

**DOMATES BAKTERİYEL SOLGUNLUK HASTALIĞI ETMENİ [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.]'NİN İZOLASYONU, GELENEKSEL, SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI\***

*Isolation and identification of tomato bacterial wilt diseases agent [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.] by using traditional, serological and molecular methods*

Raziye ÇETİNKAYA YILDIZ  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Yeşim AYSAN  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

**ÖZET**

Bu çalışmada Adana ve Mersin illerinde yetiştiriciliği yapılan domates üretim alanlarında yapılan sörveylerin yanı sıra Antalya, Artvin, Bursa ve İzmir illerinden temin edilen hasta domates bitkilerinden toplam 57 bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlar morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, serolojik (indirekt ELISA), ve moleküler (PCR) yöntemlerle domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) olarak tanılanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, domates, izolasyon, tanı

**ABSTRACT**

In this study, 57 bacterial strains were isolated from tomato plants growing in surveyed field located in Adana and Mersin provinces and also infested plants which were sent from Antalya, Artvin, Bursa and Izmir provinces. All bacterial strains were identified as *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), causal agent of tomato bacterial wilt disease by using morphological physiological, biochemical, serological (indirect ELISA), and molecular (PCR) methods.

**Key Words:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tomato, isolation, identification

**Giriş**

Domates (*Lycopersicum esculentum* Mill.) yüksek vitamin ve mineral içeriği ile dünyada ve ülkemizde tüketimi oldukça yoğun olan sebzelerden biridir. Dünyada ve ülkemizde en fazla tüketilen sebzelerin başında gelen domatesin üretimi, bu ihtiyacı karşılamak amacı ile her geçen yıl artış göstermektedir. (Anonymous, 2005). Ülkemizin farklı iklim bölgelerine sahip oluşu hem açık alanda hem de örtü altında sofralık ve sanayi domatesinin üretilmesine olanak sağlamaktadır.

Domateslerde fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanı sıra pek çok bakteriyel etmende önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Karaca ve Saygılı, 1982). Bu bakteriyel hastalıklardan biri de *Clavibacter michiganensis* subsp.

---

\* Doktora Tezi –PhD Thesis

*michiganensis* (Smith) Davis et al.'in (*Cmm*) neden olduğu bakteriyel solgunluk hastalığıdır. Etmen ilk kez 1909 yılında Amerika Birleşik Devletlerinin Michigan eyaletinde domates üretim alanlarında saptandığından beri dünyanın domates yetiştirilen bütün bölgelerinde rapor edilmiştir (Gleason ve ark., 1993). Ülkemizde ise 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 yapılan çalışmalarda etmen Doğu Akdeniz (Çınar, 1980), Batı Akdeniz (Basim ve ark., 2004) ve Doğu Anadolu (Sahin ve ark., 2002) bölgelerinde domates üretim alanlarında belirlenmiştir.

Etmen domateste solgunluk; iletim demetlerinde başlangıçta sarımsı, ilerleyen dönemde kahverengiye dönen renk bozulması oluşturmaktadır. Yaprak nekrozları ve meyvelerde kuş gözü lekesi olarak bilinen ve ürünün direkt pazar kalitesini düşüren lezyonlar etmenin enfeksiyonları sonucunda meydana gelmektedir (Gleason, 1993). Etmen *Solanaceae* familyasından domates (*Lycopersicon esculentum* L.), biber (*Capsicum annum* L.), patlıcan (*Solanum melongena*) ve *L. hirsutum*, *L. pimpinellifolium* gibi türlerde hastalık oluştursa da domates ekonomik anlamda önemli olduğu tek kültür bitkisidir (Gleason ve ark., 1993; Forster ve Echandi, 1973).

Bu çalışmanın amacı domates üretim alanlarında problem olan bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'i izole etmek ve elde edilen izolatları morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, serolojik (indirekt ELISA), ve moleküler (PCR) yöntemlerle tanılamaktır.

