct | Cycle threshold |
| NO₃ | Nitrat |
| NO₂ | Nitrit |
| PE | Phospat Buffer (Fosfat Tamponu) |
| HR | Hipersensitif Reaksiyon |
| MAB' s | Monoklonal Antibody |
| EPPO | European and Mediterranean Plant Protection Organization |
| NCBI | The National Center for Biotechnology Information |
| ICMP | International Collection of Micro-Organism from Plant |
| Cmm | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> |
| Xav | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> |
| Xcc | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> |
| Xoo | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> |
| Ptt | <i>Pseudomonas tomato</i> pv. <i>tomato</i> |
| rpm | Revolutions per minute |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1. Dünya domates üretiminde söz sahibi ülkelerin toplam üretimdeki payları..... | 2 |
| Şekil 1.2. Türkiye’de 1996-2006 yılları arasında yetiştirilen sebze miktarlarının grafiksel gösterimi..... | 3 |
| Şekil 2.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in bitkilerdeki hastalık döngüsü..... | 9 |
| Şekil 2.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in erken dönemde domates bitkisinde oluşturduğu solgunluk belirtileri..... | 12 |
| Şekil 2.3. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in domates gövdesinde oluşturduğu süngerimsi dokular | 12 |
| Şekil 2.4. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in domates meyvesinde oluşturduğu kuş gözü belirtisi | 13 |
| Şekil 2.5. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in boyuna kesilen domates iletim demetlerinde kolonize oluşu | 17 |
| Şekil 2.6. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in enine kesilen domates bitkisinin iletim demetlerindeki görüntüsü | 18 |
| Şekil 2.7. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ’ nın domates yaprağında oluşturduğu “yaprak lekesi” belirtileri..... | 26 |
| Şekil 2.8. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ’ nın domates meyvesinde oluşturduğu belirtiler | 26 |
| Şekil 4.1. Farklı <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı (I. grup) | 44 |
| Şekil 4.2. Farklı <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı (II. Grup)..... | 45 |
| Şekil 4.3. Real-Time PCR ile <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> için yapılan thermal melting eğrisi..... | 46 |
| Şekil 4.4. Farklı <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı | 47 |
| Şekil 4.5. Real-Time PCR ile <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> için yapılan thermal melting eğrisi..... | 48 |
| Şekil 4.6. Real-Time PCR’ ın <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ den izole edilen saf DNA’ dan hassasiyeti | 49 |
| Şekil 4.7. Real-Time PCR’ ın <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ’ dan izole edilen saf DNA’ dan hassasiyeti | 50 |
| Şekil 4.8. Real-Time PCR ile <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in direkt bakteriyel hücreden hassasiyeti | 51 |
| Şekil 4.9. Real-Time PCR ile <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ’ nın direkt bakteriyel hücreden hassasiyeti..... | 52 |
| Şekil 4.10. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> için geliştirilen primer ve probun seçiciliği..... | 54 |
| Şekil 4.11. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> için geliştirilen primer ve probun seçiciliği | 55 |
| Şekil 4.12. Real-Time PCR ile <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in tohumdan tanısı ve hassasiyeti..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.13. Real-Time PCR ile <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ' nın tohumdan tanısı ve hassasiyeti..... | 58 |
| Şekil 4.14. Real-Time Bio- PCR ile <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ' in tohumdan tespiti..... | 59 |
| Şekil 4.15. Real-Time Bio- PCR ile <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ' nın tohumdan tespiti..... | 60 |
| Şekil 4.16. Real-Time PCR ile <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ' in direkt domates nekrozundan tespiti..... | 61 |
| Şekil 4.17. Real-Time PCR ile <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ' nın direkt domates nekrozundan tespiti..... | 62 |
| Şekil 4.18. Real-Time PCR ile <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ' nın direkt biber nekrozundan tespiti..... | 63 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 1.1. Dünya Genelinde 2000–2007 yılları arasında üretilen domates miktarları (ton) | 1 |
| Çizelge 1.2. Türkiye’ de 1996 – 2006 yılları arasında yetiştirilen sebze miktarları | 3 |
| Çizelge 1.3. Türkiye’ nin 2007 yılı itibari ile biber üretiminde dünya ülkeleri arasındaki yeri..... | 4 |
| Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan yerli ve yabancı <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> strainleri..... | 32 |
| Çizelge 3.2. Çalışma kapsamında kullanılan yerli ve yabancı <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> strainleri..... | 33 |
| Çizelge 3.3. Çalışmada <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ve <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> dışında kullanılan farklı cins ve türlere ait bakteriler | 33 |
| Çizelge 3.4. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ve <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> için oluşturulan ortak program..... | 34 |
| Çizelge 3.5. Real-Time PCR ile <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ’ in tanı ve tespiti için geliştirilen primer ve prob için kullanılan <i>pat-1</i> gen dizisi | 35 |
| Çizelge 3.6. Real-Time PCR ile <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ’ nın tanı ve tespiti için geliştirilen primer ve prob için kullanılan <i>hrp B</i> gen dizisi | 36 |
| Çizelge 4.1. Real-Time PCR ile <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ve <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ’ nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi | 53 |
| Çizelge 4.2. Real-Time PCR ile <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ve <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ’ nın tohumdan tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi | 56 |

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun günden güne artması birçok sorunu da beraberinde getirmiştir. Bu sorunlardan bir tanesi de nüfusun beslenme ihtiyaçlarının karşılanmasıdır. Dünyada tarım yapılan alanların limitlerinin zorlanmış olması ve bu alanların genişletilmesinin neredeyse imkansız olması bilim çevrelerini mevcut alanlardan daha fazla ürün alma uğraşı içine sokmuştur.

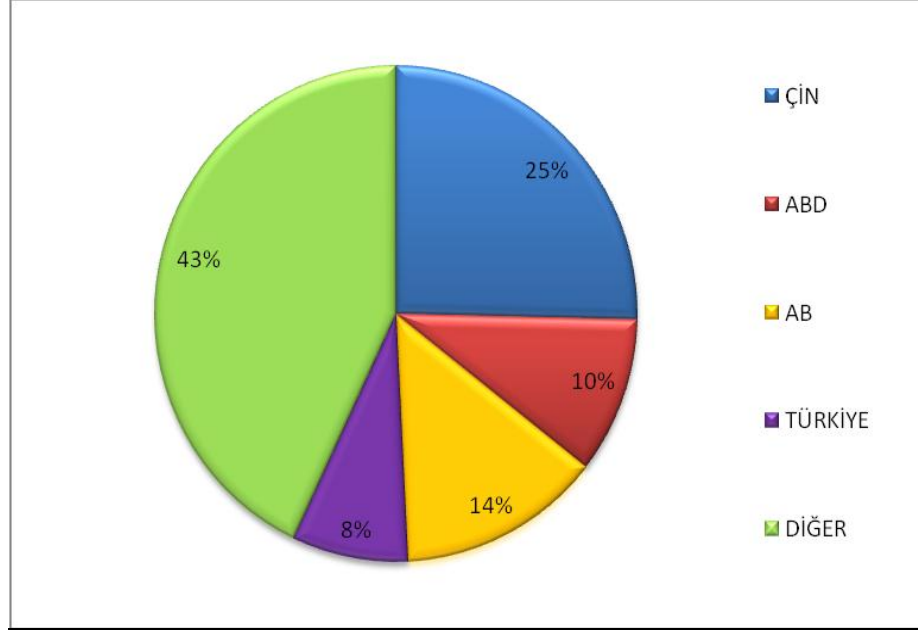
Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2007 yılı verilerine göre Dünyada toplam domates üretim miktarı 126.090.702 tona ulaşmıştır (Çizelge 1.1).

Dünya genelinde üretilen toplam Domates üretim miktarlarına bakıldığında Türkiye, Çin, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa Birliği (AB) ülkelerinden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Şekil.1.1).

Çizelge 1.1. Dünya genelinde 2000-2007 arasında üretilen domates miktarları (ton)*

| Ülkeler/Yıllar | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Çin | 22.324.767 | 24.116.211 | 27.153.121 | 28.842.743 | 30.143.929 | 31.618.462 | 32.540.040 | 33.645.00 |
| AB | 17.980.856 | 17.109.192 | 15.716.991 | 17.520.238 | 19.806.171 | 18.418.743 | 16.572.655 | 15.764.070 |
| ABD | 11.558.800 | 10.001.720 | 12.383.200 | 10.522.000 | 12.854.480 | 10.982.790 | 11.298.040 | 11.500.000 |
| TÜRKİYE | 8.890.000 | 8.425.000 | 9.450.000 | 9.820.000 | 9.440.000 | 10.050.000 | 9.854.877 | 9.919.673 |
| Diğer | 47.585.129 | 46.764.243 | 49.876.602 | 50.649.297 | 53.288.815 | 55.153.684 | 56.730.439 | 55.417.959 |

* FAO 2007 yılı verileridir.



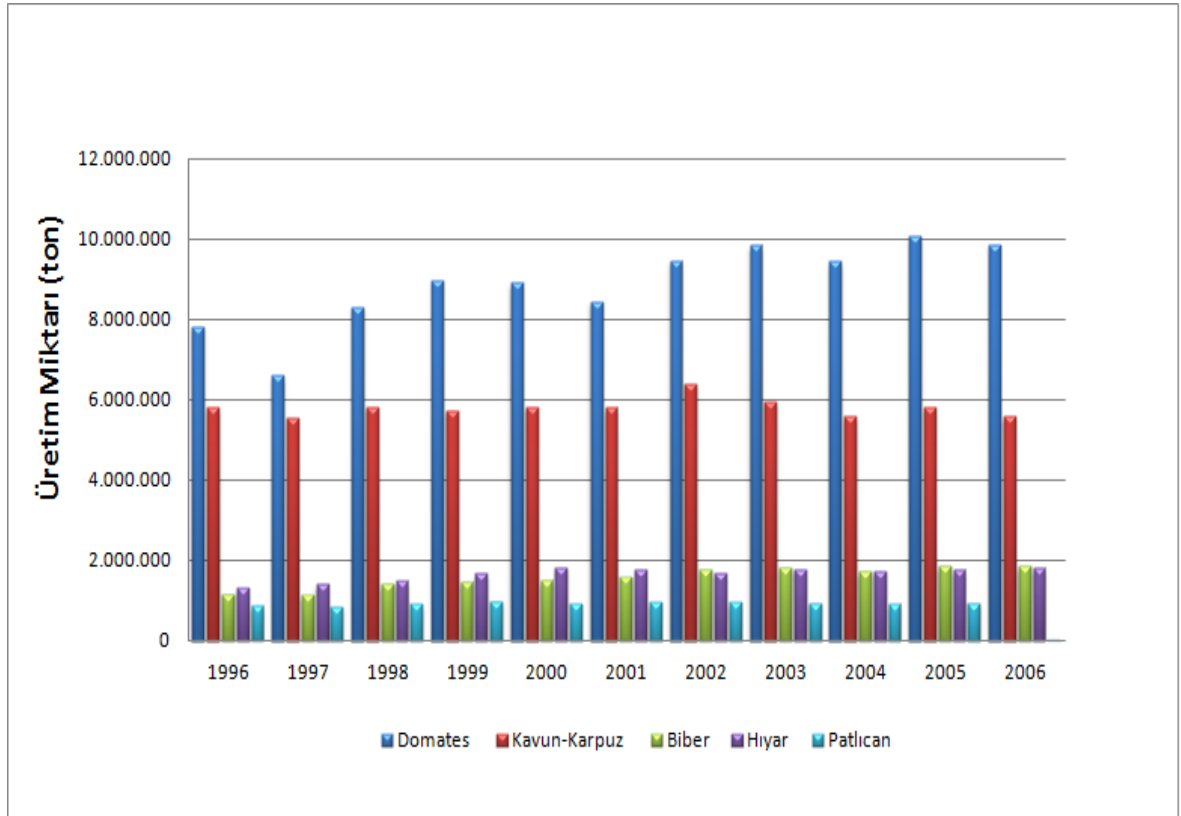
Şekil.1.1. Dünya domates üretiminde söz sahibi ülkelerin toplam üretimdeki payları (%) (FAO 2007)

Türkiye gerek coğrafi konumu gerekse iklimi itibari ile birçok meyve ve sebze türünün yetiştirilmesi için uygun koşullara sahiptir. Domateste bu sebzeler içerisinde önemli bir yer teşkil etmektedir. Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2007 yılı verilerine göre ülkemizde 984.603 hektarlık alanda sebze üretimi yapılmaktadır. Bu alanın 270.000 hektarlık kısmında domates üretimi gerçekleştirilmektedir. FAO' nun 2005 yılı verilerine göre ülkemizde 6.625.510 dekar alanda yaklaşık 24,5 milyon ton sebze üretimi yapılmakta ve 1.500.000 tonu sanayi tipi olmak üzere 9.824.877 ton ile bu ürünler içinde domates ilk sırayı almaktadır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. 1996-2006 yılları arasında Türkiye’ de yetiştirilen sebze miktarları*

| Yıl/Ürün | Domates (ton) | Kavun-Karpuz (ton) | Biber (ton) | Hıyar (ton) | Patlıcan (ton) |
|----------|---------------|--------------------|-------------|-------------|----------------|
| 1996 | 7.800.000 | 5.800.000 | 1.150.000 | 1.300.000 | 850.000 |
| 1997 | 6.600.000 | 5.550.000 | 1.130.000 | 1.400.000 | 847.000 |
| 1998 | 8.290.000 | 5.815.000 | 1.400.000 | 1.475.000 | 915.000 |
| 1999 | 8.956.000 | 5.725.000 | 1.462.000 | 1.650.000 | 976.000 |
| 2000 | 8.890.000 | 5.805.000 | 1.480.000 | 1.825.000 | 924.000 |
| 2001 | 8.425.000 | 5.795.000 | 1.560.000 | 1.740.000 | 945.000 |
| 2002 | 9.450.000 | 6.395.000 | 1.750.000 | 1.670.000 | 955.000 |
| 2003 | 9.820.000 | 5.950.000 | 1.790.000 | 1.780.000 | 935.000 |
| 2004 | 9.440.000 | 5.575.000 | 1.700.000 | 1.725.000 | 900.000 |
| 2005 | 10.050.000 | 5.795.000 | 1.829.000 | 1.745.000 | 930.000 |
| 2006 | 9.854.877 | 5.570.911 | 1.842.175 | 1.799.613 | 924,165 |

* FAO 2007 yılı verileridir.



Şekil 1.2. Türkiye’ de 1996-2006 yılları arasında yetiştirilen sebze miktarlarının grafiksel gösterimi (FAO 2005)

FAO (2007) verilerine göre dünya biber üretim miktarı ise 27.129.807 tondur. Dünya biber üretiminde Çin 14.026.272 ton ile ilk sırada yer alırken Türkiye 1.759.224 ton ile Meksikadan sonra 3. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Türkiye' nin 2007 yılı itibari ile biber üretiminde dünya ülkeleri arasındaki yeri*

| Ülkeler | Ekim Alanı (Ha) | Toplam Üretim (ton) | Verim (kg/ha) | Dünya Üretimindeki Yeri (%) |
|-----------|-----------------|---------------------|---------------|-----------------------------|
| Çin | 652510 | 14026272 | 21.495 | 51,7 |
| Meksika | 87863 | 1890428 | 21.515 | 6,96 |
| TÜRKİYE | 88000 | 1759224 | 19.991 | 6,48 |
| Endonezya | 204048 | 1128790 | 5.531 | 4,16 |
| İspanya | 21900 | 1059500 | 48.378 | 3,9 |

*FAO, 2007

İstatistik veriler değerlendirildiğinde Türkiye Dünya genelinde toplam domates üretiminin % 8' ini, toplam biber üretiminin ise % 6,48' lik kısmını tek başına karşılamaktadır.

Solanaceae familyasının *Lycopersicum* cinsine bağlı tek yıllık bir bitki olan Domates içerdiği çeşitli mineraller ve vitaminler ile önemli bir besin maddesidir. Domates, mevcut üretim potansiyeli ile ülke içindeki tüketiminin yanı sıra, hem taze olarak ve hem de dilimlenmiş şekilde yapılan ihracatı nedeni ile ülkemiz ekonomisine büyük katkılar sağlayabilecek niteliklere sahip bulunmaktadır (Erkan vd 1992).

Domates yetiştiriciliği tarlada ve örtü altında olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır (Sevgican 1999). Ülkemizin tamamında domates yetiştiriciliği yapılmasına karşın, ekonomik anlamda domates yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgeler yıllara göre değişmekle birlikte, Türkiye üretiminin büyük bir kısmını karşılayan başta Akdeniz Bölgesi olmak üzere Ege ve Marmara Bölgeleridir (Keskin ve

Dölekoğlu 2005). Türkiye’ de farklı iklim bölgelerinde açık alanda ve örtü altında hem sofralık hem de sanayi domatesi üretilmektedir. Akdeniz bölgesinde sofralık domates üretimi yazın tarlada kışın ise cam ve plastik seralarda yapılmaktadır. Türkiye’ de seracılık ekolojik koşullara bağlı olarak, özellikle Akdeniz sahil şeridinde yoğunlaşmıştır Ülkemizin mevcut sera varlığının % 90’ ı Akdeniz sahil şeridinde, % 5’ i ise Ege’ de yer almaktadır. Türkiye genelinde iller düzeyinde seraların (alçak tünel hariç), % 47’ si (13.962 ha) Antalya’ da, % 29’ u (8.634 ha) Mersin’ de ve % 10’ u (3.116 ha) da Muğla’ dadır (Anonim 2007).

Örtüaltı tarımın gelişmesi ile kültürel işlemlerin yeteri oranda yapılmaması, uzun yıllar üst üste aynı bitki kültürü yapılması, hastalıklı materyallerin üretim alanından uzaklaştırılmaması, sera havalandırmasının yanlış yapılışı, ilaçlı mücadelenin doğru zamanlarda uygulanmamasının sonucunda domates üretim alanlarında her yıl önemli oranda hastalık meydana gelmektedir. Dünyada ve Türkiye’ de her yıl zararlılar, yabancı otlar ve hastalık etmenlerinin neden olduğu ürün kayıpları toplam üretimin yaklaşık olarak % 35 kadardır. Fungal ve viral hastalık etmenlerinden başka, bakteriyel kökenli patojenler de verim ve ürün kalitesinde önemli düşüşler meydana getirmektedir. Domates üretimini ve verimini olumsuz yönde etkileyen birçok cinse dahil önemli bakteriyel hastalık etmenleri bulunmaktadır (Smith vd 1988). Kültür bitkilerinin çoğunda olduğu gibi, domates yetiştiriciliğinde de birçok hastalık ve zararlı, üretimi tehdit eden unsurlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Üretimin arttırılmasında verimli, kaliteli çeşit seçimi yanında domates üretim alanlarının hastalık ve zararlılardan korunmasının önemi büyüktür (Erkan vd 1992, Özgöz vd 1994).

Domates ve Biber yetiştiriciliğinde üretim ve kalite çeşitli bakteriyel, fungal ve viral hastalıklar nedeniyle düşmektedir. Bu hastalıklar, tüm ürünün kullanılamayacak duruma gelmesine neden olabilmektedir. Dünyada bütün hastalık etmenlerinden dolayı olan verim kayıplarının yaklaşık 500 milyar dolar (USD) dolayında olduğu tahmin edilmektedir (Oerke vd 1994).

Domates üretiminde ciddi sorunlara neden olan bakteriyel tohum kökenli patojenler arasında Domates Bakteriyel Leke etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Dawson 1939) (*Xav*) ve Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.,1984 (*Cmm*) önemli yer teşkil etmektedir.

Bu hastalık etmenlerinin tohum kökenli olması ve bunların ekimlerinden önce tohumdan doğru ve hızlı bir şekilde tespiti, bu hastalık etmenleri ile mücadelede son derece önem arz etmektedir. Ülkemizin ciddi bir hibrit tohum ithalatçısı olduğu düşünüldüğünde hastalık etmenleri ile bulaşık tohumların ülkemize girmeden hızlı, hassas ve güvenli bir şekilde tespiti oldukça önem kazanmaktadır. Bu kapsamda domates tohum kökenli bakteriyel patojenlerinden *Xav* ile *Cmm*'nin oldukça hassas ve hızlı sonuç veren Real-Time PCR (RT-PCR) ve Real-Time Bio-PCR teknikleri kullanılarak direkt bakteriyel hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki dokularından tanı ve tespitleri amaçlanmıştır.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ülkemizde uygulanan karantina düzenlemeleri kapsamında iç ve dış karantina listelerinde yer almaktadır. Özellikle yurt dışından ithal edilen üretim materyallerinin (tohum, fide) bu patojenler açısından incelenmesi zorunludur. Yine ülkemizde 308 sayılı Tohumluk Sertifikasyonuna bağlı yönetmelikte adı domates tohumlarında geçen bu etmenlerin varlığı ve erken dönemde tespiti çok önemlidir. Her iki patojenin (*Cmm*, *Xav*) tohum üzerinde kabul edilebilir limiti sıfırdır.

Ülkemiz tarımsal üretiminde kullanılan sebze tohumlarının büyük bir kısmı yurt dışından ithal edilmektedir. Bu yöntemin yaygınlaştırılması sonucu yurt dışından gelen tohumların *Cmm* ve *Xav* için kontrolü mümkün olabilecek ve bu patojenler ile bulaşık tohumların üretime kullanılmadan önce ülkemize girişleri engellenebilecektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Anavatanı Güney Amerika olan Domates , *Solanaceae* familyasına ait diğer sebzeler olan biber, patlıcan ve patatesle yakın akraba tek yıllık, çift çenekli, otsu bir bitkidir. Domatesin küçük sarı meyveler veren atası *Lycopersicon cerasiforme'* nin ilk kez Aztekler tarafından Meksika' da kültüre alındığı yine o yıllarda Peru ve Galapagos adalarında yetiştirildiğine inanılmaktadır. Domatesin Avrupa' ya 15. Yüzyılda Portekizli ve İspanyol gezginler tarafından getirildiği düşünülmektedir. Avrupa'da başlangıçta meyvelerinin it üzümüne (Nightshade) benzemesinden dolayı zehirli olduğu düşünülmüş ve kozmetik amaçlı kullanılmıştır. Ancak 18. Yüzyılda Avrupa ve Amerika kıtasında çok önemli bir besin kaynağı olduğu anlaşılmış ve yaygın olarak tüketilmeye başlanmıştır (Carver 2008).

Gerek ülkemizde gerek dünyada bu önemli ürünün verimini azaltan ve pazar değerini düşüren pek çok bakteriyel, fungal ve viral hastalık etmenleri mevcuttur. Bu etmenler arasında bakteriyel patojenler son yıllarda önemli bir yer tutmaktadır. Domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda sıklıkla görülen Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) ile Domates ve Biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda Bakteriyel Yaprak Lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) önemli yer teşkil etmektedir.

2.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al., 1984 ile İlgili Bilgiler

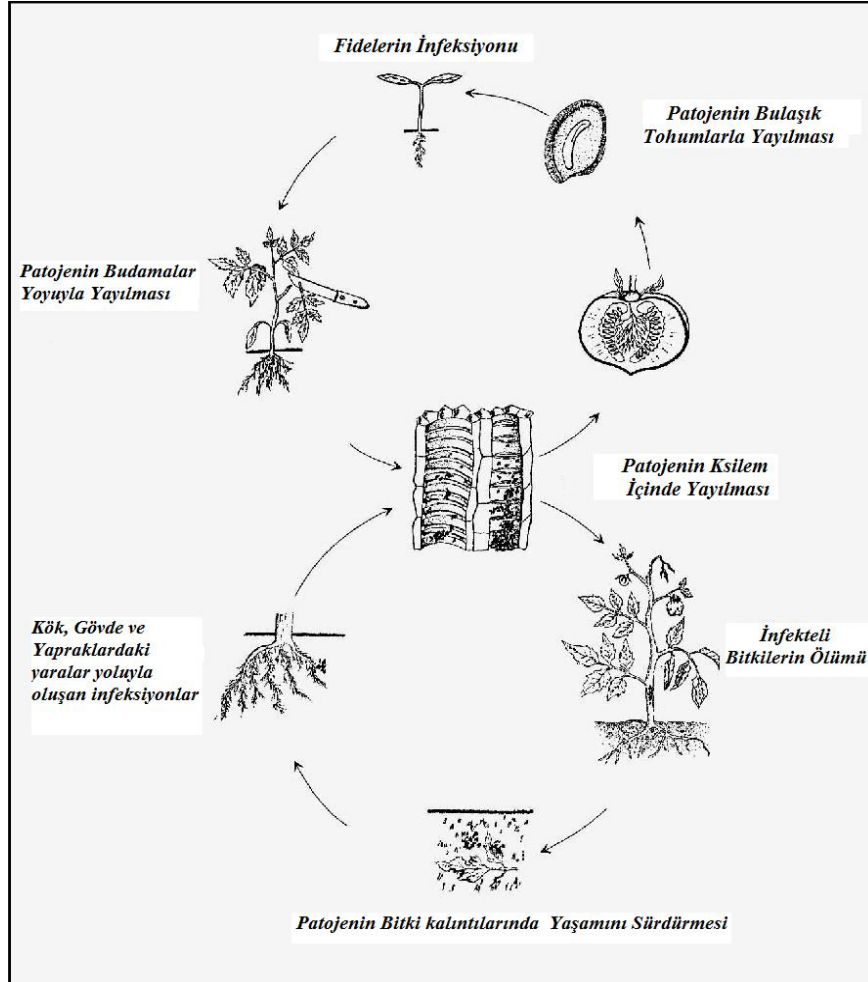
Dünya genelinde domates tarımı yapılan alanlarda fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanında, önemli oranlarda ürün kayıplarına neden olan bakteriyel patojenler de mevcuttur (Gartemann vd 2003). Bitkilerde hastalıklara neden bakteriler genellikle gram negatif olanlardır. Ancak çok az sayıda gram pozitif bakteri de ciddi kayıplara neden oldukları için oldukça önemlidir. Bunlardan biri de Bakteriyel Kanser ve Solgunluk etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis'* tir (Gartemann vd 2003).

