

Investigation on the Appropriate Method for Determination of Epiphytic Population of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato

Sabriye BELGÜZAR¹ Sümer HORUZ² Yeşim AYSAN³ Yusuf YANAR^{1,4}

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

²Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Kayseri/ TÜRKİYE

³Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana/ TÜRKİYE

⁴Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi, Bişkek/KIRGIZISTAN

Corresponding author e-mail:sabriye.yazici@gop.edu.tr

Accepted by 18 December 2017

ABSTRACT

This study was conducted to determine the most appropriate method for determining the presence of causal agent of tomato bacterial wilt disease *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) in symptomless tomato seedlings. Tomato seedlings were infected with different concentrations of *Cmm* and sampled at different time intervals. The presence of the pathogen in infected seedling tried to determine by plating on King B medium and a semi-selective *Clavibacter* Medium (SCM) and by using serological (DAS-ELISA) and molecular (PCR) methods. At the end of the study, both methods (plating on King B and DAS-ELISA) did not give any positive results even though the presence of the pathogen in leaves and vascular bundles of infected tomato seedlings. The presence of the pathogen is determined successfully in infected tomato seedling 24 hours post-inoculation by plating on SCM and performing specific PCR tests with bacteria grown on the medium. As a result of the study, tomato seedlings were tested with this method in terms of the presence of the pathogen, revealing the role of epiphytic infection in the regional epidemiology of the disease.

Key words: Tomatoes, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, epiphytic, PCR

ÖZET

Domateste *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Epifitik Popülasyonunun Belirlenmesinde Uygun Yöntemin Seçimi

Bu çalışma, hastalık belirtisi göstermeyen domates fidelerinde Domates bakteriyel solgunluk hastalığına sebep olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)'in varlığı belirlenirken kullanılacak en uygun yöntemin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Farklı *Cmm* konsantrasyonları ile domates fideleri bulaştırılmış ve farklı zaman dilimlerinde örneklemeler yapılarak patojenin varlığı genel bir besi yeri olan King B, yarı seçici besi yeri olan Selective *Clavibacter* Medium (SCM)'a ekim, serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonunda, *Cmm*'in iletim demetlerinde ve yeşil aksamda bulaşık olduğu halde, genel besi yerine ekim ve DAS-ELISA testi olumlu sonuç vermemiştir. SCM'ye ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak etmene spesifik PCR testleriyle, patojenin varlığı 24 saat sonra başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Çalışma sonucunda belirlenen bu yöntemle domates fideleri bu patojenin varlığı yönünden incelenmiş olup, hastalığın bölgesel epidemiyolojisinde epifitik bulaşıklığın rolü ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Domates, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, epifitik, PCR.

* Bu çalışma 3-5 Şubat 2014 tarihleri arasında Antalya'da düzenlenen Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuş olup kongre kitabında kısa özet olarak basılmıştır.

GİRİŞ

Dünya’da ve Türkiye’de sofralık ve sanayilik üretimi en fazla olan sebze domates (*Solanum lycopersicum*)’tir. Ülke ekonomisinde çok önemli bir yeri olan domates yetiştirme yapılan bölgelerde çiftçimizin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır. Türkiye farklı iklim bölgelerine sahip oluşu, hem açık alanda hem de örtü altında sofralık ve sanayi domatesinin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Üretimi bu denli yaygın olarak 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. Bu bakteriyel hastalıklardan biri de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.’in neden olduğu bakteriyel solgunluk hastalığıdır (Jones ve ark., 1991).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) dünya çapında domates üretimini kısıtlayan en önemli bakteriyel etmenlerden biridir (Gleason ve ark., 1993). Etmen ilk kez 1909 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nin Michigan eyaletinde domates üretim alanlarında saptandığından beri, dünyanın domates yetiştirilen bütün bölgelerinde rapor edilmiştir (Gleason ve ark., 1993). Ülkemizde ise İç Anadolu, Güney Doğu Anadolu, Doğu Anadolu, Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgesinde bu hastalığının varlığı 1950’lerden beri bilinmektedir (Tokgönül, 1998; Çetinkaya-Yıldız 2007; Şahin ve ark., 2002; Basım, 2002).

Hastalık belirtileri sistemik veya lokalize olmuş enfeksiyonlardan meydana gelmelerine göre farklılık göstermektedir. İnfeksiyon tohum veya açılan yaralar yolu ile direkt iletim demetleri dokusu içerisine taşınan inokulumdan meydana gelirse sistemik enfeksiyonun belirtileri oluşur ve hastalık ilk olarak solgunluk ile kendini göstermeye başlar. Bitkiler sistemik olarak enfekte olduğu zaman genç fideler hızla solar ve çöker, yaşlı bitkilerde ise solgunluk belirtileri yavaş ve aşama aşama gerçekleşir. Enfekteli gövdelerde iletim demetleri başlangıçta sarımsı bir renk bozulması gösterir, daha sonra kahverengiyeye döner, özellikle dikey çatlak gövdelerdeki boğumlarda bu durum açıkça görülebilir. Eğer patojen hidatodlar gibi doğal açıklıklar veya tüylerin kırılması ile açılan yaralardan giriş yapmışsa, ilk olarak nekrozlar ve yaprak lekeleri ile kendini gösteren lokal belirtiler görülür. Yaprakçıkların kenar nekrozları genellikle lokalize olmuş enfeksiyonların ilk belirtileridir. Meyvelerde kuş gözü lekesi olarak bilinen ve taze olarak tüketilen meyvenin pazar değerini düşüren küçük (0.3 cm çapından daha küçük), beyaz hale ile çevrili kahverengimsi lezyonlar hastalık etmenin lokalize olmuş enfeksiyonlarında görülmektedir. İnfeksiyonun ilerleyen aşamalarında ise meyvede iletim demetlerinde sarılaşma ve kahverengileşme görülebilmektedir (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2013).