## **Materyal ve Metot**

### **Materyal**

Çalışmanın materyalini Adana, Mersin, Antalya, Bursa, Artvin ve İzmir illerinde domates üretim alanlarından izole edilen *Cmm*'in bölge izolatları, Almanya Georg-August Üniversitesi Dr. Rudolph'dan temin edilen GSPB 382 kodlu *Cmm* izolatı, domates fideleri, akşamsafası bitkisi, besi yerleri, çeşitli kimyasallar, ELISA tanı kiti ve PCR malzemeleri oluşturmuştur.

### **Metot**

#### **Hasta Domates Bitkilerinin Toplanması**

Adana ve Mersin illerindeki domates yetiştiriciliği yapılan tarla ve seralar incelenerek solgunluk ve iletim demetlerinde kahverengileşme simptomsu gösteren domates bitkilerinden örnekler alınmıştır. Örnekler gazete kağıdı arasına sarılıp polietilen torba içerisinde laboratuara getirilmiştir. Antalya Bursa, Artvin ve İzmir illerinden üreticiler tarafından laboratuara gönderilen hasta bitki örnekleri de çalışmaya dahil edilmiştir.

### **Domateste Bakteriyel Solgunluk Etmeninin İzolasyonu**

Hasta bitkinin iletim demetlerinden hastalıklı ve sağlıklı kısmı içeren 2-3 mm büyüklüğünde bitki parçaları alınıp %70'lik alkol veya %1'lik NaOCL ile yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Parçalar steril havanda fizyolojik tuzlu su (%0.85'lik NaCL çözeltisi) ile homojenize edilmiştir. Bir öze dolusu süspansiyon, YDC agar ve King B besi yeri içeren petrilere çizgi ekimiyle çizilmiştir ve 25°C'deki inkübatörde 2-3 gün inkübe edildikten sonra gelişen koloniler incelenmiştir. Saflaştırılan izolatlar gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik olarak hazırlanmış YDC agar besi yerinde geliştirilmiş ve +4°C'de buzdolabında saklanmıştır(Lelliott ve Stead, 1987).

### **Patojenite Testi**

Hasta domates bitkilerinden izole edilen bakteri izolatları, 3-5 yapraklı dönemde bulunan domates fidelerine gövdeden steril kürdan yardımıyla 3 tekrarlı olarak inokule edilmiştir. Çalışmada 36-48 saatlik bölge izolatları, pozitif kontrol olarak GSPB 382 kodlu *Cmm* referans izolatı ve negatif kontrol olarak steril su kullanılmıştır. İnokule edilen bitkiler iklim odasına yerleştirilmiş (16 saat ışık, 8 saat karanlık, 25°C sıcaklık, %70-80 nisbi nem) ve yüksek nem sağlamak amacıyla 24 saat süreyle ıslak polietilen torba içerisinde tutulmuştur. İnokulasyondan 8-10 gün sonra enfekteli fidelerde oluşan solgunluk belirtileri ve iletim demetlerinde oluşan kahverengiliklere göre, hastalık var/yok olarak değerlendirilmiş ve izolatların patojen olup olmadığı belirlenmiştir. Simptom veren bitkilerden re-izolasyonlar yapılarak elde edilen re-izolatlar ile tanı çalışmaları yapılmıştır.

### ***Clavibacter michiganensis. subsp. michiganensis*'in Geleneksel Tanı Testleri**

#### **YDC Agar, Nutrient Agar ve SCM Besi Yerinde Koloni Gelişimi:**

Taze hazırlanmış YDC agar, Nutrient Agar (NA) ve SCM besi yerine çizilen domates bakteriyel solgunluk hastalığı izolatları ve referans izolat 25°C'de inkübe edilmiştir. İzolatlar YDC agar ve NA besi yerine 48 saat, SCM besi yerinde ise 2-3 gün inkübasyondan sonra koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir(Lelliott ve Stead, 1987; Fatmi ve Schaad, 1988).

#### **Potasyum Hidroksit Testi (KOH)**

Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra domates bakteriyel solgunluk izolatları ve referans izolatın 48 saatlik kültüründen platin özeyle alınarak solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır (Sands, 1990). Negatif kontrol olarak *Pseudomonas cichorii* (GSPB 2297) kültürü kullanılmıştır.