Gram pozitif bakterileri de içeren çok sayıda bitki patojeni bakteri morfolojik olarak cornyeform şekillidir. Bu nedenden dolayı Gram pozitif bakteriler daha önceleri göstermiş oldukları morfolojik özellikler nedeni ile *Corynebacterium* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. Kemotaksonomik ve daha ileri moleküler tekniklerin gelişmesi ile birlikte *Corynebacterium* cinsi içerisinde sayılan bir çok bitki patojeni bakteri türü arasındaki farklılık daha iyi ortaya çıkarılmış, buna bağlı olarak bakteriler birkaç yeni cins oluşturacak şekilde yeniden sınıflandırılmıştır. Günümüzde bakteriler hücre duvarı yapıları ile 16s rDNA dizilerine göre sınıflandırılmaktadır (Çetinkaya 2007)

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* gram pozitif bir bakteri olduğu ve çeşitli besi ortamlarında düzensiz yapıda şekiller oluşturduğundan dolayı 1930-1980 yılları arasında *Corynebacterium michiganense* olarak sınıflandırıldı. 1980 yılında hücre duvarı yapısı hakkında yeni bilgilerin ortaya çıkmasıyla *Clavibacter* cinsi olarak yeniden sınıflandırıldı (Davis vd 1984).

Domates Bakteriyel Solgunluk etmeni olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* gram pozitif (+) bir bakteriyel patojendir. İlk olarak 1909' da Grand Rapids (Michigan, ABD)' de rapor edildi. Dünya' nın ve Türkiye' nin domates yetiştiriciliği yapılan hemen hemen tüm açık alanlarında ve örtü altı yetiştiriciliğinde bu hastalık etmenine rastlanılmaktadır. Hastalık etmeni hastalığın şiddetine bağlı olarak %10-25 arasında ürün kaybına sebep olabilir (Huang vd 2001). Bazı seralarda % 80 oranında ürün kaybına sebep olduğu rapor edilmiştir (Burokiene 2006). İnfekteli tohumlar domates yetiştirilen alanlarda patojenin ilk infeksiyon kaynağını oluşturmaktadır (Thyr 1969). İnfekteli tohumlar *Cmm* nin neden olduğu salgınların en büyük kaynağı durumundadır (Tsiantos 1987, Gleason vd 1991). Patojen kışı bitki kalıntıları, diğer konukçu bitkilerde ve bazı odun parçaları içinde geçirebilir. Amerika' nın kuzey bölgelerinde patojenin bu şekilde 2 yıl canlı kalabildiği gözlenmiştir (Bryan 1930, Chang vd 1990).

Domates dışındaki diğer konukçu bitkiler ve patojene hassas domates fideleri *Cmm*' nin yaşaması için uygun koşullar oluştururlar (Strider vd 1969). *Clavibacter michiganensis*' in en önemli konukçusu domates olmakla beraber domates dışındaki biber, patlıcan gibi diğer *solanacea* familyası bitkilerinde de doğal enfeksiyonlar meydana getirmektedir (Chang vd 1992b). Yüksek nem, ılıman hava koşulları, patojene hassas ve genç bitkiler *Cmm*' nin üretim alanında yayılmasını teşvik eder ve hastalık belirtilerinin görülme periyodunu kısaltır (Chang vd 1992a, Carlton vd 1998). *Cmm* tohum kökenli bir patojen olduğu için (Tsiantos 1987) çok az sayıda hastalıkla bulaşık domates tohumundan elde edilen fideler bile patojenin salgın yapabilmesi için yeterlidir (Chang vd 1991, Gitaitis vd 1991).



Şekil 2.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in bitkilerdeki hastalık döngüsü

Clavibacter türleri optimum olarak 25-28 °C' de varlığını sürdüren mezofilik bakterilerdir. Agar içeren besi ortamında patojeni karakterize edecek kolonilerin görülebilmesi için 3-4 günlük bir zamanın geçmesi gerekmektedir. Patojen için maksimum gelişme sıcaklığı 35 °C, termal ölüm noktası ise 50 °C' dir. *Clavibacter* türleri pH 7-8 arasında optimum olarak gelişirken, bitkide ksilem dokusu içerisindeki pH isteği 5 civarında olmaktadır (Strider 1969).

Clavibacter strainleri oksidaz negatif, gelişmesi için mutlaka oksijene ihtiyaç duyan (obligat aerob) mikroorganizmalardır. Bu strainler ne nitrat (NO₃) nede nitrit (NO₂) indirgemesi meydana getirirler (Davis vd 1984). Yağ asitleri, düz bir zincir yapısında ve *anteiso-* ve *iso-methyl* şeklinde dallara ayrılmış doymuş yağ asitlerinden oluşur. Patojenin hücre duvarı rhamnose ve fucose gibi hareketli olmayan bileşenlerden meydana gelmiştir (Collins ve Bradbury 1986).

Patojen gelişmesi için geniş oranda karbonhidrat ve karbonik asit türevleri kullanır (Strider 1969). Selüloz ve nişasta gibi diğer bazı polisakkaritler ile üre ve peptonlar gibi organik azot kaynakları patojenin gelişmesini teşvik eder (Strider 1969).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* topraktaki bitki kalıntıları üzerinde 2-3 yıl kadar yaşamını devam ettirebilir. Topraktaki bitki kalıntıları üzerindeki patojen daha sonraki yıllarda oluşturulan enfeksiyonlardan da sorumludur (Chang vd 1992b, Fatmi ve Schaad 2002, Gleason vd 1991, Smidt ve Vidaver 1986). Patojenin doğada birçok bitki yaprağı üzerinde epifitik olarak bulunduğu bilinmektedir (Behrendt vd 2002, Carlton vd 1994, Jacobs ve Sundin 2001, Smidt ve Vidaver 1986).

Patojen ile bulaşık tohumlardan elde edilen fidelerde bitkide gelişim geriliği, bodurlaşma ve hastalığın gelişim sürecine bağlı olarak geriye döndürülemeyen ölüm gerçekleşir (Hausbeck vd 2000). Bakteriyel kanserin neden olduğu kompleks simptomlar sistemik ve lokal enfeksiyona bağlı olarak farklılık gösterir (Strider 1969, Gleason vd 1993).

Tohum ve doğrudan yaralı dokulardan iletim demetlerine giren patojen bitkide solgunluk, yaprak dökülmesi ve gövde üzerinde nekrozlar gibi sistemik infeksiyonlar meydana getirebilir. Sistemik infeksiyonlar bitkide ilk olarak tek yönlü solgunluğa neden olmakta hastalık ilerledikçe yapraklarda yukarı doğru kıvrılmalar ve yaprak kenarlarında nekrozlar görülebilir. Hastalığın son aşamalarında domates bitkisinin gövdesi kesilip incelendiğinde patojenin iletim demetleri boyunca ilerleyen ve sarıdan kahverimsi kırmızıya varan renklerde yumuşak ve süngerimsi dokular meydana getirdiği gözlenebilmektedir. Patojen ksilem içinde sistemik olarak taşındığından dolayı önemli oranlarda ürün kayıpları meydana gelmektedir (Çetinkaya 2007).

Cmm' nin neden olduğu lokal infeksiyonlarda ise stoma ve hidatod gibi doğal açıklıklardan giren patojen öncelikle yaprak kenarlarında nekrozlara ve solgunluklara neden olmakta daha sonra bu nekrozlar genişleyerek yapraklara oradan da iletim demetlerine yayılmaktadır. Lokal infeksiyon patojenin iletim demetlerine ulaşmasıyla sistemik infeksiyon özelliği kazanmaktadır (Gleason vd 1993).

Meyvede ise semptomlar kuş gözü (Bird's eye) olarak tarif edilen etrafi beyaz bir hale ile çevrili küçük ve kabarık lekeler olarak kendini belli eder. Meyvedeki semptomlar *Cmm* için karakteristik özelliكتedir. Meyvede oluşan lekeler ürün kalitesini düşürdüğünden dolayı pazar değerini düşürür ve ciddi ekonomik kayıplara neden olur (Bryan 1930). Meyve belirtileri bu hastalık etmeninin diğer solgunluk etmenlerinden ayrılmasında belirleyici rol oynar.

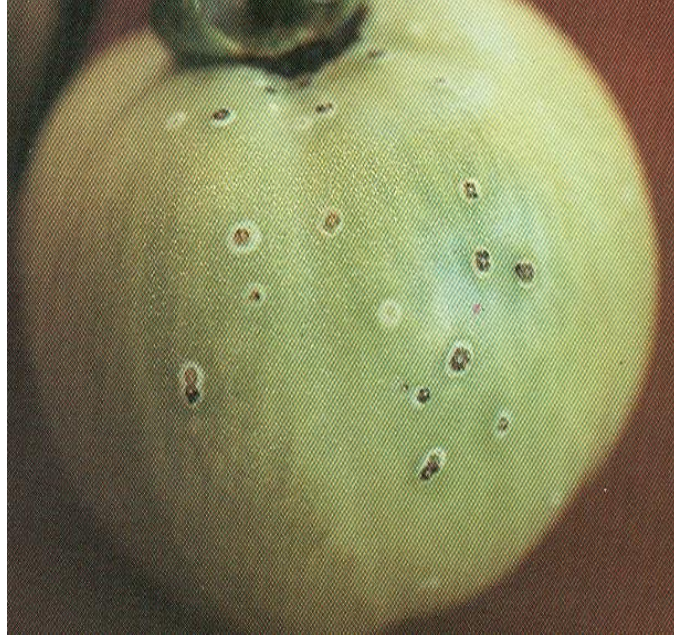
Patojen bitki çeşidi, bitkinin fizyolojik durumu, yetiştirme ortamı (sera, açık tarla), yapılan kültürel uygulamalar ve infeksiyonun oluştuğu zamana bağlı olarak bitki üzerinde geniş oranda hastalık belirtisine neden olmaktadır (EPPO 2005).



Şekil. 2.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in erken dönemde domates bitkisinde oluşturduğu solgunluk belirtileri (Basım 2007)



Şekil. 2.3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in domates gövdesinde oluşturduğu süngerimsi dokular (Blancard 1988)



Şekil. 2.4. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in domates meyvesinde oluşturduğu "Kuş Gözü" belirtisi (Blancard 1988)

Örtü altı domates tarımı yapılan alanlarda uygun koşullar sağlandığında (25-30 °C ve evapotranspirasyon stres içinde) patojen birkaç gün içinde bitkinin tüm yapraklarında büzüşme ve solgunluk meydana getirmektedir. Açık tarla tarımı yapılan alanlarda ise yaşlı yapraklarda hidatodlar aracılığı ile bitki içerisine giren bakteri, yaprak kenarlarında kıvrılmalar, sararmalar ve nekrotik lekeler şeklinde belirtiler oluşturmaktadır (Carlton vd 1998).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*' in neden olduğu solgunluk, sistemik infeksiyon özelliği bulunan diğer hastalık etmenleri ile karıştırılabilir. Bu etmenler arasında *Fusarium* ssp., *Ralstonia solanacearum* ve *Verticillium* ssp. gibi fungal etmenler ile *Pseudomonas corrugata* ve *Erwinia caratovora* gibi bakteriyel etmenlerde bulunmaktadır.

Cmm dünya genelinde ticari olarak domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda % 60 lara varan büyük kayıplara neden olmuştur (Strider 1969). Patojen üretim alanlarında verdiği ciddi kayıplardan sonra uluslar arası karantina düzenlemeleri (International quarantine regulations) kapsamına alınmıştır (Kahn 1982, Franken vd 1993).

Cmm dünyada domates yetiştirilen alanlarda görülen en önemli bakteriyel hastalıktır (Davis vd 1984, Strider 1969). Patojenle mücadelede şimdiye kadar ne dayanıklı bir çeşit nede etkili bir kimyasal mücadele yöntemi bulunamamıştır (Thompson 1986). Bu nedenle patojenle mücadele de sertifikalı tohum kullanımı hastalığın önlenmesinde kullanılan en önemli yöntemdir. Hastalık domates yetiştirilen alanlarda oldukça yaygın olarak görülmesine rağmen patojen ile mücadelede tatmin edici bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır (Gleason vd 1993).

Patojen ile mücadelede öncelikle hastalıktan ari tohum ve fidelerin kullanılması önerilmektedir (Strider 1969, Thyr vd 1973, Gleason vd 1993) ama bu her zaman memnun edici sonuçlar vermemektedir. Eğer yetiştiricilik alanındaki ürünler patojen tarafından infekte edilmişse bundan sonra alınacak kontrol önlemleri patojenin neden olacağı ikincil enfeksiyonların azaltılması ve bitki üzerinde yaşayan epifitik bakteri popülasyonunun düşürülmesine yönelik olmalıdır (Moffet ve Wood 1984, Gleason vd 1993, Carlton vd 1994, Hausbeck vd 2000, Medina-Mora vd 2001, Werner vd 2002).

Patojen ile mücadelede kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi için bitki dayanıklılığını arttırmaya yönelik bazı bakteri grupları ile kontrol edilmesi önerilmiştir (Boudyach vd 2001, Umesha 2006). Ancak şu ana kadar *Cmm* ile mücadelede etkili bir yöntem olamamıştır. Benzer şekilde genetik çalışmalar sonucunda çok az sayıda ticari çeşit patojene karşı kısmi dayanıklılık sağlamıştır (Gleason vd 1993).

Patojen ile mücadelede kullanılan bazı önlemler arasında tohum dezenfeksiyon uygulamaları, hastalıktan ari bitki parçacıklarının kullanılması ve fideliklerde bitkiye uygulanan çeşitli bakırlı preparatlar sayılabilir (Hausbeck vd 2000). Hastalıkla mücadelede kullanılacak bakırlı preparatlarla belirli bir takvime bağlı kalınmak şartıyla sıklıkla yapılmalıdır. Ancak bakır içeren bakterisitlerin çevreye olumsuz etkileri söz konusudur. Çünkü bakır içeren bakterisitler doğada yer alan toprak solucanı ve mavi-yeşil algler gibi yararlı mikroorganizmalar

üzerinde doğrudan toksik etki göstermektedir (Dumenstre vd 1999, Scott-Fordsman vd 2000). Ayrıca bakır toksisitesi yatay gen transferi aracılığı ile hızlı bir şekilde bakteriyel popülasyonlar arasında yayılabilir (Silver 1996).

Cmm genellikle patojen ile bulaşık tohum ve bitki materyalleri ile taşınır (Gitaitis vd 1991, Fatmi and Shcaad 1988). Bu nedenle oldukça önemli olan bu patojenin yayılması, ancak hastalıklı olan bitki dokularının tespiti ve eliminasyonu ile kontrol altına alınabilir (Dreier vd 1997).

Ana konukçusu domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) olmakla birlikte patojen diğer *Lycopersicon* türlerinde, *Solanum douglasi*, *Solanum nigrum* ve *Solanum trifolium* gibi yabancı bitkilerde de hastalık meydana getirebilmektedir. Patojenin suni olarak inokulasyonunda bir çok *Solanaceae* familyası bitkisinin hassas olduğu ortaya çıkmıştır (Tyre vd 1975). Son zamanlarda yapılan araştırmalar ile patojenin, buğday, arpa, yulaf, ayçiçeği, karpuz ve salatalık gibi ürünlerde de hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Stamova ve Satirova 1987).

Hastalık etmeni ile bulaşık tohumlar patojenin ilk inokulum kaynağını oluşturmaktadır (Thyr 1969). Eğer patojen ile mücadelenin etkili olması isteniyorsa, tohumdan patojenin hızlı ve güvenilir bir şekilde tespitini sağlayacak metotların geliştirilmesi gerekmektedir (Gleason vd 1991). Tohum üzerinde bulunan patojenin yoğunluğu oldukça düşük miktarlarda olabilir. Bu yoğunluktaki bakterilerin de tespiti için yaygın olarak kullanılan tespit yöntemlerinden daha güvenli olan PCR destekli metodlar geliştirildi (Dreier vd 1995, Santos vd 1997). Patojen tohum kökenli olduğu için (Tsiantos 1987) 1/10000 oranında bulaşık tohum bile domates tarımı yapılan alanlarda ciddi kayıplara neden olan epidemilerin başlamasına neden olmaktadır (Chang vd 1991, Gitaitis vd 1991). Bütün bu nedenlerden dolayı ticari domates tohum ve fidelerinde bu patojenin tespitini sağlayacak etkili, hassas ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi için çalışmalar yoğun bir şekilde sürmektedir (Gitaitis 1991, Kritzman 1991, Ghedini ve Fiore, 1995, Fatmi ve Schaad 1988, Biggerstaff vd 2000).

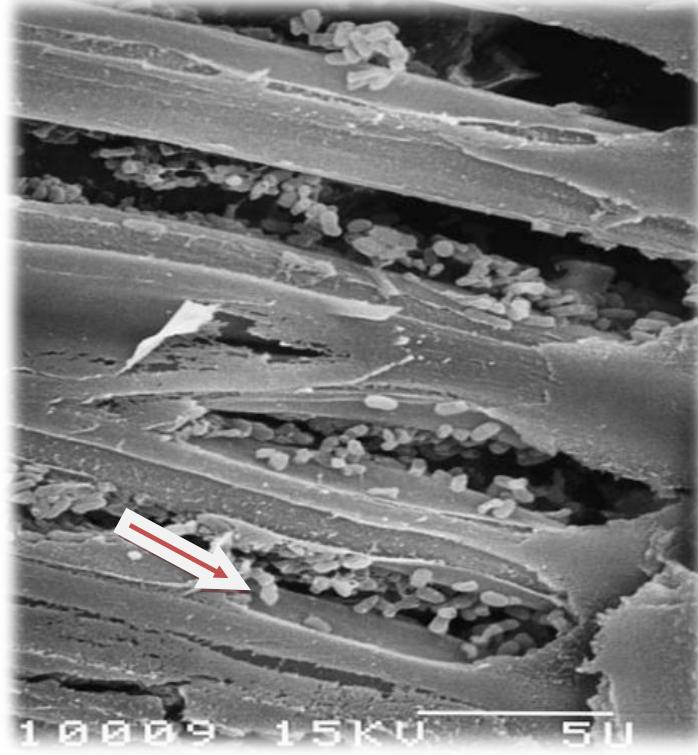
Son 20 yıl boyunca yapılan çalışmalar bitki patojeni bakterilerin konukçusu olduğu bitkilerde hastalık meydana getirme mekanizmalarının açıklanması üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak bu çalışmalar sonucunda gram negatif patojenlerin patojenisitesi üzerinde moleküler düzeyde başarılı sonuçlar elde edilmiş fakat gram pozitif bakteriler için bunun söylenmesi mümkün değildir. Gram negatif (-) patojenlerin aksine gram pozitif (+) bakterilerin bitkilerde hastalık yapma mekanizmaları hakkında detaylı bilgiler mevcut değildir. Aynı şekilde dayanıklı domates çeşitlerinin de gram pozitif bakterinin neden olduğu sistemik enfeksiyonları nasıl engellediği hakkında da bilinenler sınırlıdır.

Genellikle gram negatif yapıdaki bitki patojeni bakterilerin type III sekresyon sistemini kullanarak kendisi için gerekli bazı proteinleri konukçu hücreye taşıdığına inanılmaktadır (Ham vd 1998, Wei vd 2000, Staskawicz vd 2001, Casper-Lindley vd 2002). Birkaç Type III sekresyon sistemini teşvik eden proteinin patojene hassas olan konukçularda virülens faktör görevi yaptığı da bildirilmiştir (Galan ve Colmer 1999). Gram pozitif patojenler gram negatif patojenler gibi type III sekresyon sistemine sahip değildirler bu nedenle gram pozitif patojenlerin hücre duvarı yapısını bozan bir takım enzimleri ve diğer virülenslik faktörleri konukçu hücrelere nasıl taşıdığı hakkında da bilinenler sınırlıdır.

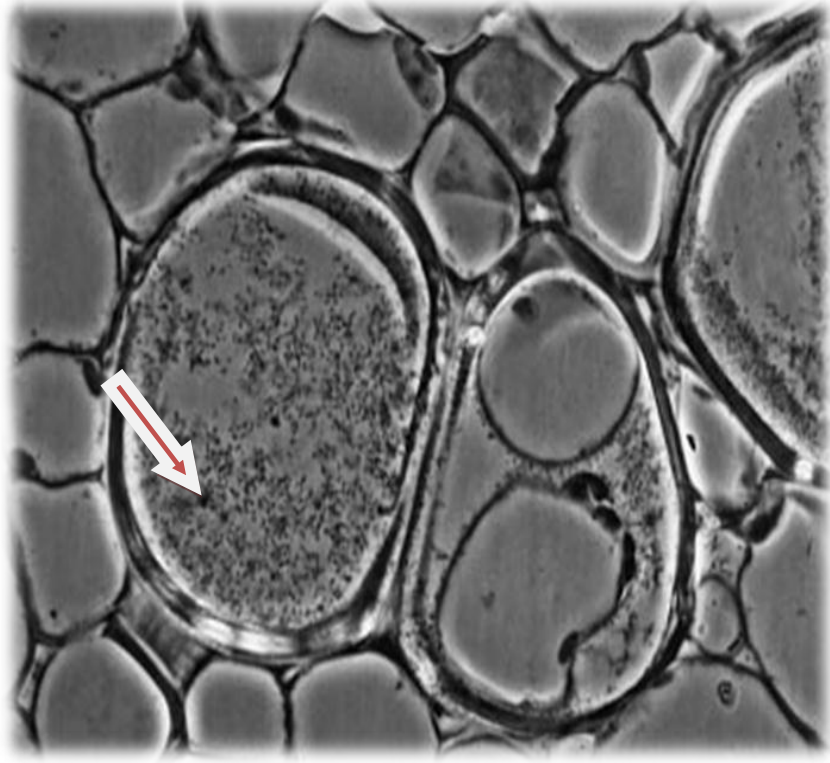
Cmm nin domates bitkisinde enfeksiyon yapma mekanizması tam olarak anlaşılmadığından dolayı patojenin hastalık yapma mekanizması hakkında birbiri ile çelişen raporlar ortaya çıkmıştır. *Cmm* ksilem iletim demetini kullanarak suyun akış yönüne bağlı olarak hızlı bir şekilde bitkinin diğer kısımlarına yayılan solgunluk etmenidir (Wellhausen 1938).

Cmm' nin domates bitkisi içindeki yayılması ile ilgili raporlarda patojenin öncelikle ksilem iletim demetinin çalışmasını sınırlandırdığından bahsedilmekteydi (Pine ve Grogan 1954, Wallis 1977, Benhamou 1991). Ancak patojene karşı tam olarak dayanıklılık sağlayacak bir gen bölgesi Quantitative Trait Loci (QTL) bulunamadı. *Cmm'* nin hastalık yapma mekanizması (virülenslik)

üzerinde çeşitli görüşler olmasına rağmen bu mekanizma da tam olarak bilinmemektedir (Jahr vd 2000).



Şekil.2.5. *Claibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)' nin boyuna kesilen domates bitkisinin iletim demetlerinde kolonize oluşu (Jahr 2000) (Scanning Electron Microscope (SEM))



Şekil.2.6. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)' nin enine kesilen domates bitkisinin iletim demetlerindeki görünüşü (Jahr 2000) (Scanning Electron Microscope)

Patojenin hastalık yapma mekanizması ile ilgili bir çok hipotez rapor edilmiştir. Bu raporlara göre laboratuvar koşullarında yetiştirilen domates fidelerinde patojen tarafından salgılanan exopolisakkarit ve glikoproteinlerin bitkide ksilem aracılığı ile yapılan suyun taşınma mekanizmasını engellediği bildirilmiştir (Rai ve Strobel 1968a, 1968b, Van den Bulk vd 1990). Yine yapılan bazı çalışmalarda *Cmm*' nin farklı strainlerinin ürettiği çeşitli exopolisakkaritler (EPS) incelendiğinde bu maddelerin aslında patojenin virülensliği üzerinde gerekli olduğu ancak çokta hayati önemi olmadığı tespit edilmiştir (Bermpohl vd 1996).

Yapılan çalışmalarda exopolisakkaritlerin, bakterinin bitki savunma sistemi tarafından salgılanan maddelerce tanınmasını engellediği rapor edilmiştir. (Niehaus 1993). Eksopolisakkaritlerin patojeni aglütininer, lektinler, fitoaleksiner ve aktif oksijen türevlerine karşıda koruduğu bildirilmiştir (Bradshaw-Rouse vd 1981, Romeiro vd 1981, Young ve Sequeira 1986, Kiraly vd 1997). EPS' ler

patojenin konukçu içerisinde infeksiyon ve kolonizasyonunu teşvik etmektedir (Tharaud vd 1994, Bermpohl vd 1996, Saile vd 1997). Domates bakteriyel solgunluk ve kanser etmeni (*Cmm*)' nin neden olduğu solgunluğun parankima hücreleri ve ksilem üzerinde patojen tarafından yapılan bir enzimatik saldırının sonucu olduğu bildirilmiştir (Wallis 1977, Benhamou 1991). Bu konuda çalışan bir çok laboratuvar hastalığın gelişimi üzerinde ekstraselüler ve hücre duvarı yapısını bozan bir çok enzimin rol oynadığı belirtilmektedir. Bu enzimler arasında endoselülazlar (Meletzus vd 1993), poligalakturonazlar (Beimen vd 1992), pektin metil esterazlar (Strider 1969) ve xylanaz (Beimen vd 1992) olduğu bildirilmiştir.

Günümüzde *Cmm* nin patojenisite mekanizmasını açıklayabilmek için çeşitli vektörler ve transformasyon sistemlerini içeren genetik yöntemler geliştirilmiştir. (Meletzus ve Eiclanlaub, 1991, Laine vd 1996). Yapılan bu genetik çalışmalar sonucunda patojenin sahip olduğu pCM1 ve pCM2 plazmidlerinin patojenisite de rol oynayan çeşitli genleri üzerinde taşıdığı belirlenmiştir. Son yapılan çalışmalar gösteriyor ki patojenin hastalık yapma mekanizmasında önemli yer tutan ve bitkinin hücre duvarı yapısını degrades eden endoselülaz enzimi geninin (*celA*) pCM1, yine hastalık simptomlarının gelişmesi için gerekli olan *pat-1* geninin de pCM2 plazmidi üzerinde yer aldığı ortaya çıkarılmıştır (Meletzus 1993).

