

**T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONYA İLİNDE ASMA UR HASTALIĞI (*Agrobacterium vitis*)' NİN BİYOKİMYASAL  
VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI**

**Sebahat ALTINPARMAK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**KONYA, 2009**

**T.C.**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONYA İLİNDE ASMA UR HASTALIĞI (*Agrobacterium vitis*)' NİN**  
**BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI**

Sebahat ALTINPARMAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI  
KONYA, 2009

Bu tez 08 / 07 / 2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet Güncan  
(Başkan)

Doç. Dr. Nuh BOYRAZ  
(Üye)

Yrd. Doç.Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ  
(Danışman)

**ÖZET**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KONYA İLİNDE ASMA UR HASTALIĞI (*Agrobacterium vitis*)' NİN**  
**BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI**

Sebahat ALTINPARMAK

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

2009, 116 Sayfa

Jüri : Prof. Dr. Ahmet Güncan

Doç. Dr. Nuh Boyraz

Yrd. Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

İç Anadolu bölgesinde, farklı çeşitlerle asma yetiştiriciliği giderek önem kazanmaktadır. 2007–2008 yıllarında, Konya iline bağlı 24 ilçe ve 14 adet farklı asma çeşidinde bakteriyel hastalıkların belirlenmesi amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. Bakteriyel ur hastalığı, *Agrobacterium vitis*'in tanılanmasında, Roy ve Sasser, King B, PDA besi yerlerinde gelişim, 37 °C' de gelişim, 3-ketolaktöz oluşumu, % 2' lik NaCl' de gelişim, L- tartarik asitten alkali oluşumu, sitrat kullanımı, pektolitik aktivite, oktopine ve napolin kullanımı, endoglukonaz aktivitesi, litmus milk testi, eritritol' den ve melezitöz'dan asit oluşumu, malonik asitten alkali oluşumu, demir amonyum sitrat, PDA+CaCO<sub>3</sub>'da asit temizleme testleri esas alınmıştır. Patojenisite testlerinde, Sultani Çekirdeksiz çeşidi asma fidanları, *Datura* sp. ve ayçiçeği bitkilerine yapılan 10<sup>8</sup> hücre/ml bakteriyel inokulasyon sonucu tipik ur oluşumu gözlenmiştir. Moleküler tanı, *peh A* ve *virA* genlerinin PCR amplifikasyonu ile yapılmıştır. Toplam 309 asma örneğinden 280' inde *A. vitis* belirlenirken, izolatların çoğunluğunun tümörojenik karakterde

olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, il genelinde bağ alanlarındaki yaygınlık %90.61' lik oranla büyük önem taşıdığı, patojenin mevcut çeşitler içersinde en fazla Sultani Çekirdeksiz, Cardinal, Hafızali ve en az Ekşi Kara çeşitlerinde görüldüğü tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler;** asma, bakteriyel ur, *Agrobacterium vitis*, çeşit



**ABSTRACT****MsC Thesis****Identification of Grapes Crown and Branch Gall Disease Caused by  
*Agrobacterium vitis* Using Biochemical and Molecular Techniques in Konya  
Province****Sebahat ALTINPARMAK****Selçuk University**

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

2009, 116 Sayfa

Jury : Prof. Dr. Ahmet Güncan  
Associate Doç. Dr. Nuh Boyraz  
Assistant Prof. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

Grapevine has an importance gradually increasing with various cultivars of grapevine in Central Anatolia Region. With the aim of determining of bacterial diseases, the researches were carried on 14 various cultivars of grapevine and in 24 district of Konya Province in 2007-2008. In the identification of bacterial gall disease, *Agrobacterium vitis*, growth on Roy and Sasser, King's B, PDA mediums, growth at 37°C, 3-ketolactose production, growth on 2% NaCl, production of alkaline from L-tartaric acid, using of citrate, pectolytic activity, using of octopine and napolin, endogluconase activity, litmus milk test, acid from erythritol and melesitose, alkaline production from malonic acid, ferric ammonium citrate, acid cleaning on PDA+CaCO<sub>3</sub> tests were based. In the pathogenicity tests, it was observed formation of gall typically in the result of bacterial inoculation

with  $10^8$  cfu/ml concentrations on seedlings of grapevine cultivar, Sultani Seedless, *Datura* sp. and sunflower plants. It was made amplification of *peh A* and *virA* genes by PCR for molecular identification. While *A. vitis* was determined on 280 plants from totally 309 plant samples, the most of isolates had been observed tumorigenic character. Obtaining the data, rate of incidence has been as 90.61% has importance and within all of the cultivars; pathogen was shown the most on cv. Sultani Seedless, cv. Cardinal, cv. Hafizali and at the least on cv. Sour Black in the province.

**Key Words;** grapevine, bacterial crown gall, *Agrobacterium vitis*, cultivar

## TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana KONYA İLİNDE ASMA UR HASTALIĞI (*Agrobacterium vitis*)' NİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI konulu Yüksek Lisans Tezini veren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ' a teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmamın tüm aşamasında bana yol gösterici ve olumlu katkılarından dolayı Yüksek Lisans Tez jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Ahmet GÜNCAN ve Sayın Doç. Dr. Nuh Boyraz Hocalarıma teşekkür ederim.

Konya ili bağ alanlarını incelenmesinde yardımlarını gördüğüm Konya Tarım İl Müdürlüğü Bitki Koruma Őube Müdürü Sayın Dr. Celal YILDIZ' a, Konya ilinde bağ alanlarını incelenmesinde yardımlarını gördüğüm Konya Tarım İl Müdürlüğü Zir. Yük. Müh. Orhan ÇORUH ve Hadim Tarım İlçe Müdürlüğü' ne, çalıőmalarım sırasında emeği geçen değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalıőmam esnasında tüm zorluklara rağmen bana manevi maddi desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen Annem Hava Altınparmak, Babam İktisat Mühendisi Yakup Altınparmak, Ağabeyim Ziraat Mühendisi Kurtuluş Altınparmak, Ablam Gülden ve kardeőlerim Handan, Hüsnü' ye sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
3. MATERYAL METOD.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Bitki Materyali.....	25
3.1.2. Denemede Kullanılan Laboratuvar Alet, Ekipman ve Besiyerleri.....	26
3.2. Metod.....	27
3.2.1. <i>Agrobacterium vitis</i> ' in İzolasyonu.....	27
3.2.2. <i>Agrobacterium vitis</i> 'in Tanısı.....	35
3.2.2.1. Biyokimyasal testler.....	35
3.2.2.1.(1). 35°C'de Gelişme.....	35
3.2.2.1.(2). Laktozdan 3-Ketolaktoz Üretimi.....	36
3.2.2.1.(3). Demir Amonyum Sitrata Kullanımı.....	37
3.2.2.1.(4). %2 NaCl İçeren Besi Yeriinde Gelişme.....	37
3.2.2.1.(5). Sakkaroz ve Eritritolden Asit Üretimi.....	38
3.2.2.1.(6). Oksidaz Testi.....	38
3.2.2.1.(7). Sitrata Kullanımı.....	39
3.2.2.1.(8). Litmus Milkte Reaksiyon.....	39
3.2.2.1.(9). Malonik Asitten Alkali Oluşturma.....	40
3.2.2.1.(10). Mucic ve L-tartarik Asitten Alkali Oluşturma.....	40
3.2.2.1.(11) PDA+CaCO <sub>3</sub> Besi Yeriinde Asit Temizleme.....	41
3.2.2.1.(12). Asit Üretimi İçin Temel Besi Yeri.....	41
3.2.2.1.(13). Roy Sasser Besi Yeri.....	42
3.2.2.1.(14). YGCA Besiyeri.....	43

3.2.2.2. Tütünde Hipersensitif Reaksiyonu(aşırı duyarlılık) testi (HR).....	43
3.2.2.3. Patojenite testleri .....	44
3.2.2.3.1. Yaprak nekrozu .....	44
3.2.2.3.2. Kök ve sürgün nekrozu .....	45
3.2.2.4. Moleküler tanı .....	45
3.2.2.4.1. DNA İzolasyonu.....	45
3.2.2.4.1.1. <i>Agrobacterium vitis</i> 'in DNA amplifikasyonu için spesifik primerlerin kullanımı .....	46
3.2.2.4.1.1.1. <i>vir A</i> geni için spesifik primer .....	46
3.2.2.4.1.1.2. 16S-23S rRNA gen bölgesi için spesifik primer.....	47
3.2.2.4.1.1.3. <i>peh A</i> geni için spesifik primer .....	47
3.2.2.4.1.1.4. <i>Ab3-F3</i> ve <i>Ab3-R4</i> gen bölgesi için spesifik primer .....	48
3.2.2.4.2. Moleküler tanıda kullanılan kimyasallar.....	48
3.2.2.4.3. <i>Agrobacterium vitis</i> 'in DNA amplifikasyonu için Polymerase Chain Reaction (PCR) karışımının hazırlanması.....	49
3.2.2.4.4. <i>Agrobacterium vitis</i> 'in DNA amplifikasyonu için spesifik primerlerle uygulanan PCR protokolleri.....	50
3.2.2.4.4.1. <i>vir A</i> geni PCR protokolü.....	50
3.2.2.4.4.2. <i>16S – 23S</i> geni PCR protokolü.....	50
3.2.2.4.4.3. <i>pehA</i> geni PCR protokolü.....	50
3.2.2.4.4.4. <i>Ab3-F3</i> ve <i>Ab3-R4</i> geni PCR protokolü .....	51
3.2.2.4.5. PCR ürünlerinin elektroforez sisteminde belirlenmesi .....	51
3.2.2.4.5.1. Agaroz jelin ve elektroforez tampon solüsyonunun hazırlanması .....	51
3.2.2.4.5.2. Amplifiye edilen bakteriyel DNA örneklerinin elektroforez sisteminde yürütülmesi.....	51
3.2.2.4.5.3. Agaroz jelin görüntülenmesi ve sonuçların incelenmesi .....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	53
4.1. Simptomatolojik Bulgular .....	55
4.1. <i>A. vitis</i> 'in Tanısı .....	58
4.1.1. Patojenin izolasyonu .....	58
4.1.2. Biyokimyasal yöntemler .....	58
4.1.2.1. 35°C'de Gelişme .....	59

4.1.2.2. Laktozdan 3-Ketolaktöz Üretimi.....	59
4.1.2.3. Demir Amonyum Sitrat Kullanımı .....	60
4.1.2.4. %2 NaCl İçeren Besi Yeriinde Gelişme.....	61
4.1.2.5. Sakkaroz ve Eritritolden Asit Üretimi.....	61
4.1.2.6. Oksidaz Testi.....	62
4.1.2.7. Sitrat Kullanımı .....	63
4.1.2.8. Litmus Milkte Reaksiyon.....	63
4.1.2.9. Malonik Asitten Alkali Oluşumu.....	64
4.1.2.10. Mucic ve L-tartarik Asitten Alkali Oluşumu .....	64
4.1.2.11. PDA+CaCO <sub>3</sub> Besi Yeriinde Asit Temizleme .....	64
4.1.2.12. Potasyum Hidroksit Testi.....	65
4.1.2.13. Roy Sasser Besi Yeri.....	66
4.2. Patojenite Testi.....	86
4.2.1. Yaprak nekrozu .....	89
4.2.2. Kök ve sürgün nekrozu .....	90
4.4. Tütünde hipersensitif reaksiyon (aşırı duyarlılık) testi (HR).....	90
4.2. <i>Agrobacterium vitis</i> izolatlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Tanılanması.....	92
5. TARTIŞMA .....	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
8. KAYNAKLAR .....	104
9. ÖZGEÇMİŞ .....	115

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 2.1. <i>Agrobacterium</i> Genusunda Yeni ve Eski Sınıflandırma.....	8
Çizelge 3.1.1. Örneklerin toplandığı ilçeler ve mevkileri .....	25
Çizelge 3.2. Konya ilinde bakteriyel taç uru ( <i>A. vitis</i> ) hastalığının belirlenmesi amacı ile örnek toplanan ilçeler asma çeşitleri ve verilen isimler .....	28
Çizelge 3.2.2.1. <i>Agrobacterium vitis</i> ' in <i>Agrobacterium</i> genusu ile karşılaştırmalı tanısında kullanılan biyokimyasal testler .....	35
Çizelge 4.1 Konya ilinde bakteriyel taç uru ( <i>A. vitis</i> ) hastalığının belirlendiği örnekler, toplanılan ilçeler, asma çeşitleri ve sayıları .....	54
Çizelge 4.1.2.1. <i>Agrobacterium</i> cinsinin biyokimyasal ve fizyolojik testler ile türlere Ayrılması.....	58
Çizelge 4.1.1 İç Anadolu Bölgesinde asma örneklerinden elde edilen <i>Agrobacterium vitis</i> izolatlarının biyokimyasal testlere gösterdikleri reaksiyonlar.....	67

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Asma taç urununun ( <i>Agrobacterium vitis</i> ) yaşam çemberi .....	10
Şekil 2.2. Bir yaşlı dallardan bakteri ekstraksiyonu için düzenlenen vakum sistemi .....	14
Şekil 3.1.1. Konya İlinde asma örneklerinin toplandığı ilçeler.....	26
Şekil 4.1.1. A: Sultani çekirdeksiz (36), B: Cardinal (91), C: Kalecik karası (29) çeşitlerinde <i>A. vitis</i> ' in oluşturduğu urlar .....	55
Şekil 4.1.2. İzolasyonlarda <i>A. vitis</i> elde edilen örnekler A: Alphonse Lavallee (42), B: Karagevrek (168), Hafızali (221), Emir (211).....	56
Şekil 4.1.3. İzolasyonlarda <i>A. vitis</i> elde edilen örnekler A: Sultani çekirdeksiz (165) çeşidinde simptomsuz örnek, B: Sultani çekirdeksiz (185) çeşidinde ur oluşturmuş örnek.....	57
Şekil 4.1.2.1. 35°C'de Gelişme gösteren <i>A. vitis</i> izolatu .....	59
Şekil 4.1.2.2. Laktozdan 3-Ketolaktoz Üretimi .....	60
Şekil 4.1.2.3. Demir amonyum sitrat kullanımı .....	60
Şekil 4.1.2.4. %2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme .....	61
Şekil 4.1.2.5. Sakkaroz ve Eritritolden Asit Üretimi .....	62
Şekil 4.1.2.6. Oksidaz testi .....	62
Şekil 4.1.1.1.7. Sitrat kullanımı .....	63
Şekil 4.1.2.8. Litmus Milkte Reaksiyon.....	63
Şekil 4.1.2.9. Malonik Asitten Alkali Oluşumu.....	64
Şekil 4.1.2.11. PDA+CaCO <sub>3</sub> Besi Yerinde Asit Temizleme .....	65
Şekil 4.1.2.12. Potasyum Hidroksit Testi.....	66
Şekil 4.1.2.13. <i>Agrobacterium vitis</i> 'in Roy Sasser Besi Yerindeki gelişimi .....	66
Şekil 4.2.1. A: Ayçiçeği bitkisinin <i>A. vitis</i> inokule edildikten sonra pamuk ve parafilmle kapatılması .....	86
Şekil 4.2.2. A: Asma bitkisinin <i>A. vitis</i> inokule edildikten sonra pamuk ve parafilmle kapatılması .....	87
Şekil 4.2.3. A: Yetiştirilen asma çubukları, B: <i>A. vitis</i> inokule edildikten 4ay sonra asmada görülen urlar .....	87
Şekil 4.2.2. A: <i>A. vitis</i> inokule edildikten 1 ay sonra asmada meydana gelen urlar, B: Hastalık bulaştırılmamış asma ( Kontrol).....	88