#### **Akşamsafası (*Mirabilis jalapa*) Bitkisinde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu**

Domates bakteriyel solgunluk izolatları ve pozitif kontrol (GSPB 382)'ün 48 saatlik kültüründen hazırlanan süspansiyonlar Akşamsafası (*Mirabilis jalapa*) bitkisinin yaprak damar aralarına enjekte edilmiştir. Çalışmada Fransa'dan ithal

edilen Vilmorin marka F1 tohumlarından geliştirilen bitkiler kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır (Gitaitis, 1990).

#### **Domates Kotiledon Testi**

Domates bakteriyel solgunluk izolatları ve pozitif kontrol (GSPB 382)'ün 48 saatlik kültüründen  $10^7$  hücre/ml yoğunlukta bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Dört günlük domates fidelerinin tam gelişmiş kotiledon yaprakları bu bakteri süspansiyonlarına batırılan ucu pamuklu bir çubuk yardımı ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan 3-4 gün sonra değerlendirme yapılmıştır. Negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır (Chaldecott ve Preece, 1983).

#### **C. m. subsp. michiganensis İzolatlarının İndirekt ELISA Testi İle Tanısı**

Domates üretim alanlarından izole edilen bakteri izolatlarının içerisinde virülenslikleri yüksek olan izolatlar seçilerek tanılamaları Vunakis (1980) ve Coligan ve ark., (1991)'e göre üç tekrarlı olarak ELISA testi kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada *Cmm*'e karşı üretilen monoklonal antibody [Agdia marka ticari kit (BRA 44001)] kullanılarak, Alkalin Fosfataz ile işaretlenmiş indirekt ELISA testi yapılmıştır. Okumalar Titertek Multiscan marka ELISA plate okuyucusunda 405 nm dalga boyunda yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### **C. m. subsp. michiganensis İzolatlarının PCR Tekniği İle Tanısı**

Klasik tanı ve İndirekt-ELISA testi ile tanılanan *Cmm* izolatları içerisinde farklı illerden gelen örneklerden seçilen 5 izolat (Muc 1c, Cıcık 1, 33-A (TT111), Çoruh Nehri 1, 15/4a1) ve GSPB 382 kodlu referans izolatın genomik DNA'sı De Boer ve Ward (1995)'a göre izole edilmiştir. İki farklı PCR çalışması yapılmıştır. Dreier ve ark., (1995)'na göre yapılan çalışmada CMM5 (5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3') ve CMM6 (5'-CGTCAGGAGGTTTCGCTAATA-3') primerleri, Santos ve ark., (1997)'na göre yapılan çalışmada ise CM<sub>3</sub> (5'-CCT CGT GAG TGC CGG GAA CGT ATC 3') ve CM<sub>4</sub> (5'-CCA CGG TGG TTG ATG CTC GCG AGA -3') primerleri kullanılmıştır.

Thermalcycler cihazında (Genius Marka) kullanılan program Çizelge 1'deki gibidir.

**Çizelge 1.** PCR işlemi için kullanılan programlar

Program adımları	Dreier ve ark (1995)		
	Sıcaklık (°C)	Süre(dak)	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	93	2	1
Denatürasyon	94	1	30
Primer Bağlanması	55	1.5	
Uzama	72	1	1
Son Uzama	72	10	
Bekleme	4	Süresiz	

DNA çoğaltımı sonucu elde edilen PCR ürünleri %1.2'lik agaroz jele verilerek 70 miliamper akım uygulanmış ve etidium bromür boyaması sonucu oluşan bantlar transsimilatörde incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Elde edilen ürün -20°C 'de saklanmıştır (Sambrook ve ark. 1989). Dreier ve ark (1995)'nin önerdiği primerler ile yapılan PCR çalışmasında 614 bp büyüklüğünde bant oluşumu; Santos ve ark., (1997)'nin dizayn ettiği primerler kullanılarak yapılan PCR çalışmasında 645 bp büyüklüğündeki bant oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### **Araştırma Bulgular ve Tartışma**