Cmm' nin ülkemizde varlığı ile ilgili bilgiler ilk olarak İç Anadolu bölgesinde (Bremer 1948), saptandıktan sonra Güney Doğu Anadolu (Bremer vd 1952), Marmara (Karahana 1965) ve Ege bölgesinde (Karaca ve Saygılı 1977) çalışmaları ile elde edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda etmen Doğu Akdeniz (Çınar 1980), Batı Akdeniz (Basım vd 2004) ve Doğu Anadolu (Sahin vd 2002) bölgelerinde domates üretim alanlarında belirlenmiştir. *Cmm* strainlerinin karakterizasyonu ise Basım ve Basım' ın 2007 yılındaki çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır.

2.2 *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Dawson, 1939) ile İlgili Bilgiler

Xanthomonas Dawson 1939, çubuksu, gram negatif ve tek kamçılı bir bakteri cinsidir. Besi ortamlarında sarı renkli koloniler oluştururlar. Bu da patojenin sahip olduğu Xanthomonadin adlı bir renk pigmentinden kaynaklanmaktadır. Az sayıda saprofitik ve epifitik tür dışında türlerinin büyük çoğunluğu bitki patojenidir (Goto 1992).

Xanthomonas cinsi doğada çok büyük bir çeşitliliğe sahiptir. Bu bakteri cinsi için 20 farklı DNA homoloji grubu tespit edilmiştir. Bu grupların tamamı genomik tür olarak kabul edilmiştir (Vauterin vd 1995). Aynı türler arasında ortalama DNA homolojisi strain bazında % 77 dir.

Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria*'nın strainleri domates ve biberde ki patojenisite özelliklerine göre 3 gruba ayrılır. Bunlar sadece biberde patojen olanlar, sadece domateste patojen olanlar ve hem biber hem de domates te patojenik olanlar şeklindedir (Stall 1995). Patojenin bitki seçiciliğinde sahip olduğu avirülens genlerin önemli yer tuttuğu belirlenmiştir (Minsavage 1990, Stall 1993)

Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria* strainleri fizyolojik olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan B grubu pektolitik ve amyliolitik özelliklere sahipken A grubuna dahil patojenle de bu özelliklere raslanılmamaktadır (Stall vd 1994). *Xanthomonas* patovarlarından DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda A grubuna dahil olanlar *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, B grubuna dahil olanlar ise *Xanthomonas vesicatoria* olarak tekrar sınıflandırılmışlardır (Vauterin vd 1995)

Jones vd (2004) yılında biber, domates ve her iki kültür bitkisinde bakteriyel leke hastalığına neden olan dört farklı fenotipik *Xanthomonas* grubunun bulunduğunu ve bunların Grup A ve C (*Xav*), grup B (*X. vesicatoria*) ve grup D (*X. gardneri*) olduğunu bildirmişlerdir. Adı geçen araştırmacılar DNA homolojisine göre

hastalığa neden olan etmenleri *X. euvesicatoria* (grup A), *X. vesicatoria* (grup B), *X. perforans* (grup C) ve *X. gardneri* (grup D) olarak isimlendirmişlerdir.

Xav çubuksu (0,4-07 X 0,7-1,8 µm) tek bir polar kamçıya sahip obligat aerob gram negatif bir bakteridir. Kapsüllü fakat spor oluşturmeyen bakteride son yıllara kadar pili ve fimbria hakkında biliniler sınırlı idi. Ojanen-Reuhs vd (1996) yılında *Xav* strainlerinin *fimA* geni taşıdığını belirlemişlerdir. *Xav* azot kaynağı olarak nitratı nitrata indirgeyemez, oksidaz negatif ve katalaz pozitifdir. Patojen karbon ve nitrojen kaynağı olarak Asparagine kullanmaz. *Xav*'nin G-C içeriği % 61' den % 71' e kadar değişebilir.

Xav'nin biberlerde patojen olduğu ilk kez 1921 yılında Güney Afrika' da saptanmıştır (Gardner ve Kendrick 1923). Hastalığın varlığı daha sonra yağmurlu ve sıcak iklime sahip domates ve biber yetiştirilen pekçok ülkede rapor edilmiştir (Cook ve Stall, 1982). Biberde bakteriyel leke hastalığı İsrail (Volcani, 1969), ABD, Yeni Zelanda, İtalya, Hindistan, Macaristan, Guadelop, El Salvador, Brezilya, Avustralya ve Arjantin'de bulunduğu Cook ve Stall (1982) tarafından bildirilmiştir (Mirik 2005).

Ülkemizde *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın domatesteste hastalık yaptığı ilk kez Çanakkale ilinde Karaca ve Saygılı (1982) çalışması ile ortaya çıkartılmıştır. Türkiye' nin Güneybatı bölgelerinde Basım vd (2004) çalışmaları ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın domates ve biberde neden olduğu hastalıklar ırk bazında ortaya konulmuştur.

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*'nın neden olduğu bakteriyel yaprak lekesi hastalığı biber (*Capsicum annum* L.) ve domates' in (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en önemli bakteriyel etmenlerinden bir tanesidir (Jones vd 1991, Stall 1993). Hastalık etmeni dünya genelinde domates ve biber yetiştiriciliği açısından ekonomik önemi olan ılıman ve uygun hava koşullarına sahip ülkelerde sıklıkla ortaya çıkmaktadır (Jones vd 1998). Doğal enfeksiyonlarda hastalık etmeni bakteri (*Xav*) bitkiye stoma veya yaralanmış dokular aracılığı ile girerek hücreler

arası boşluğa ilerler ancak patojen, domates bakteriyel solgunluk ve kanser etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) gibi ksilem iletim demetini istila etmez (Bonas vd 2000).

Patojen oldukça geniş bir konukçu aralığına sahiptir. Aralarında 124' ü monokotiledon 268' i dikotiledon olan çok sayıda bitkide hastalık oluşturduğu bilinmektedir (Leyns vd 1984, Chan ve Goodwin 1999). Özellikle sıcaklığın ve yağış miktarının fazla olduğu yerlerde bu hastalık etmeni epidemilere neden olabilmektedir (Stall 1993). Genç bitkilerde oluşan hastalık yaşlı bitkilere oranla daha şiddetli olmakta dolayısıyla ürün kaybı da daha fazla olmaktadır (Pohronezy ve Volin 1983, Stall 1993).

Ana konukçuları Domates (*Lycopersicon esculentum*) ve Biber (*Capsicum* spp.) olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın bir çok bitkide epifitik olarak bulunduğu bilinmektedir. Bunlar arasında *Solanaceae* familyasına ait yabancı otlar önemli yer tutar. *Datura* spp., *Hyoscyamus* spp., *Lycium* spp., *Nicotiana rustica*, *Physalis* spp., *Solanum* spp. bunlar arasında sayılabilir (EPPO 1988).

Patojen bitki içerisine ya doğal açıklıklardan (stoma, hidatod) yada böcekler, kültürel uygulamalar ve rüzgarın neden olduğu yaralardan girmektedir. Patojenin optimum sıcaklık isteği 24-30 °C olmasına rağmen bu seviyelerin altında ve üstündeki sıcaklıklarda da gelişim gösterebilmektedir (Kucharek 2000).

Hastalık belirtileri Domates Bakteriyel Benek hastalık etmeni olan *Pseudomonas tomato* pv. *tomato*'nun neden olduğu belirtilerle genelde karıştırılır. Ancak *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın neden olduğu lekeler *Pseudomonas tomato* pv. *tomato*'nun neden olduğu lekelerden daha büyük ve düzensizdir. Meyvedeki lezyonların orta kısımları zamanla çatlar. Meyve sapı ve genç saplardaki ilk belirtiler yaprak belirtilerine benzer sert ve ince uzun çizgiler şeklinde görünüm alırlar. Hastalık etmeninin neden olduğu belirtiler arasında gövde, yaprak ve meyvede olanlar patojen için karakteristiktir. Ilıman ve yağışlı

hava koşullarında patojen bitkilerde ciddi ürün kayıplarına sebebiyet vermektedir (Pohronezny vd 1986).

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*'nın domates ve biber tohumları üzerinde taşınabildiği çeşitli defalar rapor edilmiştir (Bashan vd 1982b, Gardner ve Kendrick 1921, Gardner ve Kendrick 1923, Jones vd 1986, Sijam vd 1991). Ayrıca hastalık etmeni ile bulaşık tohumlardan elde edilen fidelerde patojenin neden olduğu karakteristik belirtiler ortaya çıkmaktadır (Gardner ve Kendrick 1923, Higgins 1922). Sağlıklı görülen bitkilerden elde edilen tohumların patojenle bulaşık olabileceği, hastalık etmeni *Xav*'ın kurutulmuş biber tohumlarında 10 yıl, domates tohumlarında 20 yıl canlılığını sürdürebildiği, primer inokulum kaynağı olarak infekteli tohumlarının önemli rol oynadığı ve hastalığın uzun mesafelere infekteli tohumlarla yayıldığı birçok araştırmacı (Goode ve Sasser 1980, Bashan vd 1982a, Diab vd 1982, Bashan ve Okon 1986) tarafından bildirilmiştir.

Hastalık etmeni *Xav* konukçu bitkilerde, hastalıklı bitkilerden elde edilen tohumlarda (Bashan vd 1982b), bitki kalıntılarında (Peterson 1963) ve yabancıotlar üzerinde epifitik olarak yaşayabilmesinin yanı sıra topraktaki bulaşık bitki artıklarında canlılığını 18 ay sürdürebilmektedir (Jones ve Scott 1986). *Xav* kışı buğday, domates ve soya bitkilerinin rizosferinde geçirirken bu tip infekteli toprakta gelişen bitkiler için inokulum kaynağı oluşturur (Stall 1993). Infekteli topraklarda bakterinin canlı kalma süresi toprağın yapısı ve kullanılan gübrelere bağlı olarak değişir (Saygılı vd 1985).

Domates ve Biber bitkilerinde neden olduğu yaprak ve meyve lekeleri nedeniyle önemli kayıplara neden olan *Xav*'nin iletim demetleri, sekonder kökler, gövde, ovaryum ve tohumlardan izole edildiğinde bildirilmiştir (Crosan ve Morehart 1963).

Domates ve Biber Bakteriyel Yaprak Lekesi hastalığı için yoğun yağmur, yüksek nem ve 30 °C civarında sıcaklık optimum koşulları oluştururken, 35 °C üzerindeki sıcaklığın hastalık gelişimine uygun olmadığı bildirilmiştir (Diab vd

1982). Nisbi nem, domates ve biber bitkilerinde bakteriyel yaprak leke hastalığının gelişimini etkiler. Uzun periyotlarda yapraklardaki serbest suyla birlikte yüksek nemin infeksiyon için uygun olduğu ancak hastalığın ortaya çıkabilmesi için yüksek nisbi nemle birlikte ılıman bir iklimin gerekliliği vurgulanmıştır (Diab vd 1982). Tarla içerisinde seyreltme, fide dikimi, budama, bağlama ve meyve toplama gibi kültürel işlemler sırasında hızla yayılır (Goode ve Sasser 1980, Pohronezny vd 1990, Ward ve O'Garro 1992, Stall 1993). Tüm ticari üretim alanlarında *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın aerosoller aracılığı ile yayılabileceği bildirilmiştir (McInnes vd 1988).

Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria* (*Xav*) domateste yaprak, gövde, çiçek sapı ve meyve gibi tüm toprak üstü aksamda görülebilmektedir. Hastalık belirtileri yapraklar üzerinde çok küçük sulu benekler şeklinde görülür. Benekler zamanla siyahlaşarak yağlı bir görünüş alır. Meyvedeki lekeler koyu renkte ve etrafı sulu bir hale ile çevrilidir. Daha sonra bu alanlar kuruyarak çökük nekrotik bir hal alır (Jones vd 1993). Meyve enfeksiyonlarında ürünün pazar değeri ciddi anlamda düşer

Yapılan çalışmalar sonucunda, *Xav* ve konukçusu olduğu bitkiler arasındaki ilişki, hem patojende hem de bitkide bulunan genler arasındaki uyuma göre farklılık göstermektedir. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın virulent olan bir straini, hassas olan bitki dokularında sulumsu lezyon ve nekrotik lekeler meydana getirmektedir. Ancak bitkide bu patojene karşı dayanıklı bir genin (*Bs3*, *Bs.*) varlığında ise, bu genin bakteride var olan avirülenslik geni (*avrBs3*) ile uyuşması sonucu bitkide aşırı duyarlılık reaksiyonları (Hypersensitive Reaction (HR)) oluşmaktadır (Minsavage vd 1990). Genetik çalışmalar sonucunda bakteride *hrp* ve *avr* genlerinin varlığı ortaya çıkarılmıştır. Bu genlerden, *hrp* geni konukçu aralığında olan hassas bitkilerde patojenisiteden, dayanıklılık geni taşıyan bitkilerde ise HR' dan sorumludur (Bonas vd 1991).

Xav strainlerinin çoğu özel bir patojenisiteye sahiptir. Bazı strainler sadece domateste patojenik, bazıları sadece biberde patojenik iken bazı strainler ise hem

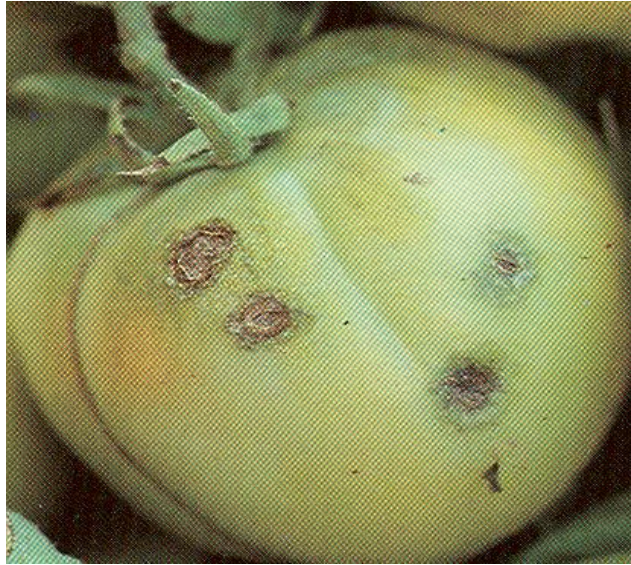
biber hemde domateste patojenik olabilir (Stall 1995). Patojen ile konukçu arasında ki bu ilişki gen için gen teorisi ile açıklanmaktadır (Stall 1993). *Xav'* nin *hrp* genleri patojenin patovarları arasında çok az farklılık göstermekte ve ana kromozom üzerinde yer almaktadır (Leite vd 1994). *hrp* genleri birbirini tamamlayan 6 genden oluşan gen salkımı şeklindedir (Bonas vd 1991).

Bakterilerde bulunan bir diğer gen grubu olan avirülenslik genleri konukçu ve çeşit seçiminde rol oynamakta ve hem ana kromozom hem de plasmid üzerinde yer bulunmaktadır (Stall 1993, Minsavage vd 1990). *Xav* hem RFLP (Cooksey ve Graham 1989, Stall vd 1994), hemde plasmid içeriği bakımından da büyük bir çeşitliliğe sahiptir. Plasmid büyüklüğü 3-300 kb arasında değişebilir. 13 farklı plasmid sınıfı ve 71 farklı plasmid profili tespit edilmiştir (Canteros 1990, Stall 1993). Avirülenslik genlerinin çoğu, bakıra dayanıklılık genleri ve streptomisine dayanıklılık genleri plasmid üzerinde yer almaktadır (Stall vd 1986, Minsavage vd 1990). Yapılan araştırmalar sonucunda kromozal bir bakıra dayanıklılık geni varlığı da belirlenmiştir (Basım 1996). Yine yapılan çalışmalarda hem plasmidlerin hemde ana kromozomun horizontal (yatay) gen transferi ile farklı strainlere aktarıldığı ispatlanmıştır (Basım 1996).

Tohum bakteriyolojisinde hem poliklonal hemde monoklonal antikorların kullanılmasına rağmen, monoklonal antikor (MABs) kullanımı gittikçe artmaktadır. Çünkü MAB' lar patojene oldukça spesifik oldukları için cross-reaction (çapraz reaksiyon) olasılığını azaltmaktadır. Kullanılacak bir MAB ile 10^{-4} cfu/ml oranındaki bakteri popülasyonu tespit edilebilmektedir (Jones vd 1997). Daha önceki bazı çalışmalarda (Tsushiya vd 2003) *Xav'* nin çeşitli strainlerinin ürettiği liposakkaritlere karşı, bazı monoklonal antikorlar (MAB) elde edilmiştir. Ancak serolojik testin hassasiyetindeki düşüklükler nedeniyle bunların rutin olarak hastalık teşhisinde kullanılmasının sınırlı olduğu ifade edilmiştir (Tsuchiya ve Ursel 2004).



Şekil.2.7. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nin domates yaprağında oluşturduğu “yaprak lekesi” belirtisi (Blancard 1988)



Şekil.2.8. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nin domates meyvesinde oluşturduğu belirtiler (Blancard 1988)

Bitki patojeni *Xanthomonas* türlerinin klasik bakteriyolojik metodlar ile tespiti ve tanısı, bu patojenlerin saf kültürde geliştirilmesi ile çeşitli biyokimyasal, serolojik ve patolojik testlerle yapılmaktadır (Seattler vd 1989, Schaad 1988). Hastalık etmeni bakterilerin tanısı ve tespiti için seçici ve yarı seçici besi yerleri de kullanılmaktadır. Seçici besi yerleri bitki materyalleri üzerinde bulunan ve hızla

gelişerek hedef bakterinin gelişmesini engelleyen mikroorganizmaların eliminasyonu için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Seattler vd 1989).

Bitki patojeni bakterilerin tanısı ve tespitinde son zamanlarda daha güvenli olan nükleik asit temelli tekniklerden oldukça fazla yararlanılmaktadır (Bereswill vd 1992, Manulis vd 1991, Schaad 1989, Seal vd 1992). Patojenin kesin olarak teşhisi laboratuvar çalışmaları ile mümkün olabilmekte iken meyve üzerindeki bazı karakteristik belirtiler teşhiste yaygın olarak kullanılmaktadır (Kucharek 2000).

Son 15 yıl içinde bitki patojeni *Xanthomonas* türlerinin hastalık meydana getirme mekanizmalarının tanımlanması açısından önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ve *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*'nin (Xoo) genom dizilerinin çıkarılması ve bunun ile ilgili çalışmalar bu ilerlemeye katkıda bulunmuştur (Da Silva vd 2002, Qian vd 2005).

Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria*'nın patojenisitesi type III sekresiyon sistemine bağlıdır (Becker vd 1998, Bonas vd 1991). Type III sekresiyon sistemi hayvan ve bitki patojeni bakterilerde oldukça korunmuş bölgelerden yönetilir. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'da Type III protein sekresiyon sistemi, hipersensitif reaksiyon ve patojenisiteden sorumlu *hrp* gen salkımı tarafından kodlanmakta (Bonas vd 1991) ve üretilen proteinler bitki hücresi içerisine taşınmaktadır (Szurek vd 2002). Type III sekresiyon sistemi sonucu oluşturulan proteinler, öncelikle bitki sitoplazmasına geçmekte daha sonra bitki savunma sistemini engellemek gibi konukçu hücre işlemlerini engellemektedir (Alfano vd 2004, Brown vd 1995).

Patojen tarafından salgılanan ve avirulens proteinler olarak adlandırılan bazı maddeler konukçu hücre tarafından tanınır. Bu mekanizma sonucunda konukçu hücre, savunma sistemini harekete geçirir ki sonuçta aşırı duyarlılık reaksiyonları (HR) oluşur (Alfano vd 2004).

Şu ana kadar *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* içerisinde type III sekresiyon sistemini etkileyen az sayıda protein tanımlanmıştır. Ancak bunların moleküler fonksiyonları hakkında çok az miktarda bilgi mevcuttur (Buttner ve Bonas 2002, Buttner vd 2003, Noel vd 2003, Rimsky 2004)

Bakteriyel bitki patojenleriyle mücadelede kimyasal uygulamalar etkili olmadığından dolayı (Bashan vd 1982a, Jones 2001), hastalık etmeninden arı tohum ve bitki materyallerinin kullanımı ile sanitasyon koşullarının iyi yapılması önerilmektedir (Pohronezny vd 1990, Marco ve Stall 1983). Hastalık etmeni ile mücadelede başarı ancak birkaç yöntemin bir arada kullanılması ile mümkün olmaktadır. Tohumların asit ve çamaşır suyu ile muamele edilmesi, sertifikalı ve hastalıktan arı üretim materyallerinin kullanımı, belirli konsantrasyonlarda maneb+bakır uygulamaları bakteriyel enfeksiyonların önlenmesinde kullanılmaktadır. Bitkiler ıslak iken üretim alanında çalışmaktan kaçınmak patojenin hızla yayılmasını önleme açısından önemli sonuçlar vermektedir. Yağmurlama sulama sistemleri yerine damlama sulama sistemleri tercih edilmelidir (Kucharek 2000).

Bakır içerikli preparatlarla yapılan ilaçlamalar domates ve biber bitkisinde yaprak lekelerinde azalmaya ve buna bağlı olarak üründe artışa neden olur. Yapılacak ilaçlama ile bitki yüzeyinde bakırlı fungusla bir film tabakası sağlanırsa bakterinin yaprak ve meyvelerde hastalık oluşturmamadan engellenebileceği, bu nedenle yağmurlu periyot öncesinde yapılacak bakırlı bir kimyasal uygulamanın çok önemli olduğu ancak ilaçlamanın doku içerisine girmiş olan bakteriye karşı etkili olmadığı bildirilmiştir (Goode ve Sasser 1980, Pernezy vd 1995, Ritchie 1996, Wright ve Miller 2000).

2.3 Bakteriyel Patojenlerin Tanı ve Tespitine Yönelik Metotlar

Domates Tohum Kökenli bakteriyel etmenleri ile mücadelede, bunların erken dönemde tanı ve tespitlerinin gerçekleştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla günümüze kadar patojenler ile mücadele için çeşitli kültürel tedbirler,

sertifikalı tohum kullanımı, tohuma çeşitli kimyasal ve biyolojik uygulamalar, yeşil aksam ilaçlamaları, toprak solarizasyonu, dayanıklı çeşit kullanımını içine alan entegre mücadele yöntemi önerilmektedir. Bu hastalık etmenlerinin tespiti için şimdiye kadar çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında yarı seçici besi ortamından seçim, serolojik testler (ELISA vb.), yağ asidi profillerinin çıkarılması (FAME) ve Polimerase Chain Reaction (PCR) gibi yöntemler yer almaktadır. Son yıllarda klasik tanı ve tespit yöntemlerinden ziyade nükleik asit temelli metodların kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu metodlardan Real-Time PCR da hassas, güvenilir ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı patojenlerin tespitinde ciddi anlamda kullanılmaya başlanmıştır. Ülkemizde domates tohum kökenli bakteriyel patojenlerden *Cmm*' nin moleküler düzeyde tespitine yönelik Benlioğlu ve Özyılmaz' ın (2007) çalışmaları da bulunmaktadır. Araştırmacılar flouresan boyalar ile işaretli Moleküler Beacon probe kullanarak Flouresan PCR ile patojeni saptayabilmişlerdir. Klasik PCR sonuçları ile karşılaştırılan Flouresan PCR sonuçlarının birbirleriyle % 100 uyumluluk gösterdiği ve testin duyarlılığının 10 bakteri/ml düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir.

Real-Time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesine dayanan ve oldukça kısa sürede sonuç veren bir PCR yöntemidir (Huletsky vd 2004, Qin vd 2003). Real-Time PCR kısa sürede sonuç veren ve sonuçların kantitatif olarak elde edilebildiği bir yöntemdir. Bu yöntemde klasik PCR işlemlerinden farklı olarak tüplerin ağızları açılmadan tanılama yapıldığı için kontaminasyon olasılığı oldukça düşüktür. Real-Time PCR yönteminde ayrıca elektroforezis işlemi uygulanmamaktadır. Bütün işlemler sisteme bağlı bir bilgisayar ünitesinden takip edilebilmektedir. Klasik PCR yöntemine oranla Real- Time PCR yöntemi 10^7 kat daha dinamiktir (Freeman 1999, Raeymaekers 2000).

Bu çalışmada ele alınan hastalık etmenlerinin (*Cmm*, *Xav*) tohumdan ve erken dönemde bitki materyallerinden doğru ve hızlı bir şekilde tespiti, bu hastalık etmenleri ile mücadelede son derece önemlidir. Ülkemizin ciddi bir hibrit tohum ithalatçısı olduğu düşünüldüğünde hastalık etmenleri ile bulaşık tohumların

ülkemize girmeden hızlı, hassas ve güvenli bir şekilde tespiti oldukça önem kazanmaktadır.

Bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda Real-Time PCR yönteminin kullanımı da artmıştır. Yöntemin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitki dokularından tespit yapılabilmesi yöntemin yaygınlaşmasında rol oynamıştır. Real-Time PCR ile günümüze kadar çeşitli bitki patojeni bakterilerin tespitleri de gerçekleştirilmiştir.

Weller vd (2000), Taqman Real-Time PCR ile birçok üründe bakteriyel solgunluk hastalık etmeni *Ralstonia solanacearum*' un RS primer ve prob seti (tüm biovarlar) ve B2 primer ve prob setini (biovar 2A) kullanarak patates yumrusundan tespitini gerçekleştirmişlerdir.

Luo vd (2008), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in tohumdan tespiti amacıyla canlı ve ölü bakterilerin, DNA' ya bağlanan ethidium monoazide (EMA) ve Taqman prob kullanarak ayırımına dayalı Real-Time PCR yöntemi geliştirmişlerdir.

