



Tokat İlinde Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığının Yaygınlığı ve Etmenin (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) Tanılanması

Sabriye BELGÜZAR¹ Yusuf YANAR¹ Yeşim AYSAN²

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Tokat

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana

*e-mail: sabriye.yazici@gop.edu.tr

Alındığı tarih (Received): 17.02.2016

Kabul tarihi (Accepted): 25.05.2016

Online Baskı tarihi (Printed Online): 20.06.2016

Yazılı baskı tarihi (Printed): 26.09.2016

Öz: Bu çalışmada, 2011 ve 2012 yıllarında Tokat ilinde domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Merkez, Pazar, Turhal, Niksar ve Erbaa ilçelerinde domates üretim alanlarında sürvey yapılarak domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranları belirlenmiş, hasta bitki örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testleri, serolojik (ELISA), moleküler (PCR) ve yağ asit metil ester (Fatty Acid Methyl Ester: FAME) analizleri ile tanısı yapılmıştır. Yapılan sürvey çalışmalarında 2011 yılında hastalığın tarlada bulunma oranı ortalama %9.64, 2012 yılında ise %4.98 olarak belirlenmiştir. Bölgede hastalığın bulunma oranı ise 2011 yılında Merkez'de %88.88, Niksar'da %54.54, Erbaa'da %52.38, Turhal'da %46.15 ve Pazar'da %18.18 olarak, 2012 yılında ise Erbaa'da %61.90, Merkez'de %52.85, Turhal'da %47.72 ve Pazar'da %44.44 olarak belirlenmiştir. Niksar'da ise hastalık saptanmamıştır. Sürveylerde toplanan hasta bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu 2011 yılında 99 adet, 2012 yılında ise 163 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. İzolatların 135 adeti domateste solgunluk hastalığına neden olan patojen olarak belirlenmiş olup, izolatlar yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler ile tanıyı destekleyici ELISA, PCR ve FAME ile *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak tanılanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, domates bakteriyel solgunluk, Tokat, ELISA, PCR, FAME

Indensity of Bacterial Wilt Disease of Tomato in Tokat and Identification of Disease Agent (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)

Abstract: This study aimed to determine the intensity of bacterial wilt disease of tomato in Central, Pazar, Turhal, Niksar and Erbaa counties which are main tomato production areas of Tokat. For this purpose surveys were conducted during the 2011 and 2012 growing seasons. For identification of the bacterial isolates, which were isolated from infected plant samples, morphological, physiological and biochemical tests were performed and also serological (ELISA), molecular (PCR) and fatty acid methyl-ester (FAME) analysis were conducted. Based on the survey results, the average disease intensities were 9.64% and 4.98% in 2011 and 2012 respectively. In 2011, the disease prevalences in Central, Niksar, Erbaa, Turhal and Pazar counties were 88.88%, 54.54%, 52.38%, 46.15% and 18.18% respectively. In 2012 the disease prevalence in Erbaa, Central, Turhal, Pazar counties were 61.90%, 52.85%, 47.72%, and 44.44% respectively. Disease was not determine in Niksar. In 2011, 99 bacterial isolates were isolated from infected plant samples. Number of bacterial isolates, obtained from infected plants, were 163 in 2012 survey. 135 bacterial isolates were determined as causal agent of bacterial wilt disease. These bacterial isolates were identified as *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by morphological, physiological and biochemical tests and confirmed by ELISA, PCR and FAME analysis.

Keywords: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Tomato Bacterial Wilt Disease, identification, Tokat, ELISA, PCR, FAME.

1. Giriş

Ülke ekonomisinde çok önemli bir yeri olan domates (*Solanum lycopersicum* L) yetiştirme

yapılan bölgelerde çiftimizin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır. Dünya'da ve Türkiye'de taze ve işlenerek

tüketimi en başta gelen sebzeler arasında yer almaktadır. Domates iç piyasada taze olarak tüketilmesinin yanı sıra gıda endüstrisinde de ham madde olarak kullanılmakta, dış pazarlara ise taze olarak veya işlenerek ihraç edilmektedir. Üretim miktarı açısından, ülkemiz Çin, Hindistan ve Amerika Birleşik Devletleri'nden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (FAO 2014).