Şekil 4.2.3. A: <i>A. vitis</i> inokule edilmiş ayçiçeği bitkisi, B: Ayçiçeği bitkisinde oluşan ur .....	88
Şekil 4.2.3. A: Hastalık bulaştırılmış domates bitkisi ve oluşan urlar, B: Sağlıklı domates bitkisi ( kontrol) .....	89
Şekil 4.2.4. Ayçiçeği bitkisinin yaprağına <i>Agrobacterium vitis</i> enjekte edildikten sonra meydana gelen nekrozlar .....	89
Şekil 4.2.5. <i>A. vitis</i> bulaştırılmış toprakta ayçiçeği fidelerinin belirtiler görüldükten sonra bitkinin köklerden başlayarak ölümü ve oluşan urlar .....	90
Şekil 4.3.1. Tütünde hipersensitif reaksiyon, K: su A: 301, B: 15, C: 250 <i>A. vitis</i> izolatlarının meydana getirdiği nekrozlar .....	91
Şekil 4.3.2. A: <i>A. vitis</i> enjekte edilmiş tütün yaprağı, B: kontrol, C: Tütün bitkisinde inokulasyondan sonraki 48 saat içinde meydana getirdiği hipersensitif reaksiyon .....	91
Şekil 4.4.1. PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde oluşturduğu bantlar A: <i>virA</i> geni 51. örnek <i>A. tumefaciens</i> , B: 16S – 23S geni, C: <i>pehA</i> geni 262. örnek <i>A. tumefaciens</i> , D: <i>Ab3-F3</i> ve <i>Ab3-R4</i> primerinde oluşan bantların görüntüsü ve 113. örnek <i>X. ampelinus</i> .....	93

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

AC : Asidik

AHL : *N*-acyl-homoserine laktone

ALK : Alkali

AT : *Agrobacterium tumefaciens*

BABA :  $\beta$ -amino butirik asit

bp : Baz çifti

°C : Santigrat derece

CT : Coumaroyl-tyramine

dak. : Dakika

ddH<sub>2</sub>O : Bidestile su

dev. : Devir

DF : Difüze olabilir faktörün

DNA : Deoksiribo nükleik asit

DSF : Difüze olabilir sinyal faktörü

EDTA : Ethylene daimine tetra acetic acid

EPS : Eksopolisakkarit

FAME : Yağ asit metil ester

FT : Feruloyl-tyramine

g : Gram

kb : Kilo baz

KB : King B besi yeri

kD : Kilo dalton

LPS : Lipopolisakkarit

RFR: Ankara Zirai Araştırma Enstitüsünden alınan referans kültürün adı

M : Molarite

MIS : Mikrobiyal Tanılama Sistemi (Microbial Identification System)

mg : Miligram

ml : Mililitre

mM : Milimolarite

NGA : Nutrient Glikoz Agar

nm : Nanometre

P : Fosfor

PBS : Fosfat Buffer-tuz Tamponu

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDA : Patates Dekstroz Agar besi yeri

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Bitki büyümesini teşvik edici Rizobakteriler)

pH : Hidrojen iyonu konsantrasyonu

ppm : Milyonda bir kısım

PR : Patogenez ile ilgili

RAPD : Rast Gele Çoğaltılmış Polimorfik DNA

rDNA : Ribozomal Deoksiribonükleik Asit

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

rRNA : Ribozomal Ribonükleik Asit

SA : Salisilik Asit

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

SDS-PAGE : Sodyum Dodesyl Sulfat-Polyacrilamid Gel Elektroforezi

sp. : Tür

spp. : Türler

syn. : Sinonim

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

TAE : Tris-Acetate-EDTA

T-DNA : Tranfer Deoksiribonükleik Asit

Ti : Tümör teşvik edici

TSA : Trypticase Soy Agar

YDC : Yeast Ekstrakt Kalsium Karbonat Besi Yeri

µg : Mikro gram

µl : Mikro litre

## 1.GİRİŞ

Tarih öncesi çağlarda kültüre alınan asma ve bağcılık kültürü, doğu ve batı medeniyetlerinin sosyal ve ekonomik yapısı içinde her dönemde önemli bir yer tutmuştur. Kimi toplumlarda asma ve özellikle şarap, mistik bir anlam kazanmıştır.

Yurdumuzda ihraç edilen ürünlerimiz arasında olan üzümün besin değeri yüksek olup, yapılan araştırmalara göre A, B, B2 ve C vitaminleri vardır ayrıca bünyesinde potasyum, magnezyum içeren üzümün insan sağlığı açısından tek başına bir eczane gibidir. Üzüm bağışıklık sistemini kuvvetlendirmektedir. Böbrek ve karaciğerin işlevini artırır, karaciğer hastalıkları ve kansızlığın tedavisinde etkilidir. Kanın temizlenmesine, vücutta yağların erimesine yardımcı olur, beyinin enerji kaynağıdır. Kuru üzüm ağız kokularını gidermekte, akciğer hastalığına, asap bozukluğuna, unutkanlığa, kansızlığa, karaciğer zafiyetine, ses kısıklığına iyi gelmektedir. Üzüm yaprağı suyu dizanteriye ve göz nezlesine karşı şifalı gelmektedir. Taze üzüm anne sütünü çoğaltmaktadır. Böbrek hastalıklarına taze üzüm iyi gelmektedir. Vücutta biriken zararlı maddelerin dışarı atılmasını sağlamaktadır (Karadeniz, 2004). Üzüm sofralık tüketim dışında kurutmalık, şaraplık, şıralık ve konservelik olarak da tüketilebildiğinden yılın her ayı beslenmede kullanılmaktadır. Son yıllarda üzüm yaprağı ihraç edilerek de gelir elde edilmektedir (Çelik ve ark., 1998).

Asma, sıcak-ılıman iklim kuşağı bitkisidir. Dünya üzerinde asmanın en başarılı olarak yetiştirildiği kuşak, 34°-49° kuzey ve güney enlemleri arasındadır (Oroman,1965). Dünyanın en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz bir yandan, halen üzüm üretimini sağlayan *Vitis vinifera* L. asma türünün gen merkezi diğer yandan bağcılık kültürünün merkezi olması nedeniyle, son derece eski ve köklü bir bağcılık geleneğine sahiptir. Bağcılığın bu durumu, ülkemiz toprakları üzerinde binlerce yıllık doğal melezlerin eseri olarak çok geniş bir çeşit ve tip zenginliğinin, ayrıca güçlü bir asma gen potansiyelinin oluşmasını sağlamıştır (Çelik ve ark., 2000).

Bağcılık, 2003 yılı itibariyle dünyada, 7.518.111 ha alanda bağcılık yapılmakta olup, toplam üzüm üretimi 60.883.454 tondur. Ülkemizde 2007 yılı toplam bağcılık

alanı 26.951.000 ha ve bunun tarım alanı içerisindeki payı ise %2 dir (Anonim, 2007a). Türkiye, Dünya Tarım Organizasyonu (Food and Agriculture Organization= FAO)' nun 2006 yılı verilerine göre 530.000 ha üretim alanı ile İspanya, Fransa ve İtalya'dan sonra dünyada dördüncü, 3.500.000 ton üzüm üretim ile İtalya, Fransa, İspanya, ABD ve Çin'den sonra dünyada altıncı ve 6,6 ton/ha verim ile kırk dördüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2006a; Anonim, 2006b).

Üzüm tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sadece sofralık olarak kullanılmamakta, ayrıca şaraplık olarak da ülkemiz ekonomisine önemli katkılar sağlamaktadır. Nitekim yaklaşık 2.5 milyon kişinin geçimini bağcılıktan sağlıyor olması bunun iyi bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Yapısında bulunan şeker, azotlu maddeler, mineraller ve vitaminler yönünden besin değeri oldukça fazla olan üzüm, taze olarak tüketilebildiği gibi pekmez, şarap, sirke, pestil, sucuk, kuru üzüm olarak da tüketilmektedir. Bunların yanı sıra budama sonucu elde edilen çubukların yakacak olarak kullanılması ve yapraklarının sarmalık olarak değerlendirilmesi de diğer yararları arasında belirtilebilir (Ağaoğlu, 1986). 2007 verilerine göre ülkemiz, toplam 4. 846. 097 da bağ alanı ile dünyada dördüncü, 3 612 781 ton üzüm üretimi ile de beşinci sırada yer almaktadır (Anonim, 2007a).

Yirmi birinci yüzyılda günümüz bağcılığını tehdit eden pek çok unsur bulunmaktadır. Bu unsurlar üretici hatalarından, hastalıklara kadar çok çeşitlilik göstermektedir. Dünyada oldukça geniş bir alanda kültürü yapılan asma, başta virüsler olmak üzere pek çok patojene karşı hassastır (Alleweldi ve Possingham, 1988). Kısa boğum, yaprak kıvrıcıklığı, mildiyö ve külleme, bakteriyel taç uru tüm dünyada ve ülkemizde bağcılığı tehdit etmektedir. Bahsedilen hastalıkların savaşımında erken uyarı, entegre ve biyolojik mücadele sistemleri yaygın ve etkin hale getirilemediği için veya yetersiz mücadeleden dolayı özellikle iklim koşullarının hastalık gelişmesi için uygun, ancak kontrolü için elverişsiz olduğu yıl ve yörelerde önemli ürün ve gelişme kayıpları meydana gelmektedir (Çelik ve ark., 1998).

*Agrobacterium vitis*, önceleri *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 olarak isimlendirilen (Ophel ve Kerr 1990), asmalarda taç uruna neden olan (Burr ve Katz,

1983), asmalarda öz su ile taşınan ve belirti vermeksizin bitkide bulunabilen bakteriyel bir etmendir. Bu nedenle çoğaltma materyali ile çok rahatlıkla taşınabilmekte ve ancak ur oluşumu görüldükten sonra fark edilebilmektedir. Bu şekilde özellikle ülke içinde hızlı ve yoğun bir şekilde dağılım göstermektedir.

Etmenin öz suda bulunması ve taşınması, budama ve diğer kültürel işlemler sırasında bulaşmaları artmaktadır. Bu durum bağcılığın önemli bir kolu olan fidancılık için önemli bir tehlike arz etmektedir. Çünkü erken dönemde fidanlıklarda oluşabilecek ularlar fidan ölümlerine dahi sebep olmaktadır. Gelişmiş bitkilerde ise daha çok verim azalması (Burr ve ark., 1998; Alleweldt ve ark., 1988) veya potansiyel inokulum kaynağı oluşturması şeklinde zarar meydana getirmektedir. Bulaşık çoğaltma materyali ile tesis edilecek bir bağ ileri dönemlerde çoğunlukla yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmaktadır. Fidan ölümlerinden ya da tesis edilmiş bir bağın bu nedenle elden çıkmasından dolayı oluşacak kayıp düşünüldüğünde temiz fidan kullanımının ne kadar büyük bir önem taşıdığı ortaya çıkmaktadır.

Bu özellikten yararlanılarak, çalışmamızda ülkemiz için önemli tarımsal ürünlerden biri olan asma bitkisinde büyük zararlara sebep olan önemli bir bakteriyel patojen olan *Agrobacterium vitis*' in biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle hızlı ve kesin tanısının Konya ve yöresinde yetiştirilen asma bitkilerinin sağlığının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Etmenin varlığı, hastalıkla mücadele için önemli sonuçlar doğuracak ve ayrıca konukçu patojen interaksyonları açısından da daha ileriki çalışmalarda dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesine olanak sağlayacak bilgiler elde edilebilecektir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bağcılıkta başarının temel şartı bağ kurulacak yörenin iklim ve toprak faktörleri ile asmanın çok iyi bir uyuşma içinde olmasını temin etmektir. Bu nedenle bir yere bağ tesis ederken iklim, toprak, mevki, yön, anaç ve çeşit seçimi gibi unsurları iyice etüt etmek gereklidir. Asma gelişme devresi oldukça uzun olan bir bitkidir (Ağaoğlu ve ark., 1986).

Günlük ısı ortalaması 10°C'yi bulunca gelişmeye başlar ve sonbaharda ısı ortalaması bu derecenin altına düşünceye kadar gelişmesini sürdürür. Her üzüm çeşidi meyveleri iyi bir şekilde olgunlaştırmak için belirli bir ısı toplamına ihtiyaç gösterir. Bağ kurulacak bölgenin yıllık aktif sıcaklık toplamının en az 1600°C derece olması gerekir. Verimli bağcılık yapabilmek için, yıllık ortalama sıcaklık 9-21°C ve sıcak aylar ortalaması 17-20°C olmalıdır (Ağaoğlu ve ark., 1997; Schroth, 1965).

Asmanın gelişmesi için bir vejetasyon devresinde 2900°C sıcaklık toplamına ihtiyaç olduğunu çeşitli araştırmalar sonucu belirlenmiştir. Erken olgunlaşan çeşitlerde tam çiçeklenmeden olgunluğa kadar geçen sürede 1600–2000°C, geç olgunlaşanlarda ise 3000°C ya da daha fazla sıcaklık toplamına ihtiyaç bulunur. Asmanın kökleri derinlere gittiği için diğer bitkilere oranla daha az yağış alan yerlerde de yetişebilir (Çelik ve ark., 1998).

Yıllık yağış miktarı yanında, yağışın dağılımı bağcılık bakımından çok önemlidir. Kış aylarında ve ilkbahar başlangıcında düşen yağmurlar asma için çok yararlıdır. İlkbaharın son döneminde ve yaz başlangıcında devam eden yağışlar özellikle fungal hastalıkların artmasına sebep olduğundan bağcılık yönünden sorunlar yaratmaktadır. Bağcılıkta iklim faktörleri çok önemlidir. Şayet bir yerde ilkbahar donları omcaların sürgün sürme zamanına kadar devam ederse, yeşil aksam, -2 °C nin altındaki ısıdan zarar göreceğinden bağ hasara uğrar (Çelik ve ark., 1998; Schroth 1988).