Bellis vd (2007), yumuşak çekirdekli meyve ağaçları (elma, armut, ayva) ve çiçeklerde ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora*' yı Real-Time PCR için geliştirdikleri Scorpion probe ve E3- E4 primer çifti ile tespit edebilmişlerdir.

Vandroeme vd (2008), çilek köşeli yaprak lekesi hastalık etmeni *Xanthomonas fragaria*' nın direkt yaprak dokusundan hassas tespiti için Real-Time PCR metodunu kullanmışlardır.

Tohum kökenli domates bakteriyel benek hastalık etmeni *Pseudomonas tomato* (*syringae*) pv. *tomato*' nun direkt hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki dokularından tanısı ve tespiti Real-Time PCR ve Real-Time Bio-PCR ile gerçekleştirilmiştir (Basım ve Basım 2007). Bu tez kapsamında diğer domates

tohum kökenli bakteriyel patojenlerin, Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti yapılmıştır. Böylece, tüm domates tohum kökenli bakteriyel patojenlerin tohumdan Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti gerçekleştirilebilecektir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler

Bu çalışma kapsamında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı' na ait kültür koleksiyonunda yer alan yerli ve yabancı *Cmm* ve *Xav* strainleri, geliştirilen primer ve prob setlerinin seçiciliğini tespit etmek için farklı cins ve türlere ait bitki patojeni bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1 - 3.2 - 3.3).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan yerli ve yabancı *Cmm* strainleri

| İzolat No | Bakteri İsmi | Orijini | Referans |
|------------------|--|--------------|------------------------|
| 1 <i>Cmm</i> 5 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Aksu | H.Basım |
| 2 <i>Cmm</i> 6 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Aksu | H.Basım |
| 3 <i>Cmm</i> 10 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Aksu | H.Basım |
| 4 <i>Cmm</i> 11 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Isparta | H.Basım |
| 5 <i>Cmm</i> 16 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Boztepe | H.Basım |
| 6 <i>Cmm</i> 17 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Boztepe | H.Basım |
| 7 <i>Cmm</i> 18 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Boztepe | H.Basım |
| 8 <i>Cmm</i> 19 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Boztepe | H.Basım |
| 9 <i>Cmm</i> 26 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Dalaman | H.Basım |
| 10 <i>Cmm</i> 27 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Serik | H.Basım |
| 11 <i>Cmm</i> 28 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Alanya | H.Basım |
| 12 <i>Cmm</i> 29 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> PD 807 | Hollanda | J.D. Janse 1986 |
| 13 <i>Cmm</i> 30 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> PD 3925 | Hollanda | J.D. Janse 2000 |
| 14 <i>Cmm</i> 31 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Macaristan | ICMP 2550 |
| 15 <i>Cmm</i> 32 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Yeni Zelanda | ICMP 1809 |
| 16 <i>Cmm</i> 33 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Yeni Zelanda | ICMP 1899 |
| 17 <i>Cmm</i> 36 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | ABD | Campell Seed,H. Bolkan |
| 18 <i>Cmm</i> 37 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | ABD | Campell Seed,H. Bolkan |
| 19 <i>Cmm</i> 44 | <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | İspanya | Valencia Inst. |

Çizelge 3.2. Çalışma dahilinde kullanılan yerli ve yabancı *Xav* strainleri

| | İzolat Numarası | Bakteri İsmi | Orijini | Referans |
|---|---------------------|--|---------|-----------|
| 1 | <i>Xav</i> 76-3 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | USA | J.B.Jones |
| 2 | <i>Xav</i> 82-8 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | USA | J.B.Jones |
| 3 | <i>Xav</i> 85-13 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | USA | J.B.Jones |
| 4 | <i>Xav</i> 86-27 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | USA | J.B.Jones |
| 5 | <i>Xav</i> 87-14 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | USA | J.B.Jones |
| 6 | <i>Xav</i> 87-16 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | USA | J.B.Jones |
| 7 | <i>Xav</i> 89-10 | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | USA | J.B.Jones |
| 8 | <i>Xav</i> Kumluca | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | Türkiye | H.Basım |
| 9 | <i>Xav</i> Mavikent | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> | Türkiye | H.Basım |

Çizelge 3.3. Çalışma dahilinde kullanılan farklı cins ve türlere ait bakteriler

| İzolat/Strain | Bitki Kaynağı | Orijini | Referans |
|---|---------------|---------|----------|
| <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> | Karpuz | Amerika | N.Schaad |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Toprak, Toz | Türkiye | H.Basım |
| <i>Erwinia amylovora</i> | Elma , Armut | Türkiye | H.Basım |
| <i>Erwinia caratovora</i> pv. <i>caratovora</i> | Domates | Türkiye | H.Basım |
| <i>Pseudomonas corrugata</i> | Domates | Türkiye | H.Basım |
| <i>Pseudomonas tomato</i> pv. <i>tomato</i> | Domates | Türkiye | H.Basım |
| <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> | Zeytin | Türkiye | H.Basım |
| <i>P.syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> | Fasulye | Türkiye | H.Basım |
| <i>P. fluorescens</i> | Toprak | Almanya | W.Zeller |
| <i>Rhizobium vitis</i> | Asma | Türkiye | H.Basım |
| <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> | Lahanagiller | Almanya | W.Zeller |
| <i>Xylella fastidiosa</i> | Asma | Türkiye | H.Basım |

3.2. Real-Time PCR Optimizasyonu

Bu çalışmada piyasada bulunan çok sayıda Real-Time PCR cihazından Smart Cycler II (Cepheid) isimli cihaz kullanılmıştır. Diğer Real-Time PCR cihazlarından farklı olarak bakteriyel patojenlerin teşhislerinin oldukça kısa sürelerde ve arazi koşullarında gerçekleştirilmesine olanak sağladığından dolayı Smart Cycler II tercih edilmiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın Real-Time PCR ile kısa sürelerde tanılarının gerçekleştirilmesi amacıyla *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* için ortak bir Real-Time PCR programı oluşturulmuştur (Çizelge 3.4). Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ortak Real-Time PCR programı aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.4. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* için oluşturulan ortak program

| | Sıcaklık (°C) | Süre | Döngü Sayısı |
|----------------------|---------------|-----------|--------------|
| İnitial Denaturation | 95 | 2 dakika | 1 |
| Denaturation | 95 | 10 saniye | 40 |
| Anneling | 56,6 | 10 saniye | 40 |
| Extension | 72 | 10 saniye | 40 |
| Final Extension | 72 | 1 dakika | 1 |

3.3. Primer ve Prob Dizaynı

Bakteriyel patojenler' in (*Cmm*, *Xav*) Real-Time PCR ile tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek için primer ve prob lar bu tez çalışması kapsamında geliştirilmiştir. Bu amaçla *Cmm*' ye ait ve patojenisiteden sorumlu 843 bp' lik *pat-1* gen dizisinin tamamı (Çizelge 3.5), *Xav* için ise hipersensitif reaksiyon ve patojenisiteden sorumlu *hrp* gen salkımında yer alan 2601 bp' lik *hrp B* gen dizisinin tamamı kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Primer ve prob ların belirlenmesinde insan gen transkriptlerinin RT-PCR ile belirlenmesi için oluşturulan "Universal Probe Library" (Roche Applied Science) ve LNA (Locked Nucleic Acid) sistemi kullanılmıştır (Petersen vd 2003).

Bu çalışmada kullanılan prob lar (LNA prob), bugün Real-Time PCR sistemleri için sıklıkla kullanılan 25-30 nükleotidlik uzun prob lardan farklılık göstermektedir. LNA prob lar 8-9 nükleotid uzunluğunda fakat sahip olduğu son teknolojik özellikler nedeniyle uzun dizilere sahip prob lar kadar güvenilir ve hassas sonuçlar elde etmektedir. Bu çalışmada kullanılan prob lar için reporter boya Flourescin (FAM), Quencher boya ise TAMRA' dır.

Çizelge 3.5. Real-Time PCR' da *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in tespiti için kullanılan *pat-1** geni dizisi

| | | | | | | |
|-------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 55321 | GGCTTGATC | TGTGGAGAGT | GCACGCTCGT | CGCCTGTTCC | GGGCGCTACT | ATGCAGTTCA |
| 55381 | TGTCGCGCAT | AAACAGGATA | TTGTTTCGTCG | CTGTAGTCAG | TCTTCTCAGC | GTTCTCGGTT |
| 55441 | GCTGTGTCGC | CGCCGCACCA | GCCCAGGCTG | TAGACCGTAT | AGCCCGTGTT | TCGTTGCCTG |
| 55501 | TACGGGCGGG | TACTCATCTC | ATCTTCAGCG | ACAGTCAAGG | TCCTGCTCGT | TCGGCGGACT |
| 55561 | ACGACTGCAC | GGCTGGGGCT | GTGCTGACGG | GGTCGGGGAT | CCTCTCGCGA | ATCAGCCCAT |
| 55621 | ATCAA CGTGC | TGTCCGATAT | GTCGTTACCG | CGAAGCATTG | CGGCGGTCGT | GGTGCGCATG |
| 55681 | TGCGCGTCGG | TGACGTGCAA | GTCGGCTCGG | TCATTTGGGA | ATCGTCAGAC | GCCGATCTCT |
| 55741 | CGATTGTCCG | GATCGAGCCC | TTGCAGACGA | CCAGAAGAAG | TTGTTATCCG | ACTTCGGCCG |
| 55801 | GCATACGCTG | TACTCTCGTC | AATGACTACG | AGCCTCGGGC | TAGCGGTGAG | GTCTTCGGCG |
| 55861 | CAAGGAACCG | ATCAGGCCAG | GAGTCATCCG | TGCAGGTAGC | CGGAACCAAA | GTCCCGGCTG |
| 55921 | ATCGAGAGAT | TTTCTGCACT | AGCGGGGCAA | TAACCGGAAT | TCTGTGTAAT | TGGGTATCAG |
| 55981 | CTCCACCGCC | TCGAGGGCTG | GAAATAGGAA | GTCACCAAGT | CGTAGCGGAG | ACCTTTTCAG |
| 56041 | CTGCGACGAG | GCAAGGGGAC | TCGGGGGGGC | CCGTTGTCAG | CAGGGACATG | AAAATCATCG |
| 56101 | GTGTAATATG | CGACGGTGGG | TTGCCAGGGT | CTGGAGACGA | TACCTATATG | AGTACCTTC |

Çizelge 3.5' in devamı

| | | | | | | |
|-------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 56161 | CGATTTCCGGT | GCTTTTCCGC | GAGCAACCGT | ATTACATATT | AGCGACCTCC | TGACG CGCGC |
| 56221 | CGCGGCTCCG | CGTGATCGCT | GCCGAGGTGA | TGACCTCGCT | CGTGGAGCAT | TGACCAGGCG |
| 56281 | AGGACACGGA | GATCCTCTGG | GCGGTAATAG | GTCTCAGGAG | TTCTGGGACA | GGGGTGTATG |
| 56341 | GGCAGCGCAT | GACGACGTGC | CGCCCCGAAG | ACGACGGTGA | AGTCGAGCAT | TTTTAATCGG |

* *pat-1* geni (NCBI Accession Nimer : NC_009479 843bp)

* Kırmızı renkle işaretli kısımlar bu çalışmada *pat-1* geni kullanılarak geliştirilen *HBCMML* ve *HBCMRR* primerlerini, mavi renkle işaretli kısım ise **probu** göstermektedir.

Çizelge 3.6. Real-Time PCR' da *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın tespiti için kullanılan *hrp B** geni dizisi

| | | | | | | |
|------|-------------------|--------------------|-------------------|------------|-------------------|--------------------|
| 1 | GTGCGCTGTA | TCGTGGTGAG | CCGGAACGCA | GCGGGCTGCC | GGCAGTTGGC | CACAGGTCTC |
| 61 | TGTCGCACTC | TAT GCAGCAG | AAACGTATCC | TTCCCGCGCA | TGACCGACCC | TGCTTTTC CG |
| 121 | ATCTCCCCGT | TGTTGCCGCA | AATTCGCGAC | AGTCTCGCTG | CGCATCCGCG | GCTGGTGCTG |
| 181 | GAAGCCCCGC | CCGGCGCCGG | CAAGACCACC | CAGGTGCCGC | TGGCGTTGCT | GGACGCGCCG |
| 241 | TGGCTGGCCG | GCCGCAGAAT | CGTGATGCTC | GAACCGCGCC | GCGTGGCGGC | CCGCAGCGCG |
| 301 | GCGCAGTTCA | TGGCGCGCCA | GCTCGGCGAG | CCGGTCCGGG | AAACGGTGGG | GTACCCGATC |
| 361 | CGCTTCGAGA | ACAAGACCTC | CGCGCGCACC | CGCATCGAAG | TCGTCACCGA | AGGCATCCTG |
| 421 | ACCCGGCTGA | TCCAGGACGA | CCCCATGCTG | GAAAGCGTCG | GCGCGCTGCT | GTTCGACGAA |
| 481 | TTCCACGAAC | GCCATCTGGC | CGGCGACCTG | GGTCTGGCGC | TGGCGCTGGA | TGTGCAGGCG |
| 541 | CAGGTGCGCG | ATGACCTACG | CATCGTGCGG | ATGTCGGCCA | CGCTCGATGG | CGAAGCGCTG |
| 601 | GCCGGCTTTC | TGGAAGCGCC | GCGGCTGAGC | AGTGCCGGGC | GCAGTTTCCC | GGTGGAGATT |
| 661 | GCGCACTTTC | CGGCGCGCCG | CGACGAAGCG | CTGGAGCCGC | AGACGCGGCG | CGCGGTGGAG |
| 721 | CACGCGTTGT | CCACGCATCC | CGGCGACGTG | CTGGTGTTTT | TGCCCGGCCA | GCGCGAGATC |
| 781 | GCGCGGGTGC | ATCGCGCACT | GCAGGATGCG | CTGGATCCGG | CGGTGCAGGT | GCTGCCGCTG |
| 841 | CACGGCGAGC | TGTCGGTGGA | GGCGCAAAGC | CAGGTAAGTC | AGCCCGACCC | GCAAGCGCGC |
| 901 | CGCCGCGTGG | TGCTGGCCAC | CAACGTGGCC | GAATCTTCGG | TCACCTTGCC | CGGCGTGCGC |
| 961 | GTAGTGATCG | ACAGCGGGCT | GGCGCGGAG | CCGCATTACG | ACCCCAACAG | CGGGTTTTTCG |
| 1021 | CGGCTGGACG | TGGCCGCCAT | TGCGCAGGCT | TCGGCCGAAC | AGCGCGCCGG | CCGCGCCGGG |
| 1081 | CGTGTCGCCA | GCGGCTGGGC | CTACCGGCTG | TGGCCGAGT | CGCAACGGCT | GGAACCGCAG |
| 1141 | CGCCGTGCCG | AGATCACCCA | GGTGGAAGT | GCCGGCCTGG | CGCTGGAAGT | GGCCGCTGG |
| 1201 | GGCAGCAGCG | CGCTGCGCTT | TGTCGATGCG | CCGCCAGTG | GCGCACTGGC | CGCCGCGCGC |
| 1261 | GAGCTGCTGC | GGCGGCTGGG | CGCGCTCACC | GCAAGCGGCG | GCATCACCCAC | GCTCGGCGCG |
| 1321 | CGCATGCTCG | CGCTGGGCAC | GCATCCACGC | CTGGCGGCGA | TGCTGGCGCA | GGCCGGCGAT |
| 1381 | GCGCCGCGTG | TGGCGCTGGC | CTGCGACCTG | GCCGCGTTGC | TGGAAGCGCG | CGATCCGCTG |
| 1441 | CGCCAGGGTG | GCGATGGGCT | GGCCGCGCGT | TGGCGGGCGC | TGGCGGCATT | TCGTACAGGC |
| 1501 | CGCAGCGCGG | CCGACGCCGA | TCGTGGCGGC | CTGGCTGCCA | TCGACAGCGC | CGCCAAACAA |

Çizelge 3.6' nın devamı

| | | | | | | |
|------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|
| 1561 | TGGCGGCGCC | GGCTGCGCTG | CGACAGCGCC | CCGCCATCCA | GCGTGGAGGC | GCACGCGCTC |
| 1621 | GGCGACCTGC | TGTCGCACGC | ATTTCCCGAT | CGCATCGCCG | CACGCCACCC | GGCCGACCCG |
| 1681 | CTGCGCTACC | TGCTCGCCAA | CGGCCGAGC | GCGCGCCTGT | TCGACCATAG | CGATCTGCGC |
| 1741 | GGCGAACCGT | GGCTGGTGGC | CAGCGAACTG | CGCTATGAAG | CCAAGGATGC | GCTGTTGCTG |
| 1801 | CGCGCCGCGC | CGGTGGATGA | AGCCTACCTG | CGTCGCAGCC | TGCCTGAGCG | CTTCGTGCAG |
| 1861 | CAGGACGTGG | TGCAGTGGGA | CGCGGACAAA | CGGGCCCTGG | TCGCCC GCCG | CCAATCCAGC |
| 1921 | TTCGACCGCA | TCGTGCTCGA | CAGCCGCCCG | GCCGGCCGCG | TCGACCCGGC | ACACGCCGCA |
| 1981 | GCCGCGCTCA | CCGACGCAGT | GCGTCAACTC | GGCCTGGACG | CCCTGCCTTG | GACAGAAAAC |
| 2041 | CTGCAGCAGT | GGCGCGCCCG | CGTGCAGTCG | CTGCAGAGAT | GGATGCCCGA | GCTGGCGCTG |
| 2101 | CCC GATCTCT | CCGATGCCAC | ACTGCTGGAG | ACGCTGGACA | CCTGGCTACG | CCCGCCCTTC |
| 2161 | GCCGGCAAGA | CCCGCTGGA | CGCGCTGGAT | GAGGCCAGCC | TGGGGCAAGC | ACTGAAGAGC |
| 2221 | GCGCTGCCCT | GGGAGCGCCG | CCAGTGGATC | GACCGCCATG | CGCCACCCG | CATCAGCGTG |
| 2281 | CCCTCCGGCA | TGGAGCGCCC | CATCAGCTAT | GCCCTCGACC | ACGCCGGCCA | ACCGTACCG |
| 2341 | CCGGTGCTGG | CGGTCAA ACT | GCAGGAACTG | TTCGGCCTGG | CCGAAACCC | ACGCATCGCC |
| 2401 | GACGGCCGTA | TCCGTTGAC | CTTGACCTG | CTGTGCCCCG | GCGGGCGGCC | GTTGCAGGTG |
| 2461 | ACCCAGGACT | TGAAGAGTTT | CTGGGCGAAT | ACGTATCCGG | ACGTTAAAAA | AGAGATGAAG |
| 2521 | GGGAGGTATC | CGAGGCATCC | GTGGCCGGAC | GATCCCTGGA | CAGCTGCCGC | AACCCACAGA |
| 2581 | GCAAAACCAC | GCGGCACCTG | A | | | |

* *hrp B* (NCBI Accession Number : NC_007508 2601bp)

* Kırmızı renkle işaretli kısımlar bu çalışmada *hrpB* geni kullanılarak geliştirilen *HBXAVL* ve *HBXAVR* primerlerini, mavi renkle işaretli kısım ise **probu** göstermektedir

3.4. Primer ve Probu Saf DNA' dan Hassasiyetinin Belirlenmesi

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük DNA miktarının tespiti için saf DNA' dan hassasiyet çalışması yapılmıştır. Çalışma için Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalına ait kültür koleksiyonundan faydalanılmıştır. Bu amaçla öncelikle *Cmm* ve *Xav*' nin DNA' ları, Thermo FastPrep FP 120A-230 multi tüp homozenizatör ve Qubiogene/Bio 101 Fast DNA moleküler izolasyon Kit' ine göre izole edilerek DNA miktarları hassas spektrofotometrelerle (Thermo Nanodrop ND-1000 ve Qubit (Qubiogene, Amerika)) gerçekleştirilmiştir. Çalışmada tespit edilebilecek en düşük DNA miktarı hedeflendiğinden pikogram (pg) düzeyine kadar seyreltmeler Qubit (Qubiogene, Amerika) ile yapılmıştır.

Real-Time PCR yönteminin hassasiyetinin belirlenmesinde 50 pg, 40 pg, 30 pg, 20 pg ve 10 pg DNA seviyeleri test edilmiştir. Elde edilen her bir seviyedeki DNA' lardan 2 şer µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR işleminde kullanılan master mix; toplam volume 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon yada template DNA, Forward ve Reverse primerlerin herbirinden 1,2 µl, 0,3 µl Taqman prob, 4,8 µl DNTP karışımı, 3 µl 10X Buffer, 7,2 µl MgCl₂, 0,36 µl Taq polimerase ve 9,54 µl Milli Q (MQ) su şeklindedir. Kullanılan Real-Time PCR programı 95 °C' de 1 döngü (2 dakika), 95 °C' de 40 döngü (10 sn.), 56,6 °C' de 40 döngü (10 sn.), 72 °C' de 40 döngü (10 sn.) ve 72 °C' de 1 döngü (1 dakika) olarak belirlenmiştir.

3.5. Direkt Bakteriyel Hücreden Primer ve Probu Hassasiyetinin Belirlenmesi

Bakteriyel patojenler olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti için, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji laboratuvarındaki kültür koleksiyonundan yararlanılmıştır.

Patojenler kültür koleksiyonundan alınıp kendileri için seçici besi ortamlarında geliştirilmiş, gelişen kolonilerden her bir patojen için ayrı ayrı olmak koşulu ile yoğun bir stok çözelti oluşturulmuştur. Oluşturulan stok çözeltilerden 10⁻¹' den 10⁻⁹' a kadar 10' un katları şeklinde seyreltmeler 3 tekerrürlü (paralel) olarak gerçekleştirilmiş ve bunlar ayrı ayrı tüplere konulmuştur. Elde edilen her bir solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır. PCR işleminde kullanılan master mix; toplam volume 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon yada template DNA, Forward ve Reverse primerlerin herbirinden 1,2 µl, 0,3 µl Taqman prob, 4,8 µl DNTP karışımı, 3 µl 10X Buffer, 7,2 µl MgCl₂, 0,36 µl Taq polimerase ve 9,54 µl Milli Q (MQ) su şeklindedir. Kullanılan Real-Time PCR programı 95 °C' de 1 döngü (2 dakika), 95 °C' de 40 döngü (10 sn.), 56,6 °C' de 40

döngü (10 sn.), 72 °C' de 40 döngü (10 sn.) ve 72 °C' de 1 döngü (1 dakika) olarak belirlenmiştir.

Bu aşamada Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti hedeflendiğinden 10^{-1} ' den 10^{-9} ' a kadar seyreltilen ve ayrı tüplere alınan süspansiyonlardan 2 µl alınıp 50 µl deiyonize su içerisinde karıştırılmış ve NA (Nutrient Agar) besi ortamlarına steril cam baget ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra besi ortamlarında gelişen bakteri sayılarını tespit etmek için petriler 3 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

3.6. Primer ve Proben Seçiciliğinin Belirlenmesi

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* için geliştirilen primer ve problemlerin bu hastalık etmenleri için seçiciliğini (spesifitesini) belirlemek için farklı bakteri cinsleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Kültür koleksiyonundan geliştirilen bakteriyel strainlere ait tek koloniler, her birinde 100 µl steril deiyonize su bulunan mikrofüj tüplerine alınmış, bu tüplerdeki sıvılardan 2 şer µl alınıp Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR işleminde kullanılan master mix; toplam volume 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon yada template DNA, Forward ve Reverse primerlerin herbirinden 1,2 µl, 0,3 µl Taqman prob, 4,8 µl DNTP karışımı, 3 µl 10X Buffer, 7,2 µl MgCl₂, 0,36 µl Taq polimerase ve 9,54 µl Milli Q (MQ) su şeklindedir. Kullanılan Real-Time PCR programı 95 °C' de 1 döngü (2 dakika), 95 °C' de 40 döngü (10 sn.), 56,6 °C' de 40 döngü (10 sn.), 72 °C' de 40 döngü (10 sn.) ve 72 °C' de 1 döngü (1 dakika) olarak belirlenmiştir.

3.7. Bakteriyel Patojenlerin (*Cmm*, *Xav*) Tohumdan Tespiti

Bakteriyel patojenler *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tohumdan tanıları için *in vitro* koşullarda yapay olarak bulaştırılacak 1000 adet domates tohumu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tohumlar steril bir petri kabı içerisinde 1×10^8 cfu/ml taze kültürden hazırlanan bakteriyel süspansiyondan 1 ml alınarak muamele edilmiştir. Bu işlem sonrasında tohumlar, laminar flow içerisinde 24 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. 24 saatlik periyottan sonra 200 adet bulaşık domates tohumu alınmış ve üzerine 30 ml PE Buffer (Fosfat Tamponu) ilave edilip 8 saat boyunca 200 rpm hızındaki çalkalayıcıda sıvı ve tohumların karışması sağlanmıştır. Bu işlemden sonra oluşan süspansiyondan 10 ml alınıp 4100 g' de 20 dk. ve 4 °C' de santrifüjlenerek, oluşan pelet PE Buffer içerisinde iyice çözdürülmüş ve stok bir çözelti oluşturulmuştur. Stok çözeltilerden 10^{-1} ' den 10^{-9} ' a kadar 10' un katları şeklinde seyreltmeler gerçekleştirilerek bunlar ayrı ayrı tüplere konulmuştur. Her bir seyreltme örneği 3 tekerrürlü (paralel) olarak test edilmiştir. Elde edilen her bir solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır. Real-Time PCR işleminde kullanılan master mix; toplam volume 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon yada template DNA, Forward ve Reverse primerlerin her birinden 1,2 µl, 0,3 µl Taqman prob, 4,8 µl DNTP karışımı, 3 µl 10X Buffer, 7,2 µl MgCl₂, 0,36 µl Taq polimerase ve 9,54 µl Milli Q (MQ) su şeklindedir. Kullanılan Real-Time PCR programı 95 °C' de 1 döngü (2 dakika), 95 °C' de 40 döngü (10 sn.), 56,6 °C' de 40 döngü (10 sn.), 72 °C' de 40 döngü (10 sn.) ve 72 °C' de 1 döngü (1 dakika) olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları hesaplanarak standart sapmaları belirlenmiştir.