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

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

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

değişen oranlarda ürün kaybına neden olmuştur. Bu yıllarda üretici bazındaki ürün kaybı ise %60'nin üzerinde görülmüştür (Sherf ve Macnab 1986).

Ülkemizde ise domates bakteriyel solgunluk hastalığının varlığı Tokgönül (1998)'ün bildirdiğine göre ilk olarak İç Anadolu bölgesinde (Bremer ve Özkan 1950) saptandıktan sonra, Güney Doğu Anadolu (Bremer ve ark. 1952), Marmara (Karahana 1965) ve Ege bölgesinde (Karaca ve Saygılı 1977) tespit edilmiştir. Daha sonra ülkemizin farklı bölgelerinde domates üretim alanlarında yapılan çalışmalarla hastalığın Doğu Akdeniz, Orta Anadolu, Doğu Anadolu ve Akdeniz Bölgesi'nde bulunduğu ortaya konulmuştur (Çınar 1980, Öktem ve Benlioğlu 1993, Şahin ve ark. 2002, Basım ve ark. 2004). Bu çalışmalarla, ülkemizde domates üretim alanlarında Cmm'nin sebep olduğu domates bakteriyel solgunluk hastalığının yaygınlığının %0.5-100 arasında değiştiği belirlenmiştir (Öktem 1984, Özyılmaz 2001, Şahin ve ark. 2002, Basım ve ark. 2004, Çetinkaya-Yıldız 2007).

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

Bu çalışma ile Tokat ilinde domates üretim alanlarında domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranları ortaya konulmuş, hasta bitki örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testleri, serolojik (ELISA), moleküler (PCR) ve yağ asit metil ester (Fatty Acid Methyl Ester: FAME) analizleri ile tanıları yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmanın ana materyalini Tokat ili Merkez, Pazar, Turhal, Niksar ve Erbaa ilçelerinde domates üretim alanlarındaki hastalıklı domates bitkilerinden elde edilen *Cmm* izolatları oluşturmaktadır. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Laboratuvarı stok kültürlerinde bulunan virulent YY-2 izolatı kullanılmıştır.

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

Sürvey Çalışmaları ve Etmenin İzolasyonu

Domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranlarının belirlenmesi için 2011 ve 2012 yıllarında Tokat ili Merkez, Niksar, Erbaa, Turhal ve Pazar ilçelerinde domates üretim alanlarında, Tokat İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nden alınan veriler doğrultusunda sürveyler yapılmıştır. Örneklenme alanı, ilçe bazında mevcut ekiliş alanının %0.2'si olacak şekilde belirlenmiştir. Örneklemelerde hastalığın bulunma oranı Bora ve Karaca (1970)'nin belirttiğine göre hesaplanmıştır. Domates bakteriyel solgunluk hastalığından şüphelenilen bitkilerin özellikle iletim demetlerinden bakteri izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemlerinde *Pseudomonas* Agar F (PSF; Proteose Peptone 10 g, Tryptone 10 g, Gliserin 10 ml, K_2HPO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, Agar 15 g, Distile Su 1000 ml) besi yeri kullanılmıştır. Yapılan izolasyonlarda petrilere gelişen koloniler incelenmiş ve açık sarı renkli koloni morfolojisine sahip olan

koloniler saflaştırılarak saf kültürler elde edilmiştir.

Gram Reaksiyon ve Patojenite Testleri

Taze hazırlanmış %3'lük Potasyum Hidroksit (KOH) solüsyonu kullanılarak yapılan Gram reaksiyon testinde, lam üzerinde viskoz, yapışkanimsi bir uzama oluşturmeyen izolatlar Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sands 1990).