Sonbaharda erken gelen donlar da odun kısmının iyi odunlaşmasına engel olarak genç omcaların kurummasına sebep olur. Rüzgarların bağlara çok etkisi vardır. Diğer

iklim faktörleri müsait olmak şartıyla rüzgârlardan korunmuş yerler bağcılığa daha elverişlidir. Asma kökleri derine giden bir bitkidir. Bu yüzden yumuşak dokulu topraklardan hoşlanır. Bağlar yazları kurak veya az yağışlı yerlerde en iyi geliştiğinden bağ toprağının derin ve su tutma kapasitesinin yüksek olması istenir. Toprak yapısı köklerin gelişmesine müsait olduktan sonra fakir topraklarda bile yetişir (Çelik ve ark.,1998).

Yerli asmalar kendi kökleri üzerinde yetiştirildiğinde topraktaki kirece oldukça fazla tolerans gösterirler. Kalkerli topraklar şaraplık kırmızı üzüm çeşitlerinin sevdiği topraklardır. Ancak bazı Amerikan asma anaçları yetişmez. Humuslu toprakların bağcılık açısından önemi olmamasına rağmen iyi bir bağ toprağında % 5-10 humusun bulunması arzu edilir (Çelik ve ark.,1998).

Ülkemiz yıllık 350-400 bin tonluk üretimi ile dünyanın en büyük kuru üzüm üreticisidir. Bu değer, dünya üretiminin %40-50'sine denktir. Çekirdeksiz kuru üzüm üretimi yönünden ise yaklaşık 250 000 ton üretimle, ABD'den sonra ikinci sıradadır. Üretimin yaklaşık %75-80'i ihraç edilmektedir (Anonim, 2007).

Ülkemizde üretilen yaş üzümün yaklaşık %30'unun sırası değişik tipte pekmez, sucuk (orcik), pestil (bastık), köfter, muska, tarhana vb. ürünlere işlenerek, sınırlı bir bölümü ise sirke, şıra, üzüm suyu ve hardaliye yapılarak değerlendirilmektedir.

Yaş üzüm üretimimizin %2.5-3'ü şaraba işlenmektedir. Özellikle son yıllarda şaraba karşı ilginin arttığı, bu ilginin tüketime ve dolayısıyla şarap üretiminde artışa yansıdığı gözlenmektedir. Ülkemizin ekolojik koşulları, kaliteli şaraplık üzüm yetiştiriciliği için mükemmel seçenekler sunmaktadır.

Anadolu yarımadasının kuzeydoğu bölümünü de içine alan Karadeniz ve Hazar denizi arasındaki bölge, asmanın en önemli türü olan *Vitis vinifera* L.'nin gen merkezi ve kültüre alındığı yöre olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, ülkemiz yaklaşık 6000 yıllık bir bağcılık kültürüne ve hem yabani asma (*Vitis vinifera* sp. *sylvestris*) ve hem de kültür asmasına (*Vitis vinifera* sp. *sativa*) ait olmak üzere çok



zengin bir asma gen potansiyeline sahiptir (Ağaoğlu ve ark., 1997; Çelik ve ark., 1998).

Bilindiği üzere, ülkemiz dokuz tarım bölgesine ayrılmıştır. Tarım bölgeleri düzeyinde bağ alanı ve üzüm üretimi incelendiğinde, uzun yıllardan bu yana olduğu gibi, 2007 yılında da bölge sıralamalarının değişmediği görülmektedir. Ülkemiz bağ alanlarının %33.0'üne sahip olan Ege bölgesi, üretimin % 43.3'ünü karşılayarak birinci sıradaki yerini sürdürmektedir. Bu bölgemizi, alan ve üretimin %19.5'ine sahip olan Akdeniz Bölgesi izlemektedir. Bağ alanlarının %18.2'sine sahip olan ve üretimin %13.8'ini karşılayan Ortagüney tarım bölgesi ise üçüncü sıradaki yerini korumaktadır (Anonim, 2007).

Coğrafi konumu itibariyle ülkemiz; sofralık, kurutmalık, şaraplık ve şıralık üzüm çeşitlerinin yetiştiriciliği için ideal sayılabilecek ekolojik koşullara sahiptir. Bağcılık ve şarapçılık kültürünün yaklaşık 6 bin yıl önce Anadolu'nun kuzeydoğu kesimini de içine alan bölgede başladığı kabul edilmektedir. Bu süreçte, çok güçlü uygarlıklara ev sahipliği yapan Anadolu, bağcılık ve şarapçılık kültürünün Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'ya; oralardan da Amerika, Güney Afrika, Okyanusya ve Uzak Doğu'ya kadar yayılmasında öncü ve köprü görevini üstlenmiştir. Bu nedenle, çok köklü bir bağcılık kültürüne ve zengin bir asma gen potansiyeline sahip olan ülkemizin bütün bölgelerinde bağcılık yapılmakta ve elde edilen ürünler hem yaş halde sofralık olarak, hem kurutulularak, hem de sırası değişik ürünlere dönüştürülerek değerlendirilmektedir (Çelik ve ark., 1998).

Bağlarda görülen hastalık ve zararlılar içerisinde, fungal hastalıklar; kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), bağ mildiyösü (*Plasmopara viticola*), külleme (*Uncinula necator*) ve Ölü Kol (*Phomopsis viticola*), bakteriyel hastalıklar; bakteriyel gal (*Agrobacterium tumefaciens*), bağ kanseri veya taç uru (*Agrobacterium vitis*), sürgünlerde bakteriyel benek (*Xanthomonas campestris pv. viticola*), bakteriyel yanıklık (isilik marazı) (*Xylophilus ampelinus*), phony (Pierce's) hastalığı Asma vebası (*Xylella fastidiosa*), viral hastalıklar; asmada kısa boğum (Fanleaf Virüs), asmalarda yaprak kıvrıcıklığı (Grapevine Leafroll Virüs) ve zararlılar; bağ

maymuncuğu (*Otiorynchus* spp.), bağ filokserası (*Viteus vitifoli*), salkım güvesi (*Lobesia botrana*), bağ göz kurdu (*Theresimima ampelophaga*) olarak bildirilmektedir (Çelik ve ark.,1998).

*Agrobacterium tumefaciens*, toprak kökenli olup 90 farklı familyada 648 bitki türünde hastalık oluşturmaktadır (Bradbury 1986; De Cleene ve Deley, 1976). Değişik meyve ağaçları, kabuklu meyveler, üzüm, gül, krizantem ve diğer süs bitkileri ile diğer bazı bitkiler konukçuları arasındadır (Kerstens ve De Ley, 1975).

Asmalarda maddi olarak önemli kayıplara neden olan bakteriyel hastalıkların başında gelen asma dal kanseri (*Agrobacterium vitis*) tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir (Burr ve ark., 1999). Bakteriyel dal kanseri, başta asma olmak üzere ayçiçeği, tütün, domates, gül, krizantem, Datura ve Bryophyllum bitkilerinde doğal açıklıklardan ve özellikle soğuk, dolu vb. yoluyla açılan yaralardan kolaylıkla girerek bitkilerin dal ve gövde kısımlarında ur şeklindeki odunsu yapılar oluşturmaktadır. Bu yapılar bitkinin besin maddesi ve su alımını engellemekte ve dolayısıyla bitki canlılığını giderek kaybetmekte ve en sonunda da bitki tamamen kurumaktadır. Etmen yara benzeri simptomlar da oluşturabilmektedir (Ophel ve Kerr 1990).

Burr ve Katz (1984) tarafından, Panagapoulas ve ark., (1978)' na atfen bildirildiğine göre, *A. tumefaciens* biovar 3 diğer biovarlara göre daha az konukçuya sahiptir. Buna paralel olarak Burr ve Katz (1983), asmalardan büyük çoğunlukla *A. tumefaciens* biovar 3 izole edilmesinin sebebini asmalarda bu bakteri yönünden gerçekleşen seleksiyona bağlamışlardır. Burr ve ark. (1995a), Cavara ve ark., (1897)' ye atfen bağlarda urlara neden olan bakterinin (*Bacillus ampelopsorae*) ilk defa İtalya' da gözlemlendiğini bildirmektedir. Daha sonra Smith ve Townsend (1907), papatya (*Argyranthemum frutescens*) bitkilerindeki urlardan zayıf gelişen bir bakteri izole etmiş ve bu bakteri kültürü ile yaptıkları yapay inokulasyonlardan tekrar benzer karakterde yavaş gelişen bakteriyi elde ederek onu *Bacterium tumefaciens* olarak isimlendirmişlerdir.

Daha önceleri *A. tumefaciens* (Smith ve Townsend) Conn biovar 3 veya biotip 3 olarak isimlendirilen *A. vitis* (Panagopoulos ve Psallidas, 1973; Ophel ve Kerr 1990; Conn, 1942; Jarvis, 1996; Kloepper, 1980; Xianying, 1986) asmalarda taç uruna neden olan başlıca tür ve asmanın en önemli hastalıklarından biridir (Burr ve ark., 1985b).

Young ve ark. (2001) tarafından *Agrobacterium* genusunda yer alan *Agrobacterium vitis*'in *Agrobacterium vitis* olarak adlandırılması gerektiğini önermişlerdir (Çizelge 2. 1).

**Çizelge 2.1.** *Agrobacterium* Genusunda Yeni ve Eski Sınıflandırma

<b>Yeni sınıflandırma</b>	<b>Eski sınıflandırma</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> biovar 1 <i>Agrobacterium radiobacter</i> biovar 1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> biovar 1
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> biovar 2 <i>Agrobacterium radiobacter</i> biovar 2 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> biovar 2
<i>Agrobacterium vitis vitis</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> biovar 3 <i>Agrobacterium radiobacter</i> biovar 3
<i>Agrobacterium rubi</i>	<i>Agrobacterium rubi</i>

Hastalığın tipik belirtisi, asmanın kök boğazında, gövde üzerinde ve yeni sürgünlerde urların oluşmasıdır. Urlar ilk oluştuklarında yüzeyleri düz, soluk renkli ve düzensiz şekilli hücreler yığından ibarettir. Büyüyüp genişlediklerinde renkleri koyulaşır ve yüzeyleri pürüzlü bir hal alır. Yumrular yaşlandıkça renkleri iyice koyulaşarak çatlar (Burr ve Katz 1987).

Bakteri asmalara yara yerlerinden girer. Bu yaralar don veya dolu nedeniyle oluşabileceği gibi; budama, aşılama ve toprak işleme gibi kültürel işlemler sırasında oluşan yaralar ile hastalık ve böceklerin neden olduğu yaralarda bakteri için uygun giriş yerleridir. İç Anadolu gibi kışları soğuk geçen, omcaların yere yakın taçlandırıldığı ve kışın toprakla örtüldüğü bölgelerimizde gövde ve kök boğazında don zararı sonucu meydana gelen çatlaklardan kolayca bitki bünyesine giren

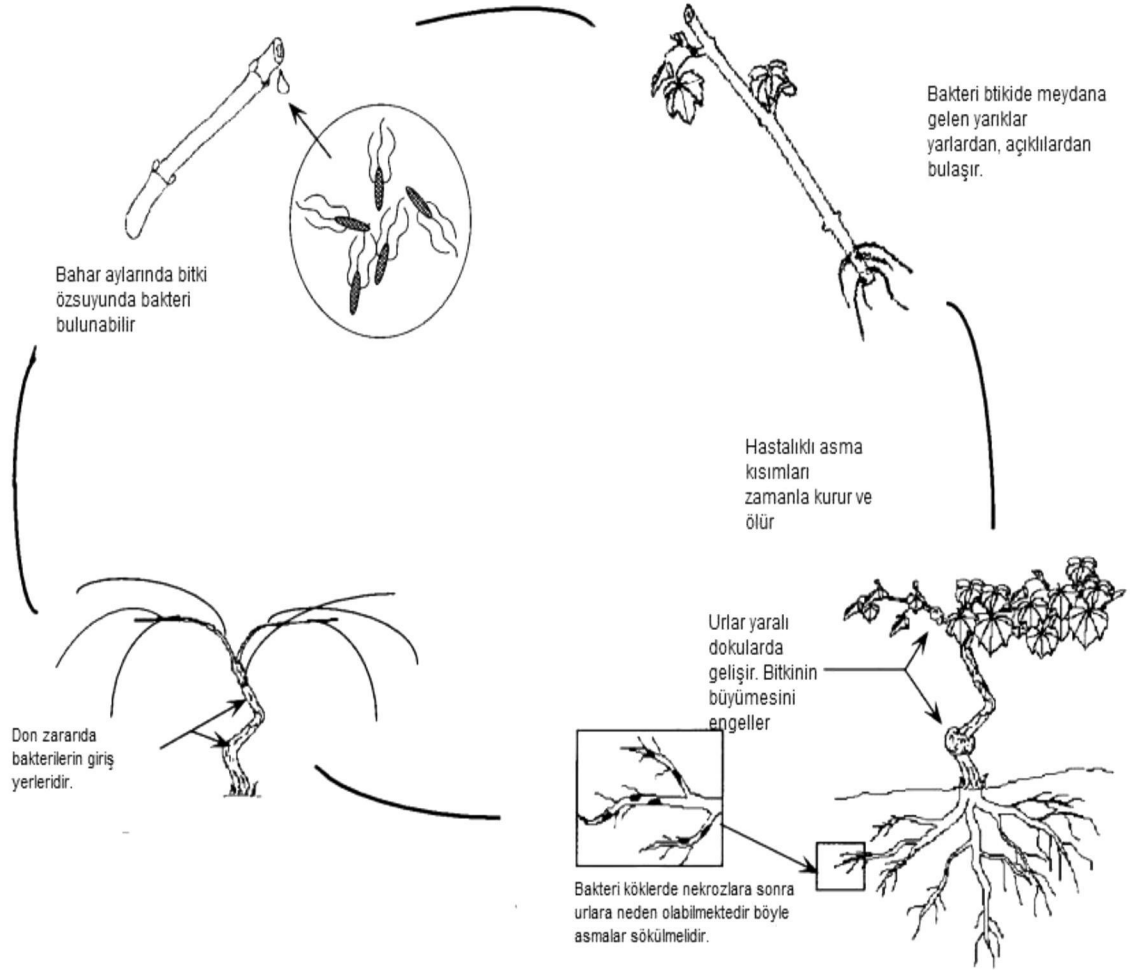
bakterinin yol açtığı hastalık, böyle iklimsel özelliklere sahip bölgelerimizde oldukça yaygındır (Argun, 2001).