3.8. Real-Time Bio-PCR

Real-Time PCR ile tohum üzerinde var olan ölü bakterilerinde tespiti mümkün olabildiği için bu çalışmada tohum üzerinde canlı olarak bulunan patojenlerin tespiti için Real-Time Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla öncelikle, en düşük bakteri sayısının tohumdan tespitinde kullanıldığı gibi stok bir bakteriyel süspansiyon hazırlanmış ve bu solusyon 10^{-1} ' den 10^{-3} ' a kadar 10^1 ' un katları şeklinde seyreltilmiştir. Tüplerdeki örneklerden 2 şer µl alınıp 50 µl deiyonize su içerisinde karıştırılarak NSA (Nutrient Sucrose Agar) besi ortamlarına cam baget ile inokule edilmiş ve 8 saat süre için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petrilere 1 ml steril deiyonize su eklenerek canlı olan bakterilerin suya geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen stok bakteriyel süspansiyon 10^{-1} ' den 10^{-3} ' e kadar seyreltilmiştir. Her seyreltmeden 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR işleminde kullanılan master mix; toplam volume 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon yada template DNA, Forward ve Reverse primerlerin herbirinden 1,2 µl, 0,3 µl Taqman prob, 4,8 µl DNTP karışımı, 3 µl 10X Buffer, 7,2 µl MgCl₂, 0,36 µl Taq polimerase ve 9,54 µl Milli Q (MQ) su şeklindedir. Kullanılan Real-Time PCR programı 95 °C' de 1 döngü (2 dakika), 95 °C' de 40 döngü (10 sn.), 56,6 °C' de 40 döngü (10 sn.), 72 °C' de 40 döngü (10 sn.) ve 72 °C' de 1 döngü (1 dakika) olarak belirlenmiştir.

3.9. Hastalıklı Bitki Dokularından Bakteriyel Patojenlerin (*Cmm*, *Xav*) Tespiti

Hastalıklı bitki dokularından *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın doğrudan tespiti için bu tez çalışması kapsamında Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı' na ait serada yetiştirilen domates ve biber fidelerine *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis, 1×10^8 cfu/ml konsantrasyon 1ml' lik aşı iğnesi (insülin iğnesi) ile inokule edilerek hastalık etmenleri için karakteristik simptomların oluşması için 23-28 °C sıcaklık ve % 60-70 nisemi nem içeren ortamda 3 hafta süre ile bekletilmiştir. Bakteriyel patojenler (*Cmm*, *Xav*) için karakteristik simptom gösteren dokular (tek nekroz) steril bir bistüri yardımı ile kesilerek santrifüj tüplerine konulmuştur. Tüplerdeki bitki dokuları 14000 g' de 3 dk süre ile santrifüj edilmiş ve üzerine 30 µl MQ su ilave edilerek 10^{-2} oranında süspansiyonlar hazırlanmıştır. Oluşturulan süspansiyonlardan alınan 2 µl' den Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol sadece steril su injekte edilen sağlıklı bitki yaprağından alınan dokulardan yararlanılmıştır. Real-Time PCR işleminde kullanılan master mix; toplam volume 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon yada template DNA, Forward ve Reverse primerlerin herbirinden 1,2 µl, 0,3 µl Taqman prob, 4,8 µl DNTP karışımı, 3 µl 10X Buffer, 7,2 µl MgCl₂, 0,36 µl Taq polimerase ve 9,54 µl Milli Q (MQ) su şeklindedir. Kullanılan Real-Time PCR programı 95 °C' de 1 döngü (2 dakika), 95 °C' de 40 döngü (10 sn.), 56,6 °C' de 40 döngü (10 sn.), 72 °C' de 40 döngü (10 sn.) ve 72 °C' de 1 döngü (1 dakika) olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in Real-Time PCR ile Tanısı

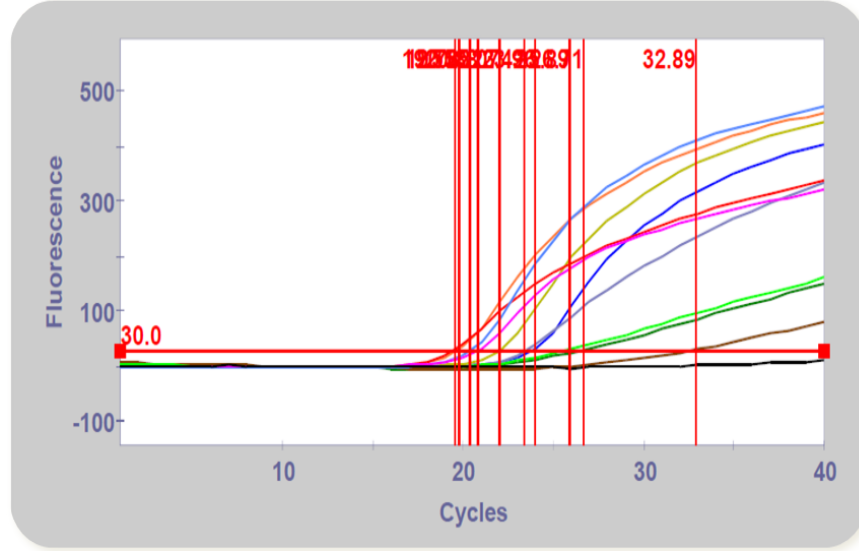
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*' in Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için Akdeniz Ünivesitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı' na ait kültür koleksiyonunda yer alan ve farklılıkları Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile belirlenmiş (Basım 2007) yerli ve yabancı *Cmm* strainleri kullanılmıştır (Şekil 4.1 - 4.2).

Çalışmada *Cmm*' nin tanısında kullanılan Real-Time PCR yönteminin doğruluğunu ispatlamak ve Real-Time PCR ile tek bir fragmentin elde edildiğini göstermek amacıyla Syber Green ile karşılaştırılmalı Thermal Melting (Erime Eğrisi) eğrisi elde edilmiştir (Şekil. 4.3).

4.2. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın Real-Time PCR ile Tanısı

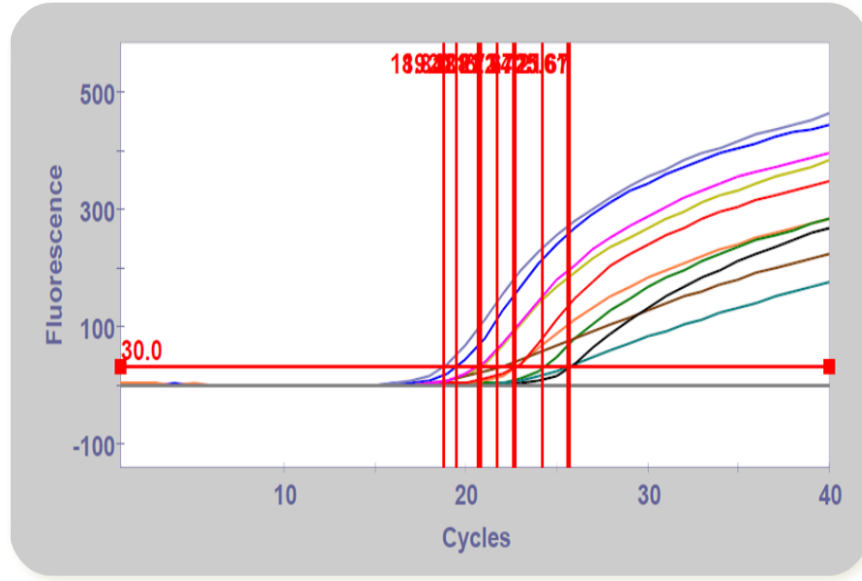
Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria*' nın Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için Akdeniz Ünivesitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı' na ait kültür koleksiyonunda yer alan yerli ve yabancı *Xav* strainleri kullanılmıştır (Şekil 4.4).

Çalışmada *Xav*' nin nin tanısında kullanılan Real-Time PCR yönteminin doğruluğunu ispatlamak ve Real-Time PCR ile tek bir fragmentin elde edildiğini göstermek amacıyla Syber Green ile karşılaştırılmalı Thermal Melting (Erime Eğrisi) eğrisi elde edilmiştir (Şekil. 4.5).



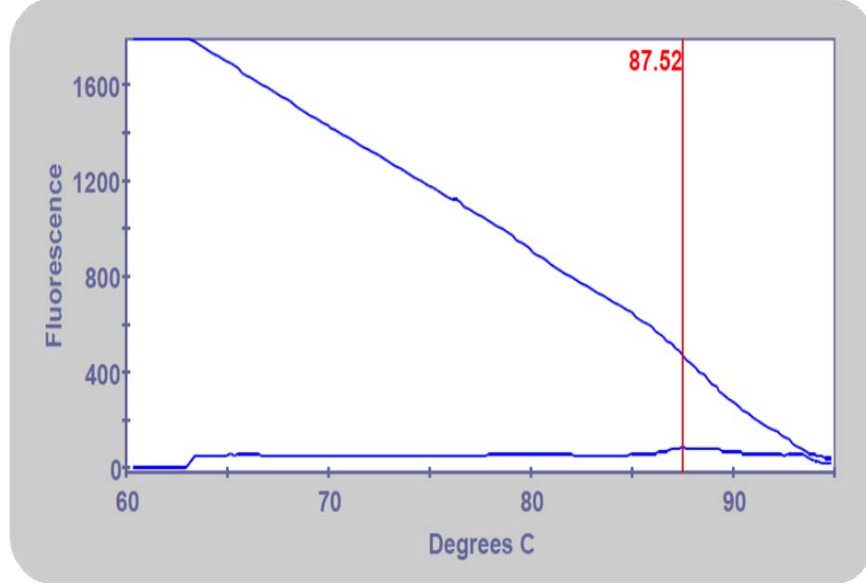
| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---------|--------------|--------|----------|
| A1 | cmm 5 | 23.96 | cmm |
| A2 | cmm 6 | 23.42 | cmm |
| A3 | cmm 10 | 19.76 | cmm |
| A4 | cmm 11 | 26.71 | cmm |
| A5 | cmm 16 | 22.07 | cmm |
| A6 | cmm 17 | 32.89 | cmm |
| A7 | cmm 18 | 19.55 | cmm |
| A8 | cmm 19 | 25.89 | cmm |
| A9 | cmm 22 | 20.35 | cmm |
| A11 | cmm 27 | 20.88 | cmm |
| A12 | Neg. Kontrol | 0.00 | cmm |

Şekil 4.1. Farklı *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti (I. Grup)



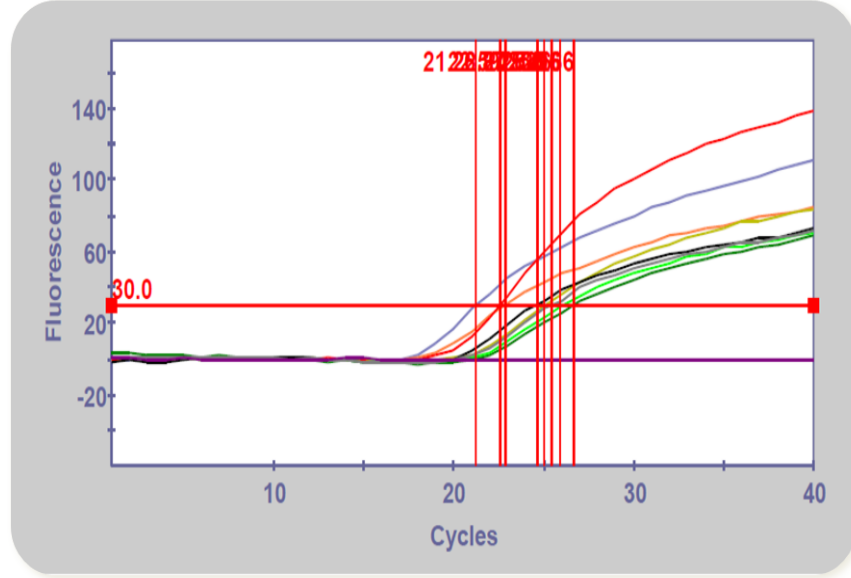
| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---------|--------------|--------|----------|
| A1 | cmm 26 | 19.48 | cmm |
| A2 | cmm 28 | 18.81 | cmm |
| A3 | cmm 29 | 22.70 | cmm |
| A4 | cmm 30 | 24.21 | cmm |
| A5 | cmm 31 | 20.81 | cmm |
| A6 | cmm 32 | 21.73 | cmm |
| A7 | cmm 33 | 22.67 | cmm |
| A10 | cmm 36 | 25.61 | cmm |
| A11 | cmm 37 | 20.60 | cmm |
| A12 | cmm 44 | 25.67 | cmm |
| A13 | Neg. Kontrol | 0.00 | cmm |

Şekil 4.2. Farklı *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti (II.Grup)



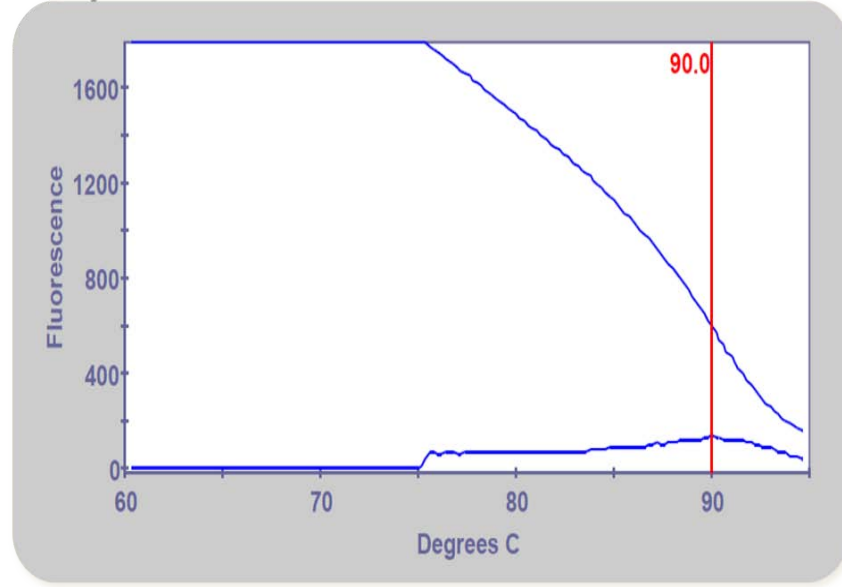
| Site ID | Sample ID | Melt Peak1 | Protocol |
|---------|-----------|------------|----------------|
| A1 | ■ cmm | 87.52 | cmm syber melt |

Şekil 4.3. Real-Time PCR ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için yapılan thermal melting eğrisi



| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|----------------|--------|
| A2 | xav 76-3 | 21.26 |
| A3 | xav 82-8 | 22.87 |
| A4 | xav 85-13 | 26.66 |
| A5 | xav 86-27 | 25.00 |
| A7 | xav 87-16 | 22.59 |
| A8 | xav 89-10 | 25.96 |
| A12 | Xav Kum. Macar | 24.62 |
| A13 | xav mavikent | 25.46 |
| A14 | Neg.K | 0.00 |

Şekil 4.4. Farklı *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti

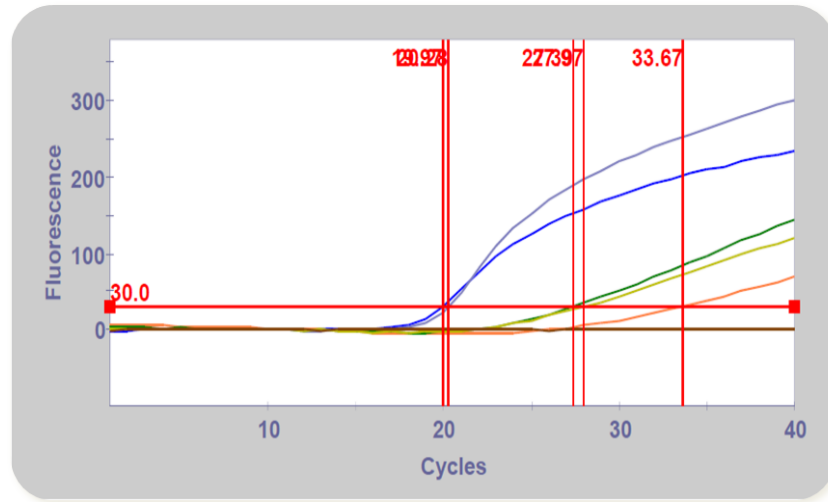


| Site ID | Sample ID | Melt Peak1 | Protocol |
|---------|---|------------|--------------------|
| A1 | ■ x.a.ves | 90.0 | x.a.ves syber melt |

Şekil 4.5. Real-Time PCR ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* için yapılan thermal melting grafiği

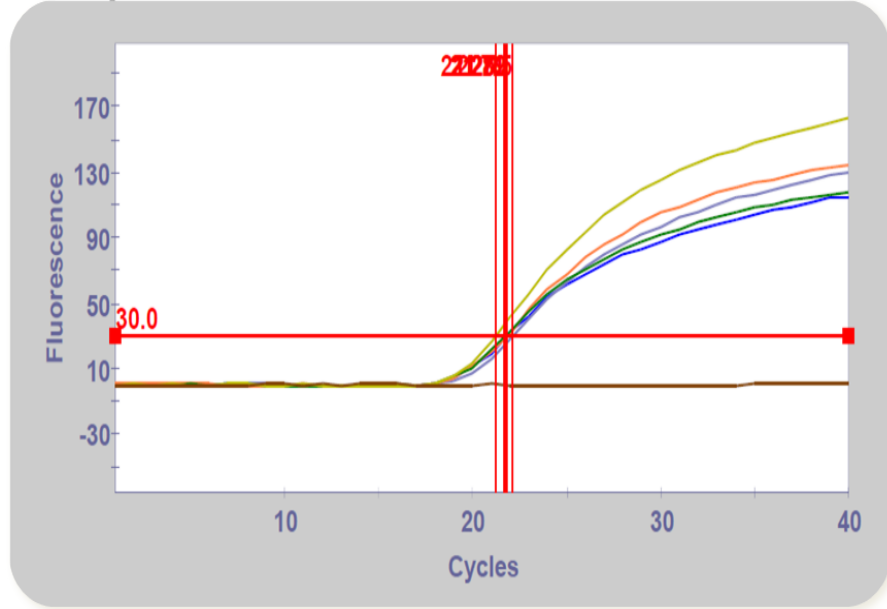
4.3. Primer ve Probu Saf DNA' dan Hassasiyeti

Real-Time PCR ile primer ve prob setinin genomik DNA' dan hassasiyetini belirlemek için *Cmm* ve *Xav*' den izole edilen saf genomik DNA' lar 50 picogram (pg), 40 pg, 30 pg, 20 pg ve 10 pg olacak şekilde seyreltilmiş, yapılan çalışma sonucunda her iki bakteriyel patojen için genomik DNA' dan tespit limiti 10 pg olarak bulunmuştur (Şekil 4.6 - Şekil 4.7)



| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|-------------|--------|
| A1 | cmm-50pg | 19.97 |
| A2 | cmm-40pg | 20.28 |
| A3 | cmm-30pg | 33.67 |
| A4 | cmm-20pg | 27.39 |
| A5 | cmm-10pg | 27.97 |
| A6 | Neg.Kontrol | 0.00 |

Şekil 4.6. Real-Time PCR ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in genomik DNA' dan hassasiyeti

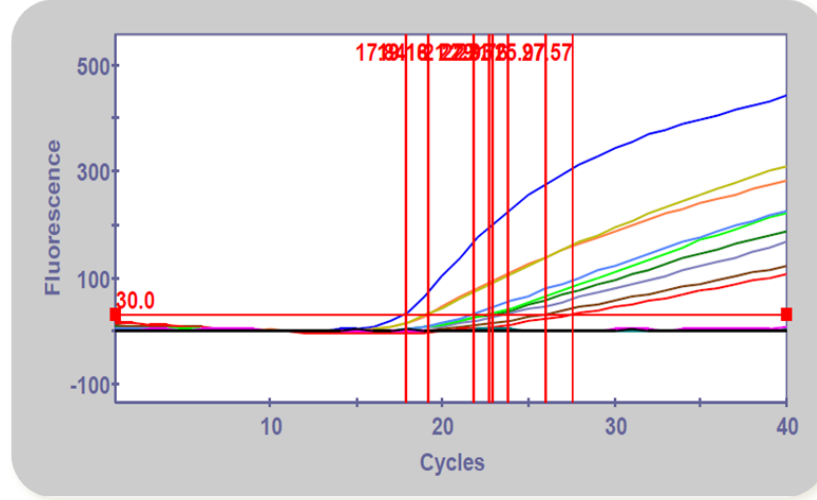


| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|-------------|--------|
| A1 | xav 50 pg | 21.79 |
| A2 | xav 40 pg | 22.15 |
| A3 | xav 30 pg | 21.82 |
| A4 | xav 20 pg | 21.71 |
| A5 | xav 10 pg | 21.25 |
| A6 | Neg.Kontrol | 0.00 |

Şekil 4.7. Real-Time PCR ile *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria*'nın genomik DNA'dan hassasiyeti

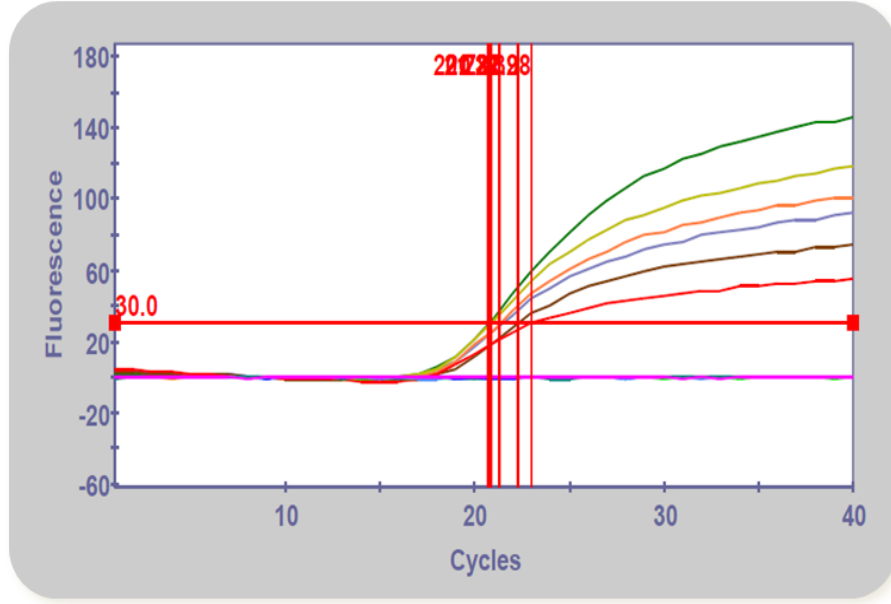
4.4. Direkt Bakteriden Primer ve Probu Hassasiyeti

Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında, Real-Time PCR ile *Cmm*'nin direkt bakteriyel hücreden tespit limiti *Cmm* için 1 cfu/ml olarak bulunurken (Şekil 4.8), *Xav* için tespit limiti 2 cfu/ml olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).



| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---------|--------------|--------|----------|
| A1 | cmm stok | 17.84 | cmm |
| A2 | cmm 10-1 | 23.76 | cmm |
| A3 | cmm 10-2 | 19.16 | cmm |
| A4 | cmm 10-3 | 22.93 | cmm |
| A5 | cmm 10-4 | 19.18 | cmm |
| A6 | cmm 10-5 | 25.97 | cmm |
| A7 | cmm 10-6 | 27.57 | cmm |
| A8 | cmm 10-7 | 22.71 | cmm |
| A9 | cmm 10-8 | 21.79 | cmm |
| A10 | cmm 10-9 | 0.00 | cmm |
| A11 | cmm 10-10 | 0.00 | cmm |
| A12 | Neg. Kontrol | 0.00 | cmm |

Şekil 4.8. Real-Time PCR ile *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*'in direkt bakteriyel hücreden tespiti



| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|-----------|--------|
| A1 | Xav stok | 0.00 |
| A2 | xav 10-1 | 21.37 |
| A3 | xav 10-2 | 21.31 |
| A4 | xav 10-3 | 20.72 |
| A5 | xav 10-4 | 20.80 |
| A6 | xav 10-5 | 22.32 |
| A7 | xav 10-6 | 22.98 |
| A8 | xav 10-7 | 0.00 |
| A9 | xav 10-8 | 0.00 |
| A10 | xav 10-9 | 0.00 |
| A11 | Neg.K | 0.00 |

Şekil 4.9. Real-Time PCR ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın direkt bakteriyel hücreden tespiti