Sera koşullarında yürütülen patojenite çalışmalarında ise, Alsancak RN F1 domates çeşidi kullanılmıştır. *Pseudomonas* Agar F besi yerinde 72 saat geliştirilmiş olan bölge izolatları spektrofotometrede 600 nm 0.2 absorbans değerine (10^8 hücre/ml yoğunluğuna) ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan, steril enjektör yardımıyla 100 µl alınarak, 3-5 yapraklı domates bitkilerinin gövde kabuk altından inokule edilmiştir. Pozitif kontrol olarak YY-2 izolatı, negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. İnokulasyona bırakılan bitkilerde hastalık değerlendirmesi Francis ve ark. (2001) tarafından verilen 0-5 skalasına göre yapılmıştır. Skala değerleri enfekteli bitkilerdeki solgunluk, yaprak yanıklığı ve kanser yarısı oluşumuna göre belirlenmiştir. Bu üç belirti de bitkide orta düzeyde görülüyor ise her bir simptome 1 değeri verilmiştir. Buna göre bu 3 belirtiyi sergileyen bitkide hastalık şiddeti 3 olarak tanımlanmıştır. Bu belirtilerin her birinin şiddetli veya zayıf olması durumunda 0,5 birim artırma veya azaltma yapılmıştır. Yani her üç belirtide bitkide zayıf düzeyde görülüyor ise skala değeri 1,5 olarak tanımlanmıştır. Her üç semptomun şiddetli olması durumunda skala değeri 4,5 olarak tanımlanmıştır. Bitki ölmüş ise skala değeri 5 olarak verilmiştir. Ayrıca bitkilerde sağlıklı ve hastalıklı yaprak sayımı yapılmış, çiçek oluşumu kaydedilmiş, iletim demetlerindeki nekroz uzunluğunun bitki boyuna oranı alınarak yüzde nekroz oranı elde edilmiştir. İzolatların virülenslik düzeylerini belirlemek için, yapılan gözlemlerde elde edilen veriler, SAS istatistik programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuştur ve ortalamalar arasındaki fark LSD testi kullanılarak

değerlendirilmiştir. Ölçümü yapılan bitkilerden izolasyon yapılarak re-izolatlar elde edilmiştir.

Taniyi destekleyici testler

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

Tokat ilinde 2011 ve 2012 yıllarında hasta domates bitkilerinden elde edilen izolatlar patojenite ve Gram reaksiyon testi ile *Cmm* olarak belirlenmiş olup, bu taniyi desteklemek amacıyla da 150 adet re-izolatla ELISA testi yapılmıştır. Çalışmada *Cmm*'e karşı üretilen monoklonal antibody (Agdia marka ticari kit-AGD 44000) kullanılarak, Alkalın Fosfataz ile işaretlenmiş DAS ELISA testi yapılmıştır. Pozitif ve negatif kontrol olarak kit içerisinde hazır olarak gelen kontroller kullanılmıştır. Her bir uygulama 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. ELISA testi firma tarafından belirtilen prosedür esas alınarak uygulanmıştır. ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okuma yapılarak absorbans değerleri sonuçlarına göre değerlendirme yapılmıştır. Örneklerden elde edilen absorbans değerleri, negatif kontrolün iki katından fazla olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

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

Tokat ilinde 2011 ve 2012 yıllarında hasta domates bitkilerinden elde edilen ve klasik tanı, ELISA testi ile tanılanan 57 adet tesadüfi olarak seçilen *Cmm* izolatından Genomik DNA izolasyonu Nejat ve ark. (2009)'a göre yapılmıştır. Patojene spesifik olan CMM5:5'-GCCAATAAGCCCATATCAA-3' ve CMM6:5'-CGTCAGGAGGTTCGCTAATA-3' primer dizilimleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında %1'lik agaroz jel üzerinde Dreier ve ark. (1995)'nın bildirdiği gibi 614 bp büyüklüğünde bant oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