*Agrobacterium vitis*'in tümör oluşturan ve oluşturmeyen ırkları, asmanın iletim demetlerinde uzun yıllar canlı kalabilirler. Toprakta ise her zaman mevcuttur. Bakteri, asmanın köklerinde ve çevresindeki toprakta yaşayabilirse de kökler öldükten ya da topraktan uzaklaştırıldıktan sonra, popülasyonu zamanla azalır. *Agrobacterium vitis*, asmaya özgü olmasıyla diğer *Rhizobium* türü bakterilerden ayrılır. *Agrobacterium tumefaciens* ve *A. rhizogenes*' in tersine, toprakta uzun yıllar canlı kalabilir ve enfeksiyon için kaynak oluşturabilir. Uurlar genellikle omcanın enfekte olmuş dokularında yaralanmayla birlikte gelişir(Şekil 2.1.). Nemli koşullar hastalığın gelişmesini hızlandırır (Lehoczky ,1968; Liang 1990).

*A. vitis* asmalarda öz su ile taşınan ve belirti vermeksizin bitkide bulunabilen bir bakteridir. Bu nedenle çoğaltma materyali ile çok rahatlıkla taşınabilmekte ve ancak ur oluşumu görüldükten sonra fark edilmektedir. Bu şekilde özellikle ülke içinde hızlı ve yoğun bir şekilde dağılım göstermektedir. Bakterilerin öz suda bulunması ve taşınması, budama ve diğer kültürel işlemler sırasında bulaşmalarında artırmaktadır. Bu durum bağcılığın önemli bir kolu olan fidancılık için önemli bir tehlike arz etmektedir. Çünkü erken dönemde fidanlıklarda oluşabilecek uurlar fidan ölümlerine dahi sebep olmaktadır (Lehoczky ,1968).

Bakteri hastalıklı asma artıklarında ve hatta diğer bitki artıklarında uzun yıllar canlılığını koruduğu bu zamana kadar ki kayıtlar içerisinde yer almaktadır. Buna karşın bugüne kadar özellikle asma artığı olmayan topraktan bakteriyi izole etmek pek mümkün olmamıştır (Burr ve ark., 1987, Burr ve ark., 1995a).

Damla ya da yeraltı sulama sistemi ile sulanan kumlu topraklarda, sürekli ve yüksek oranda nemlilik nedeniyle, uurlar çok hızlı bir şekilde çoğalır. Ayrıca aşılı ve aşısız asma fidanlarının bağ dikilmeleri sırasında, dikim budaması yapılarak köklerin yaralanması, kanser etmeni için önemli bir giriş kapısı oluşturmaktadır (Burr ve ark., 1995b).



**Şekil 2.1.** Asma taç urunun (*Agrobacterium vitis*) yaşam çemberi

Burr ve Katz (1983), patojenik *Agrobacterium* türlerinin gallerden, öz sudan ve topraktan izole edilebildiğini, ancak mevsimsel farklılıkların bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu amaçla, öz sudan izolasyon için Nisan-Mayıs aylarını tercih ederken, gal ve topraktan izolasyonda Hazirandan Eylül'e kadar olan bir dönemi seçmişlerdir.

Galli dokulardan elde edilen izolatların çoğunun patojen olduğunu, ancak öz su ve topraktan izolasyonlarda bu yoğunluğun olmadığını gözlemlemişlerdir. Toprakta izole ettikleri patojen strainlerin, taze galli dalların bulunduğu omcaların

çevresinden olduğunu, bunun da gallerden yıkanma sonucu toprağa geçen akıntıdan kaynaklanabileceğini savunmuşlardır (Burr ve ark., 1983).

*Agrobacterium* türleri asma dalları galli dokular gibi çeşitli bitki aksamalarının yanı sıra topraklardan da izole edilebilmektedir. İzolatların patojenisiteleri asıl konukçusu olan asmanın yanı sıra domates ayçiçeği gibi indikatör bitkilerle havuç disklerinde belirlenebilmektedir. Ancak havuç diskleri çok pratik olmalarına karşın, bazen düşük patojenisite gösterdiklerinden şüpheli sonuçlar verilebilmektedir (Burr ve Katz 1983).

Knauf ve ark., (1982) *Agrobacterium* spp. konukçularını belirlemek amacıyla 220 asma örneği toplamışlar ve 34 patojen *Agrobacterium vitis* izolatu, 30 patojen *Agrobacterium tumefaciens* izolatu elde etmişlerdir.

Burr ve Katz, (1983) *A. vitis* bakterisini izola edebilmek için seçici bir besi yeri kullanılarak asma urlarından, asmanın öz suyundan ve bağ toprağından izole edilmiştir. Urlardan izole edilen en yaygın *Agrobacterium* türleri arasında *A. vitis* olduğu, 24 infekteli asmanın yedisi ve sağlıklı görünen 17 asmanın birinin öz suyundan elde edilmek suretiyle belirlenmiştir. 10 öz su izolatının *A. vitis* olarak belirlenmiş ve hepsinin asma ve ayçiçeğinde patojen olduğu tespit edilmiştir.

Tarbah ve Goodman, (1986) 5 farklı asma çeşidinden oluşan 200 asma örneği toplamışlar ve urlardan ve öz sularından 150 adet *A. vitis* izole etmişlerdir.

Argun (2001), Orta Anadolu bölgesinde 1000 da üzerinde bağ alanı olan 55 köyü *Agrobacterium vitis* yönünden incelemişler 27 köyün bağlarının adı geçen bakteri ile bulaşık olduğunu tesbit etmişlerdir. İncelemeler sonucunda 57 *Agrobacterium vitis* izolatu elde etmişlerdir.

Demir ve ark. (2002), asma kök uru hastalığının görüldüğü fidan üretim merkezleri ve farklı bölgelerdeki bağlardan alınan toplam 56 örnekten yapılan izolasyonlar sonunda, *Agrobacterium* benzeri 118 izolat elde edilmiş ve bu

izolatlardan 82 tanesinin patojen olduğu belirlemişlerdir. Tanılanmış *Agrobacterium vitis* izolatlarının karşılaştırmalı olarak denemelere alındığını tür tanılama testleri sonunda asma izolatlarının *Agrobacterium vitis* özelliği gösterdikleri ve asma dışında bazı bitki türlerinde de ur oluşturdıklarını belirlemişlerdir.

Küsek (2007), Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde bulunan bağ alanlarını incelemiş ve hastalıklı bitkilerden örnek almışlardır. Mersin, Gaziantep, Hatay, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde hastalıklı asma bitkilerindeki urlu dokulardan toplam 47 adet ur oluşturan patojen bakteri izole etmişlerdir.

Benlioğlu ve ark. (1998) Orta Anadolu bölgesinde sağlıklı görünen 150 asma örneği toplanmış ve 7 örnekte *Agrobacterium vitis* tesbit etmişlerdir. Ayrıca 8 bulaşık asmasının da 6 tanesinin sürgünlerinden *A. vitis* elde etmişlerdir. Toplanan örneklerin 6 tanesinin patojen, 7 tanesinin de non patojen *A. vitis* olduğunu belirlemişlerdir.

*Agrobacterium vitis*' in ait olduğu *Agrobacterium* grubu bakteriler morfolojik özellik bakımından genel olarak hemen hepsi birbirine benzer koloni oluşturur. Spor üretmezler ve gram negatif bakterilerdir. Fizyolojik olarak kendilerine ait solunumla, ilgili bir enerji metabolizmaları vardır. Toprak üstü ve toprak altı belirtilerden, iletim demetlerinden akan sıvı kısımlardan ve belirti görülmeyen kısımlardan izolasyon yapılabilir. İzolasyon için beyaz – krem renkte ve aktif olan urlar daha uygundur. Koyu renkli nekrotik bölgelerden daha kolay izolasyon yapılabilir. Urlardan patojen olan ve olmayan izolatlar elde edilebilir. Aynı urdan değişik bakteriler izole edilebilir (Burr ve ark., 1987; Burr ve ark., 1995).

Burr ve Katz (1984), asmalarda yaptıkları izolasyonlarda RS (Roy ve Sasser), SCH (Schroert et al), NKS (Modified New ve Kerr) ve NK (New ve Kerr ) besi yerlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar, patojen türlerin daha çok RS ve NKS besi yerlerinde az oranda da NK' da iyi oranda geliştiğini gözlemlemişler, ancak NKS besi yerinde de bulaşmalara sık rastlandığını ifade ederek en uygun besi yerinin RS

olduğunu rapor etmişlerdir. Buna karşın RS' de, her ne kadar biovar 3' e göre daha yavaş gelişse dahi *A. tumefaciens* biovar 1'in de gelişebildiğini, bu nedenle patojenisite ve diğer testlerin yapılmasının gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

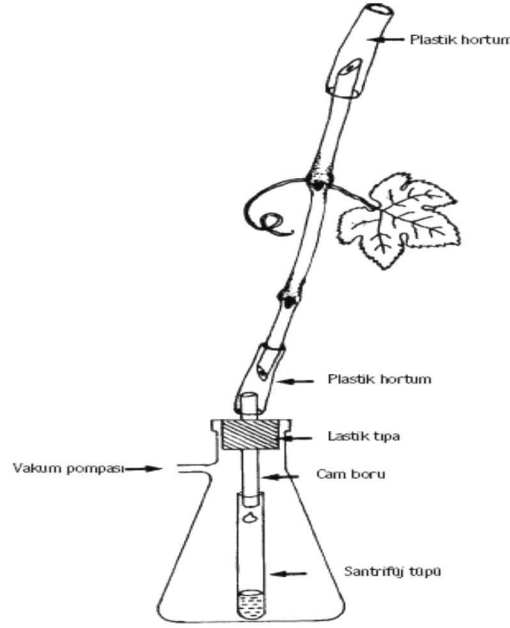
Lehoczky (1968), bağ uru etmeni ile enfekte edilmiş asmalardan, urun 15 ve 80 cm altından kesilen asma çubuklarından akan öz sudan etmeni (*Agrobacterium vitis*) izole etmiştir. Budamayla ve diğer yaralanmalarla asma çubuklarında yeni urların oluştuğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile ilk defa bağ urunun iletim demetleri yoluyla taşındığı ve bitkinin üst kısmında ikincil urlara neden olduğu tespit edilmiştir

Tarbah ve Goodman (1986), ekim ve kasım aylarında 100 cm'lik asma dalı örnekleri almışlar ve bunları 12-15 cm'lik parçalara ayırmışlardır. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan bu parçalardaki öz suyun, vakumla apikal kısımda toplanması sağlandıktan sonra çok ince borularla alıp steril tüplerde biriktirmişlerdir.

Her örnekten alınan öz suları *A.tumefaciens* biovar 3 için yarı seçici olan RS ortamına eklemişler ve bunun sonucunda gelişen bakterilerin büyük bir çoğunluğunun *A. tumefaciens* biovar 3 ve patojen olduğunu, birkaç tanesinin *A. tumefaciens* biovar 1, sadece bir izolatanın da *A.radiobacter* olduğunu tespit etmişlerdir. Öz su çıkarma işlemi örneklerin dip, orta ve uç kısmına uygulamışlar ve örneklerin bu uç kısmından da bakteri izole etmeyi başarmışlardır.

Benlioğlu ve Özakman (1998), bağ çubuklarında iletim demetlerinde bulunan *A.tumefaciens*' in tesbiti amacıyla Kırşehir ve Nevşehir yöresindeki bağlardan dormant dönemde 1 yaşlı bağ sürgünleri (yaklaşık 40-50 cm uzunlukta üzerinde 3-4 göz bulunan) toplamışlardır. Bağ sürgünlerinden özsu ekstraksiyonu için çubukların her iki ucuna 5-6 cm uzunlukta plastik hortum takılarak sürgünün büyüme ucu vakum erlenine bağlanacak şekilde Şekil 2.2.'de belirtilen bir düzenele vakum pompasına bağlamışlardır. Sürgünün köke yakın olan ucundaki plastik hortuma 3 ml steril damıtık su kondu ve 500 mm Hg lık bir vakum uygulanarak bu suyun sürgünün iletim demetlerinden geçirilip erlen içindeki tüpte toplanması sağlanmış, tüpteki bu sıvı 5000 g de 10 dakika santrifüjlenip pellet 0.3 ml steril su içinde süspanse edilmiştir (Şekil 2.2).





**Şekil 2.2.** Bir yaşlı dallardan bakteri ekstraksiyonu için düzenlenen vakum sistemi (Benlioğlu ve Özakman, 1998)

Aynı araştırmacılar, survey zamanı olarak urlu dokulardan daha iyi izolasyon için ilkbahar ve yaz aylarında fidanlıklardan alınan dal örnekleri içinde kış aylarının en uygun olduğunu belirlemişlerdir. Gerek urlu dokulardan gerekse köklerden yapılan izolasyonlarda RS' nin uygun bir besi yeri olmasına karşın, koloni morfolojileri ve patojenisitelerinin belirlenmesi açısından yeterli olmadığını kaydetmişlerdir. RS besi yerinin diğer bazı besi yerleri daha özel testler ve patojenisite testleri ile desteklenmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Bu çalışmalarda araştırmacılar, köklerinde lezyonlar bulunan asmalardan yaptıkları izolasyonlarda *A. tumefaciens* biovar 3'ün oluşturma yeteneğinde olan ve olamayan streynlerini elde etmişlerdir. Daha sonra Burr ve ark., (1987), 6-10 adet kök parçasını %5' lik sodyum hipoklorit içinde dezenfekte ettikten sonra steril suda durulamışlardır. Durulanan parçaları lezyonların bulunduğu yerlerden çaprazlama keserek RS besi erine çizmek suretiyle köklerden izolasyon yapmışlardır. Bunun sonucunda, asmalara özel kök çürüklüğüne *A. tumefaciens* ve *A. radiobacter* biovar 3'ün sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Goodman ve ark. (1993), denemelerinde kullandıkları asma anaçlarında *A. vitis* tespiti için Tarbah ve Goodman (1986)' nın kullandığı vakum yöntemini tercih etmişler ve vakumla ksilem dokularından elde ettikleri ksilem sıvısını Roy ve Sasser besi yerinde bakteri izolasyonu için kullanılmışlardır.