Solanaceae familyasından biber ve patlıcanda da hastalık oluşturabilme yeteneğindeki etmen, sadece domateste ekonomik zarar meydana getirir. Patojen bakteri, domatesin olmadığı dönemde tohumda, toprakta, topraktaki hastalıklı bitki artıklarında, çeşitli yabancı otlarda, değişik malzemeler (fide saksısı, oluk, vb), sera konstrüksiyon malzemeleri ve çeşitli aletler üzerinde yaşamını devam ettirebilir (Gitaitis ve ark., 1991; Gleason ve ark., 1991; Gleason ve ark., 1993).

Etmenin farklı yerlerde yaşamını sürdürebilme özelliğinden dolayı mücadelesinde zorluklar yaşanmaktadır. Sertifikalı tohum ve fide kullanımı bakteriyel solgunluk hastalığının mücadelesi için önemlidir. Ancak bu etmenle epifitik olarak yani düşük popülasyonda bakteriyle bulaşık olan tohumların da sertifika alabilme olasılığı bulunmaktadır. Bu şekildeki tohumlar ve yine bu tohumlardan elde edilen fidelerin kullanımı ile hastalık yayılabilmektedir (Chang ve ark., 1992).

Bu çalışma, hastalık belirtisi göstermeyen, üreticiler tarafından kullanılan domates fidelerinde *Cmm*’in varlığı belirlenirken kullanılacak en uygun yöntemin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla farklı *Cmm* popülasyonu ile domates fideleri bulaştırılmış ve farklı zaman dilimlerinde (24, 48, 72 ve 96 saat sonra) örneklemeler yapılarak patojenin varlığı yarı seçici besi yerine ekim, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmayla, hastalık belirtisi göstermeyen domates fidelerinde kullanılacak en uygun yöntem araştırılmıştır.

Bu çalışmada yanıt aranılan sorular: (1) Hastalık belirtisi göstermeyen domates fidelerinde bu patojen aranırken; yarı seçici besi yerine ekim, serolojik testlerden ELISA ve moleküler testlerden PCR yöntemlerinden hangisi en duyarlıdır? (2) Patojenin varlığını belirlemede yarı seçici besi yerine ekim, ELISA ve PCR tek başına mı

yoksa kombinasyon olarak mı kullanılmalıdır? (3) Eğer birkaç yöntem kombine olarak kullanılacaksa en uygun kombinasyon nedir? (4) Bu yöntemler patojenin sistemik infeksiyonunu ve üretim alanında su sıçratmasıyla bulaşan lokal infeksiyonları belirleyecek duyarlılıkta mıdır? (5) Patojenin farklı popülasyonu (10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ ve 10² hücre/ml) bulaştırılmış domates fidelerinde patojenin varlığı kaç gün (1, 2, 3 ve 4 gün) sonra bizim yöntemimizle saptanabilir? (6) Hastalık belirtisi göstermeyen domates fidelerinden tesadüfi olarak örnekleme yapıldıktan sonra yapılacak izolasyonlarda King B gibi genel bir besi yeri mi, SCM gibi yarı seçici olan bir besi yeri mi veya her ikisi mi kullanılmalıdır? (7) Domates örnekleri sıvı besi yerinde çalkalandıktan sonra elde edilen pelletten direk genomik DNA izolasyonu ile PCR ve ELISA çalışması mı yapılmalı, yoksa pellet besi yerinde geliştirildikten sonra gelişen bakterilerin genomik DNA'sı izole edilip PCR ve ELISA testleri mi yapılmalıdır?

Bu amaçla farklı *Cmm* konsantrasyonu ile domates fideleri bulaştırılmış ve farklı zaman dilimlerinde (24, 48, 72 ve 96 saat sonra) örneklemeler yapılarak patojenin varlığı yarı seçici besi yerine ekim, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmayla, hastalık belirtisi göstermeyen domates fidelerinde kullanılacak en uygun yöntem araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Domates Fideleri: İklim odasında yapılan saksı çalışmalarında, Mihrimah çeşidi (Yeniyayla köyü, Sarıçam/Adana) domates fideleri kullanılmıştır.

Patojen İzolat: Tokat ilinden izole edilen ve tanılanan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in YY-2 kodlu izolatu kullanılmıştır (Yazıcı ve ark., 2011).

Besi Yeri: Patojen bakterinin çoğaltılmasında besi yeri olarak King B (20 g Proteose peptone, 1.5 g K₂HPO₄. 3H₂O, 1.5 g MgSO₄. 7H₂O, 10 g Glycerol, 15 g Agar, 1000 ml Distile Su) (King ve ark., 1954) besi yeri ve SCM (0.1 g Yeast extract, 10 g Sucrose, 1.5 g H₃BO₃ (Boric acid), 0.25 g MgSO₄.7H₂O, 2 g K₂HPO₄, 1.5 g KH₂PO₄, 15 g Agar, 1000 ml Distile Su, 1.0 ml Potassium tellurite (%1 Chapman tellurite solüsyonu Difco), 121°C'de 15 dakika otoklav işleminden sonra soğuk steril edilen 30 mg Nalidixic acid, 100 mg (20 mg/ml distile su) Nicotinic acid, 200 mg Cycloheximide (200 mg/ml metanol) (Fatmi ve Schaad, 1988) besi yeri kullanılmıştır.

İklim Odasının Özellikleri: Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim dalında bulunan 25±2°C, %70 nem, 16 saat aydınlık 8 saat gece koşullarına sahip klima ile ısıtılan iklim odasında denemeler yürütülmüştür.

ELISA kiti: Çalışmada *Cmm*'e karşı üretilen monoklonal antibody (Agdia, AGD 44000) kullanılarak, Alkalın Fosfataz ile işaretlenmiş Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA testi yapılmıştır.

PCR malzemeleri: Iontek firması tarafından üretilen primer çifti (CM3: 5'- CCT CGT GAG TGC CGG GAA CGT ATC 3') ve (CM4: 5'- CCA CGG TGG TTG ATG CTC GCG AGA -3'), PCR master mix (Fermantas, SM0241), 100 bp'lik DNA ladder (Invitrogen, 15628019) kullanılmıştır.