#### **Hasta Domates Bitkilerinin Toplanması**

Mersin (Erdemli, Tarsus, Bozyazı) ve Adana (Merkez, Tuzla) illerinde arazi sörveylerinde solgunluk, yaprak yanıklığı iletim demetlerinde renklenme, gövdede siğiller ve çatlaklar gözlenmiştir (Şekil 1a-b). Antalya (Gazipaşa, Kaş, Koyunlar), Bursa (Yenişehir, Karacabey, Kemalpaşa), Artvin ve İzmir (Dikili) illerinden ise üreticiler tarafından gönderilen örneklerde de benzer belirtilere rastlanmıştır.

#### **Domateste Bakteriyel Solgunluk Etmeninin İzolasyonu**

Hasta bitki örneklerinden yapılan izolasyonlarda 2-3 gün içinde YDC agar ve King B besi yerinde sarı renkte dominant koloniler gelişmiştir. Mersin ilinden 32 adet, Adana ilinden 9 adet, Antalya ilinden 3 adet, Artvin ilinden 2 adet, İzmir ilinden 6 adet ve Bursa ilinden ise 5 adet olmak üzere toplam 57 adet izolat saflaştırılarak bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Bu izolatlardan Cmm 23 kodlu izolat Dr. Sabiha Tokgönül'den temin edilmiştir.



**Şekil 1a-b.** Hasta domates bitkilerinin görünümü

### Patojenite Testi

Çalışmada kullanılan 57 adet bölge izolatu ve referans kültür ile yapılan patojenite testlerinde tüm izolatlar inokulasyondan sonraki 8-10 gün içinde domates fidelerinde inokulasyon bölgesinde kahverengilikler, yapraklarda ve dallarda solgunluk, iletim demetlerinde ve özde kahverengileşme oluşturmuştur (Şekil 2). Negatif kontrolde herhangi bir hastalık simptomsu gözlenmemiştir. Tipik hastalık simptomsu gösteren bitkilerden yapılan re-izolasyonlar sonucu da 57 re-izolat tekrar elde edilmiştir.

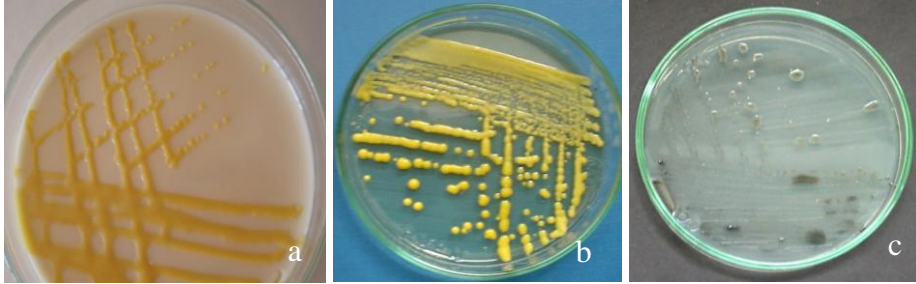


Şekil 2. Domates fidelerinde patojenite testi

### *Clavibacter michiganensis*. subsp. *michiganensis*'in Geleneksel Tanı Testleri

#### YDC Agar, Nutrient Agar ve SCM Besi Yerinde Koloni Gelişimi

Domates re-izolatları ve referans kültür YDC agar besiyerinde koyu sarı, etrafı düz (Şekil 3a); NA besiyerinde tipik parlak sarı etrafı düz (Şekil 3b); SCM besiyerinde ise koyu gri etrafı açık renk haleli koloniler (Şekil 3c) oluşturmuştur



Şekil 3. *Cmm* izolatının (a) YDC Agar besiyerinde, (b) NA besiyerinde, (c) SCM besiyerinde koloni gelişimleri

### **Potasyum Hidroksit Testi (KOH)**

*Cmm* re-izolatları ve referans kültür test sonucunda özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturmadığından gram pozitif olarak kabul edilmiştir. Karşılaştırma kültürü olarak kullanılan *Pseudomonas cichorii* (GSPB 2297) kültürü özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturduğundan gram negatif olarak değerlendirilmiştir.