Pu ve Goodman (1993), enfekteli toprakta yetiştirilen temiz fidanlara topraktan bakteri bulaşması olduğunu ve etmenin köklerden uç kısımlara kadar tırmanmanın mevsimsel farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durumu mevsimlere göre köklerden yukarı doğru öz su transferinin farklılığına bağlamışlardır. Dolayısıyla sürgünlerden haziran ayında az sayıda bakteri elde edilirken, aynı yılın kasım ayında hiç bakteri elde edilememiş, buna karşın ertesi yılın nisan ayında ise yüksek oranda koloni elde edilmiştir. Hatta mart ve nisan ayları kıyaslandığında dahi mart ayında nisana göre çok az sayıda bakteri izole edilebilmiştir. Çünkü ilkbaharla birlikte köklerden basınç artmakta ve özsu ile birlikte bakteri de yukarı taşınmaktadır.

Burr ve ark., (1995)' ne göre, *A. vitis* toprakta en az 23 ay çürümüş ve çürümekte olan bitki artıklarında canlı olarak kalabilmekte ve ur oluşturma yeteneğini koruyabilmektedir. Ayrıca en az 16 ay süre ile genetik olarak hiçbir değişikliğe uğramamaktadırlar. Bakterinin toprakta uzun süre canlı kalabilmesinde, bakteriyel gelişme oranı, toprağın besin maddesi durumu ve çevresel etmenlere tolerans gibi faktörler önemli rol oynamakta, fakat streynin asma çeşidindeki virulensi ya da agrocin üretimini etkisi bulunmamaktadır.

Bir çok araştırmacı, topraktan izolasyonun etkinliğini artırmak amacıyla, *Agrobacterium* türleri için sıklıkla kullanılan RS besi yerinde, gerek içerdiği kimyasallarda ve gerekse ortamın pH' sında bazı modifikasyonlar yapmanın mümkün olacağı ileri sürmüşlerdir. Bu şekilde RS besi yerinde bulunan cycloserine'i elimine etmişler ve bu kimyasallar olmadan hazırlanan besi yerinde (MRS) kolonilerin sarı renkli ve RS' e göre % 20 daha iyi geliştiğini kaydetmişlerdir. pH derecesinde ise en yoğun gelişmenin, gerek biyolojik kontrol ajanı gerekse biyolojik patojen açısından 5-6.5 olduğunu saptamışlardır. Özellikle pH sı 8 olan besi

yerlerinde hemen hemen hiçbir gelişme gözlemlenmemişlerdir (Pu ve Goodman, 1993; Benlioğlu ve Özakman, 1998).

Goodman ve ark., (1987), küçük bir basınç kabini içinde sürgün ve dallara basınç uygulayarak, steril suyla birlikte iletim demetlerindeki bakterinin yıkanmasını ve steril tüp içinde birikmesini sağlamışlardır. Tüp içerisinde biriken bakterili sıvıyı RS besi yerine ekerek, 28 °C' 5 günlük inkubasyondan sonra gelişen kolonileri YTSA (Yeast Tryptone Sakkoroz Agar) besi yerine transfer etmişlerdir. Bu şekilde, yeşil sürgünlerde ve odunsu aksamda indeksleme sisteminin başarılı olduğunu ve bu şekilde patojenden ari anaç ve çeliklerin tesbit edilebileceğini belirtmişlerdir.

*A. vitis* teşhisi için kullanılan pek çok yöntem bulunmaktadır. Bir çok araştırmacı bu amaçla genel olarak, Burr ve Katz (1983); Burr ve Katz (1984); Tarbah ve Goodman (1986); Schaad (1988) ve Schaad (2001)' de yer alan teşhis kriterlerini kullanmaktadırlar. Bunun yanı sıra serolojik testlerde bu amaçla kullanılabilir. Nitekim Bishop ve ark. (1989), ELISA ve Immunoblot testlerinin hızlı ve pratik olarak uygulanabileceğini, kısa sürede çok sayıda izolatın güvenilir olarak teşhis edilebileceğini kaydetmişlerdir.

Benlioğlu ve Özakman (1998), sağlıklı görünen 150 asma çubuğunun 7' sinden 8 bulaşık asma çubuğunun da 6' sında *A. tumefaciens* biovar 3 izole etmişlerdir. Burr ve ark. (1987)' na göre köklerdeki lezyonlarda ur oluşturma yeteneğinde olan ve olmayan *A. tumefaciens* biovar 3' ün ikisi birlikte veya ayrı ayrı bulunabilmektedirler.

Küsek (2007), Mersin, Gaziantep, Hatay, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde hastalıklı asma bitkilerindeki urlu dokulardan toplam 47 adet ur oluşturan patojen bakteri izole etmişlerdir. Klasik bakteriyolojik tanılama teknikleri, PCR, yağ asit analizi ve patojenisite testlerine göre izole edilen tüm izolatlar *Agrobacterium vitis* olarak tanılanmışlardır. Yaptıkları patojenisite testlerinde, tüm izolatlar bağda ur oluştururken, 7 izolat domateste (*Lycopersicum esculentum*) ve 8 izolat kalonşe (*Bryophyllum daigremontianum*) bitkilerinde ur oluşturmamıştır.

Argun (2001), Ankara, Kırıkkale, Nevşehir, Konya, Karaman illerinde 1000 da üzerinde bağ alanı olan 55 köy *Agrobacterium vitis* yönünden incelenmiş, toplam 27 köyün bağlarının adı geçen bakteri ile bulaşık olduğu tesbit etmişlerdir. İzolasyonlar sonucunda; 2 si öz sudan olmak üzere toplam 57 *Agrobacterium vitis* izolatu elde etmişler ve hepsinin asma dallarında ur, sürgün ve kökte nekroz ve ayrıca tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR) oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Bazı *Rhizobium* türleri besi yerinde çok yavaş gelişmekte ve koloni renkleri, şekilleri değişik olabilmektedir. Elde edilen koloniler, steril suda süspansiyon haline getirilip ondan sonra çizgi ekim yapılmalıdır. *Rhizobium*, genelde PDA+CaCO<sub>3</sub> agarda çok iyi gelişmekte ve ayrımları kolay olmaktadır. Urlardan izole edilen izolatların bazıları patojenik, bazıları ise patojenik karakterde olmamaktadır. Koloniler genelde konveks (kabarık), parlak, ve düz kenarlı iken renkleri ise beyazımsı krem renkte olabilmektedir. Etmen en iyi 25-27 ° C gelişmektedir (Burr ve ark.,1987; Tıghe 2000; Wang, 2003).

*Agrobacterium vitis*' in tanılanmasında birkaç seçici besiyeri tanımlanmıştır. *Rhizobium* türlerinin izolasyonu, diğer fitopatojen bakterilere göre daha zordur. Bu nedenle bu etmenler için seçici ve yarı seçici besi yerleri geliştirilmiştir. *Agrobacterium vitis* için geliştirilen seçici ve yarı seçici besi yerleri 1A, 2E ve 3 DG besi yerleri (Brisbane ve Kerr, 1983), Roy ve Sasser (1983) besi yeri, PDA, NGA, kalsiyum karbonat içeren PDA besiyeridir (Burr ve Katz 1983).

Besi yerlerini hazırlarken damıtık veya de-iyonize sudan yararlanılmalıdır. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri eğik PDA veya NGA besi yerlerinde ve +4°C' de buzdolabında saklanır. Tekrar çalışılacaksa bu eğik agardan alınarak PDA veya YDC besiyerine aşılır. Kültürler 40-48 saat gelişince %0.85'lik NaCl eriği içinde bir süspansiyon hazırlanır. Kullanılacak süspansiyon yaklaşık 10<sup>5-6</sup> hücre/ml olmalıdır. Sıvı besi yerinde geliştirmek istenirse bu süspansiyondan 0.1 ml alınıp sıvı besi yerine aşılır (Burr ve Katz 1983).

Türkiye’ de yerli çeşit ve anaçlarla yaptıkları çalışmada, Demir ve ark., (1998), farklı opine sentezine sahip izotların denendiği çeşit reaksiyonu denemelerinde çeşit duyarlılıklarının opine sentez tiplerine göre değişebileceği savunmuşlardır. Denemelerinde Süle ve ark., (1994) tarafından kullanılan inokulasyon yönteminden faydalanmışlardır. Araştırmacılar Sultanina çeşidinin (Sultani Çekirdeksiz) sadece octopine sentezini uyaran *A. vitis* izolatlarına duyarlı olduğunu belirtmişlerdir ki bu sonuç Szegedi ve ark., (2005)’ nin bulgularıyla da paralellik göstermektedir. Ayrıca aynı çeşidin farklı izolatlara karşı reaksiyonunda farklılık olabileceğini de belirtmişlerdir. Diğer yandan Pembe Çekirdeksiz en duyarlı, Cardinal ise hastalıktan en az etkilenen çeşit olarak saptanmıştır (Argun, 2001).

Stover ve ark., (1997)’ ne göre de araştırmacıların bulguları arasında farklılıklar bulunmakta ve bu da daha çok ekolojik ve coğrafik koşullardan ileri gelmektedir. Örneğin adı geçen araştırmacılar Teleki 5C anacının en az hassas olarak bulurken Ferreira ve Van Zyl (1986) Güney Afrika’ da orta derecede hassas (Stover ve ark., 1997), Goodman ve ark., (1993) ise, İsviçre’ de aynı anacı çok hassas olarak saptamışlardır. Bunların yanı sıra Stover ve ark., (1997) tarafından bildirildiğine göre, *A. vitis*’ in oluşturduğu taç uruna karşı bağışık bir asma türü bulunmamaktadır.

Araştırmacıların vurguladıkları bu diğer nokta ise izotların tek tek ya da birlikte enfeksiyonları durumunda kimi zaman ur oluşma gözlenmesi kimi zaman da hastalıkta bir azalma ve engellenme görülmesidir. Kombine inokulasyonlar sonunda bazı çeşitlerde eşit miktarda opine tesbit edilirken diğerlerinde opine miktarında azalma gözlenmiştir (Szegedi ve ark., 2003; Mcguire, 1991).

Birisset ve ark. (1991), *Agrobacterium* spp.’ nin tumorijenitesinde ve kök çürüklüğü oluşturmasında bitki hücrelerine bağlanma durumlarının önemine dikkat çekmişler ve bunu etkileyen çok çeşitli faktörlerin olabileceğini bildirmişlerdir. *A. tumefaciens* biovar 3’ün, *A. tumefaciens* biovar 1’e oranla daha spesifik bağlanma kapasitesinin bulunmasının, *R vitis*’ in bağlanmasının da, köklerde yara yerlerinin bulunması ve Polygalacturonase (PG) enzimi üretimi ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

*Agrobacterium vitis*'in tanınmasında, Roy ve Sasser, King B, PDA besi yerlerinde gelişim, 35 °C' de gelişim, 3-ketolaktöz oluşumu, % 2' lik NaCl' de gelişim, L- tartarik asitten alkali oluşumu, sitrat kullanımı, pektolitik aktivite, oktopine ve napolin kullanımı, endoglukonaz aktivitesi, litmus milk testi, eritritol' den ve melezitöz'dan asit oluşumu, malonik asitten alkali oluşumu, demir amonyum sitrat, PDA+CaCO<sub>3</sub>'da asit temizleme testleri Moore ve ark. (2001) tarafından yapılmıştır.

Bir diğer çalışmalarında, Burr ve Katz (1984), izolasyon yapılan bitki aksamına göre elde edilecek bakterinin türünde ve patojenisitesinde değişiklikler bulunduğunu saptamışlardır. Nitekim çalışmalarında; dallardan yapılan izolasyonlarda, 541 izolattan sadece 34'ünün *A. tumefaciens* biovar 3 ve bunlarını hepsinin ayçiçeği, domates ve asmanın en az birinde patojen olduğu, kalan izolatların büyük çoğunluğunun ise *A. tumefaciens* biovar 1 olduğunu belirlemişlerdir.

Anderson ve Moore (1979), konukçu özelleşmesini belirlemek amacıyla ABD'de yapılan bir çalışmada, 11 bitki familyasına dahil 26 bitki türünden izole edilen 176 izolat ile kök boğazı uru hastalığı konukçusu olan 11 farklı bitki türüne inokule etmişlerdir. Patojenik izolatların %66'nın testlenen 11 konukçu türünden 6-8'inde ur veya saçak kök oluşturduğu, 27 izolatın (baştaki 11 konukçu türünde patojen olmayan) ilave 3 konukçu türünde patojen olmadığı belirlenmiştir.

Patojenlerin %3'nün yalnızca izole edildikleri konukçuları enfekte ettikleri ve bir izolatın konukçu dizisinde minimum bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bazı durumlarda farklı konukçu türlerinde doğal olarak ortaya çıkan urlardan aynı izolatlar elde edilmiş, ancak izolatların bazıları izole edildikleri konukçusunda ur oluşturmamıştır. *Agrobacterium rubi* izolatlarının patojenisite testleriyle ile *A. tumefaciens*' den ayırt edilemediği, *A. rhizogenes* izolatlarının sekizde beşinin bazı bitkilerde ur ve havuçlarda ise saçak kök oluşturduğu, domates ve *Datura stramonium* test bitkilerinde patojenik *Agrobacterium*'ların büyük çoğunluğu (her biri %81) ile enfektelendiği fakat domatesi enfekte eden tüm izolatların datura da (*Datura* sp.) enfeksiyona neden olmadığı bildirilmiştir.

Tarbah ve Goodman (1986), patojenisite testleri için domates (*Lycopersicon esculentum* Mill ev. Rehovat B ) hint yağı bitkisi (*Ricinus communis* L.) ve asmanın Charcellor çeşidini kullanmışlardır. *A. tumefaciens* biovar 3 izolatlarının hepsinin bu üç konukçuda da patojen olduğunu gözlemişlerdir. Bu amaçla, bakteri YTSA (Yeast Extract Trypton Sucrose Agar) besi yerinde 48 saat süreyle geliştirilmiş ve kültürlerden, steril iğne ucu ile alınarak yüzey dezenfeksiyonu yapılmış gövdelere yaralama suretiyle inokulasyon yapılmıştır.

Burr ve Katz (1984), diğer bir çalışmalarında aynı şekilde galli dokulardan izolasyonda elde edilen izolatların %97' sinin ayçiçeğinde patojen olduğunu, topraktan elde edilen izolatların ise ancak %5' nin ayçiçeğinde patojen olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, belirti gösteremeyen dormant dönemdeki çubuklarda gerek *A. tumefaciens* biovar 1 ve gerekse *A. tumefaciens* biovar 3' ün bulunduğu ve küçük bir kısmının patojen olduğunu kaydetmişlerdir.