Çizelge 4.1 Real-Time PCR ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* nin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

| Konsantrasyon | RT-PCR Sonucu (<i>Ct</i>) | | Bakteri sayıları (<i>cfu/ml</i>) | | | | | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------------------|------------|------------|-----------|-------------|------------|------------|------------|-----------|-------------|------------|
| | <i>Cmm</i> | <i>Xav</i> | <i>Cmm</i> | <i>Cmm</i> | <i>Cmm</i> | \bar{X} | <i>D</i> | <i>Xav</i> | <i>Xav</i> | <i>Xav</i> | \bar{X} | <i>d</i> | <i>P/N</i> |
| Stok | 20.54 | 0.00 ^a | * | * | * | | - | * | * | * | | - | + |
| 10 ⁻¹ | 28.74 | 19.28 | * | * | * | | - | * | * | * | | - | + |
| 10 ⁻² | 24.37 | 18.85 | 1189 | 1198 | 1196 | 1194 | 4,74 | 2086 | 2090 | 2082 | 2086 | 4,06 | + |
| 10 ⁻³ | 23.14 | 18.27 | 107 | 105 | 99 | 104 | 4,18 | 231 | 235 | 229 | 232 | 3,08 | + |
| 10 ⁻⁴ | 29.56 | 18.16 | 11 | 14 | 10 | 11,7 | 1,58 | 24 | 27 | 25 | 25 | 1,58 | + |
| 10 ⁻⁵ | 26.92 | 27.66 | 1 | 2 | 1 | 1,3 | 0,7 | 2 | 3 | 2 | 2,3 | 0,7 | + |
| 10 ⁻⁶ | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | | - | 0 | 0 | 0 | | - | - |
| 10 ⁻⁷ | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | | - | 0 | 0 | 0 | | - | - |
| 10 ⁻⁸ | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | | - | 0 | 0 | 0 | | - | - |
| Negatif Kontrol | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | | - | 0 | 0 | 0 | | - | - |

a : Stok çok yoğun olduğundan amplifikasyon gerçekleşmedi

d : Standart sapma

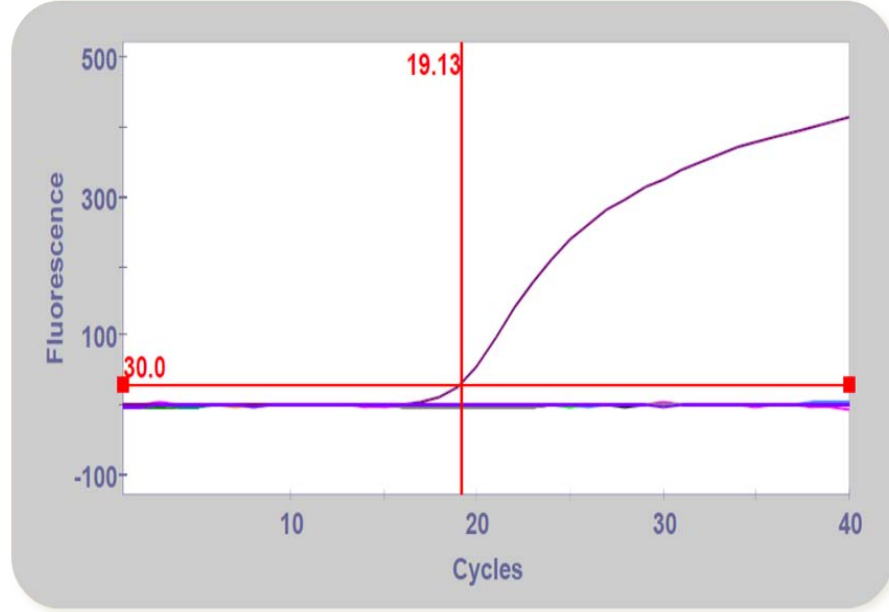
***** : Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

P/N : Pozitif/ Negatif

\bar{X} : Aritmetik ortalama

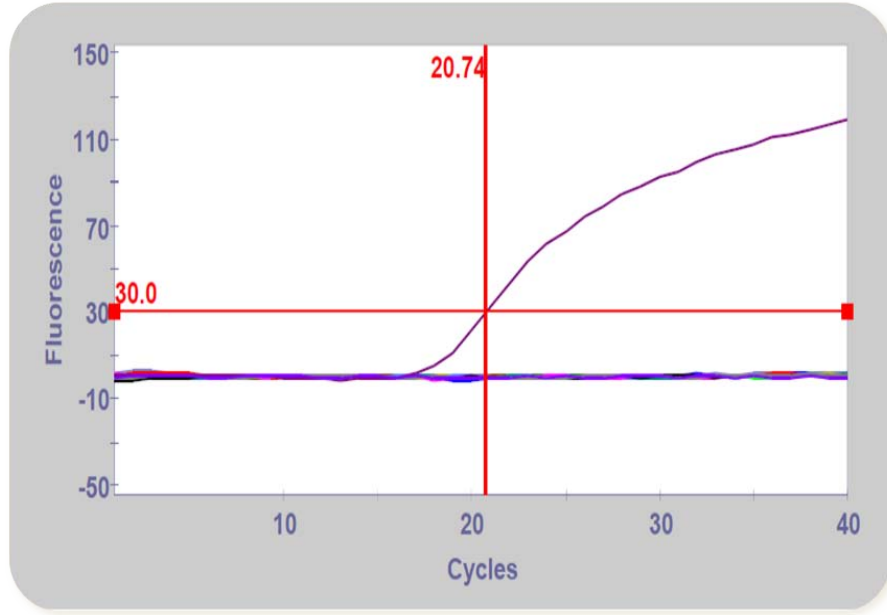
4.5. Primer ve Probuun Seçiciliği

Çalışmada ele alınan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanı ve tespitleri için tasarlanan primer ve probun seçiciliğini test etmek amacıyla herbir patojen için, Çizelge 3.3' te verilen farklı cins ve türlere ait bitki patojeni bakteriler ile Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR işlemi sonucunda hem *Cmm* hemde *Xav* için tasarlanan primer-prob setinin bu patojenler için spesifik olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 4.10 – 4.11).



| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|------------------------------|--------|
| A1 | Acidovorax citrulli | 0.00 |
| A2 | Agrobacterium vitis | 0.00 |
| A3 | Bacillus subtilis | 0.00 |
| A4 | Erwinia amylovora | 0.00 |
| A5 | E.caratovora pv. caratovora | 0.00 |
| A6 | X.axonopodis pv. vesicatoria | 0.00 |
| A7 | X.campestris pv. campestris | 0.00 |
| A8 | P.savastoni pv. savastonii | 0.00 |
| A9 | P.tomato pv.tomato | 0.00 |
| A10 | P.corrugata | 0.00 |
| A11 | P.phaseolicola | 0.00 |
| A12 | P.flourocences | 0.00 |
| A13 | Xylella fastidiosa | 0.00 |
| A14 | P.Kontrol (cmm) | 19.13 |
| A15 | Neg.Kontrol | 0.00 |

Şekil 4.10. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* için geliştirilen primer ve probun seçiciliği



| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|-------------------------------------|--------|
| A1 | Acidovorax citrulli | 0.00 |
| A2 | Agrobacterium vitis | 0.00 |
| A3 | Bacillus subtilis | 0.00 |
| A4 | C.michiganensis ssp.michiganensi | 0.00 |
| A5 | Erwinia amylovora | 0.00 |
| A6 | Erwinia caratovora pv.caratovora | 0.00 |
| A7 | X. campestris pv. campestris | 0.00 |
| A8 | P.savastanoi pv. savastanoi | 0.00 |
| A9 | P.tomato pv.tomato | 0.00 |
| A10 | P.corrugata | 0.00 |
| A11 | P.phaseolicola | 0.00 |
| A12 | P.flourocenc | 0.00 |
| A13 | Xylella fastidiosa | 0.00 |
| A14 | Pozitif Kont.(Xav) | 20.74 |
| A15 | Neg.Kontrol | 0.00 |

Şekil 4.11. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* için geliştirilen primer ve probun seçiciliği

4.6. Bakteriyel Patojenlerin (*Cmm*, *Xav*) Tohumdan Tespiti

Bu çalışmada geliştirilen Real-Time PCR yöntemi ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tohumdan tanı ve tespitleri gerçekleştirilerek primer-prob setinin hassasiyet limitleri belirlenmiştir (Şekil 4.12 – Şekil 4.13). Hassasiyet limitleri *Cmm* için 1 cfu/ml ve *Xav* için ise 2 cfu/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Real-Time PCR ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tohumdan tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

| Konsantrasyon | RT-PCR Sonucu (<i>Ct</i>) | | Bakteri sayıları (<i>cfu/ml</i>) | | | | | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|-------------|------------------------------------|----------|----------|-----------|-------------|------------|----------|----------|-----------|-------------|------------|
| | <i>Cmm</i> | <i>Xav</i> | <i>Cmm</i> | | | \bar{X} | <i>D</i> | <i>Xav</i> | | | \bar{X} | <i>d</i> | <i>P/N</i> |
| Stok | 17.84 | 0.00 | * | * | * | | - | * | * | * | | - | + |
| 10 ⁻¹ | 23.76 | 21.37 | * | * | * | | - | * | * | * | | - | + |
| 10 ⁻² | 19.16 | 21.31 | * | * | * | | - | * | * | * | | - | + |
| 10 ⁻³ | 22.93 | 20.72 | * | * | * | | - | 1268 | 1272 | 1275 | 1272 | 3,53 | + |
| 10 ⁻⁴ | 19.18 | 20.80 | * | * | * | | - | 129 | 133 | 131 | 131 | 2 | + |
| 10 ⁻⁵ | 25.97 | 22.32 | 1352 | 1348 | 1354 | 1351 | 3,08 | 13 | 14 | 12 | 13 | 1 | + |
| 10 ⁻⁶ | 27.57 | 22.98 | 111 | 109 | 112 | 111 | 1,58 | 2 | 1 | 2 | 1,6 | 0,7 | + |
| 10 ⁻⁷ | 22.71 | 0.00 | 12 | 11 | 12 | 11,7 | 0,7 | 0 | 0 | 0 | | - | + |
| 10 ⁻⁸ | 21.79 | 0.00 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 0 | 0 | 0 | | - | + |
| 10 ⁻⁹ | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | | - | 0 | 0 | 0 | | - | - |
| Negatif Kontrol | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | | - | 0 | 0 | 0 | | - | - |

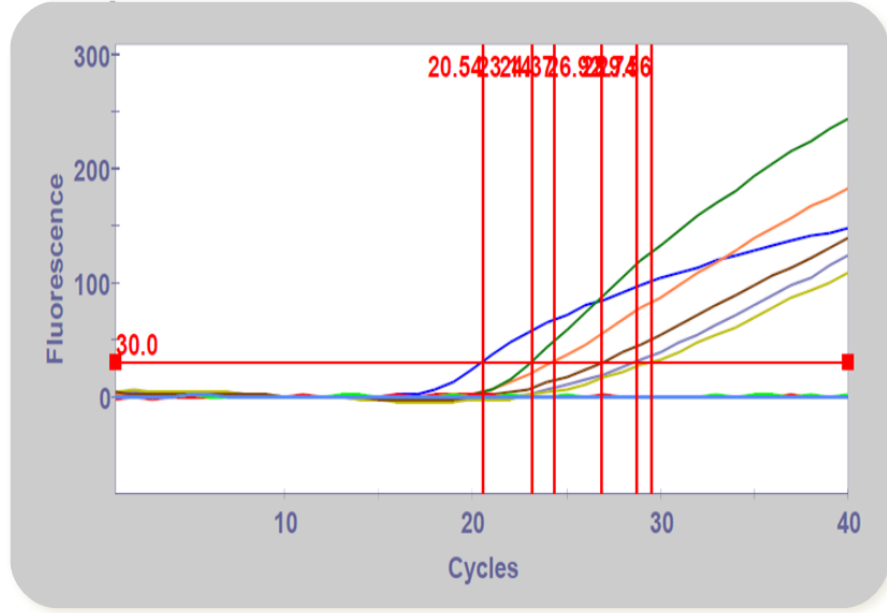
a : Stok çok yoğun olduğundan amplifikasyon gerçekleşmedi

d : Standart sapma

* : Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

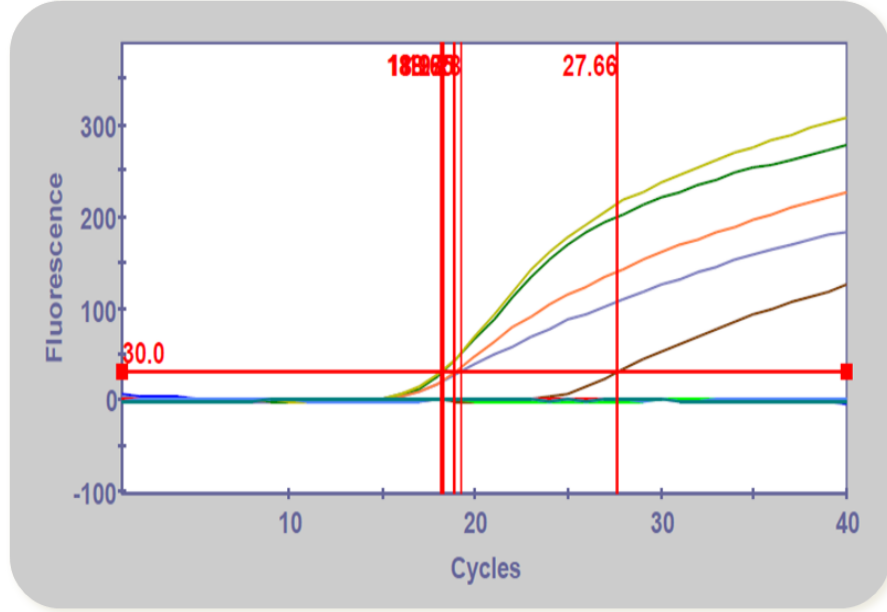
P/N : Pozitif/ Negatif

\bar{X} : Aritmetik ortalama



| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|-------------|--------|
| A1 | tohum stok | 20.54 |
| A2 | 10-1 | 28.74 |
| A3 | 10-2 | 24.37 |
| A4 | 10-3 | 23.14 |
| A5 | 10-4 | 29.56 |
| A6 | 10-5 | 26.92 |
| A7 | 10-6 | 0.00 |
| A8 | 10-7 | 0.00 |
| A9 | Neg.Kontrol | 0.00 |

Şekil 4.12. Real-Time PCR ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in tohumdan tanısı ve hassasiyeti

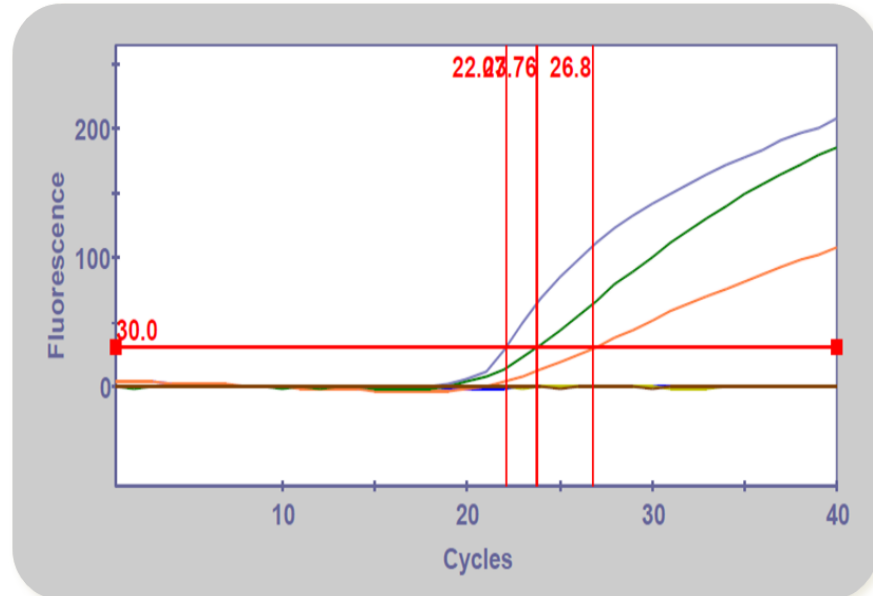


| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|-------------|--------|
| A1 | tohum stok | 0.00 |
| A2 | 10-1 | 19.28 |
| A3 | 10-2 | 18.85 |
| A4 | 10-3 | 18.27 |
| A5 | 10-4 | 18.16 |
| A6 | 10-5 | 27.66 |
| A7 | 10-6 | 0.00 |
| A8 | 10-7 | 0.00 |
| A9 | 10-8 | 0.00 |
| A10 | Neg.Kontrol | 0.00 |

Şekil 4.13. Real-Time PCR ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın tohumdan tanısı ve hassasiyeti

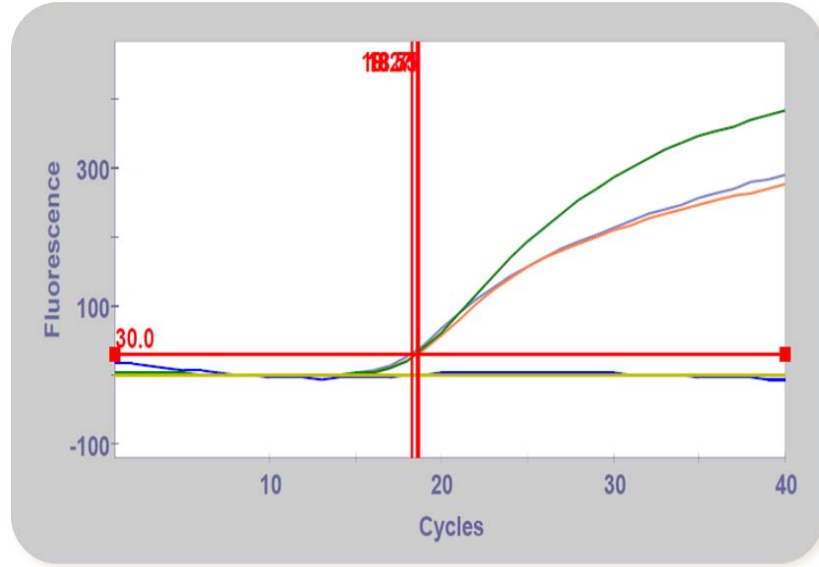
4.7. Real-Time Bio-PCR

Real-Time PCR yöntemi ile tohum üzerinde bulunan canlı ve ölü bakterilerin tespiti mümkün olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada yalnız canlı bakterilerin tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla Real-Time Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} seviyeleri ile yapılan Real-Time Bio-PCR işlemi sonucunda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, her üç seyreltme seviyesinde tespit edilmiştir (Şekil 4.14-Şekil 4.15).



| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|-------------|--------|
| A1 | Cmm stok | 0.00 |
| A2 | 10-1 | 22.07 |
| A3 | 10-2 | 26.80 |
| A4 | 10-3 | 23.76 |
| A5 | 10-4 | 0.00 |
| A6 | Neg.Kontrol | 0.00 |

Şekil 4.14. Real-Time Bio- PCR ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in tohumdan tespiti

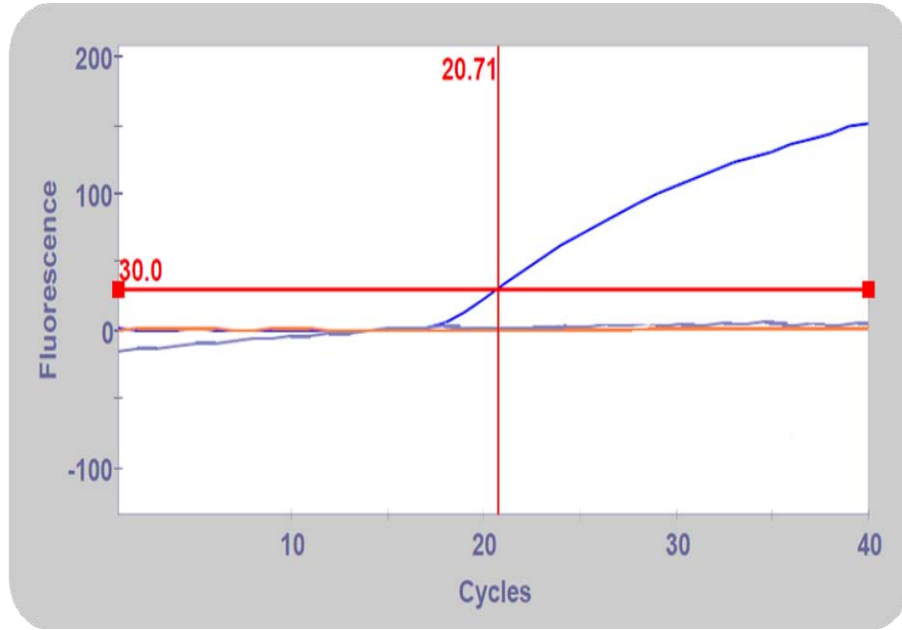


| Site ID | Sample ID | FAM Ct |
|---------|-------------|--------|
| A1 | xav stok | 0.00 |
| A2 | 10-1 | 18.27 |
| A3 | 10-2 | 18.71 |
| A4 | 10-3 | 18.55 |
| A5 | Neg.Kontrol | 0.00 |

Şekil 4.15. Real-Time Bio- PCR ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nin tohumdan tespiti

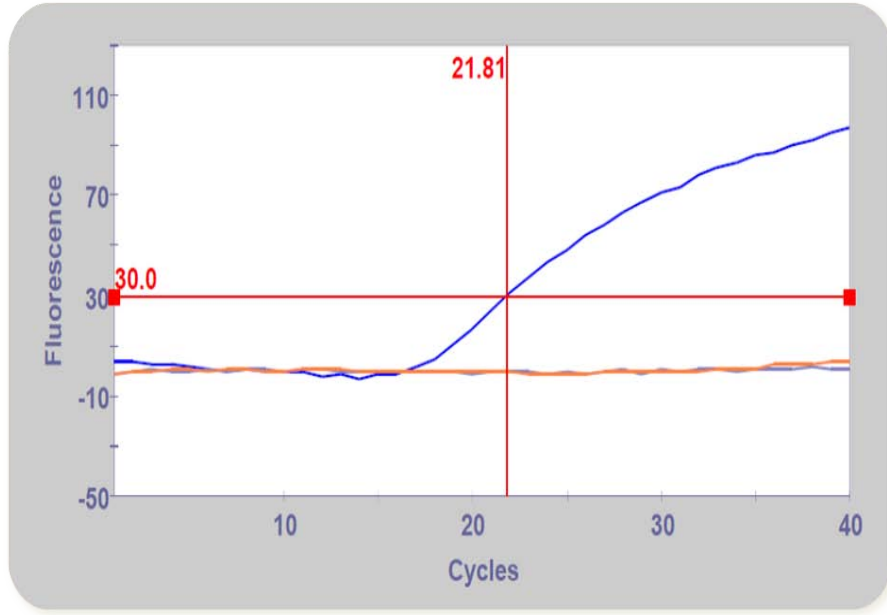
4.8. Hastalıklı Bitki Dokularından Bakteriyel Patojenlerin (*Cmm*, *Xav*) Tespiti

Domates ve Biber yetiştiriciliğinde ciddi oranda ürün ve kalite kayıplarına neden olan *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' nin hastalıklı bitki dokularından direkt tespiti içinde bu çalışmada Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiş, her iki patojenin tespiti oldukça kısa sürelerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.16 - Şekil 4.17 - Şekil 4.18).



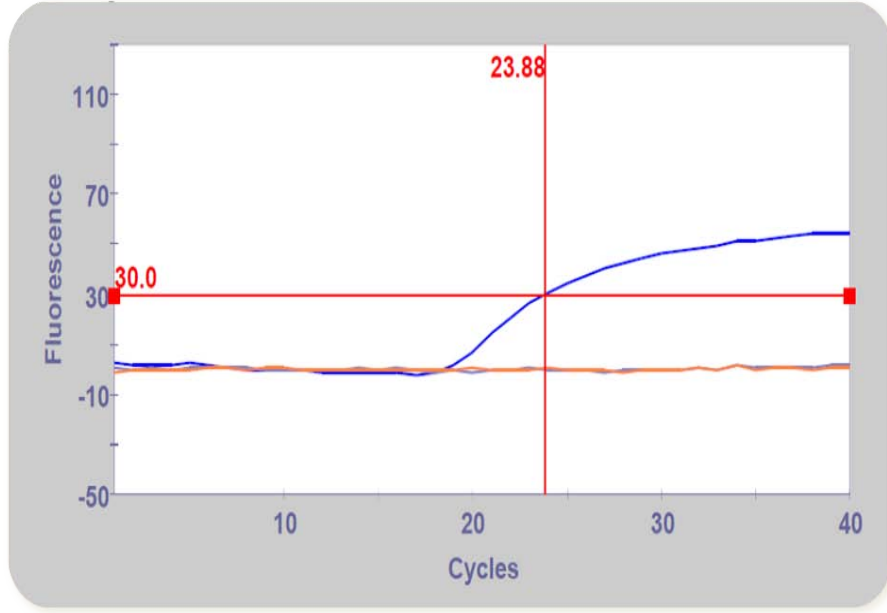
| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---------|-------------|--------|----------|
| A1 | Dom.Nekroz | 20.71 | cmm |
| A2 | Dom. DNA | 0.00 | cmm |
| A3 | Neg.Kontrol | 0.00 | cmm |

Şekil 4.16. Real-Time PCR ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in direkt domates nekrozundan tespiti



| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---------|-------------|--------|-----------------|
| A1 | Tek Nekroz | 21.81 | X.a.vesicoteria |
| A2 | Domates DNA | 0.00 | X.a.vesicoteria |
| A3 | Neg.Kontrol | 0.00 | X.a.vesicoteria |

Şekil 4.17. Real-Time PCR ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nin direkt domates nekrozundan tespiti



| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---------|----------------|--------|-----------------|
| A1 | ■ Biber Nekroz | 23.88 | X.a.vesicoteria |
| A2 | ■ Biber DNA | 0.00 | X.a.vesicoteria |
| A3 | ■ Neg.Kontrol | 0.00 | X.a.vesicoteria |

Şekil 4.18. Real-Time PCR ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın direkt biber nekrozundan tespiti

5. TARTIŞMA

Dünya' da ve Türkiye' de yetiştirilen sebze miktarları dikkate alındığında domates ve biber ilk sıralarda yer almaktadır. Örtü altı ve açık tarım alanlarında yetiştiriciliği yapılan domates ve biber, yaş olarak tüketildiği gibi birçok üründe ham madde ve salçalık olarakta kullanılmaktadır. Bu denli önemli olan domates ve biberin, üretimini etkileyen çok sayıda bakteriyel, viral ve fungal hastalık etmenleri mevcuttur. Bu etmenler gerek örtü altı tarımında gerekse açık tarla yetiştiriciliği yapılan alanlarda etkili olmakta, ciddi ürün ve kalite kayıplarına sebebiyet vermektedir. Kalite kayıpları nedeniyle ürünlerin pazar değerleri düşmekte ve ekonomik açıdan da kayıplar oluşmaktadır. Tarım alanlarında sebze yetiştiriciliğini etkileyen hastalık etmenleri arasında bakteriyel patojenler, hızlı çoğalma ve yayılabilme kabiliyetleriyle ortam değişkenlerine karşı gösterdikleri yüksek adaptasyon yetenekleri sebebiyle ayrı bir öneme sahiptir. Domates vejetasyon periyodu boyunca pekçok bakteriyel etmen tarafından saldırıya uğramaktadır. Bunlar arasında Domates Bakteriyel Benek etmeni *Pseudomonas tomato* pv. *tomato* (*Ptt*), Domates Bakteriyel Solgunluk ve Kanser etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ve Domates ve Biber Bakteriyel Yaprak Lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) ile Domates Öz nekrozu hastalık etmenlerinin neden olduğu kayıplar ciddi boyutlardadır. Bu etmenlerden *Ptt*, *Cmm* ve *Xav* tohum kökenli olup, tohumların ekiminden önce bu hastalık etmenlerinin erken teşhisleri, bu patojenlerin ortaya çıkardığı hastalıklarla mücadelenin başarısı açısından önem taşımaktadır.