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

Çalışmada elde edilen *Cmm* izolatlarının yağ asit profil analizleri Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde yapılmıştır. Patojenite, ELISA ve PCR çalışmaları

sonucu pozitif olarak kabul edilen ve tesadüfi olarak seçilen 13 izolatın yağ asit profilleri belirlenmiştir. İzolatların yağ asitlerinin izolasyonu Chase ve ark. (1992)'nın belirttiği prosedüre göre yapılmıştır. Yağ aistleri izole edilen örnekler, Mikrobiyal Identifikasyon Sistemin (MIS cihazı-HP6890, HewlettPackard, Palo Alto, CA) üzerindeki örnek depolama birimine yerleştirilmiş ve daha sonra MIS bilgisayar paket programı kullanılarak (Shelock MIS version 4.5 Microbial ID. Inc. Newark, Delaware) her izolat program kütüphanesindeki bakteri izolatları ile benzerlik oranlarına göre tanılanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Tokat ili Merkez ve ilçelerinde domates üretim alanlarında, domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranlarının belirlenmesi için 2011 yılı Temmuz-Eylül, 2012 yılı Haziran-Eylül aylarında survey çalışmaları yapılmıştır. 2011 yılında Tokat Merkezde 9, Pazar ilçesinde 11, Turhal'da 13, Erbaa'da 21 ve Niksar'da da 21 olmak üzere toplam 65 domates tarlasında survey yapılmıştır. 2012 yılında ise Merkezde 70, Pazar'da 18, Turhal'da 44, Erbaa'da 21 ve Niksar'da ise 10 olmak üzere toplam 163 domates tarlasında survey yapılmıştır.

Survey yapılan alanlarda tesadüfi olarak seçilen 100 adet bitki incelenerek hastalık belirtisi gösterip göstermediği kaydedilmiş ve hastalığın tarladaki bulunma oranı hesaplanmıştır. Çizelge 1 ve Çizelge 2'de 2011 ve 2012 yıllarında ilçe bazında hastalığın bölgedeki ve tarladaki bulunma oranı verilmiştir.

Çizelge 1 incelendiğinde, 2011 yılında hastalığın Tokat Merkez'de 111 da'lık survey alanında bitkilerin %12.44'ünde, Pazar ilçesinde 62 da'lık alanda bitkilerin %3.72'sinde, Turhal'da 199 da'lık alanda bitkilerin %9.69'unda, Erbaa'da 85 da'lık alanda bitkilerin %10.71'inde ve Niksar'da ise 86 da'lık alanda bitkilerin %11.18'inde yaygınlık gösterdiği görülmektedir. 2012 yılında ise hastalık Tokat Merkez'de 513.5 da'lık survey alanında bitkilerin %6.51'inde, Pazar ilçesinde 131 da'lık alanda bitkilerin

%3.61'inde, Turhal'da 404 da'lık alanda bitkilerin %5.25, Erbaa'da 129 da'lık alanda bitkilerin %2.9'unda yaygınlık göstermesine rağmen, Niksar'da domates bakteriyel solgunluk hastalığına rastlanılmamıştır (Çizelge 2). Diğer taraftan Merkez'de 9 araziden 8'inde hastalık görülmüş olup hastalığın bölgedeki bulunma oranı %88.88 olarak belirlenmiştir. Diğer ilçelerde ise bu oran sırasıyla Niksar'da %54.54, Erbaa'da %52.38, Turhal'da %46.15 ve Pazar'da %18.18 olarak belirlenmiştir. 2012 yılı verilerine bakıldığında ise, bölgedeki hastalığın bulunma oranı Erbaa'da %61.90, Merkez'de %52.85, Turhal'da %47.72, Pazar'da %44.44 olarak belirlenmiştir (Çizelge 2).