*Agrobacterium vitis* streynlerinin bazıları, ur oluşumunun yanı sıra kök çürüklüğüne de sebep olmaktadır. Bu özellik, çeşitli şekillerde incelenmekte ve streynlerin ayrılmasında bir kriter olarak kullanılmaktadır. Burr ve ark. (1987) bu amaçla, çalışmaları sırasında elde ettikleri streynlerin kök çürüklüklüğü oluşturma yeteneklerini farklı çeşitler üzerinde iki ayrı yöntemle testlemişlerdir. İlkinde, sürgünlerin köklerini  $10^8$  cfu / ml'lik süspansiyondan iğne yardımıyla inokulasyon yapılmıştır. Sonuçta sadece asma köklerinde kök çürüklüğü oluştuğunu ve asma çeşitleri arasında kök çürüklüğü bakımından farklılıklar bulunduğunu, buna karşın ayçiçeği ve fasulye bitkilerinde kök çürüklüğü oluşmadığını gözlemişlerdir.

Günümüzde, insan, hayvan ve bitkilerde görülen hastalıkların tanısında genellikle hastalık belirtileri, patolojik bulgular ve etmenlerin izolasyonu yanında daha çok immünolojik yöntemler ile teşhise yardımcı olan diğer testlerden faydalanılmaktadır. Bu klasik tekniklerle bazı hastalıkların teşhisi yüksek oranda doğrulukla yapılabilmesine karşın birçok hastalık etmenlerinin tanısı ya çok zaman almakta yada kesin sonuçlar vermemektedir. Bu nedenle son 5-10 yıl içinde uygulamaya konulan

nükleik asit temelli tekniklere dayalı teşhis ve tanı yöntemleri erken, kesin ve güvenilir sonuçlarıyla oldukça yararlı olmaya ve klasik tekniklerin boşluklarını doldurmaya başlamıştır. Özellikle PCR gibi bazı teknikler patojenin tek bir hücrenin bile tespitine ve tanılanmasına olanak vermektedir ( Burr ve ark., 1987; Burr ve ark., 1995).

Szegedi ve ark. (1988), *A. tumefaciens* biotip 1 ve 2' nin ur oluşturma bakımından biotip 3' ten farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında, *A. tumefaciens* biotip 3, diğerlerinin aksine *Kalanchoe daigremontiana*'nın gövdesinde çok zayıf patojenite gösterirken, sürgün uçlarında çok büyük urlara neden olmuş ve bu urlar morfolojik olarak farklılıklar göstermişlerdir. Bunun da biotiplerin farklı ur oluşturma yapılarından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanında, *A. tumefaciens* biotip 3 tarafından oluşturulan urların biotip 1'e göre çok daha fazla octopine içerdiğini tesbit etmişlerdir. Ancak nopaline içeriğinde bu farklılık gözlemlenmemiştir.

Hassas çeşitlerde tesbit edilebilir urlar 4-6 hafta sonra oluşurken, *V. riparia*' da 6 hafta sonra küçük şişkinlikler, 2-5 ay sonra ise az çok ölçülebilir urlar meydana gelmiştir. Araştırmacıların bulgularına göre, bitki içinde bakteri gelişmesi ve çoğalması, hem hassas hemde dayanıklı çeşitlerde aynı oranda olmuş, bütün *A. vitis* streynleri tüm asmalarda kök çürüklüğü oluşturmuş, *vir* (virulens) geni aktivitesi tüm asmalarda görülmüş ve hassas *V. vinifera*' ya oranla daha az olmakla birlikte, dayanıklılarda T-DNA transferinin gerçekleştiği gözlenmiştir. Ancak araştırmacılar, çeşitlerde dayanıklılık bakımından, araştırmacıların bulguları arasında bazen farklılıklar görüldüğünü, bunun da büyük ihtimale streynin ya da inokulasyon metodunun farklılığından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (Szegedi ve ark.,1988).

Asma genotipleri arasında *A. vitis*' e karşı farklı reaksiyonlar gözlenmekte ve değişik düzeylerde dayanıklı anaçlarda bulunmaktadır. Bir diğer nokta ise, reaksiyonlar bakımından denemeler arasında farklılıklar bulunmasıdır ki bunun en büyük sebebi konukçu patojen ilişkisidir (Stover ve ark., 1997).



Szegedi ve ark. (1989), asmalarda *A. tumefaciens* biovar 3'e karşı aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR) oluştuğunu, bu sırada inokulasyon bölgesindeki bitki hormonlarının yoğun üretimi sonucu toksisitenin meydana geldiğini ve bununda virulens ve T-DNA ile belirlendiğini bildirmişlerdir. Daha çok vitopine tipli izolatların hipersensitif reaksiyona benzer bir nekroz oluşturduğunu, fakat nekrozun inokulasyondan yaklaşık 20-25 gün gibi kısmen uzun sayılabilecek bir süre sonra oluştuğunu belirtmişlerdir. Aralarında bir ilişki olup olmadığının anlaşılması için ise genetik bir incelemenin gerekliliğini vurgulamışlardır.

Son yıllarda özellikle 1980'li yılların başından itibaren nükleik asit karakterizasyonu, moleküler klonlama, sekans analizi, rekombinant teknolojisi ve genetik materyaller üzerindeki çalışmalar, nükleik asit tabanlı problemlerden yararlanma olanakları giderek artmıştır. Ayrıca prokaryotik ve ökaryotiklerin genomlarındaki modifikasyonlar, restriksiyon analizleri ve sistemleri üzerinde de son zamanlarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Saiki ve ark. 1985, yılında DNA veya RNA baz sıralarının sayısal olarak artırılması (amplifikasyon) teknolojisine dayanan dolayısıyla mevcut yöntemlerle analiz edilebilmelerini sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu geliştirmişlerdir (Saiki ve ark., 1985).

PCR'ın geliştirilmesi, moleküler teknolojinin ve aynı zamanda kullanım alanının da genişlemesine yol açmıştır. PCR son yıllarda enfeksiyöz etmenlerin teşhisinde, epidemiyolojide, genetik defektlerin saptanmasında ve diğer alanlarda geniş bir uygulama ortamı bulmuştur. PCR, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA) spesifik kısa zincirli Oligonükleotit primerler yardımı ile enzimatik olarak sayısal çoğaltılması (amplifikasyon)'dır. bu hedef genetik materyal çok az sayıda ve hatta bir çok veya sayısız diğer veya ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile çoğaltılabilir ve homojen bir DNA materyali haline getirebilir ve kolayca identifiye edilebilir (Saiki ve ark., 1985; Sachadyn, 1997).

PCR solüsyonu, aranan hedef DNA sekansları, iki tür spesifik oligonükleotit primerleri (15–30 bazlık tek iplikçikli), DNA polimeraz enzimi (ençok kullanılan Taq polimeraz) ve dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) şeklinde

hazırlandıktan sonra hedef DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması, polimerizasyon, amplifiye edilmiş ürünlerin saptanması aşamaları ile tanıya gidilmektedir (Arda, 1994).

*Agrobacterium* türlerinin *virA*, *pehA* ve *6a* genlerinin amplifikasyonu için tasarlanan oligonukleotid primerlerin *Agrobacterium vitis*'in tanılanmasında kullanımı değerlendirilmiştir. *pehA* spesifik primer çifti polimeraz zincir reaksiyonu ile testlenen tüm *A. vitis* izolatlarını kolayca tanılamıştır (Saiki ve ark., 1985).

Haas ve ark. (1995), patojenik *Agrobacterium* izolatlarını *virD2* ve *ipt* genlerine dayalı iki PCR primer çifti ile belirlemişlerdir. Transfer DNA (T-DNA) sınır bölgesinin kırıldığı yer olan *VirD2* proteininin endonükleaz bölgesinin oldukça korunmuş olduğu, *virD2* endonükleaz kısmı için spesifik oligonukleotid primerinin testlenen *Agrobacterium*'ların tüm patojenik izolatlarını belirlediğini bildirmişlerdir. T-DNA'nın taşıdığı sitokinin geni *ipt*'de korunan bölgeye karşılık gelen PCR primerleri yalnızca *A. tumefaciens*'i belirlemiş ve *A. rhizogenes*'den ayırt etmiştir. Aynı PCR amplifikasyonuna eklendiğinde *virD2* ve *ipt* primer çiftleri birbirini engellemediği ve tek bir reaksiyonda her iki geni aynı zamanda tanılamaya izin verdiğini tespit etmişlerdir.

Argun ve ark. (2002), Türkiye'de İç Anadolu bölgesinde birçok bağda asma ürünü tespit etmişlerdir. Urlardan izole edilen baskın türün standart biyokimyasal ve fizyolojik testlerle, Ti plazmid ve kromozomal gen dizilişlerine spesifik polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyonu ve türe spesifik bir monoklonal antibody ile *A. vitis* olduğunu belirlemişlerdir.

Tüm izolatlar oktopini kullandığı için aynı tip Ti plazmid taşıdığını öne sürmüşlerdir. İzolatlardan bazılarının farklı konukçu dizisi sergilediği ve asmalarda oluşturduğu ur sayısına göre daha az virulent olduğunu bildirmişlerdir. *A. vitis* izolatları ile inokule edilmeden önce tümörögenik olmayan *A. vitis* F2/5 izolatları asmaya uygulandığında asma ürünü önemli ölçüde kontrol altına aldığını gözlemişlerdir. 16S ve 23S rRNA genleri arasında intergenik bölgenin restrüksiyon

enzimleri ile kesilmesi ile geliştirilen DNA fingerprint karşılaştırması ile izolatların genetik farklılığını değerlendirmişlerdir. İki ana gruba ayırmışlar; biri daha önce tanımlanan oktopin tip Ti plazmid taşıyan *A. vitis* izolatları ile benzer olduğu, diğerinin ise nopalin ve vitopin tipi Ti plazmid taşıyan izolatlarla çok benzer olduğunu belirlemişlerdir (Argun ve ark., 2002; Ponsonnet, 1994).

### 3. MATERYAL METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki Materyali

Çalışmanın ana bitkisel materyalini Konya ilinde 2007-2008 yılı rakamlarına göre en yoğun asma yetiştiriciliği yapılan Cihanbeyli, Güneysınır, Meram, Hüyük, Seydişehir, Hadim, Beyşehir, Akören, Ahırlı, Yalılıyük, Derebucak, Bozkır, Selçuklu, Ilgın, Derbent, Doğanhisar, Yunak, Çayırbağı, Karadiğın, Akşehir, Tuzlukçu, Çumra, Kadınhanı ve Taşkent ilçe ve mevkilerindeki bağ alanlarından simptomlu ve simptomsuz asma örnekleri oluşturulmuştur (Çizelge 3.1.). Örnekler toplanırken çeşitler bağ alanlarının sahiplerine sorularak belirlenmiştir. Patojenisite çalışmalarında asma (*Vitis vinifera* cv. Sultani ), domates (*Lycopersicon esculentum*) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkileri kullanılmıştır. Konya İlinde asma örneklerinin toplandığı ilçeler Şekil 3.1.1.' de ve Çizelge 3.1.1.' de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.1. Örneklerin toplandığı ilçeler ve mevkileri**

İLÇELER	MEVKİ
HADİM	Merkez, Gaziler –Çavuşalan, Aşağı Akpınar, Aladağ, Yağcılar, Yer köprü, Kaplanlı, Aşağı Eşenler, Sarıaltun, Taşbaşı, Holağzı Köprüsü, Yelmez
HATIP	Merkez, Sürmene, Hatip Mahallesi
GÜNEYSINIR	Merkez, Konya Yolu Üzeri, Göynük, Ağca oba, Oba Koyağı, Güney bağ, Alanözü, Kızıl özü, Kara güney
DEREBUCAK	Merkez, İç Mevkii
BOZKIR	Merkez, Armutlu, Yeniköy
SEYDİŞEHİR	Merkez, İncesu, Kesecik, Gök Hüyük, Gökçe Hüyük, Kara bulak
TUZLUKÇU	Merkez
ÇAYIRBAĞI	Merkez
KARADIĞIN	Merkez
MERAM	Merkez, Dikmeli
CİHANBEYLİ	Merkez
YALIHÜYÜK	Merkez
TAŞKENT	Merkez, Avşar
DOĞANHİSAR	Merkez, Kemer
AKÖREN	Merkez
AKŞEHİR	Merkez
AHIRLI	Merkez
BEYŞEHİR	Merkez
DERBENT	Merkez
ÇUMRA	Merkez
HÜYÜK	Merkez, Hüyük Girişi
YUNAK	Merkez
SELÇUKLU	Merkez
ILGIN	Merkez
KADINHANI	Merkez



Şekil-3.1.1. Konya İlinde asma örneklerinin toplandığı ilçeler

### 3.1.2. Denemede kullanılan laboratuvar alet, ekipman ve besiyerleri

Çeşitli laboratuvar aletleri yanında ayrıca PDA+CaCO<sub>3</sub>, PDA, NA, RS, YDC, NGA, King B, Kado 523 besiyerleri kullanılmıştır.

## 3.2. Metod

### 3.2.1. *Agrobacterium vitis*' in izolasyonu

Urlu ve ursuz omcalardan örnekleri toplamak amacıyla bağ alanlarına ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında gidilerek taze ur oluşturmuş ve simptomsuz bitkilerden dal ve omcalarından örnekler alınmış ve bir gazete kağıdına sarılarak polietilen torbalara konmuştur.

Örnek odasına getirildiğinde naylon torbadan ve gazeteden çıkarılarak örneklerin kuruması sağlanmış ve bu şekilde fungus oluşması engellenmiştir. Örnekleme yapılan ilçe ve mevkilerinden toplam 309 adet örnek toplanmıştır (Çizelge 3.2.) Koyu yeşil grimsi veya açık kahverengi ve henüz kuruma belirtisi göstermeyen urlar taze ur olarak kabul edilmiştir. Taze urlu asma örnekleri naylon torbalarda etiketlenerek buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiştir.

Örnekler toplanırken özel bir örnekleme metodu kullanılmamış, örnekleme sayısı bağ alanı büyüklüğüne göre değil bağdaki hasta asma sayısına göre değişmiştir (Argun, 2001). Ayrıca bu ilçeler ve köylerinden bir çok farklı hastalıklı ve hastaliksız asma çeşitleri toplanmıştır asma çeşitleri ve hangi ilçeler ve köylerinden toplandığı Çizelge-3.2.' de görülmektedir.