### **Akşamsafası (*Mirabilis jalapa*) Bitkisinde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu**

Domates bakteriyel solgunluk izolatları ve pozitif kontrol (GSPB 382) ile inokule edilen Akşamsafası bitkilerinin yapraklarında aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşmuş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan steril distile su uygulamasında ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4).

### **Domates Kotiledon Testi**

Domates bakteriyel solgunluk izolatları ve pozitif kontrol (GSPB 382) dört günlük domates fidelerinin tam gelişmiş kotiledon yapraklarında beyazımsı siğil benzeri yapılar oluşturarak pozitif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan steril distile su uygulamasında ise herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 5).



**Şekil 4.** Akşamsafası bitkisinde inokulasyon noktasında (\*) aşırı duyarlılık reaksiyonu



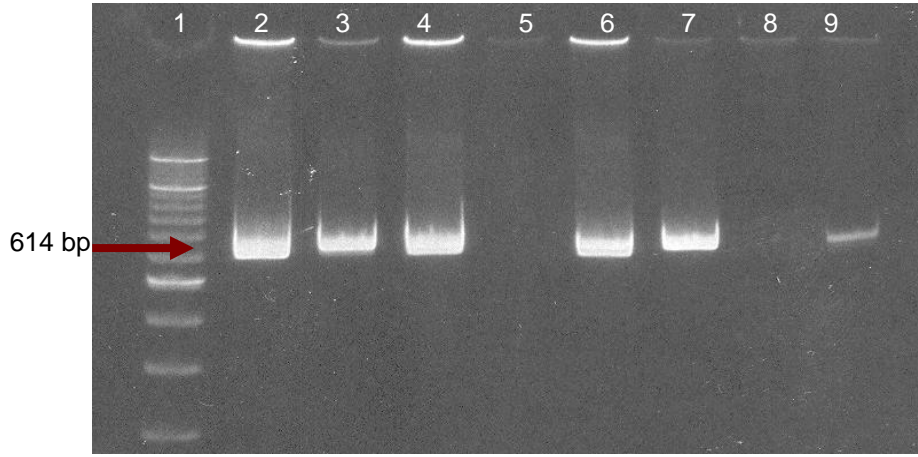
**Şekil 5.** Domates kotiledon testi sonucunda oluşan beyaz siğilimsi yapılar

### ***C. m* subsp. *michiganensis* İzolatlarının İndirekt-ELISA Testi İle Tanısı**

Bölge izolatlarının Agdia firmasından satın alınan ticari tanı kiti ile yapılan İndirekt-ELISA çalışmasında, 405nm'de izolatların absorbans değerleri 1.051 ile 1.722 arasında kaydedilmiştir. Pozitif kontroldeki absorbans değeri 3.518 iken negatif kontrolde 0,389 olarak belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinin negatif kontrolün iki katından fazla oluşu nedeniyle izolatlarımız *Cmm* olarak tanılanmıştır.

### ***C. m. subsp. michiganensis* İzolatlarının PCR Testi İle Tanısı**

*Cmm* izolatlarının DNA izolasyonu işleminden sonra saflaştırılan genomik DNA'ları ile iki farklı PCR çalışması yapılmıştır. Dreier ve ark., (1995)'nin dizayn ettiği CMM5 ve CMM6 primerler kullanılarak yapılan çalışmada tüm izolatların 614 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 6). Santos ve ark., (1997)'nin önerdiği primerler kullanılarak yapılan PCR çalışmasında ise kullanılan bütün izolatların 645 bp büyüklüğün bant oluşturması pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 7). Bu çalışmada elde edilen bantlar Dreier ve ark., (1995) ve Santos ve ark., (1997) yaptığı çalışma ile birebir örtüşmektedir. Sonuç olarak bu çalışma çerçevesinde elde ettiğimiz izolatların *Cmm* olduğu moleküler çalışma ile de saptanmış ve izolatların spesifik, duyarlı ve hızlı tanısı yapılmıştır.