Domates tohum kökenli bakteriyel patojenler ile mücadelenin başarısı için; kültürel önlemler, sertifikalı tohum kullanımı, kimyasal ve biyolojik tohum uygulamaları, yeşil aksam ilaçlamaları, toprak solarizasyonu ve dayanıklı çeşit kullanımını kapsayan entegre savaşım yöntemi önerilmektedir. Patojenler ile mücadele de entegre savaşım metodları yanında, hastalık etmenlerinin hızlı, güvenilir ve erken dönemde tanı ve tespitlerinin yapılması önemlidir. Günümüze kadar patojenlerin tanısı ve tespiti için pekçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında seçici ve yarı seçici besi ortamı kullanımı, çeşitli serolojik testler (ELISA,

Aglütinasyon testi vb.), yağ asidi profillerinin çıkarılması, çeşitli fiziksel ve biyokimyasal testler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction) yöntemleri yer almaktadır.

Organizmalar ile ilgili en kesin ve doğru bilgiler nükleik asitlerde yer almaktadır. Bu nedenle hastalık etmenlerinin tanı ve tespitleri için kullanılan diğer metodlara oranla nükleik asit temelli yöntemler daha güvenilir ve kesin sonuçlar vermektedir.

Nükleik asit temelli metotları kullanarak günümüze kadar *Cmm*' nin tanısı ve tespitine yönelik yapılan bazı çalışmalar mevcuttur. Dreier vd (1995) *C. michiganensis*' in alt türlerinin pCM1 plasmidi üzerinde yer alan ve endoselülaz enzimini kodlayan *cel A*' ya spesifik olarak geliştirdikleri DNA problrarı kullanılarak ayırt edilebileceğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca *Cmm*' ye özgü olan ve virülenslikten sorumlu *pat-1* genine spesifik primer kullanılarak PCR metoduyla virüレント izolatların saptanabileceğini belirtmişlerdir. *pat-1* geni kullanılarak *Cmm*' nin Klasik-PCR ile tanısı ve tespiti için Santos vd (1997) tarafından CMM3 (5' CCTC GTGAGTGCCGGAACGTATC 3') ve CMM4 (5' CCACGGTGGTTGATGCT CGCGAGAT 3') primer çifti, Louws vd (1998) tarafından ise CMM5 (5'GCGAATAAGCCCATATCAA 3') ve CMM6 (5' CGTCAGGAGGTTGCTAATA 3') primer çifti geliştirilmiştir.

Bakteriyel patojenlerin kesin tanı ve tespiti için son yıllarda yaygınlık gösteren ve nükleik asit temelli olan Real-Time PCR yönteminden faydalanılmaktadır. Klasik PCR yöntemi, PCR işleminden sonra çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jelde yürütülmesi ve ethidium bromide ile boyanıp ultraviöle (UV) ışık altında görüntüleme gibi bir takım yan işlemlere ve uzun süreye gereksinim duymaktadır. Bu yöntemde, kesin sonuçlar elde edilmesine rağmen iş gücü ve zaman kayıpları fazladır. Bu nedenle son yıllarda patojenlerin erken tanı ve tespitleri için Klasik-PCR yönteminde yapılan agaroz jelde yürütme ve UV ışık altında DNA fragmetlerinin görüntülenmesi gibi ek işlemlere ihtiyaç duymayan Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir.

Real-Time PCR (RT-PCR) yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesine dayanan ve oldukça kısa sürede sonuç veren bir PCR yöntemidir. Real-Time PCR yönteminde sonuçlar Klasik PCR yöntemlerine oranla oldukça kısa sürelerde (20-30 dakika) ve kantitatif olarak elde edilmektedir. Real-Time PCR yönteminde Klasik PCR metoduna nazaran daha az miktarda (1-2 µl) DNA kullanılarak daha hassas ve doğru sonuçlar elde edilmektedir. Real-Time PCR yönteminde tüm işlem kapalı bir PCR tüpü içerisinde ve tek seferde gerçekleştiği için kontaminasyon (bulaşma) riski Klasik PCR metoduna göre çok daha düşüktür. Real-Time PCR sisteminde yapılan işlemin doğruluğunu test etmek ve tek bir DNA fragmentinin çoğalıp çoğalmadığını anlamak için Thermal Melting (Erime Eğrisi) çalışması da yapılmaktadır. Ayrıca Real-Time PCR sisteminde tüm PCR aşamaları bir bilgisayar ekranı aracılığı ile kontrol edilebilmekte ve işlem istenildiğinde durdurulabilmektedir. Real-Time PCR yönteminin Klasik PCR yöntemine bir diğer üstünlüğünde kantitatif sonuçların daha güvenilir şekilde elde edilmesine imkan vermesidir.

Real-Time PCR metoduyla patojenlerin tanı ve tespitleri iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan ilki DNA'ya spesifik olmayan ve DNA zincirleri arasına bağlanarak ışığa veren SYBER GREEN adı verilen boya ile yapılmaktadır. İkinci yöntem ise DNA'ya spesifik olan problarla (Taqman, Moleküler Beacon, Scorpion vb.) yapılmaktadır. Bu çalışmada patojenlerin tanı ve tespitleri için DNA'ya spesifik Taqman prob sistemi kullanılmıştır.

Real-Time PCR metodunun dezavantajları arasında bu yöntemin şu an için ekonomik olmaması, Real-Time PCR işlemi için SYBER GREEN gibi DNA'ya spesifik olmayan floresan boya kullanılması durumunda yanlış bağlanmalardan dolayı bazen tutarsız sonuçlar elde edilmesi, yeterli teknik bilgi ve iyi yetişmiş eleman ihtiyacı duyması gösterilebilir.

Real-Time PCR Yöntemin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitki dokularından tespit yapılabilmesi, bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek

amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamıştır. Real-Time PCR ile günümüze kadar çeşitli bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitleriyle ilgili bazı çalışmalar tamamlanmıştır.

Schaad vd (1999), Patetes halka çürüklüğü etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*)' un patates yumrusundan Taqman Bio-PCR ile tanı ve tespitini gerçekleştirmiştir.

Basım ve Basım (2009), Asma da Pierce's Hastalık etmeni *Xylella fastidiosa*' için geliştirdikleri EBXY1- EBXY2 primer çifti ve Taqman probu kullanarak oldukça kısa sürede direkt bakteriyel hücreden ve hastalıklı asma dokusundan patojenin tanısını ve tespiti yapmışlardır.

Weller vd (2000), Taqman Real-Time PCR ile birçok üründe bakteriyel solgunluk hastalık etmeni *Ralstonia solanacearum*' un RS primer ve prob seti (tüm biovarlar) ve B2 primer ve prob setini (biovar 2A) kullanarak patates yumrusundan tespitini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar patates yumrusundan elde edilen bakteriyel solüsyondan, geliştirdikleri yöntemin hassasiyet limitinin 10^2 cfu/ml olduğunu bildirmişlerdir.

Luo vd (2008), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in tohumdan tespiti amacıyla canlı ve ölü bakterilerin, DNA' ya bağlanan ethidium monoazide (EMA) ve Taqman prob kullanarak ayırımına dayalı Real-Time PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem bakteriyel konsantrasyonun 10^7 cfu/ml ve aşağısı olduğu durumlarda $1\mu\text{g/ml}$ EMA (Ethidium Monoazide) kullanarak canlı bakterileri ölülerden ayırabildikleri, metodun hassasiyet limitinin ise 10^3 cfu/ml olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar geliştirilen yöntemin Bio-PCR ile birlikte kullanılması durumunda patojenin tohumdan tespitinde daha etkili olacağını da vurgulamıştır.

Benlioğlu ve Özyılmaz (2007), Flouresan boyalar ile işaretli Moleküler Beacon probe kullanarak Flouresan PCR ile patojeni saptayabilmışlerdir. Klasik PCR sonuçları ile karşılaştırılan Flouresan PCR sonuçlarının birbirleriyle % 100

uyumluluk gösterdiği ve testin duyarlılığının 10 bakteri/ml düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir.

Bellis vd (2007), Yumuşak çekirdekli meyve ağaçları (elma, armut, ayva...) ve çiçeklerde ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora*' yı Real-Time PCR için geliştirdikleri Scorpion probe ve E3-E4 primer çifti ile tespit edebilmişlerdir. Araştırmacılar *Erwinia amylovora*' nın bu yöntem kullanılarak tespitinde hassasiyet limitlerinin $3,4 \times 10^4$ cfu/ml (bakteriyel süspansiyon) ve 10^4 cfu/ml (direkt yaprak dokusu) olduğunu bildirmişlerdir.

Vandroeme vd (2008), Çilek köşeli yaprak lekesi hastalık etmeni *Xanthomonas fragaria*' nın direkt yaprak dokusundan hassas tespiti için Real-Time PCR metodunu kullanmışlardır. Çalışmada bakteriyel patojenin 100 mg yaprak dokusunda 3×10^2 cfu/ml konsantrasyona kadar tespit edilebildiği bildirilmiştir. Yalnız araştırmacılar geliştirdikleri yöntemin *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ile *Xanthomonas fragaria*' nın ayırımında güvenilir olmadığını da açıklamışlardır.

Patojenlerle mücadele de erken dönemde doğru, güvenilir ve hassas tanı ve tespit büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav)' nın tohumdan, bakteriyel hücreden ve hastalıklı bitki dokularından direkt tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek için Real-Time PCR primer-prob ve yöntemi geliştirilmiştir. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in Real-Time PCR ile tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla primer ve prob seti geliştirilmiştir. pCM2 plasmidi üzerinde yer alan ve patojenisiteden sorumlu 843 bp' lik *pat-1* gen dizisi dikkate alınarak HBCMML : 5' GGCTAGCGG TGAGGTCTTC 3', HBCMMR: 5' TTTGGTTCCGGCTACCTG 3' primerleri ve Taqman: 5' GGCCAGGA 3' probu geliştirilmiştir.

Cmm' nin tohumdan ve bakteriyel hücreden, birbirinden farklılıkları Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile belirlenmiş strainlerden ve hastalıklı dokulardan Real-Time PCR ile tanı ve tespiti için 73 bp' lik bir amplifikasyon ürünü

elde edilmiştir. Bu PCR ürünü *Cmm* dışındaki farklı bitki patojeni bakterilerden ve domates genomik DNA' sından çoğaltılamamıştır. Real-Time PCR yönteminin *Cmm* için hassasiyet çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen metodunun *Cmm* için tohumdan hassasiyet limiti 1 bakteri, direkt bakteriyel hücreden hassasiyet limiti 1 bakteri ve saf genomik DNA' dan ise 10 pg olarak bulunmuştur. Bu elde edilen hassasiyet limitleri *Cmm*' nin tanı ve tespitine yönelik daha önce Klasik PCR ve Real-Time PCR ile elde edilen hassasiyet limitlerine göre daha başarılıdır ve çok daha kısa sürede işlemler tamamlanabilmektedir..

Bitki patojeni *Xanthomonas* türlerinin klasik bakteriyolojik metodlar ile tespiti ve tanısında, seçici besi kültüründe geliştirilme, çeşitli biyokimyasal testler, serolojik ve patolojik testlerin uygulanabilmektedir (Seattler vd 1989, Schaad 1988). Ancak bu testlerin oldukça uzun zaman alması ve bazı durumlarda kesin sonuç vermemesi sebebiyle nükleik asit temelli yöntemler daha hızlı ve güvenilir olmasından dolayı tercih edilmektedir.

Klasik PCR yöntemi ile *Xav*' nin tanısında patojenisite ve hipersensitif reaksiyondan sorumlu *hrp* gen salkımından geliştirilen RST2 (5' AGGCCCTGGAAGGTGCCCTGGA 3') ile RST3 (5' ATCGCACTGCGTACCGC-GCGCGA 3'), RST9 (5' GGCACATGCAATGACTG 3') ile RST10 (5'AATAC-GCTGGAAGTCTGCTG3') ve RST21 (5'GCACGCTCCAGATCAGCAT-CGAGG 3') ile RST22 (5' GGCATCTGCATGCGTGCT CTCCGA 3') primer çiftleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Leite vd 1994).

Bu çalışmada, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın Real-Time PCR ile tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla primer ve prob geliştirilmiştir. *hrp* gen salkımında yer alan 2601 bp' lik *hrpB* geni bu amaçla kullanılmıştır. Geliştirilen primer ve prob dizisi HBXAVL :5' CAGGTCTCTGTCGCACTC 3' , HBXAVR: 5' GAAAAGCAGGGTCGGTCAT 3' ve Taqman prob : 5' GCAGCAGA 3' dir.

Xav' nin tohumdan, bakteriyel hücreden, farklı *Xav* strainlerinden ve hastalıklı bitki dokularından Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti için 69 bp' lik bir

PCR ürünü elde edilmiştir. Bu PCR ürünü *Xav* dışındaki farklı bitki patojeni bakterilerden ve domates ile biber genomik DNA' sından çoğaltılamamıştır. Real-Time PCR yönteminin *Xav* için hassasiyet çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen metodun *Xav* için tohumdan hassasiyet limiti 2 bakteri, direkt bakteriyel hücreden hassasiyet limiti 2 bakteri ve saf genomik DNA' dan ise 10 pg olarak bulunmuştur.

Real-Time PCR yöntemi ile tohum üzerinde bulunan ölü bakteriler tespiti de mümkün olabilmektedir. Bu nedenle tohum üzerinde sadece canlı olarak bulunan bakteriyel patojenlerin tespiti için Real-Time Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Hem *Cmm* hemde *Xav* için gerçekleştirilen Real-Time Bio PCR ile patojenler seyreltilen stok çözeltilerden 10^{-3} cfu/ml konsantrasyona kadar tespit edilmişlerdir.

Bu çalışmada gerek *Cmm* gerekse *Xav*' nin tanı ve tespitleri için elde edilen Real-Time PCR sonuçlarıyla, daha önce farklı bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitleri için elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında bu çalışmada geliştirilen yöntemle patojenlerin tespitindeki hassasiyet limitlerinin daha düşük ve çok daha hızlı gerçekleştirilebildiğini ortaya çıkarılmıştır. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın Real-Time PCR ile tohumdan, bakteriyel hücreden ve hastalıklı bitki dokularından direkt tanı ve tespitleri gerçekleştirilmiştir. Domates bakteriyel benek hastalık etmeni *Pseudomonas tomato* (*syringae*) pv. *tomato*' nın Real-Time PCR ile tanı ve tespiti daha önce Basım ve Basım (2007) çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Basım ve Basım' ın (2007) çalışmaları ve bu çalışma ile birlikte, tüm domates tohum kökenli bakteriyel patojenlerin Real-Time PCR ile kısa sürelerde (20-30 dk) hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde tanı ve tespitleri mümkün olabilmektedir.

6. SONUÇ

Dünyada yetiştiricilik yapılan alanların sınırlarının zorlanmış olması ve bu alanlardan elde edilen ürün miktarının insan beslenmesi için yetersiz kalması bilim çevrelerini harekete geçirmiş ve birim alandan daha fazla ürün alma uğraşı başlamıştır. Domateste besin olarak kullanılan sebzelerin en başında yer almaktadır. Türkiye’de Dünya domates üretiminde Çin ve ABD’ den sonra 3. sırada yer almaktadır. Türkiye domates üretiminde bu denli önemli bir konuma sahipken bu bitkinin yetiştiriciliğinde viral, fungal ve bakteriyel patojenlerin neden olduğu kayıplar önemli boyutlardadır. Domateste hastalık oluşturan bakteriyel patojenlerden *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, bu çalışmada ele alınmış, bu patojenlerin hızlı tanı ve tespitleri için etkili güvenilir ve hassas bir yöntem geliştirilmiştir.

Bu hastalık etmenlerinin tohum kökenli olması ve bunların ekimlerinden önce tohumdan doğru ve hızlı bir şekilde tespiti, bu hastalık etmenleri ile mücadelede son derece önem arz etmektedir. Ülkemizin ciddi bir hibrit tohum ithalatçısı, aynı zamanda bir çok yerli tohum ıslah firması tarafından üretilen sebze tohumu potansiyeli ve bölgemizde 60 dan fazla fide üretim firmasının hemen hemen Türkiye’ nin sebze fidesi üretim ihtiyacını karşıladığı düşünüldüğünde hastalık etmenleri ile bulaşık tohumların ülkemizde üretimde kullanılmadan önce hızlı, hassas ve güvenli bir şekilde tespiti patojenle mücadele şansını arttırabilecektir.

Bu çalışmada domates tohum kökenli bakteriyel patojenlerinden *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*’ nın oldukça hassas ve hızlı sonuç veren Real-Time Bio-PCR ile tohumdan ve hastalıklı bitki dokularından tanı ve tespitleri gerçekleştirilmiştir.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) tohum kökenli bakteriyel patojenlerdir. Bu çalışmada *Cmm* ve *Xav*’ nin laboratuvar koşullarında suni yollarla bulaştırılmış

domates ve biber tohumlarından tanısı ve tespitleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların pratiğe aktarılması açısından doğal infekteli tohumlardan bu patojenlerin tespitlerinin yapılması faydalı olacaktır. Yine bu çalışmada test edilen 8 *Xav* straininden 2 tanesi ülkemizden izole edilmiş olandır. Bu nedenle daha sonra yapılacak çalışmalarda daha fazla Türk izolatu ile çalışılması yararlı olacaktır.

Bu çalışmada geliştirilen yöntemin yaygınlaştırılması sonucunda daha kısa sürede *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicaoria*' ile bulaşık tohumların tespiti mümkün olabilecek, fide üretiminde ve sonuçta bitkisel üretimde temiz tohum kullanımı sağlanarak tohum kökenli domates bakteriyel hastalık etmenlerinin oluşturacağı hastalık kayıplarının önüne geçilmesine büyük katkı sağlanabilecektir. Ayrıca bu çalışmada geliştirilen primer, prob ve RT-PCR yöntemi *Cmm* ile *Xav*' nin kesin ve güvenilir tanısı çalışmalarına önemli katkı sağlayabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- ALFANO, J. R., and COLLMER, A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42:385-414.
- ANONİM, 2005. Statics of Food and Agriculture Organization (Fao)
- ANONİM, 2007. Statics of Food and Agriculture Organization (Fao)
- BASHAN, Y., OKAN, Y., and HEINS, Y 1982a. Long-term survival of *Pseudomonas tomato* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology*, 72:1143-1144.
- BASHAN, Y., DIAB, S., and OKAN, Y. 1982b. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant and Soil*, 68:161-170.
- BASHAN, Y., and OKAN, Y., 1986. Internal and external infections of fruits and seeds of peppers by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Can. J.Bot.*, 64:2865-2871
- BASIM, H. 1996. Horizontal chromosomal gene transfer among strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* by conjugation. Ph. D. Dissertation, University of Florida, Dept. of Plant Pathology, Gainesville 137 pp.
- BASIM, E. 1998. Pulsed-Field Jel Elektroforez yöntemi ile Domates ve Biberde Yaprak Lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın genom büyüklüğünün saptanması ve fiziksel haritasının oluşturulması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, 103 sayfa.
- BASIM, H. 2007. PFGE ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Strainlerinin Genom Analizi. *Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi 27-29 Ağustos*.
- BASIM, H., BASIM, E. 2007. "TaqMan Real-Time PCR ile *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun tanısı ve tespiti ", *II. Bitki Koruma Kongresi, 27-30 Ağustos, Isparta*, 104.
- BASIM, E., BASIM, H., E. R. DICKSTEIN, J. B. JONES, 2004. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean region of Turkey. *Plant Disease*, 88 (9): 1048-1048.

- BASIM, H., BASIM, E., JONES, J.B., MINSAVAGE, G.V., 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
- BASIM, E., BASIM, H. 2009. Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki Bağ Alanlarında Pierce Hastalığı Etmeni *Xylella fastidiosa*' nın Tanısı, Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, 156
- BECKER, A., KATZEN, F., PUHLER, A., and IELPI, L. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:145–152.
- BEHRENDT, U., ULRICH, A., SCHUMANN, P., NAUMANN, D., and SUZUKI, K.-I. 2002. Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward, polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1441-1454.
- BEIMEN, A., BERMPOHL, A., MELETZUS, D., EICHENLAUB, R., and BARZ, W. 1992. Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains differing in virulence. *Z. Naturforsch.*, 47C, 898-909.
- BELLÌS, P.D., SCHENA, L., CARİDDÌ, C. 2007. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *Eur J Plant Pathol*, 118:11–22
- BENHAMOU, N. 1991. Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*: localization of some glycoproteins in infected host leaf tissues. *Phys. Mol. Plant Pathol.*, 38: 15-38.
- BERMPOHL, A., DREIER, J., BAHRO, R., and EICHENLAUB, R. 1996. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol. Res.*, 151: 391-399.

- BENLİOĞLU, K., ÖZYILMAZ, Ü. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in Moleküler Beacon Probe ve Fluoresan PCR Testi ile saptanması, Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, 27-29 Ağustos, 103.
- BIGGERSTAFF, C.M. , GLEASON, M.L., BRAUN E.J., 2000. Refinement of a nondestructive tomato seed assay for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using seed fiber. *Seed Science and Technology* 28: 261–9.
- BLANCARD, D. 1988. Maladies De La Tomate (Domates Hastalıkları) (Çevirenler; ABAK,K., SARI, N., ABAK, M.F 1993 Çukurova Üniversitesi), INRA, Paris. Pages 212.
- BRADSHAW-ROUSE, J.J., WHATLEY, M.H., COPLIN, D.L., WOODS,A., SEQUEIRA, L., and KELMAN, A. 1981 Agglutination of *Erwinia stuartii* strain, with a corn agglutinin: correlationwith extracellular polysaccharide production and pathogenicity. *Appl Environ. Microbiol.* 42: 344–350.
- BERESWILL, S., PAHL, A., BELLEMANN, P., ZELLER, W. AND GEIDER, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3522±3526.
- BREMER, H., G., KAREL, K., BIYIKOĞLU, N., GÖKSEL VE PETRAK, F. 1952. Türkite' nin parazit mantarları üzerinde incelemeler (Schizomycetes, Oomycetes, Ascomycetes 2). İ.Ü Fen Fakültesi Mecmuası, 17: 145 -160.
- BREMER, H. 1948. Türkiye Fitopatolojisi 2. İstiklal matbaası, Ankara
- BROWN, I., MANSFIELD, J., and BONAS, U. 1995. *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papillae deposition in pepper mesophyll cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 825–836.
- BRYAN. M.K. 1930 Studies on bacterial canker of tomato. *Journal of Agricultural Research* 41: 825-851.
- BONAS, U., SCHULTE, R., FENSELAU, S., MİNSAVAGE, G.V., STASKAWICZ, B.J., and STALL, R.E. 1991. Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:81–88.
- BONAS, U., ACKERVECEN V.D., BUTTNER, D., HAHN, K., MARAOİS, E., NENNSTİEL, D., NOEL, L., ROSSIER, O and SZUREK, B. 2000. How the Bacterial Pathogen

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* conquers the host. *Molecular Plant Pathology* 1 (1) : 73-76

- BOUDYACH, E.H., FATMI, M., AKHAYAT, O., BENIZRI, E., AIT BEN AOUMAR, A., 2001. Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol Sci. Technol.* 11: 141–149.
- BUROIKENE D. 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Agronomy Research 4 (special issue)*, 151-154.
- BUTTNER, D., and BONAS, U. 2002. Getting across bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* 21:5313–5322.
- BUTTNER, D., NOEL, L., THIEME, T., and BONAS, U. 2003. Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J. Biotechnol.* 106:203–214.
- CANTEROS, B. I. 1990. Diversity of plasmids and plasmid encoded phenotypic traits in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Ph. D. Dissertation, University of Florida, Gainesville 183 pp.
- CARLTON, W.M., GLEASON, M.L., and BRAUN, E.J. 1994. Effects of pruning on tomato plants supporting epiphytic populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 78: 742-745.
- CARLTON, W.M., BRAUN, E.J., and GLEASON, M.L. 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*, 88: 525-529.
- CARVER, W.G. 2008. Historical Background of Tomato In: Benton Jones, J. Jr. (Editors), *Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden* 2.ed., *CRC Press*, pp. 1-1, USA
- CASPER-LINDLEY, C., DAHLBECK, D., CLARK, E.T., STASKAWICZ, B.J. 2002. Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8336-8341
- CHAN, J.W., AND GOODWIN, P.H. 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Adv.* 17:489-508.