Yöntem

King B besi yerinde 25°C'de 72 saat geliştirilmiş olan *Cmm*'in YY-2 kodlu izolatından steril su ile hazırlanan süspansiyonu, spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0.2 absorbans değerine ayarlanmış ve 9 ml saline buffer içerisinde (% 0,85 NaOCI) 6 kez seyreltilerek, patojenin 6x10⁸, 6x10⁷, 6x10⁶, 6x10⁵, 6x10⁴, 6x10³ ve 6x10² hücre/ml yoğunluğunda yedi farklı konsantrasyonda bitkilere inokule edilmek amacıyla hazırlanmıştır.

Patojen Bakterinin Domates Fidelerine Bulaştırılması

Sistemik infeksiyonu sağlamak amacıyla *Cmm*'in yedi farklı popülasyonundan 100'er µl süspansiyon, domates bitkisinin gövdesine steril bir enjektör yardımıyla tek bir noktadan inokule edilmiştir (Çetinkaya Yıldız,

INVESTIGATION ON THE APPROPRIATE METHOD FOR DETERMINATION OF EPIPHYTIC POPULATION OF *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* ON TOMATO

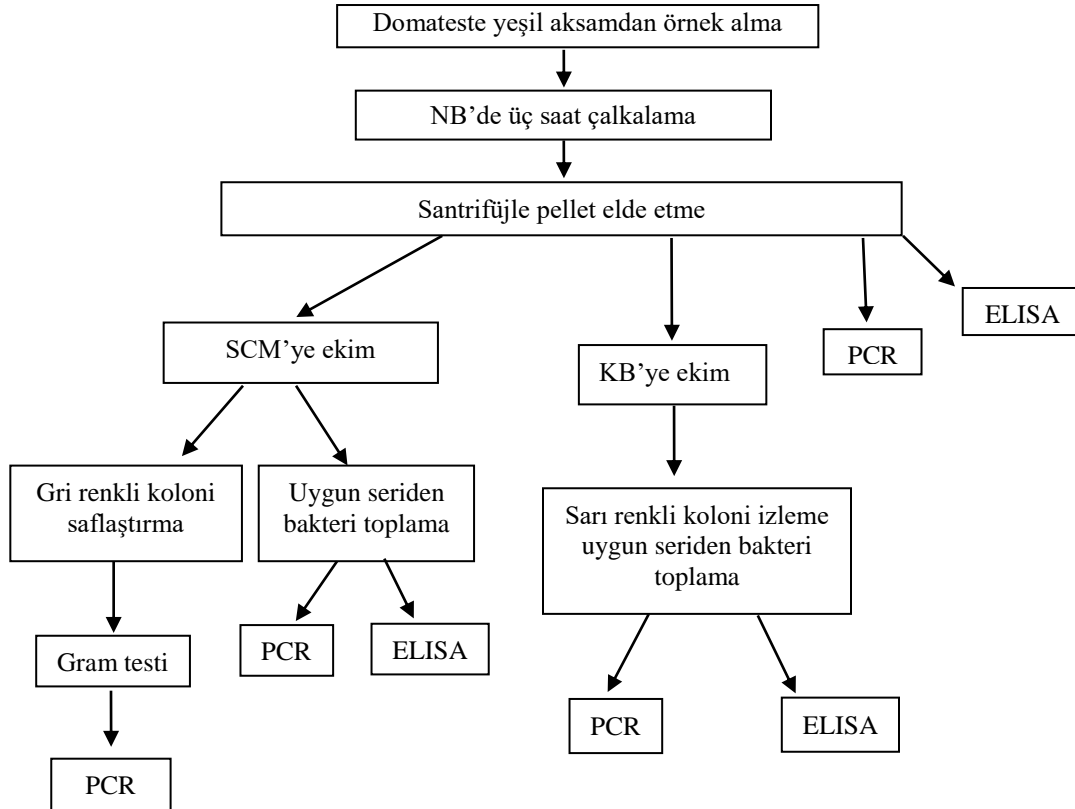
2007; Çakmak ve ark., 2008). Her bir konsantrasyon için dört bitki kullanılmış ve böylelikle toplam 28 domates bitkisi patojenle bulaştırılmıştır. Lokal infeksiyonu sağlamak amacıyla *Cmm*'in yedi farklı konsantrasyonu bir el pülverizatörüyle domates bitkisinin yapraklarına püskürtülmüştür. Her bir konsantrasyonda yine dört bitki kullanılmış ve toplamda 28 domates bitkisi patojenle bulaştırılmıştır. Patojenle bulaştırılmış 56 adet domates bitkisi iklim odasında muhafaza edilmiştir.

Cmm'in Epifitik Popülasyonunun Belirlenmesi

Patojenin farklı popülasyonu (6x10⁸, 6x10⁷, 6x10⁶, 6x10⁵, 6x10⁴, 6x10³ ve 6x10² hücre/ml) bulaştırılmış domates fidelerinde patojenin varlığının kaç gün sonra saptanabileceğini belirlemek amacıyla, inokulasyondan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra, iki farklı yöntemle yedi farklı patojen popülasyonu ile inokule edilen bitkilerden dörder gr yeşil aksam örneği alınmıştır. Toplamda 56 farklı bitki örneği testlenmiştir. Her bir örnek 40 ml Nutrient Broth içerisinde üç saat çalkalanmıştır. Bitki parçaları süzgeçten süzülerek uzaklaştırılmış ve kalan sıvı 15.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek pellet toplanmıştır. Elde edilen pelletler dokuz ml saline buffer (%0,85 g NaCl) içinde tekrar süspansiyon edilmiştir.

Pelletlerden 1'er ml alınarak direk genomik DNA izolasyonu yapılmış (Nejat ve ark., 2009) ve *Cmm*'e spesifik olan CM3 ve CM4 primerleriyle PCR yapılmıştır. Yapılan PCR çalışması sonucunda, elde edilen PCR ürünleri % 1.5'lik agaroz jelde yürütülerek 645 bp'lik bantların oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Santos ve ark., 1997).