**Şekil 6.** Dreier ve ark., (1995)'nin primeri kullanılarak yapılan PCR işleminde oluşan bantlar. Çukur 1: 1 kb markır, Çukur2: GSPB 382, Çukur3: Muc 1c, Çukur4: Cıcık 1, Çukur5: Negatif kontrol, Çukur6: 33-A (TT111), Çukur7: Çoruh Nehri 1, Çukur8: Negatif kontrol, Çukur9: 15/4a1





**Şekil 7.** Santos ve ark., (1997)'nin primeri kullanılarak yapılan PCR işleminde oluşan bantlar. Çukur 1: 1 kb markır, Çukur2: GSPB 382, Çukur3: Muc 1c, Çukur4: Negatif kontrol, Çukur5: Cıcık 1, Çukur6: 33-A (TT111), Çukur7,8,9,10,11: Boş, Çukur12: Çoruh Nehri 1, Çukur13: 15/4a1, Çukur14:Dikili 3, Çukur15: Negatif kontrol, Çukur16: Erwinia spp., Çukur17: 10/1B, Çukur18: Negatif kontrol: Çukur19: 11/1b1, Çukur20: Pseudomonas spp, Çukur21: Dom.il. dem.

#### Kaynaklar

- ANONYMOUS, 2005. Tarımsal Yapı ve Üretim. Başbakanlık D.İ.E. Yayınları
- BASIM, E., BASIM, H., DICKSTEIN E. R. JONES J. B., 2004. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* on greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean Region of Turkey. Plant Disease 88: 1048.
- CHALDECOTT, M. A., PREECE, T. F., 1983. The use of a tomato cotyledon test to identify *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*. Plant Pathology 32: 441-448.
- COLIGAN, J. E., KRUESBEEK, A. M., MARGULIES, D. H. SHEVACH, E. M. STROBER,W., 1991. Current Protocols in Immunology. (John Wiley & Sons) New York.
- ÇINAR, 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.
- DE BOER, S. H., WARD, L. J., 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroceptica* associated with potato tissue. Phytopathology, 85: 854-858.
- DREIER, J., BERMPHOHL, A., EICHENLAUB, R., 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 85:462-468.

- FATMI, M., and SCHAAD N. W., 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology* 78: 121-126.
- FORSTER, R. L., ECHANDI, E., 1973. Relation of age of plants, temperature, and inoculum concentration to bacterial canker development in resistant and susceptible *Lycopersicon* spp. *Phytopathology* 63: 773-777.
- GITAITIS, R. D., 1990. Induction of hypersensitivelike reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease* 74: 58-60.
- GLEASON, M. L., GİTAİTİS, 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.
- KARACA, İ., 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.
- LELLIOT, R.A., STEAD, D.E., 1987. Diagnostic procedures for bacterial plant diseases. In *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants* 58-59. Blackwell Scientific Publications, 216.
- SAHİN, F., USLU, H., KOTAN, R. DONMEZ, F. 2002. Bacterial canker, caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. *Plant Pathology* 51: 399.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., 1989. *Molecular cloning- a Laboratory Manual: Second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SANDS, D. C., 1990. Physiological criteria-determinate tests. In: *Methods in Phytobacteriology*. (Edts. Klement, Z.; Rhudolp, K.; Sands, D. C.) Academia Kiado, Budapest, Hungary.
- 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*, 25:581-584.
- TOKGÖNÜL, S., 1998. Ticari Domates Tohumlarında Bakteriyel Solgunluk Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*)'nin Etmeninin Saptanması ve Mücadele Olanakları Üzerine Araştırmalar. Ç. Ü. Ziraat Fakültesi – Doktora Tezi 93 sayfa.
- VUNAKIS, H. V., 1980. Radioimmunassay: An Overview. In: (Engvall, E.: *Enzyme immunassay ELISA and EMIT Methods in Enzymology*), Academic Press, New York, p.419-439.

### **Teşekkür**

Bu çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi (ZF2005D5) ve TUBİTAK tarafından (105 O 465) Desteklenmiştir.