- CHANG, R.J., RIES, S.M., PATAKY, J.K. 1990. Overwintering of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and spread on alternative hosts and non-host plants. *Phytopathology* 80: 1070-1071
- CHANG, R.J., RIES, S.M., and PATAKY, J.K. 1991 Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practises used to produce tomato plants. *Phytopathology* 81: 1276-1281.
- CHANG, R.J., RIES, S.M., and PATAKY, J.K. 1992a. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Disease*, 76: 1150-1155.
- CHANG, R.J., RIES, S.M., and PATAKY, J.K. 1992b. Local sources of of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology*, 82: 553-560.
- CROSAN, D. F., and MOREHART, A. L., 1963. Isolation of *Xanthomonas vesicatoria* from tissues of *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 54:358-359.
- COLLINS, M.D. and BRADBURY, J.F. 1986. Plant pathogenic species of *Corynebacterium*. In J. P. Butler vd (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (pp. 1276-1283). 2nd edition. Baltimore,U.S.A.: Wilkins and Wilkins.
- COOK, A.A. and STALL, R.E., 1982. Distributionn of races of *Xanthomonas vesicatoria* pathogenic on pepper. *Plant Disease* 66: 388-389
- COOKSEY, D.A. AND GRAHAM, J.H. 1989. Genetic fingerprinting of two pathovars of phytopathogenic bacteria by rare-cutting restriction enzymes and field inversion gel electrophoresis. *Phytopathology*, 79: 745-750
- ÇETİNKAYA Y., R. 2007. Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.' un Tanılanması ve Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakteriler İle Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, 191 sayfa.
- ÇINAR, Ö. 1980. Bakteriyel Domates solgunluğu hastalığı (*Corynebacterium michiganense* (Erwin. F. Smith) Jensen)' nın tanımı, savaş yöntemleri ve etmene karşı dayanıklı domates çeşitleri üzerine araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 139- Bilimsel Araştırma ve İnceleme Tezleri.

- DA SILVA, A. C., FERRO, J. A., REINACH, F. C., FARAH, C. S., FURLAN, L. R., QUAGGIO, R. B., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., VAN SLUYS, M. A., ALMEIDA, N. F., ALVES, L. M., DO AMARAL, A. M., BERTOLINI, M. C., CAMARGO, L. E., CAMAROTTE, G., CANNAVAN, F., CARDOZO, J., CHAMBERGO, F., CIAPINA, L. P., CICARELLI, R. M., COUTINHO, L. L., CURSINO-SANTOS, J. R., EL-DORRY, H., FARIA, J. B., FERREIRA, A. J., FERREIRA, R. C., FERRO, M. I., FORMIGHIERI, E. F., FRANCO, M. C., GREGGIO, C. C., GRUBER, A., KATSUYAMA, A. M., KISHI, L. T., LEITE, R. P., LEMOS, E. G., LEMOS, M. V., LOCALI, E. C., MACHADO, M. A., MADEIRA, A. M., MARTINEZ-ROSSI, N. M., MARTINS, E. C., MEIDANIS, J., MENCK, C. F., MIYAKI, C. Y., MOON, D. H., MOREIRA, L. M., NOVO, M. T., OKURA, V. K., OLIVEIRA, M. C., OLIVEIRA, V. R., PEREIRA, H. A., ROSSI, A., SENA, J. A., SILVA, C., DE SOUZA, R. F., SPINOLA, L. A., TAKITA, M. A., TAMURA, R. E., TEIXEIRA, E. C., TEZZA, R. I., TRINDADE DOS SANTOS, M., TRUFFI, D., TSAI, S. M., WHITE, F. F., SETUBAL, J. C., AND KITAJIMA, J. P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.
- DAVIS, M.J., GILLESPIE, J.R., A.G., VIDAVER, A.K. and HARRIS, R.W. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 107-117.
- DIAB, S., BASHAN, Y., and OKON, Y., 1982. Effects of relative humidity on bacterial scab caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper. *Phytopathology*, 72:1257-1260.
- DOWSON, W. J., 1939. On the systemic position and generic names of the gram negative bacterial pathogens. *Zentrabl. Bakteriolog. Parasitenk., Infektionskr. Hyg. Abs. II* 100:177-193.
- DREIER, J., BERMPHOHL, A. and EICHENLAUB, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, : 462-468.
- DREIER, J., MELETZUS, D., and EICHENLAUB, R. 1997. Characterization of the Plasmid Encoded Virulence Region *pat-1* of Phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*, 10 (2): 195-206

- DUMESTRE A., SAUVE S., McBRIDE M., BAVEYE P., BERTHELIN J. 1999. Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Arch Environ Contam Toxicol* 36: 124-131
- EPPO, 1988. *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 18:521-525 (1988).
- EPPO, 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bull. OEPP- EPPO Bull.*, 35: 275-283.
- ERKAN, S. ESER, B., VE YORGANCI, Ü. 1992. Domates Mozayik Virusu'nun bazı domates çeşitlerine olan etkileri. I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Cilt II. s. 411, 13-16 Ekim 1991, İzmir.
- FATMI, M. and SCHAAD, N.W. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology* 78:121-126
- FATMI, M. and SCHAAD, N.W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*, 51: 149-154.
- FRANCIS D.M., KABELKA E., BELL J., FRANCHINO B., ST. CLAIR D. 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis.*, 85:1171-1176.
- FREEMAN, W.M., WALKER, S.J., and VRANA, K.E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 26: 112-122, 115-124
- FRANKEN, A.A.J.M., KAMMINGA, G.C., SNYDERS, W., VAN DER ZOUWEN, P.S. and BIRNBAUM, Y.E. 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy and dilution plating. *Neth. J. Plant Pathol.*, 99: 125-137.
- GALAN, J.E., COLLMER, A. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
- GARDNER, M.V., and KENDRICK, J.B. 1921. Bacterial spot of tomato. *J.Agric.Res.*, 21: 123-156
- GARDNER, M.V., and KENDRICK, J.B. 1923. Bacterial spot of tomato and pepper. *Phytopathology*, 13: 307-315

- GARTEMANN, K.H., KIRCHNER, O., ENGEMANN, J., GRAFEN, I., EICHENLAUB, R., BURGER, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology* 106 : 179–191
- GHEDINI, R., FIORE, N. 1995. The use of polymerase chain reaction to detect latent infection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *OEPP/EPPO Bulletin* 25: 449–54.
- GITAITIS, R.D., BEAVER, R.W., and VOLOUDAKIS, A.E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis.*, 75: 834-838.
- GLEASON, M.L., GITAITIS, R.D. and RICKER, M. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial cancer of tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 75: 834-838.
- GLEASON, M.L., BRAUN, E.J., CARLTON, W.M. and PETERSON, R.H. 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81: 1519-1523.
- GOODE, J.M. and SASSER, M. 1980. Presentation-the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Disease* 64 (7): 831-834.
- GOTO, M. 1992. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. *Academic Press, Inc.* USA, 342 pp.
- HAUSBECK, M.K., BELL, J., MEDINA-MORA, C., PODOLSKY, R. and FULBRIGHT, D.W. 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90: 38-44
- HAM, J.H., BAUER, D.W., FOUTS D.E., COLLMER, A. 1998. A cloned *Erwinia chrysanthemi* Hrp (type III protein secretion) system functions in *Escherichia coli* to deliver *Pseudomonas syringae* Avr signals to plant cells and secrete Avr proteins in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10206-10211.
- HIGGINS, B.B. 1922. The Bacterial spot of pepper. *Phytopathology* 12: 501-516
- HUANG, R. and TU, J.C. 2001. Effects of nutrient solution pH on the survival and transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in hydroponically grown tomatoes. *Plant Pathology*, 50: 503-508

- HULETSKY, A., GIROUX, R., ROSSBACH, V., GAGNON, M., VAILLANCOURT, M., BERNIER, M., GAGNON, F., TRUCHON, K., BASTIEN, M., PICARD, F.J., BELCUM, A., QUELLETTE, M., ROY, P.H., AND BERGERON, M.G. 2004. New Real-Time PCR assay For rapid detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Specimens Containing a mixture of *Staphylococci*. *Microbiology*, 1875-1884
- JACOBS, J.L. and SUNDIN, G.W. 2001. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5488-5496.
- JAHN, H., DREIER, J., MELETZUS, D., BAHRO, R. and EICHENLAUB, R. 2000. The Endo- β -1,4-glucanase Cella of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13: 703-714.
- JONES, J.B., POHRONEZNY, K.L., STALL, R.E., and JONES, J.P. 1986. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds and volunteer tomato plants. *Phytopathology* 76: 430-434
- JONES, J. B., STALL, R. E., and BOUZAR, H., 1998. Diversity among *Xanthomonads* pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review Phytopathology* 36:41-58.
- JONES, J.B. 1991. Bacterial spot In: J. B. Jones, R. E. Stall, and T. A. Zitter (Editors), *Compendium of tomato disease*. APS Press, St. Paul, Minn, p: 27
- JONES, J.B., and SCOTT, J.W., 1986. Hypersensitive response in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 70:337-339.
- JONES, J.B., MINSAVAGE, G.V., STALL, R.E., KELLY, R.O., and H. BOUZAR. 1993. Genetic analysis of a DNA region involved in expression of two epitopes associated with lipopolysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 83:551-556
- JONES, J.B. 2001. Bacterial spot of tomato. In: Maloy OC, Murray TD (eds) *Encyclopedia of plant pathology*, vol 1. Wiley, New York, pp 83-84
- JONES, J. B., LACY, G. H., BOUZAR, H., STALL, R. E., and SCHAAD, N. W., 2004. Reclassification of the *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *System. Appl. Microbiol.* 27: 755-762.

- KAHN, R.P. 1982. The host as a vector: Exclusion as a control. Pages 123-149 in: Pathogens, Vectors, and Plant Diseases - Approaches to Control. K. F. Harris and K. Maramorosch, eds. Academic Press, London.
- KARAHAN, O. 1965. Muhtelif sebzelerde zararlı hastalık amilleri ve mücadeleleri. Tarım Bakanlığı Ankara Ziraî Mücadele Enstitüsü Müdürlüğü Sayı: 42, Ankara, 52.
- KARACA, İ., ve SAYGILI, H. 1977. Domateslerde bakteriyel hastalıklar. İzmir Bölge Ziraî Mücadele ve Karantina Başkanlığı, Yayın No: 1, İzmir, 22.
- KARACA, İ, VE SAYGILI, H., 1982. Batı Anadolunun bazı illerinde domates ve biberde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar. *III. Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 12-15 Ekim, Adana, 182-192.
- KESKİN, G., VE DÖLEKOĞLU, C. 2005. Domates ve Domates Salçası Durum Tahmin: 2004/2005. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları, 123, 1-75, Ankara
- KIRALY, Z., EL-ZAHABY, H.M. and KLEMENT, Z. 1997 Role of extracellular polysaccharides (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J. Phytopathol.*, 145: 59-68.
- KOTAN, R., 1998. Biber ve domatesteki bakteriyel leke hastalığı (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye.)'nın biyolojik ve kimyasal kontrolü. Yüksek Lisans Tezi. A. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 45 s.
- KRITZMAN, G. 1991. A method for detection of seedborne bacterial diseases in tomato seed. *Phytoparasitica*, 19: 133-41.
- KUCHAREK, T. 2000. Bacterial Spot of Tomato and Pepper. *Plant Pathology Fact Sheet* PP-3
- LAINE, M.J., NAKHEI, DREIER, J., LEHTILA, K., MELETZUS, D., EICHENLAUB, R. and METZLER, M.C. 1996. Stable transformation of the Gram-positive phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with several cloning vectors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1500-1506.
- LEITE, R. P. JR., MINSAVAGE, G.V., BONAS, U., and STALL, R. E., 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplication of

- DNA sequences related to hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1068-1077.
- LEITE, R.P. JR., JONES, J.B., SOMODI, G. C., MINSAVAGE, G.V. and STALL, R.E., 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Disease*, 79: 917-922.
- LEYNS, F., M. DE CLEENE, J.-G. SWINGS, and J.DE LEY. 1984. The host range of genus *Xanthomonas*. *Bot.Rev.*, 50: 308-356
- LOUWS, F. J., BELL, J., MEDINA-MORA, C. M., SMART, C. D., OPGENORTH, D., ISHIMARU, C. A., BRUJIN, F. J., FULBRIGTH, D. W., 1998. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88: 862.
- LUO, L.X., WALTERS, C., BOLKAN, H., LIU, X.L., and LI, J.Q. 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathology*, 57: 332-337
- MARCO, G. M., and STALL, R. E., 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, 67:779-781.
- MANULIS, S., GAFNI, Y., CLARK, E., ZUTRA, D., OPHIR, Y. AND BARASH, I. 1991. Identification of a plasmid DNA probe for detection of strains of *Erwinia herbicola* pathogenic on *Gypsophila paniculata*. *Phytopathology* 81, 54±57.
- McINNES, T.B., GITAITIS, R.D., McCARTER, S.M., JAWORSKI, C.A., AND PHATAK, S.C. 1988. Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant field. *Plant Dis.*, 72: 575-579
- MEDINA-MORA, C.M., HAUSBECK, M.K., FULBRIGHT, D.W., 2001. Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis.*, 85: 88-91.
- MELETZUS, D., BERMPHOHL, A., DREIER, J. and EICHENLAUB, R. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J. Bacteriol.*, 175: 2131-2136.

- MELETZUS, D. and EICHENLAUB, R. 1991. Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* by electroporation and development of a cloning vector. *J. Bacteriol.*, 173: 184-190.
- MINSAVAGE, G. V., DAHLBECK, D., WHALEN, M. C., KEARNY, B., BONAS, U., STASKAWICZ, B. J., and STALL, R. E., 1990. Gene for gene relationship specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3: 41-47.
- MİRİK, M. 2005. Biberde Bakteriyel Leke Etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria'* nin Tanılanması ve Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakteriler ile Biyolojik Mücadele Olanakları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, 184 sayfa.
- MOFFET, M.L., WOOD, B.A., 1984. Survival of *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* within host debris in soil. Australas. *Plant Pathol.*, 13: 1-3.
- NIEHAUS, K., KAPP, D., PUHLER, A., 1993. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* 190: 415-425.
- NOEL, L., THIEME, F., GABLER, J., BUTTNER, D., and BONAS, U. 2003. XopC and XopJ, two novel type III effector proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 185:7092-7102.
- OERKE, E.C., DEHNE, H.-W., SCHONBECK, F., WEBER, A., 1994. Crop Production and Crop Protection-Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Elsevier, Amsterdam, 808 pp.
- OJANEN-REUHS, T., KALKKINEN, N., WESTERLUND-WILKSTROM, B., VAN DOORN, J., HAAHTELA, K., NURMIAHO-LASSILA, E.L., WELGENLIK, K., BONAS, U., and KARHONEN, T.K. 1996. Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*, 179: 1280-1290
- ÖZGÖZ, A., BAYKAL, N., ve ERKAN, S. 1994. "Bursa yöresinde yetiştirilen sanayi domateslerinde görülen virüs hastalıklarının tespiti ve yayılışı üzerinde çalışmalar. s.31-37". Editör: Semih Erkan & İbrahim Duman. Sandom No:8., 53 s.

- PERNEZNY, K., KUDELA, V., KOKOSKOVA, B., and HLADKA, I., 1995. Bacterial diseases of tomato in the Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among copper-tolerant bacterial strains. *Crop Protection Vol. 14(4): 267-270.*
- PETERSEN, M AND WENGEL, J. 2003. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol. 21, 74-81*
- PETERSON, G. H., 1963. Survival of *Xanthomonas vesicatoria* in soil and diseased tomato plants. *Phytopathology, 53:765-767.*
- PINE T.S., GROGAN R.G., HEWITT W.B. 1954. Pathological analogy of bacterial canker of young tomato plants. *Phytopathol., 45: 267-271.*
- POHRONEZNY, K., VOLIN, R.B., 1983. The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes. *HortScience 18: 69-70*
- POHRONEZNY, K., SCHUSTER, D.J., SONODA, R.M. 1986. Integrated pest management for Florida tomatoes. *Plant Dis. 70:96-102*
- POHRONEZNY, K. L., MOSS, M. A., DANKERS, W., and SCHENK, J., 1990. Dispersal and Management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* During Thinning of Direct-Seeded Tomato. *Plant Dis.. 74: 800-805.*
- QIAN, H., LU, N., XUE, L., LIANG, X., ZHANG, X., FU, M., XIE, Y., ZHAN, Q., LIU, Z. AND LIN, C. 2005. Reduced MTA1 expression by RNAi inhibits *in vitro* invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma cell line. *Clin. Exp. Metastasis 22, 653-662*
- QIN, X., EMERSON, J., STAPP, L., ABE, P., and BURNS, J.L. 2003. Use of Real-Time PCR with Multiple Targets to Identify *Pseudomonas aeruginosa* and other Nonfermenting Gram-Negative Bacilli From Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology, 4312-4317*
- RAI, P. V., and STROBEL, G. A. 1968a. Phytotoxic glycopeptides produced by *Corynebacterium michiganense*. I. Methods of preparation, physical and chemical characterization. *Phytopathology, 59: 47-52.*
- RAI, P. V., and STROBEL, G. A. 1968b. Phytotoxic glycopeptides produced by *Corynebacterium michiganense*. II. Biological properties. *Phytopathology, 59: 53-57.*

- RAEYMAEKERS, L. 2000. Basic principles of quantitative PCR. *Mol. Biotechnology* 15: 115-122
- RIMSKY, S. 2004. Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7:109–114.
- RITCHIE, D.F. 1996. Bacterial Spot of Pepper and Tomato. www.ces.nesu.edu/depts/pp/notes/vegetable/vdin018:
- ROMEIRO, R., KARR, A., AND GOODMAN, R. 1981. Isolation of a factor from apple that agglutinates *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.*, 68: 772–777.
- SAHIN, F., USLU, H., KOTAN, R. and DONMEZ, F. 2002. Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. *Plant Pathology*, 51: 399.
- SAILE, E., MCGARVEY, J.A., SCHELL, M.A., and DENNY, T.P. 1997 Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 87: 1264–1271.
- SANTOS, M, S., CRUZ, L., NORSEKOV, P., and RASMUSSEN, O. F., 1997. A Rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Science and Technology*, 25:581-584
- SANDBRINK J.M., VAN OOIJEN J.W., PURIMAHUA C.C., VRIELINK M., VERKERK R., ZABEL P., LINDHOUT P. 1995. Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs. *Theor. and Appl. Genet.*, 90: 444-450.
- SAYGILI, H., KÖSEOĞLU, T., VE DEMİR, G., 1985. Batı Anadolu Bölgesi domates ekim alanlarında hastalık etmeni olan bakterilerin toprakta yaşam durumları ve kullanılan suni gübrelerin bu etmenlere etkileri üzerinde araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi*, D2, (9):367-383
- SCHAAD, N. W., and STALL, R. E., 1988. *Xanthomonas*, In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed (ed. N.W. Schaad). APS press, St Paul, M. N., pp. 81-94.
- SCHAAD, N.W., 1989. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifers. In: Saettler, A.W., Schaad, N.W. & Roth, D.A. (Eds), Detection of

- bacteria in seed and other planting material. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA. p. 73.,
- SCHAAD, N.W., BERTHIER, Y., SECHLER, A., KNORR, D. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Potato Tubers by BIO-PCR and an Automated Real-Time Fluorescence Detection System. *Plant Dis.* 83: 1095-1100.
- SCOTT-FORDSMAN J.J., WEEKS J.M., HOPKIN S.P. 2000. Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm *Eisenia fetica*, using neutralred retention assay. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 19: 1774-1780.
- SEAL, S.E., JACKSON, L.A., AND DANIELS, M.J. 1992. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3751-3758
- SEATTLER, A. W., SCHAAD, N. W. and ROTH, D. A. 1989. Detection of Bacteria in Seed and Planting Material. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 122pp.
- SEVGİCAN, A. 1999. Örtüaltı Sebzeçiliği (Topraksız Tarım). Ege Univ. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 526 Bornova, İZMİR
- SILVER S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions a review. *Gene* 179: 9-19.
- SIJAM, K., CHANG, C.J., and GITAITIS, R.D. 1991. An agar medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. *Phytopathology* 81: 831-834
- SMIDT, M. and VIDAVER, A.K. 1986. Population dynamics of *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense* in field-grown dent corn and popcorn. *Plant Disease*, 70: 1031-1036.
- SMIDT, M.L., VIDAVER, A.K., 1987. Variation among stains of *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskensis* isolated from a single popcorn field. *Phytopathology* 77, 388-392.
- SMITH, E.F. 1910. A new tomato disease of economic importance (Abstr.). *Science* (N.S) 31: 794-796

- STALL, R. E., LOSCHKE, D. C., and JONES, J. B., 1986. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Dis. Rep.* 46: 389-392.
- STALL, R.E. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper. In: J. G. Swings, and E. L. Civerola (Editors), *Xanthomonas*, Chapman and Hall, London, United Kingdom pp: 57-60
- STALL, R.E. 1995. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: U.S. Singh, R.P. Singh, K. Kohmoto (Editors), Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases Volume I: Prokaryotes, Elsevier Science Ltd. Great Britain pp: 167-181
- STALL, R.E., BEALIEU, C., EGEL, D., HODGE, N.C., LEITE, R.P., MINSAVAGE, G.V., BOUZAR, H., JONES, J.B., ALVAREZ, A.M., AND BENEDICT, A.A. 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in a pathovar of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int.J. Syst. Bacteriol.*, 44: 47-53
- STAMOVA, L. SOTIROVA, V. 1987. Reaction of different crops to artificial inoculation with *Corynebacterium michiganense*. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz* 23, 211-216.
- STASKAWICZ B.J., MUDGETT M.B., DANGL J.L., GALAN J.E. 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* 292: 2285-2289.
- STRIDER, D.L. 1969. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. *North Carolina Agric. Exp. Stn., Tech. Bull.*, 193.
- SZUREK, B., ROSSIER, O., HAUSE, G., and BONAS, U. 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.*, 46:13-23.
- THARAUD, M., MENGGAD, M., PAULIN, J.P. and LAURENT, J. 1994. Virulence, growth and surface characterization of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. *Microbiology* 140: 659-669.
- THOMPSON, E.T. 1986. The toxicity of a number of different bacteriocides to *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (Smith 1910) Jensen 1934 comb. nov. basonym *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (AL)

- and to the tomato plant, *Lycopersicon esculentum*. *J. Appl. Bacteriol.*, 61: 427-436.
- THYR, B.D. 1969. Assaying tomato seeds for *Corynebacterium michiganensis*. *Plant Disease Reporter*, 5: 858-860.
- THYR, B.D., WEBB, R.E., KAWORSKIC, A., and RATCLIFTE, T.J. 1973 Tomato bacterial canker: control by seed treatment. *Plant Disease Reporter* 57: 974-977.
- THYR, B.D., SAMUEL, M.J. and BROWN, P.G. 1975. New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. *Plant Disease Reporter*, 59: 595-598.
- TSIANTOS, J. 1987. Transmission of the bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *J. Phytopathol.*, 119: 142-146.
- TSUCHIYA, K., D'URSEL, C.M, HORITA, M., NOZU, Y. 2003. Relation of Japanese *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* with worldwide strains revealed with three specific monoclonal antibodies. *J Gen Plant Pathol* 69:310–315
- TSUCHIYA, K., D' URSEL, C.C.M. 2004. Development of a sensitive ELISA using three monoclonal antibodies against lipopolysaccharides to detect *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, the causal agent of bacterial spot of tomato and pepper. *J. Gen Plant Pathol.*, 70: 21–26
- UMESHA, S., 2006. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. *Crop. Prot.*, 25: 375–381.
- VAN DEN BULK, R.W., LOFFLER, H.J.M. and DONS, J.J.M. 1990 Inhibition of callus development from protoplasts of *Lycopersicon peruvianum* by extracellular polysaccharides of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Sci.*, 71: 105–112.
- VAN DROEMME, J., BAEYEN, S., VAN VAERENBERGH, J., DE VOS, P., and MAES, M. 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology*, 57: 438–444
- VAN HEUSDEN A.W., KOORNNEEF M., VOORRIPS R.E., BRUGGENMANN W., PET G., VRIELINKVAN-GINKEL R., CHEN X., LINDHOUT P. 1999. Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Theor and Appl Genet* 99: 1068-1074.

- VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTERS, K., AND SWINGS, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int.J. Syst. Bacteriol.*, 45: 472-489
- VOLCANI, Z., 1969. The Effect of Mode of irrigation and wind direction on disease severity caused by *Xanthomonas vesicatoria* on tomato in Israel. *Plant Disease Reporter*, 53: 459-461.
- WALLIS, F.M. 1977. Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiol. Plant Pathol.*, 11: 333-342.
- WARD, H.P. and O'GARRO, L.W., 1992. Bacterial spot of pepper and tomato in Barbados. *Plant Dis.*, 76:1046-1048.
- WEI W.S., PLOVANICH J.A., DENG W.L., JIN Q.L., COLLMER A., HUANG H., HE S.Y. 2000. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2247-2252.
- WELLER, S. A., ELPHINSTONE, J.G., SMITH, N.C., BOONHAM, N., and STEAD, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 2853–2858
- WERNER, N.A., FULBRIGHT, D.W., PODOLSKY, R., BELL, J., and HAUSBEEK, M.K. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Disease*, 86: 535-542.
- WELLHAUSEN E.J. 1938. Infection of maize with *Phytomonas flaccumfaciens*, *P. insidiosa*, *P.michiganensis*, *P.campestris*, *P. pannici* and *P. striafaciens*. *Phytopathology*, 18: 475-482
- WRIGHT, S., and MILLER, S. A. 2000. Evaluation of methods for biological and chemical control of bacterial spot and other diseases of tomato and pepper. *Phytopathology* 90:S85. (Abstract).
- YOUNG, D.H., SEQUEIRA, L., 1986. Binding of *Pseudomonas solanacearum* fimbriae to tobacco leaf cell walls and its inhibition by bacterial extracellular polysaccharides. *Physiol.Mol. Plant Pathol.*, 28, 393–402.

ÖZGEÇMİŞ

Deniz ÇAPLIK, 1984 yılında Mardin' de doğdu. İlk öğretimini Adana'da, Orta ve Lise öğretimini büyük kısmını İstanbul' da okuduktan sonra liseyi Diyarbakır' da tamamladı. 2003 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği programı Bitki Koruma Bölümünden 2007 yılında bölüm ikincisi olarak mezun oldu. 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı' nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen aynı bölümde çalışmalarına devam etmektedir.