Çalışmamızda kullandığımız işlemler Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Domateste *Cmm*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntem

Geriye kalan üç ml süspansiyon üç kez seyreltilerek elde edilen seyreltme serileri King B ve SCM besi yerlerine iki tekrarlı olarak yayılmıştır. 25°C'de 72 saat inkübasyondan sonra King B ve 96 saat inkübasyondan sonra SCM besi yerlerinde gelişen tüm bakteri kolonileri steril bir öze yardımıyla toplanarak 9'ar ml saline buffer içine alınmıştır. Bunlardan 100'er µl süspansiyon alınarak *Cmm*'e spesifik olan DAS-ELISA testi gerçekleştirilmiştir. DAS-ELISA testinde pozitif kontrol olarak YY-2 kodlu izolat, negatif kontrol olarak sağlıklı domates yaprağı ve buffer kullanılmıştır. Bir saat sonra ELISA okuyucusunda 405 nm'de yapılan okumada, negatif kontrolün iki katından fazla olan değerler pozitif olarak kabul edilmiştir. Ayrıca geriye kalan süspansiyondan bir ml alınarak genomik DNA izolasyonu yapılmış ve CM-3 ve CM-4 primerleriyle PCR gerçekleştirilmiştir. Yapılan elektroforez çalışmalarıyla 645 bp'lik bantların varlığı sonucun pozitif olduğunun göstergesidir. King B ve SCM besi yerlerine yapılan ekimlerde *Cmm*'e benzer koloni gelişimlerine sahip olanlar seçilerek saflaştırılmışlardır. Bunların tanısı yine türe spesifik PCR ve Gram reaksiyonu (%3'lük KOH) testlerine göre yapılmıştır (Çetinkaya-Yıldız, 2007).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sistemik infeksiyonu sağlamak amacıyla *Cmm*'in yedi farklı konsantrasyonuyla gövde inokulasyonundan, 24 saat sonra yapılan incelemelerde, alınan bitki örnekleri Nutrient Broth sıvı besi yerinde çalkalandıktan sonra elde edilen pelletten yapılan DAS-ELISA ve PCR testlerinde patojen bakterinin varlığına rastlanılmamıştır. Lokal infeksiyonu sağlamak amacıyla *Cmm*'in yedi farklı konsantrasyonuyla yaprak inokulasyonundan, 24 saat sonra yapılan incelemelerde, benzer şekilde pelletten yapılan DAS-ELISA ve PCR testlerinde yine patojen saptanamamıştır. Sonuç olarak, patojen bakteri iletim demetlerine veya yeşil aksama bulaştıktan 24 saat sonra, pelletin incelenmesi yöntemiyle tespit edilememiştir. Bitkilerden elde edilen pellet seyreltilerek King B ve SCM besi yerlerinde geliştirildikten sonra tüm bakteri kolonileriyle yapılan DAS-ELISA testinde patojen yine inokulasyondan 24 saat sonra saptanamamıştır. King B besi yerinde gelişen tüm bakteri kolonileriyle yapılan PCR testinde herhangi bir bant elde edilememiştir. Ancak SCM besi yerinde gelişen bakterilerle yapılan PCR testinde tümü 645 bp büyüklüğünde bant oluşturarak pozitif sonuç vermiştir. Sonuç olarak, *Cmm*'in 6×10^8 , 6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 , 6×10^4 , 6×10^3 ve 6×10^2 hücre/ml yoğunluğundaki yedi farklı popülasyonuyla bitkiler iletim demetlerine veya yeşil aksama bulaştıktan 24 saat sonra SCM besi yerine ekim ve burada gelişen bakterilerle türe spesifik PCR yapıldığında başarıyla varlığı saptanmıştır (Çizelge 1).

Genel bir besi yeri olan King B besi yerinde pek çok bakteri cinsi gelişebilirken, özellikle *Pseudomonas*'lar diğer cinslere göre bu besi yerinde daha iyi gelişmektedir ve bazı türleri floresan parlama yapmaktadır. *Clavibacter* cinsine ait türler King B besi yerinde gelişene kadar *Pseudomonas* cinsine ait türler hızla gelişerek bu besi yerini kaplamakta ve az miktarda gelişme göstermiş olabilen *Cmm* popülasyonunun gelişmesini engelleyebilmiş olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle *Cmm* popülasyonu King B besi yerinde az olduğundan 24 saat sonra yapılan işlemlerde DAS-ELISA ve PCR testlerinde saptanamamıştır. Yarı seçici bir besi yeri olan SCM besi yerinde *Clavibacter* cinsi diğer cinslere göre daha kolay geliştiğinden az sayıdaki popülasyon ELISA ile saptanamazken, PCR testlerinde saptanmıştır. King B besi yerinde gelişen bakteriler üç gün, SCM besi yerinde gelişimin daha yavaş olmasından dolayı bakteriler dört gün sonra toplanıp DAS-ELISA ve PCR testlerine tabii tutulmuş ve SCM besi yeri daha başarılı bulunmuştur. Örneklerin incelenmesinde SCM besi yeri kullanıldığında fazladan bir güne ihtiyaç duyulsa da *Cmm* popülasyonu daha iyi geliştiğinden doğru sonuçlar alınmıştır.

INVESTIGATION ON THE APPROPRIATE METHOD FOR DETERMINATION OF EPIPHYTIC POPULATION OF *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* ON TOMATO

Çizelge 1. *Cmm*'in epifitik popülasyonunun bitkiye inokulasyonundan 24 saat sonra tespit edilebilme durumu