Bölgede 2008-2009 yıllarında yapılan survey çalışmalarında hastalığın bölgedeki bulaşıklık oranının %1.65 gibi çok düşük oranda olduğu rapor edilirken (Saygı, 2010), özellikle ön çalışmaların yürütüldüğü 2010 yılında hastalığın hızlı bir şekilde artış gösterdiği ve %2-100 arasında değişen oranlarda ürün kayıplarına neden olduğu görülmüştür (Yazıcı ve ark. 2011). Bölgede 2010 yılından itibaren hastalığın bu kadar hızlı bir şekilde artış göstermesinde, hastalık gelişimi için özellikle sıcaklık oldukça etkili olmuştur. Hastalığın epidemiy yapmasında, bölgede tek bir domates çeşidinin yetiştirilmiş olması ve bölgeye dışarıdan gelen fidelerin hastalık ile bulaşık olmasının da oldukça etkili olduğu düşünülmektedir. Özellikle hastalığın gelişiminde fide kaynaklı bir enfeksiyonun rol oynadığı düşünülmektedir.

Çizelge 1. 2011 yılında Tokat ilinde hastalığın bölgedeki ve tarladaki bulunma oranı

İlçe	Survey Alanı (da)	Hastalığın Bölgedeki Bulunma Oranı (%)	Hastalığın Tarladaki Bulunma Oranı (%)
Merkez	111	88.88	12.44
Niksar	86	54.54	11.18
Erbaa	85	52.38	10.71
Turhal	199	46.15	9.69
Pazar	62	18.18	3.72

Çizelge 2. 2012 yılında Tokat ilinde hastalığın bölgedeki ve tarladaki bulunma oranı

İlçe	Survey Alanı (da)	Hastalığın Bölgedeki Bulunma Oranı (%)	Hastalığın Tarladaki Bulunma Oranı (%)
Merkez	513.5	52.85	6.51
Pazar	131	44.44	3.61
Turhal	404	47.72	5.25
Erbaa	129	61.90	2.90
Niksar	74	0	0

Yapılan bu çalışmada, hasta bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu 2011 yılında toplam 99 adet bakteri izolatu, 2012 yılında ise toplam 163 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Yapılan Gram reaksiyon testinde 2011 yılında elde edilen toplam 99 adet izolattan 86'sı, 2012 yılında elde edilen toplam 163 adet izolattan 111 adeti Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir. Patojenite testinde ise, yapılan uygulamalardan 20 gün sonra ilk belirtiler görülmeye başlanmış olup, hastalık değerlendirmesi uygulamadan 30 gün sonra yapılmıştır. Hastalık şiddeti, iletim demetlerinde kahverengileşme oranı ve solgun yaprak sayısına göre değerlendirme yapılmıştır. Uygulama yapılan bitkilerde kanser belirtisi görülmemiş olup, belirgin bir şekilde solgunluk ve yaprak yanıklığı belirtilerine rastlanılmıştır. Hastalık şiddetinin skala değeri 2011 yılı izolatlarının 60'ında, 2012 yılı izolatlarının 35'inde 5 olarak kaydedilmiştir. Uygulama yapılan bitkilerde iletim demetlerindeki kahverengileşme oranları 2011 yılı izolatların uygulandığı bitkilerde %0-100 arasında, 2012 yılında %21.17-100 arasında değişmiştir. Uygulamaların yapıldığı bitkilerdeki solgun yaprak oranı incelendiğinde, 2011 yılı izolatlarında %0-100 arasında, 2012 yılı izolatlarında %20.37-100 arasında değişmiştir.

Tanıyı destekleyici testlerden ELISA testinde, 2011 yılı izolatlarıyla yapılan testlemede, Pozitif Kontrolde absorbans değeri 2.903, Negatif Kontrolde 0.208 olarak belirlenirken, izolatların 70'inde 405 nm'de absorbans değerleri 1.719-3.392 arasında değişmiştir. Testlenen 70 izolatın 70'i de *Cmm* olarak tanımlanmıştır. 2012 izolatlarının Pozitif Kontrolde absorbans değeri 3.179, Negatif Kontrolde 1.348 olarak

belirlenmiştir. İzolatların 405 nm'de absorbans değerleri 1.273-3.577 arasında değişmiştir. Absorbans değerleri negatif kontrolün iki katından fazla olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiş olup, testlenen 80 izolattan 76'sı *Cmm* olarak tanımlanmıştır.