**Çizelge 3.2.** Konya ilinde bakteriyel taç uru (*Agrobacterium vitis*) hastalığının belirlenmesi amacı ile örnek toplanan ilçeler asma çeşitleri ve verilen isimler

No	İlçe	Mevki	Üzüm çeşidi	<i>A. vitis</i> izolatının adı
1.	Hadim	Merkez	Cardinal	HdMeCa
2.	Hadim	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	HdMeSÇ
3.	Hadim	Merkez	Pembe Çekirdeksiz	HdMePÇ
4.	Hadim	Merkez	Hafızali	HdMeHa
5.	Hadim	Merkez	Kalecik Karası	HdMeKK
6.	Hadim	Merkez	Karagevrek	HdMeKa
7.	Hadim	Merkez	AlphonseLavallée	HdMeAlp
8.	Hadim	Merkez	Hasan dede	HdMeHd
9.	Hadim	Merkez	Razakı	HdMeRa
10.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Cardinal	HdGaCa
11.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Sultani Çekirdeksiz	HdGaSÇ
12.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Pembe Çekirdeksiz	HdGaPÇ
13.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Hafızali	HdGaHa
14.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Kalecik Karası	HdGaKK
15.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Karagevrek	HdGaKa
16.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Italia	HdGaIt
17.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	AlphonseLavallée	HdGaAlp
18.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Hasan dede	HdGaHd
19.	Hadim	Gaziler – Çavuşalan	Razakı	HdGaRa
20.	Hadim	Aşağı Akpınar	Cardinal	HdAkCa
21.	Hadim	Aşağı Akpınar	Sultani Çekirdeksiz	HdAkSÇ
22.	Hadim	Aşağı Akpınar	Hafızali	HdAkHa
23.	Hadim	Aşağı Akpınar	Karagevrek	HdAkKa
24.	Hadim	Aşağı Akpınar	AlphonseLavallée	HdAkAlp
25.	Hadim	Aladağ	Cardinal	HdAlCa
26.	Hadim	Aladağ	Sultani Çekirdeksiz	HdAlSÇ
27.	Hadim	Aladağ	Pembe Çekirdeksiz	HdAlPÇ
28.	Hadim	Aladağ	Hafızali	HdAlHa
29.	Hadim	Aladağ	Kalecik Karası	HdAlKK
30.	Hadim	Aladağ	Karagevrek	HdAlKa
31.	Hadim	Aladağ	Gül Üzümlü	HdAlGü
32.	Hadim	Aladağ	AlphonseLavallée	HdAlAlp
33.	Hadim	Aladağ	Hasan dede	HdAlHd
34.	Hadim	Aladağ	Razakı	HdAlRa
35.	Hadim	Yağcılar	Cardinal	HdYaCa
36.	Hadim	Yağcılar	Sultani Çekirdeksiz	HdYaSÇ
37.	Hadim	Yağcılar	Pembe Çekirdeksiz	HdYaPÇ
38.	Hadim	Yağcılar	Hafızali	HdYaHa
39.	Hadim	Yağcılar	Kalecik Karası	HdYaKK
40.	Hadim	Yağcılar	Karagevrek	HdYaKa
41.	Hadim	Yağcılar	Italia	HdYaIt
42.	Hadim	Yağcılar	AlphonseLavallée	HdYaAlp
43.	Hadim	Yağcılar	Hasan dede	HdYaHd
44.	Hadim	Yağcılar	Razakı	HdYaRa
45.	Hadim	Yerköprü	Cardinal	HdYrCa
46.	Hadim	Yerköprü	Sultani Çekirdeksiz	HdYrSÇ
47.	Hadim	Yerköprü	Pembe Çekirdeksiz	HdYrPÇ
48.	Hadim	Yerköprü	Hafızali	HdYrHa
49.	Hadim	Yerköprü	Hasan dede	HdYrHd
50.	Hadim	Yerköprü	Razakı	HdYrRa

Çizelge 3.2. Devam

No	İlçe	Mevki	Üzüm çeşidi	<i>A. vitis</i> izolatının adı
51.	Hadim	Kaplanlı	Cardinal	HdKaCa
52.	Hadim	Kaplanlı	Sultani Çekirdeksiz	HdKaSÇ
53.	Hadim	Kaplanlı	Pembe Çekirdeksiz	HdKaPÇ
54.	Hadim	Kaplanlı	Hafızali	HdKaHa
55.	Hadim	Kaplanlı	Hasan dede	HdKaHd
56.	Hadim	Kaplanlı	Kadınparmağı	HdKaKp
57.	Hadim	Kaplanlı	Alphonse lavallee	HdKaAl
58.	Hadim	Yelmez	Cardinal	HdYeCa
59.	Hadim	Yelmez	Sultani Çekirdeksiz	HdYeSÇ
60.	Hadim	Yelmez	Hafızali	HdYeHa
61.	Hadim	Yelmez	Hasan dede	HdYeHd
62.	Hadim	Aşağı Eşenler	Cardinal	HdEŞCa
63.	Hadim	Aşağı Eşenler	Sultani Çekirdeksiz	HdEŞSÇ
64.	Hadim	Aşağı Eşenler	Pembe Çekirdeksiz	HdEŞPÇ
65.	Hadim	Aşağı Eşenler	Hafızali	HdEŞHa
66.	Hadim	Aşağı Eşenler	Hasan dede	HdEŞHd
67.	Hadim	Aşağı Eşenler	Hasan dede	HdEŞHd
68.	Hadim	Sarıaltun	Cardinal	HdSaCa
69.	Hadim	Sarıaltun	Pembe çekirdeksiz	HdSaPÇ
70.	Hadim	Sarıaltun	Sultani Çekirdeksiz	HdSaSÇ
71.	Hadim	Sarıaltun	Hafızali	HdSaHa
72.	Hadim	Sarıaltun	Hasan dede	HdSaHd
73.	Hadim	Taşbaşı	Cardinal	HdTaca
74.	Hadim	Taşbaşı	Sultani Çekirdeksiz	HdTaSÇ
75.	Hadim	Taşbaşı	Pembe çekirdeksiz	HdTAPÇ
76.	Hadim	Taşbaşı	Hafızali	HdTaha
77.	Hadim	Taşbaşı	Hasan dede	HdTahd
78.	Hadim	Holağzı Köprüsü	Cardinal	HdHoCa
79.	Hadim	Holağzı Köprüsü	Sultani Çekirdeksiz	HdHoSÇ
80.	Hadim	Holağzı Köprüsü	Pembe Çekirdeksiz	HdHoPÇ
81.	Hadim	Holağzı Köprüsü	Karagevrek	HdHoKa
82.	Hadim	Holağzı Köprüsü	Hafızali	HdHoHa
83.	Hadim	Holağzı Köprüsü	Kadın parmağı	HdHoKp
84.	Hadim	Holağzı Köprüsü	Hasan dede	HdHoHd
85.	Hatip	Merkez	Cardinal	HtMeCa
86.	Hatip	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	HtMeSÇ
87.	Hatip	Merkez	Karagevrek	HtMeKa
88.	Hatip	Merkez	Hasan dede	HtMeHd
89.	Hatip	Sürmene	Cardinal	HtSüCa
90.	Hatip	Sürmene	Sultani Çekirdeksiz	HtSüSÇ
91.	Hatip	Sürmene	Karagevrek	HtSüKa
92.	Hatip	Sürmene	Razakı	HtSüRa
93.	Hatip	Sürmene	Hasan dede	HtSüHd
94.	Hatip	Hatip Mahallesi	Cardinal	HtHmCa
95.	Hatip	Hatip Mahallesi	Karagevrek	HtHmKa
96.	Hatip	Hatip Mahallesi	Hasan dede	HtHmHd
97.	Güneysınır	Merkez	Cardinal	GüMeCa
98.	Güneysınır	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	GüMeSÇ
99.	Güneysınır	Merkez	Pembe Çekirdeksiz	GüMePÇ
100.	Güneysınır	Merkez	Hafızali	GüMeHa



Çizelge 3.2. Devam

No	İlçe	Mevki	Üzüm çeşidi	<i>A. vitis</i> izolatının adı
101.	Güneysınır	Merkez	Karagevrek	GüMeKa
102.	Güneysınır	Konya Yolu Üzeri	Cardinal	GüKoCa
103.	Güneysınır	Konya Yolu Üzeri	Sultani Çekirdeksiz	GüKoSÇ
104.	Güneysınır	Konya Yolu Üzeri	Pembe Çekirdeksiz	GüKoPÇ
105.	Güneysınır	Konya Yolu Üzeri	Hafızali	GüKoHa
106.	Güneysınır	Konya Yolu Üzeri	Karagevrek	GüKoKa
107.	Güneysınır	Konya Yolu Üzeri	Razakı	GüKoRa
108.	Güneysınır	Konya Yolu Üzeri	Kalecik Karası	GüKoKK
109.	Güneysınır	Göynük	Sultani Çekirdeksiz	GüGöSÇ
110.	Güneysınır	Göynük	Pembe Çekirdeksiz	GüGöPÇ
111.	Güneysınır	Göynük	Hafızali	GüGöHa
112.	Güneysınır	Göynük	Razakı	GüGöRa
113.	Güneysınır	Göynük	AlphonseLavallée	GüGöAlp
114.	Güneysınır	Ağcaoba	Cardinal	GüAğCa
115.	Güneysınır	Ağcaoba	Pembe Çekirdeksiz	GüAğPÇ
116.	Güneysınır	Ağcaoba	Eksikara	GüAğEk
117.	Güneysınır	Ağcaoba	Hafızali	GüAğHa
118.	Güneysınır	Oba Koyağı	Sultani Çekirdeksiz	GüObSÇ
119.	Güneysınır	Oba Koyağı	Eksikara	GüObEk
120.	Güneysınır	Oba Koyağı	AlphonseLavallée	GüObAlp
121.	Güneysınır	Karagüney	Cardinal	GüKaCa
122.	Güneysınır	Karagüney	Sultani Çekirdeksiz	GüKaSÇ
123.	Güneysınır	Karagüney	Pembe Çekirdeksiz	GüKaPÇ
124.	Güneysınır	Karagüney	Eksikara	GüKaEk
125.	Güneysınır	Karagüney	Karagevrek	GüKaKa
126.	Güneysınır	Karagüney	Kalecik Karası	GüKaKK
127.	Güneysınır	Karagüney	AlphonseLavallée	GüKaAlp
128.	Güneysınır	Güneybağ	Cardinal	GüGbCa
129.	Güneysınır	Güneybağ	Sultani Çekirdeksiz	GüGbSÇ
130.	Güneysınır	Güneybağ	Eksikara	GüGbEk
131.	Güneysınır	Güneybağ	Hafızali	GüGbHa
132.	Güneysınır	Güneybağ	Karagevrek	GüGbKa
133.	Güneysınır	Güneybağ	AlphonseLavallée	GüGbAlp
134.	Güneysınır	Kızılözü	Sultani Çekirdeksiz	GüKıSÇ
135.	Güneysınır	Kızılözü	Eksikara	GüKıEk
136.	Güneysınır	Kızılözü	Hafızali	GüKıHa
137.	Güneysınır	Kızılözü	AlphonseLavallée	GüKıAlp
138.	Güneysınır	Alanözü	Eksikara	GüAlEk
139.	Güneysınır	Alanözü	Hafızali	GüAlHa
140.	Güneysınır	Alanözü	Kadın parmağı	GüAlKp
141.	Güneysınır	Alanözü	AlphonseLavallée	GüAlAlp
142.	Derebucak	Merkez	Cardinal	DbcMeCa
143.	Derebucak	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	DbcMeSÇ
144.	Derebucak	Merkez	Hafızali	DbcMeHa
145.	Derebucak	Merkez	Karagevrek	DbcMeKa
146.	Derebucak	Merkez	Eksikara	DbcMeEk
147.	Derebucak	Merkez	AlphonseLavallée	DbcMeAlp
148.	Derebucak	İç Mevkii	Cardinal	DbcİçCa
149.	Derebucak	İç Mevkii	Sultani Çekirdeksiz	DbcİçSÇ
150.	Derebucak	İç Mevkii	Hafızali	DbcİçHa

Çizelge 3.2. Devam

No	İlçe	Mevki	Üzüm çeşidi	<i>A. vitis</i> izolatının adı
151.	Derebucak	İç Mevkii	Ekşikara	DbcİçEk
152.	Derebucak	İç Mevkii	Karagevrek	DbcİçKa
153.	Derebucak	İç Mevkii	AlphonseLavallée	DbcİçAlp
154.	Bozkır	Merkez	Cardinal	BoMeCa
155.	Bozkır	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	BoMeSÇ
156.	Bozkır	Merkez	Hafızali	BoMeHa
157.	Bozkır	Merkez	Ekşikara	BoMeEk
158.	Bozkır	Merkez	Karagevrek	BoMeKa
159.	Bozkır	Armutlu	Cardinal	BoArCa
160.	Bozkır	Armutlu	Sultani Çekirdeksiz	BoArSÇ
161.	Bozkır	Armutlu	Hafızali	BoArHa
162.	Bozkır	Armutlu	Ekşikara	BoArEk
163.	Bozkır	Armutlu	Karagevrek	BoArKa
164.	Bozkır	Yeniköy	Cardinal	BoYeCa
165.	Bozkır	Yeniköy	Sultani Çekirdeksiz	BoYeSÇ
166.	Bozkır	Yeniköy	Kadın parmağı	BoYeKp
167.	Bozkır	Yeniköy	Ekşikara	BoYeEk
168.	Bozkır	Yeniköy	Karagevrek	BoYeKa
169.	Bozkır	Yeniköy	İtalia	BoYeIt
170.	Bozkır	Yeniköy	Hafızali	BoYeHa
171.	Seydişehir	Merkez	Cardinal	SeyMeCa
172.	Seydişehir	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	SeyMeSÇ
173.	Seydişehir	Merkez	Hafızali	SeyMeHa
174.	Seydişehir	Merkez	Ekşikara	SeyMeEk
175.	Seydişehir	Merkez	Karagevrek	SeyMeKa
176.	Seydişehir	Merkez	Emir	SeyMeEm
177.	Seydişehir	Merkez	Razakı	SeyMeRa
178.	Seydişehir	İncesu	Cardinal	SeyİnCa
179.	Seydişehir	İncesu	Pembe Çekirdeksiz	SeyİnPÇ
180.	Seydişehir	İncesu	Emir	SeyİnEm
181.	Seydişehir	İncesu	Ekşikara	SeyİnEk
182.	Seydişehir	İncesu	Karagevrek	SeyİnKa
183.	Seydişehir	İncesu	Razakı	SeyİnRa
184.	Seydişehir	Kesecik	Cardinal	SeyKeCa
185.	Seydişehir	Kesecik	Sultani Çekirdeksiz	SeyKeSÇ
186.	Seydişehir	Kesecik	Pembe Çekirdeksiz	SeyKePÇ
187.	Seydişehir	Kesecik	Karagevrek	SeyKeKa
188.	Seydişehir	Kesecik	Ekşikara	SeyKeEk
189.	Seydişehir	Kesecik	Emir	SeyKeEm
190.	Seydişehir	Kesecik	Razakı	SeyKeRa
191.	Seydişehir	Gökhüyük	Cardinal	SeyGkCa
192.	Seydişehir	Gökhüyük	Sultani Çekirdeksiz	SeyGkSÇ
193.	Seydişehir	Gökhüyük	Emir	SeyGkEm
194.	Seydişehir	Gökhüyük	Hafızali	SeyGkHa
195.	Seydişehir	Gökhüyük	Karagevrek	SeyGkKa
196.	Seydişehir	Gökhüyük	Razakı	SeyGkRa
197.	Seydişehir	Gökçeşhüyük	Cardinal	SeyGkÇCa
198.	Seydişehir	Gökçeşhüyük	Sultani Çekirdeksiz	SeyGkÇSÇ
199.	Seydişehir	Gökçeşhüyük	Karagevrek	SeyGkÇKa
200.	Seydişehir	Gökçeşhüyük	Hafızali	SeyGkÇHa