Örnekler	ELISA Okuma Değerleri				PCR
	1.Tekrar	2.Tekrar	Ortalama	Sonuç	645 bp'lik bant varlığı
24-Pellet-E*0**	0.446	0.453	0.449	-	-
24-Pellet-E1	0.497	0.463	0.480	-	-
24-Pellet-E2	0.407	0.421	0.414	-	-
24-Pellet-E3	0.409	0.412	0.411	-	-
24-Pellet-E4	0.403	0.406	0.405	-	-
24-Pellet-E5	0.411	0.421	0.416	-	-
24-Pellet-E6	0.403	0.401	0.402	-	-
24-KB- E0	0.518	0.500	0.509	-	-
24-KB- E1	0.470	0.453	0.462	-	-
24-KB- E2	0.516	0.580	0.548	-	-
24-KB- E3	0.481	0.468	0.475	-	-
24-KB- E4	0.511	0.531	0.521	-	-
24-KB- E5	0.469	0.468	0.469	-	-
24-KB- E6	0.513	0.462	0.488	-	-
24-SCM- E0	0.724	0.648	0.686	-	+
24- SCM- E1	0.616	0.639	0.628	-	+
24- SCM- E2	0.575	0.527	0.551	-	+
24- SCM- E3	0.566	0.594	0.580	-	+
24- SCM- E4	0.544	0.516	0.530	-	+
24- SCM- E5	0.561	0.587	0.574	-	+
24- SCM- E6	0.593	0.627	0.610	-	+
24-Pellet- P0	0.555	0.562	0.559	-	-
24-Pellet-P1	0.442	0.436	0.439	-	-
24-Pellet- P2	0.513	0.407	0.460	-	-
24-Pellet- P3	0.409	0.416	0.413	-	-
24-Pellet- P4	0.425	0.435	0.430	-	-
24-Pellet- P5	0.416	0.423	0.420	-	-
24-Pellet- P6	0.411	0.400	0.406	-	-
24-KB- P0	0.521	0.504	0.513	-	-
24-KB- P1	0.642	0.601	0.622	-	-
24-KB- P2	0.639	0.575	0.607	-	-
24-KB- P3	0.506	0.494	0.500	-	-
24-KB- P4	0.549	0.542	0.545	-	-
24-KB- P5	0.504	0.507	0.505	-	-
24-KB- P6	0.561	0.549	0.555	-	-
24-SCM- P0	0.763	0.725	0.744	-	+
24- SCM - P1	0.565	0.606	0.585	-	-
24- SCM - P2	0.484	0.473	0.478	-	-
24- SCM - P3	0.577	0.68	0.628	-	+
24- SCM - P4	0.511	0.54	0.525	-	+
24- SCM - P5	0.526	0.523	0.524	-	+
24- SCM - P6	0.587	0.567	0.577	-	+
Negatif Kontrol	0.488	0.476	0.482	-	-
Pozitif Kontrol	1.050	1.095	1.073	+	+

*E: Enjeksiyon yöntemi, P: Yaprğa püskürtme yöntemi

**0: 6×10^8 , 1: 6×10^7 , 2: 6×10^6 , 3: 6×10^5 , 4: 6×10^4 , 5: 6×10^3 , 6: 6×10^2 hücre/ml

Çizelge 2'de görüldüğü gibi, patojenin yedi farklı popülasyonu ile gövde ve yaprak inokulasyonundan, 48 saat sonra pelletten yapılan DAS-ELISA ve PCR testlerinde patojen bakterinin varlığı belirlenmemiştir. *Cmm*'in iletim demetlerine veya yeşil aksama bulaşmasından 48 saat sonra bitki parçaları nutrient broth sıvı besi yerinde çalkalanarak pellet elde edildiğinde direkt pelletten DNA izolasyonu yapılarak gerçekleştirilen PCR testleri ve bu patojene spesifik DAS-ELISA testi, etmeni saptamaya yeterli olamamıştır.

Elde edilen pellet SCM besi yerlerine yayıldığında pelletteki bakteri popülasyonu besi yerinde çoğaldıktan sonra yapılan DAS-ELISA ve PCR testleri patojeni saptamada başarılı olmuştur. Bir önceki çalışmayla benzer şekilde, King B besi yeri kullanımı tekrar başarısız bulunmuştur. 24 saat sonra yapılan işlemlerin hiçbirinde DAS-ELISA testi başarılı değilken, SCM besi yerinde gelişen bakterilerle 48 saat sonra yapılan ELISA testlerinde *Cmm*'in hem sistemik hem de yeşil aksamdaki epifitik bulaşıklığı belirlenebilmiştir. Patojen bakterinin inokulasyondan sonra bitkide popülasyonunu artırdığından SCM besi yerinde daha fazla *Cmm* kolonisi geliştiğinden DAS-ELISA testinde başarı elde edilmiştir. Patojenin 6×10^8 , 6×10^7 ve 6×10^6 hücre/ml yoğunluğundaki popülasyonu iletim demetlerine bulaştırılan bakteri 48 saat sonra DAS-ELISA ile saptanmıştır. Patojenin yedi farklı popülasyonu iletim demetlerine ve yeşil aksama bulaştırıldığında, inokulasyondan 48 saat sonra, SCM besi yerinde geliştirilip PCR yapıldığında tümünde 645 bp'lik bantlar elde edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. *Cmm*'in epifitik popülasyonunun bitkiye inokulasyonundan 48 saat sonra tespit edilebilme durumu