Hasta domates bitkilerinden elde edilen ve klasik tanı, ELISA testi ile tanımlanan 57 adet *Cmm* izolatu ile CMM5 ve CMM6 primerleri kullanılarak PCR çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda 57 izolattan 34'ünün %1'lik agaroz jel üzerinde 614 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu saptanmıştır.

Patojenite, ELISA ve PCR çalışmaları sonucu pozitif olarak kabul edilen 13 izolatın içerdikleri yağ asit kompozisyonu ve bunların bulunma oranları (%) Mikrobiyal Identifikasyon Sisteminin Sherlock version 6.0B Mikrobial ID. Inc. Newark programı kullanılarak tanımlanmıştır. *Cmm* izolatlarından 14:0 iso, 14:0, 15:1 iso G, 15:1 anteiso A, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 N alcohol, 16:0 iso, 16:0, 17:0 iso, 17:0 anteiso, 17:0 cyclo, 17:0, 18:0 iso, 18:0 yağ asitleri elde edilmiştir. Yağ asitlerinin bulunma oranları incelendiğinde, izolatlar arasında büyük ölçüde benzerlik gösterdiği, 14:0 iso, 14:0, 15:1 anteiso A, 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 16:0, 17:0 iso, 17:0 anteiso ve 17:0 yağ asitlerinin her izolatta bulunduğu görülmüştür. Özellikle izolatlarda 15:0 anteiso ve 17:0 anteiso yağ asitleri yüksek oranlarda bulunurken, *Cmm* için karakteristik olan 15:1 anteiso A'nın (Gitaitis ve Beaver 1990) da ortalama %2.29 oranında bulunduğu görülmüştür. Çalışmamızda izole ettiğimiz 13 adet izolat yağ asit metil ester analizi ile %58-82 oranında *Cmm* olarak tanımlanmıştır. Bu değerler yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Örneğin; Doğu Anadolu Bölgesinde Şahin ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada Oltu, İspir ve Yusufeli'nde yapılan surveylerden elde edilen 16 izolatın yağ asit metil ester analizleri yapılmış olup, izolatların %47-89 benzerlik oranıyla *Cmm* olduğu saptanmıştır. Yine, Çetinkaya-Yıldız (2007), Mersin ve Adana illerinden elde ettikleri 6 adet izolatu yağ asit analizlerine göre yaptıkları tanıda %41-81 oranında *Cmm* olarak tanımlanmışlardır.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Tokat ilinde domates bakteriyel solgunluk hastalığının bölgedeki ve tarladaki bulunma oranları belirlenmiştir. *Cmm* sistemik yayılan bir hastalık etmeni olması nedeniyle genelde infekteli tohumlarla taşınmakta, ayrıca hastalıklı bitki artıkları ve bulaşık topraklarla gelecek üretim sezonuna aktararak büyük ürün kayıpları meydana getirebilmektedir. Patojen ayrıca çeşitli yabancı otlarda, değişik malzemeler (fide saksısı, oluk vb.), sera konstrüksiyon malzemeleri ve çeşitli aletler üzerinde de yaşamını devam ettirebilmektedir (Gitaitis ve Beaver 1990, Gleason ve ark. 1991, Gleason ve ark. 1993). Etmenin farklı yerlerde yaşamını sürdürebilme özelliğinden dolayı mücadelesinde zorluklar yaşanmaktadır. Ayrıca etmene karşı alınabilecek etkin bir mücadele yöntemi de bulunmamaktadır. Hastalık ile mücadele edilebilmesi için öncelikle tarla koşullarında hastalığı iyi bir şekilde tanımak gerekmektedir. Yapılan bu çalışma ile Tokat bölgesindeki izolatların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri belirlenmiş olup, serolojik (ELISA), moleküler (PCR) ve yağ asit metil ester (Fatty Acid Methyl Ester: FAME) analizleri ile tanısı yapılmıştır.