Örnekler	ELISA Okuma Değerleri				PCR
	1.Tekrar	2.Tekrar	Ortalama	Sonuç	645 bp'lik bant varlığı
48-Pellet-E0	0.615	0.652	0.634	-	-
48-Pellet-E1	0.446	0.428	0.437	-	-
48-Pellet-E2	0.403	0.422	0.413	-	-
48-Pellet-E3	0.394	0.415	0.405	-	-
48-Pellet-E4	0.424	0.423	0.424	-	-
48-Pellet-E5	0.453	0.429	0.441	-	-
48-Pellet-E6	0.389	0.410	0.399	-	-
48-KB- E0	0.518	0.601	0.559	-	-
48-KB- E1	0.486	0.481	0.484	-	-
48-KB- E2	0.488	0.481	0.485	-	-
48-KB- E3	0.516	0.527	0.522	-	-
48-KB- E4	0.499	0.489	0.494	-	-
48-KB- E5	0.54	0.541	0.541	-	+
48-KB- E6	0.572	0.68	0.626	-	+
48-SCM- E0	1.397	1.262	1.329	+	+
48- SCM- E1	0.984	1.004	0.994	+	+
48- SCM- E2	0.928	0.924	0.926	+	+
48- SCM- E3	0.511	0.501	0.506	-	-
48- SCM- E4	0.541	0.545	0.543	-	+
48- SCM- E5	0.609	0.677	0.643	-	-
48- SCM- E6	0.759	0.704	0.732	-	+
48-Pellet- P0	0.565	0.501	0.533	-	-
48-Pellet- P1	0.421	0.434	0.428	-	-
48-Pellet- P2	0.414	0.411	0.413	-	-
48-Pellet- P3	0.413	0.407	0.410	-	-
48-Pellet- P4	0.442	0.432	0.437	-	-
48-Pellet- P5	0.424	0.403	0.414	-	-
48-Pellet- P6	0.452	0.413	0.433	-	-
48-KB- P0	0.526	0.533	0.530	-	-
48-KB- P1	0.475	0.466	0.471	-	-
48-KB- P2	0.510	0.503	0.507	-	-
48-KB- P3	0.539	0.523	0.531	-	-
48-KB- P4	0.481	0.480	0.481	-	-
48-KB- P5	0.508	0.507	0.508	-	+
48-KB- P6	0.526	0.532	0.529	-	+
48-SCM- P0	2.112	2.150	2.131	+	+
48- SCM - P1	0.889	0.868	0.879	-	+
48- SCM - P2	0.608	0.573	0.591	-	+
48- SCM - P3	0.651	0.613	0.632	-	+
48- SCM - P4	0.645	0.717	0.681	-	+
48- SCM - P5	1.770	1.573	1.672	+	+
48- SCM - P6	0.491	0.500	0.496	-	-
Negatif Kontrol	0.488	0.476	0.482	-	-
Pozitif Kontrol	1.050	1.095	1.073	+	+

INVESTIGATION ON THE APPROPRIATE METHOD FOR DETERMINATION OF EPIPHYTIC POPULATION OF *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* ON TOMATO

Çizelge 3 ve Çizelge 4’de görüldüğü üzere, 72 saat ve 96 saat sonra pelletten yapılan ELISA ve PCR testlerinde patojen bakterinin varlığı belirlenememiştir. 48 saatlik uygulamalarda olduğu gibi, *Cmm*’in iletim demetlerine veya yeşil aksama bulaşmasından 72 saat ve 96 saat sonra bitki parçaları nutrient broth sıvı besi yerinde çalkalanarak pellet elde edildiğinde direk pelletten DNA izolasyonu yapılarak gerçekleştirilen PCR testleri ve bu patojene spesifik DAS-ELISA testi etmeni saptamaya yeterli olamamıştır.

Aynı şekilde SCM besi yerlerinde pelletteki bakteri popülasyonu çoğaldıktan sonra yapılan ELISA ve PCR testleri patojeni saptamada başarılı olurken, King B besi yeri kullanımı başarısız bulunmuştur. SCM besi yerinde gelişen bakterilerle 72 saat ve 96 saat sonra yapılan DAS-ELISA testlerinde *Cmm*’in hem sistemik hem de yeşil aksamdaki epifitik bulaşıklığı belirlenebilmiştir. Patojenin yedi farklı popülasyonu iletim demetlerine ve yeşil aksama bulaştırıldığında, inokulasyondan 72 saat ve 96 saat sonra, SCM besi yerinde geliştirilip PCR yapıldığında tümünde 645 bp’lik bantlar elde edilmiştir (Çizelge 3 ve Çizelge 4).

Çizelge 3. *Cmm*’in epifitik popülasyonunun bitkiye inokulasyonundan 72 saat sonra tespit edilebilme durumu

Örnekler	ELISA Okuma Değerleri				PCR
	1.Tekrar	2.Tekrar	Ortalama	Sonuç	645 bp’lik bant varlığı
72-Pellet-E0	0.678	0.679	0.679	-	-
72-Pellet-E1	0.731	0.738	0.735	-	-
72-Pellet-E2	0.520	0.506	0.513	-	-
72-Pellet-E3	0.499	1.028	0.764	-	-
72-Pellet-E4	0.422	0.421	0.422	-	-
72-Pellet-E5	0.436	0.445	0.441	-	-
72-Pellet-E6	0.430	0.430	0.430	-	-
72-KB-E0	0.559	0.524	0.542	-	+
72-KB-E1	0.499	0.522	0.511	-	+
72-KB-E2	0.503	0.511	0.507	-	+
72-KB-E3	0.535	0.563	0.549	-	+
72-KB-E4	0.581	0.695	0.638	-	+
72-KB-E5	0.458	0.457	0.458	-	+
72-KB-E6	0.483	0.466	0.475	-	+
72-SCM-E0	0.978	1.340	1.159	+	+
72- SCM -E1	1.070	1.028	1.049	+	+
72- SCM -E2	1.332	1.291	1.312	+	+
72- SCM -E3	0.771	0.734	0.753	-	+
72- SCM -E4	0.676	0.664	0.670	-	+
72- SCM -E5	0.524	0.533	0.529	-	+
72- SCM -E6	0.540	0.621	0.581	-	+
72-Pellet-P0	0.502	0.496	0.499	-	+
72-Pellet-P1	0.466	0.481	0.474	-	+
72-Pellet-P2	0.404	0.400	0.402	-	-
72-Pellet-P3	0.402	0.411	0.407	-	-
72-Pellet-P4	0.538	0.495	0.517	-	-
72-Pellet-P5	0.417	0.396	0.407	-	-
72-Pellet-P6	0.445	0.433	0.439	-	-
72-KB-P0	0.463	0.473	0.468	-	-
72-KB-P1	0.523	0.537	0.530	-	-
72-KB-P2	0.484	0.480	0.482	-	-
72-KB-P3	0.485	0.482	0.484	-	-
72-KB-P4	0.504	0.490	0.497	-	-
72-KB-P5	0.476	0.477	0.477	-	-
72-KB-P6	0.463	0.473	0.468	-	+
72-SCM-P0	0.650	0.658	0.654	-	+
72- SCM -P1	1.511	1.273	1.392	+	-
72- SCM -P2	0.470	0.473	0.472	-	-
72- SCM -P3	0.594	0.621	0.608	-	-
72- SCM -P4	0.490	0.487	0.489	-	-
72- SCM -P5	0.479	0.480	0.479	-	-
72- SCM -P6	0.493	0.495	0.494	-	-
Negatif Kontrol	0.488	0.476	0.482	-	-
Pozitif Kontrol	1.050	1.095	1.0725	+	+

Çizelge 4. *Cmm*'in epifitik popülasyonunun bitkiye inokulasyonundan 96 saat sonra tespit edilebilme durumu

Örnekler	ELISA Okuma Değerleri				PCR
	1. Tekrar	2. Tekrar	Ortalama	Sonuç	645 bp'lik bant varlığı
96-Pellet-E0	0.736	0.723	0.730	-	-
96-Pellet-E1	0.653	0.608	0.631	-	-
96-Pellet-E2	0.561	0.571	0.566	-	-
96-Pellet-E3	0.413	0.446	0.430	-	-
96-Pellet-E4	0.482	0.551	0.517	-	-
96-Pellet-E5	0.496	0.482	0.489	-	-
96-Pellet-E6	0.414	0.409	0.412	-	-
96-KB-E0	0.508	0.494	0.501	-	-
96-KB-E1	0.460	0.505	0.4825	-	-
96-KB-E2	0.453	0.447	0.450	-	-
96-KB-E3	0.467	0.459	0.463	-	-
96-KB-E4	0.459	0.453	0.456	-	-
96-KB-E5	0.457	0.477	0.467	-	-
96-KB-E6	0.481	0.463	0.472	-	-
96-SCM-E0	0.608	0.549	0.579	-	+
96-SCM-E1	1.022	0.942	0.982	+	+
96-SCM-E2	1.075	0.967	1.021	+	+
96-SCM-E3	0.485	0.489	0.487	-	+
96-SCM-E4	0.498	0.517	0.508	-	+
96-SCM-E5	0.992	0.929	0.961	+	+
96-SCM-E6	0.787	0.791	0.789	-	+
96-Pellet-P0	0.469	0.466	0.468	-	-
96-Pellet-P1	0.424	0.422	0.424	-	+
96-Pellet-P2	0.667	0.425	0.546	-	-
96-Pellet-P3	0.410	0.414	0.412	-	-
96-Pellet-P4	0.422	0.479	0.451	-	-
96-Pellet-P5	0.796	0.450	0.623	-	-
72-Pellet-P6	0.457	0.398	0.428	-	-
96-KB-P0	0.467	0.469	0.468	-	-
96-KB-P1	0.486	0.499	0.493	-	-
96-KB-P2	0.602	0.490	0.546	-	-
96-KB-P3	0.469	0.476	0.473	-	-
96-KB-P4	0.463	0.514	0.489	-	-
96-KB-P5	0.516	0.495	0.506	-	-
96-KB-P6	0.472	0.485	0.479	-	-
96-SCM-P0	0.681	0.638	0.660	-	-
96-SCM-P1	0.453	0.450	0.452	-	-
96-SCM-P2	0.565	0.554	0.560	-	-
96-SCM-P3	0.524	0.575	0.550	-	-
96-SCM-P4	0.476	0.452	0.464	-	-
96-SCM-P5	0.458	0.463	0.461	-	-
96-SCM-P6	0.474	0.459	0.467	-	-
Negatif Kontrol	0.488	0.476	0.482	-	-
Pozitif Kontrol	1.05	1.095	1.073	+	+

Yapılan bu çalışmada, *Cmm*'in neden olduğu bakteriyel solgunluk hastalığı belirtisinin henüz domates fidelerinde görülmediği, ancak patojenin iletim demetlerinde ve yeşil aksamda bulaşık olduğu dönemde, varlığının kanıtlanmasında yarı seçici besi yerine ekim ve gelişen bakterilerin toplanarak total genomik DNA izolasyonunu takiben, etmene spesifik PCR testleriyle serolojik testlerden ELISA kullanmadan patojenin varlığı son derece başarılı şekilde belirlenmiş ve bu iki yöntem patojenin epifitik popülasyonunun saptanmasında en duyarlı yöntemler olarak saptanmıştır.

Patojenin 6×10^2 hücre/ml popülasyonu ile yeşil aksama veya iletim demetlerine inokule edilen bitkilerde, bulaşmadan 24 saat sonra bile yarı seçici besi yerine ekim ve türe spesifik PCR gibi moleküler yöntemleri kombine

INVESTIGATION ON THE APPROPRIATE METHOD FOR DETERMINATION OF EPIPHYTIC
POPULATION OF *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* ON TOMATO

ederek kullanımıyla patojen saptanabilmiştir. Patojenin inokulasyondan bir gün sonra gibi en kısa sürede varlığını belirlemede bu iki yöntemin kombine halde kullanımının başarı getireceği belirlenmiştir.

Yarı seçici besi yerine ekim ve moleküler yöntemi kombine ederek kullanmak, patojenin sistemik ve üretim alanında su sıçratmasıyla bulaşan lokal infeksiyonlarını belirleyecek duyarlılıktadır.

Çalışmamızda, besi yerine ekim yapmaksızın fidelerden alınan bitki örnekleri sıvı besi yerinde çalkalandıktan sonra santrifüjleme sonucu elde edilen pelletten genomik DNA izolasyonunu takiben yapılan PCR ve ELISA testlerinin yeterince başarılı olmadığı tespit edilmiştir. Patojen inokülasyonundan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra elde edilen pelletten yapılan DAS-ELISA testlerinin tümünde negatif sonuç alınmıştır. Moleküler testlerde ise, patojenin en yüksek (6×10^8 hücre/ml) popülasyonu ile yeşil aksama veya iletim demetlerine inokulasyondan 72 saat sonra yapılan PCR testlerinde 645 bp'lık bantlar oluşturarak pozitif sonuç elde edilmiştir. Buna karşın pellet yarı seçici besi yerine ekildikten sonra yapılan PCR testlerinde patojen en düşük (6×10^2 hücre/ml) popülasyonda bile 24 saat sonra tespit edilmiştir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarımızda elde edilen pelletten direk ELISA ve PCR testlerinin yapılmasının uygun olmayacağına karar verilmiştir.