4. Teşekkür

Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından desteklenen 2011/102 nolu proje kapsamında yapılmıştır. Çalışmada elde edilen *Cmm* izolatlarının yağ asit profillerinin belirlenmesinde, katkılarından dolayı Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN ve laboratuvar ekibine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Anonim (2013). Tokat İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Tarım İstatistikleri.
- Basım E, Basım H, Dickstein ER and Jones JB (2004). Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean Region of Turkey, Plant Disease, 88:1048.
- Bora T ve Karaca İ (1970). Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, 43s.

- Chase AR, Stall RE, Hodge NC and Jones JB (1992). Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from Aroids using physiological, pathological and fatty acid analysis. *Phytopathology*, 82, 754-759.
- Çetinkaya-Yıldız R (2007). Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.)'nin Tanınması ve Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakteriler İle Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması. (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. Adana.
- Çınar Ö (1980). Bakteriyel Domates Solgunluğu Hastalığı (*Corynebacterium michiganense* (Erwin. F. Smith) Jensen)'nin Tanımı, Savaş Yöntemleri ve Etmene Karşı Dayanıklı Domates Çeşitleri Üzerine Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 139- Bilimsel Araştırma ve İnceleme Tezleri.
- Dreier J, Bermpohl A and Eichenlaub R (1995). Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 85, 462-468.
- FAO (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical database.
- Francis DM, Kabelka E, Bell J, Franchino B and Clair StD (2001). Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease*, 85, 1171-1176.
- Gitaitis RD and Beaver RW (1990). Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 80, 318-321.
- Gleason ML, Braun EJ, Carlton WM and Peterson RH (1991). Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81:1519-1523.
- Gleason ML, Gitaitis RD and Ricker MD (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 77:1069-1076.
- Karaca İ ve Saygılı H (1982). Batı Anadolu'nun bazı illerinde domates ve biberde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar. III. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 12-15 Ekim, Adana, 182-192.
- Nejat N, Sijam K, Abdullah SNA, Vadamalai G and Dickinson M (2009). Molecular characterization of a phytoplasma associated with Coconut Yellow Decline (CYD) in Malaysia. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (7), 1331-1340.
- Öktem YE (1984). Domates bakteriyel solgunluğu (*Corynebacterium michiganense*)'nin Ankara İlindeki yayılışı, etmenin toprak ve bitkiden izolasyonu ile bitki artıklarında yaşama süresi üzerine çalışmalar. Türkiye'de Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Sempozyumu, 8-10 Şubat, s 27, Ege Üniversitesi, Atatürk Kültür Merkezi, İzmir.
- Öktem YE ve Benlioğlu K (1993). Orta Anadolu Bölgesi'nde domates ekim alanlarında bakteriyel hastalıklar üzerinde ön çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 33 (1-2).
- Özyılmaz Ü (2001). Aydın İlinde Sera Domateslerinde Toprak Kaynaklı Bakteriyel Hastalıkların Saptanması. (Yüksek Lisans Tezi), Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın.
- Sands DC (1990). Physiological criteria-determinate tests. In: *Methods in Phytobacteriology*. (Edts. Klement, Z.; Rhudolf, K.; Sands, D. C.) Academia Kiado, Budapest, Hungary.
- Saygı S (2010). Tokat Domates Üretim Alanlarında Bakteriyel Kanser (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.) Hastalığının Rastlanma Sıklığı ve Bu Hastalığa Karşı Domates EBR3 Mutantlarının Reaksiyonlarının Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Tokat.
- Sherf AF and Macnab AA (1986). *Vegetable diseases and their control*. AWiley Interscience Publication, New York, 711 p.
- Şahin F, Uslu H, Kotan R ve Dönmez MF (2002). Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. *Plant Pathology*, 51, 399.
- Tokgönül S (1998). Ticari Domates Tohumlarında Bakteriyel Solgunluk Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'nin Saptanması ve Etmene Karşı Mücadele Olanakları Üzerinde Araştırmalar. (Doktora Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana.
- Yazıcı S, Karamustafaoğlu İ, Aysan Y ve Yanar Y (2011). Tokat yöresi domates alanlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olduğu domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş, s 331.