Patojen bakteri epifitik dönemde olduğunda, domates fidelerinden örnek alındıktan sonra nutrient broth besi yerinde en az 3 saat çalkaladıktan sonra elde edilen pellet seyreltilerek genel besi yeri olarak King B ve yarı seçici besi yeri olarak SCM'ye ekim yapılmıştır. SCM'de gelişen bakterilere PCR yapıldığında 24 saat sonra pozitif sonuçlar elde edilirken, King B besi yerinde gelişen bakterilere PCR yapıldığında 24 saat sonra negatif sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle ileriki çalışmalarımızda bu patojenin saptanmasında genel besi yeri kullanımı yerine yarı seçici besi yeri olan SCM'nin kullanımının uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde, Gitaitis ve ark. (1991) belirti göstermeyen domates fidelerinde *Cmm*'in varlığını araştırmışlardır. *Cmm* izolasyonu, fidelerden alınan örneklerin, %100 etanol ile yüzey dezinfeksiyonuna tabi tutulması ve yarı seçici (mCNS) besi yerinde geliştirilmesiyle yapılmıştır. Sera koşullarında yürütülen denemede, izolasyon, inokulasyondan 7 gün sonra inokulasyon noktasının 10 cm aşağısından gövde parçaları alınarak yapılmıştır. Güney Georgia'da 24 araziden toplanan 24.000 fideden yalnızca 3'ünde mCNS besi yerinde *Cmm*'e rastlanmıştır. Yapılan ELISA testi ile bakterinin varlığı teyit edilmiştir. Ayrıca Gaz kromatografisi ile de bakterilerin yağ asit profilleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmada bitki dokularından izolasyonda 1×10^8 CFU/ml bakteri yoğunluğunun yeterli olduğu ve inokulasyondan 7 gün sonra belirti göstermeyen fidelerde ortalama *Cmm* yoğunluğunun $1,7 \times 10^8$ hücre/cm olarak geliştiğini bildirmişlerdir.

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

Çetinkaya-Yıldız (2007)'nin bildirdiğine göre, antiserum ile kaplanmış ELISA çukurlarına direkt bitki gövdesinden özsuyun sıkılması veya gövdenin batırılması yöntemleri kullanılarak da belirti göstermeyen bitkilerde *Cmm*'in varlığı belirlenebilmektedir (Gleason, 1993). Benzer şekilde, Gitaitis ve ark. (1995) belirti göstermeyen bitkilerde *Cmm*'in varlığının ELISA testi ile belirlenebileceğini bildirmişlerdir (Çetinkaya-Yıldız, 2007).

Yaptığımız bu çalışmada, kullandığımız yöntemlere göre, *Cmm*'in domates fidelerinde belirtilerinin henüz görülmediği dönemde, varlığı araştırılırken genel besi yerine ekim ve DAS-ELISA testinin *Cmm*'i belirlemede yetersiz olduğu saptanmıştır. Laboratuvar çalışmalarında kısa sürede, doğru sonuca en az maliyetle ulaşmak ana hedeflerimiz arasındadır. Bu nedenle *Cmm*'in epifitik popülasyonunun belirlenmesinde yarı seçici besi yerine ekim ve bu besi yerinde gelişen bakterilerin toplanarak total genomik DNA izolasyonunu takiben, etmene spesifik PCR testlerinin kombinasyonunun kullanımı başarı getirmiştir.

Sonuç olarak, çalışma sonucunda belirlenen bu yöntemle, domates fideleri bu patojenin varlığı yönünden incelenebilecektir. Hastalığın epidemiyolojisinde, kullanılan fidelerdeki epifitik bulaşıklığın rolü ortaya konabilecektir. Domates fidelerindeki bu patojenin epifitik bulaşmalarının saptanması hastalığın üretim alanlarında yayılmasının engellenmesi ve ekonomik kayıpların önüne geçilmesi açısından önemlidir. Ayrıca belirlenen bu yöntem, gelecekte *Cmm* ile çalışacak araştırmacılar tarafından da kullanılabilir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Basım, E., 2002. Isparta ve çevresindeki sera domateslerinde görülen bakteriyel patojenlerin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6:1-8.
- Burokiene, D., 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. Agronomy Research, 4:151-154.
- Chang, R. J., Ries, S. M., Pataky, J. K., 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. Phytopathology, 82:553-560.
- Çakmak, Ö., Aysan, Y., Erdem, H., 2008. Farklı düzeylerde çinko beslemesi altındaki domates bitkilerinde bakteriyel solgunluk hastalığı üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisinin araştırılması. TÜBİTAK TOVAG-1070273 nolu proje raporu.
- 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. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. /Doktora Tezi. Adana.
- Çetinkaya-Yıldız, R., Aysan, Y., 2013. Bitki Bakteri Hastalıkları kitabının 2. Baskısı, Editörler: Saygılı, H., Şahin, F. ve Aysan, Y. Meta Basım, İzmir.
- Fatmi, M., Schaad, N. W., 1988. A semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. Phytopathology, 81, 1519-1523.
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., Voloudakis, A. E., 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. Plant Disease, 75 (8), 834-838.
- Gleason, M.L., Braun, E. J., Carlton, W. M., Peterson, R. H., 1991. Survival and disesemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. Phytopathology, 81:519-1523.
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., Ricker, M. D., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. Plant Disease, 77:1069-1076.
- Jones, J. B., Stall, R. E., Zitter, T. A., 1991. Bacterial Canker, Compendium of Tomato Diseases, 25 sayfa.
- King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocianin and fluoresin. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44:301-307.
- Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S. N. A., Vadamalai, G., 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.
- Santos, M. S., Cruz, L., Norskov, P., Rasmussen, O. F., 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. Seed Science and Technology, 25(1):581-584.
- Şahin, F., Uslu, H., Kotan, R., Dönmez, M. F., 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., Yanar, Y., 2011. Tokat Yöresi Domates Alanlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Neden Olduğu Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran 2011. Kahramanmaraş. sayfa: 331.