Çizelge 3.2. Devam

No	İlçe	Mevki	Üzüm çeşidi	<i>A. vitis</i> izolatının adı
201.	Seydişehir	Gökçe Hüyük	Razakı	SeyGkçRa
202.	Seydişehir	Karabulak	Cardinal	SeyKaCa
203.	Seydişehir	Karabulak	Sultani Çekirdeksiz	SeyKaSÇ
204.	Seydişehir	Karabulak	Emir	SeyKaEm
205.	Seydişehir	Karabulak	Hafızali	SeyKaHa
206.	Seydişehir	Karabulak	Kadın parmağı	SeyKaKp
207.	Seydişehir	Karabulak	Razakı	SeyKaRa
208.	Tuzlukçu	Merkez	Cardinal	TuMeCa
209.	Tuzlukçu	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	TuMeSÇ
210.	Tuzlukçu	Merkez	Pembe Çekirdeksiz	TuMePÇ
211.	Tuzlukçu	Merkez	Karagevrek	TuMeKa
212.	Tuzlukçu	Merkez	Emir	TuMeEm
213.	Tuzlukçu	Merkez	Alphonse Lavallée	TuMeAlp
214.	Tuzlukçu	Merkez	Hafızali	TuMeHa
215.	Çayırbağı	Merkez	Cardinal	ÇaMeCa
216.	Çayırbağı	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	ÇaMeSÇ
217.	Çayırbağı	Merkez	Pembe Çekirdeksiz	ÇaMePÇ
218.	Çayırbağı	Merkez	İtalia	ÇaMeIt
219.	Çayırbağı	Merkez	Emir	ÇaMeEm
220.	Çayırbağı	Merkez	Alphonse Lavallée	ÇaMeAlp
221.	Çayırbağı	Merkez	Hafızali	ÇaMeHa
222.	Çayırbağı	Merkez	Karagevrek	ÇaMeKa
223.	Çayırbağı	Merkez	Kadın Parmağı	ÇaMeKp
224.	Karadığın	Merkez	Cardinal	KrMeCa
225.	Karadığın	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	KrMeSÇ
226.	Karadığın	Merkez	Hafızali	KrMeHa
227.	Karadığın	Merkez	İtalia	KrMeIt
228.	Karadığın	Merkez	Emir	KrMeEm
229.	Karadığın	Merkez	Kadın parmağı	KrMeKp
230.	Meram	Merkez	Cardinal	MrMeCa
231.	Meram	Merkez	Emir	MrMeEm
232.	Meram	Merkez	Hafızali	MrMeHa
233.	Meram	Merkez	İtalia	MrMeIt
234.	Meram	Dikmeli	Sultani Çekirdeksiz	MrDiSÇ
235.	Meram	Dikmeli	Cardinal	MrDiCa
236.	Meram	Dikmeli	Emir	MrDiEm
237.	Meram	Dikmeli	Kadın parmağı	MrDiKp
238.	Cihanbeyli	Merkez	Eksikara	CiMeEk
239.	Cihanbeyli	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	CiMeSÇ
240.	Cihanbeyli	Merkez	Cardinal	CiMeCa
241.	Cihanbeyli	Merkez	Hafızali	CiMeHa
242.	Cihanbeyli	Merkez	Emir	CiMeEm
243.	Yalıhüyük	Merkez	Cardinal	YaMeCa
244.	Yalıhüyük	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	YaMeSÇ
245.	Yalıhüyük	Merkez	İtalia	YaMeIt
246.	Taşkent	Merkez	Cardinal	TaMeCa
247.	Taşkent	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	TaMeSÇ
248.	Taşkent	Merkez	Hafızali	TaMeHa
249.	Taşkent	Merkez	İtalia	TaMeIt
250.	Taşkent	Merkez	Kadın parmağı	TaMeKp

Çizelge 3.2. Devam

No	İlçe	Mevki	Üzüm çeşidi	<i>A. vitis</i> izolatının adı
251.	Taşkent	Merkez	Razakı	TaMeRa1
252.	Taşkent	Merkez	Razakı	TaMeRa2
253.	Taşkent	Merkez	Hasan dede	TaMeHd
254.	Taşkent	Avşar	Cardinal	TaAvCa
255.	Taşkent	Avşar	Razakı	TaAvRa1
256.	Taşkent	Avşar	Razakı	TaAvRa2
257.	Taşkent	Avşar	Razakı	TaAvRa3
258.	Taşkent	Avşar	Italia	TaAvIt
259.	Taşkent	Avşar	Hafızali	TaAvHa
260.	Taşkent	Avşar	Kadın parmağı	TaAvKp
261.	Taşkent	Avşar	Kalecik karası	TaAvKK
262.	Taşkent	Avşar	Hasan dede	TaAvHd
263.	Doğanhisar	Merkez	Cardinal	DoMeCa
264.	Doğanhisar	Merkez	Hafızali	DoMeHa
265.	Doğanhisar	Merkez	Emir	DoMeEm
266.	Doğanhisar	Merkez	Italia	DoMeIt
267.	Doğanhisar	Kemer	Cardinal	DoKeCa
268.	Doğanhisar	Kemer	Sultani Çekirdeksiz	DoKeSÇ
269.	Doğanhisar	Kemer	Hafızali	DoKeHa
270.	Doğanhisar	Kemer	Emir	DoKeEm
271.	Akören	Merkez	Karagevrek	AköMeKa
272.	Akören	Merkez	Hafızali	AköMeHa
273.	Akören	Merkez	Italia	AköMeIt
274.	Akşehir	Merkez	Cardinal	AkşMeCa
275.	Akşehir	Merkez	Karagevrek	AkşMeKa
276.	Akşehir	Merkez	Emir	AkşMeEm
277.	Ahırlı	Merkez	Cardinal	AhMeCa
278.	Ahırlı	Merkez	Karagevrek	AhMeKa
279.	Beyşehir	Merkez	Cardinal	BeMeCa
280.	Beyşehir	Merkez	Karagevrek	BeMeKa
281.	Beyşehir	Merkez	Hafızali	BeMeHa
282.	Beyşehir	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	BeMeSÇ
283.	Derbent	Merkez	Cardinal	DbtMeCa
284.	Derbent	Merkez	Emir	DbtMeEm
285.	Derbent	Merkez	Hafızali	DbtMeHa
286.	Derbent	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	DbtMeSÇ
287.	Çumra	Merkez	Cardinal	ÇuMeCa
288.	Çumra	Merkez	Emir	ÇuMeEm
289.	Çumra	Merkez	Hafızali	ÇuMeHa
290.	Çumra	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	ÇuMeSÇ
291.	Hüyük	Merkez	Cardinal	HüMeCa
292.	Hüyük	Merkez	Razakı	HüMeRa
293.	Hüyük	Merkez	Hafızali	HüMeHa
294.	Hüyük	Hüyük girişi	Sultani Çekirdeksiz	HüHgSÇ
295.	Hüyük	Hüyük girişi	Emir	HüHgEm
296.	Yunak	Merkez	Cardinal	YuMeCa
297.	Yunak	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	YuMeSÇ
298.	Yunak	Merkez	Hafızali	YuMeHa
299.	Selçuklu	Merkez	Cardinal	SelMeCa
300.	Selçuklu	Merkez	Hafızali	SelMeHa

**Çizelge 3.2.** Devam

No	İlçe	Mevki	Üzüm çeşidi	<i>A. vitis</i> izolatuının adı
301.	Selçuklu	Kampus	Sultani çekirdeksiz	SelKaSÇ
302.	İlgin	Merkez	Cardinal	IIMeCa
303.	İlgin	Merkez	Sultani Çekirdeksiz	IIMeSÇ
304.	İlgin	Merkez	Hafızali	IIMeHa
305.	İlgin	Merkez	Emir	IIMeEm
306.	İlgin	Merkez	Kadın parmağı	IIMeKp
307.	Kadınhamı	Merkez	Hafızali	KdMeHa
308.	Kadınhamı	Merkez	Karagevrek	KdMeKa
309.	Kadınhamı	Merkez	Kadın parmağı	KdMeKp

Laboratuara getirilen taze urlu dokular %1'lik sodyum hipoklorit ile 3 dakika yüzeysel dezenfekte edildikten sonra 3 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra bir bistüri yardımıyla ürün üst tarafı hafifçe soyularak alttaki taze canlı dokudan küçük parçalar alınmıştır. Bu parçalar daha sonra bir havanda steril fizyolojik tuzlu su (%8,5 NaCl) içerisinde homojenize edilmiştir. Bir saat bekleddikten sonra bu süspansiyondan bir öze alınarak içinde King B (KB) ve Patates Dekstroz Agar+CaCO<sub>3</sub> (PDA+CaCO<sub>3</sub>), NA, YDC, Kado 523 besi yeri bulunan petrilere çizilerek ekim yapılmış ve petrilere 25±1°C'de 2 gün inkübatörde inkübe edilmiştir (Schaad, 2001; Kado, 1970; King, 1954).

Alternatif bir izolasyon olarak iletim demetlerinden izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Buna göre özellikle ilkbaharda eğer bitkide *A. vitis* mevcut ise iletim demetlerindeki sızıntıdan direkt seçici besiyeri üzerine çizim yapılarak bakterinin gelişimi izlenmiştir (Schaad, 2001).

Çizgi ekimle saflaştırılan ve roy ve Sasser besiyerinde *A. vitis* olarak tanılanan kültürler %25' lik gliserol stok çözeltisiyle -30 °C' lik derin dondurucuda saklanmışlardır. Üç ayda bir kültürler NA üzerine ekim yapılarak yenilenmişlerdir (Schaad, 2001; Lelliott ve ark., 1987).

### 3.2.2. *Agrobacterium vitis*'in Tanısı

#### 3.2.2.1. Biyokimyasal testler

Etmenin tanısı için, PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerinde asit temizleme, laktozdan 3-ketolaktöz üretimi, demir amonyum sitrat kullanımı, %2 NaCl içeren besi yerinde gelişme, eritritol, melezitöz ve sakkarozdan asit oluşturma, oksidaz testi, sitrat kullanımı, litmus milk'de reaksiyon, malonik asit, L-tartarik asit ve mucic asitten alkali oluşturma ve 35°C'de gelişme testleri Moore ve ark. (2001)'na göre yapılmıştır (Çizelge 3.2.2.1.). Etmenin teşhisinde kullanılan biyokimyasal testler, her bir izolat için en az 3'er tekerrürlü olarak yapılmıştır.

**Çizelge 3.2.2.1.** *Agrobacterium vitis*' in *Agrobacterium* genusu ile karşılaştırmalı tanısında kullanılan biyokimyasal testler

Biyokimyasal testler	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>
3-Ketolactose oluşumu	+	-	D
%2'lik NaCl' de gelişme	+	-	+
35°C' de gelişme	+	D	D
Litmus milk'de gelişme	ALK	AC	ALK
Asit oluşum Erytritrol' den	-	+	-
Melezitose'dan	+		-
Alkali oluşumu:	-	+	+
Malonic asitten	-		+
L- tartarik asitten	-	+	+
Mucic asitten	-	+	-
Demir ammonium citrate	+		-
Oksidaz reaksiyon	+	D	D
Citrate kullanımı	D	+	+
PDA+CaCO <sub>3</sub> 'da asit temizleme	-	+	-
pH:7.0'de hareketlilik	+	+	-
pH:4.5 de pektolitik aktivite	-	-	+

+: %80 ve daha fazla pozitif, D:%21-79 pozitif, -: %80 ve daha fazla negatif, ALK: alkaline, AC:asit

#### 3.2.2.1.1. 35°C'de gelişme

Urulu dokulardan izole edilen bakteri izolatları Nutrient Glikoz Agar (NGA) besi yeri içeren petri kaplarında 35°C'de 2 gün geliştirilmiştir. Besi yerinde koloni gelişimi gösteren izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001). Besiyerinin içeriği ve hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

Nutrient Agar	13,0 g
Glikoz	1,0 g
Saf su	1000 ml

Hazırlanan içerik 121°C’de 15 dakika 1,5 atm’ de otoklavda sterilize edilmiştir.

### 3.2.2.1.2. Laktozdan 3-ketolaktoz üretimi

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları ile %1  $\alpha$ -laktoz, %0,1 Yeast ekstrakt ve %2 agar içeren petri kaplarına 1,0 cm uzunluğunda çizgi ekim yapılmıştır. Her petriye 6 izolat olacak şekilde ekim yapılmış. Petriler 27±1°C’de 2 gün kültüre alındıktan sonra agarlı besi yerinin üzerini kapatacak şekilde Benedict ayırıcı ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında bir saat beledikten sonra kolonilerin etrafında oluşan sarı bir hale pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001; Johri, 1999).

#### Benedict’s Ayırıcı (Moore ve ark., 2001)

*Sodyum sitrat	17,3 g
*Sodyum karbonat	10,0 g
Bakır sülfat	1,73 g

\*Sodyum sitrat ve sodyum karbonat 60 ml saf su içerisinde ısıtılarak eritilir. Eğer gerekiyorsa filtre kağıdı ile süzülür. Ayrı bir beherde 15 ml saf su içerisinde bakır sülfat iyice eritilir. Geniş bir beherde sodyum sitrat ve sodyum karbonat içeren solüsyonun üzerine yavaşça bakır sülfat karıştırarak eklenir. Daha sonra saf su ile 1000 ml’ ye tamamlanır.

Aşağıda verilen besi yeri otoklavda 121°C’de 15 dakika 1,5 atm’ de sterilize edildikten sonra, petrilere dökülmüş ve daha sonra bakteri aşılansarak 48 saat, 20 °C’ de inkübe edilmiştir.

Laktoz	10 g
Yeast ekstrakt	1 g
Agar	15 g
Saf su	1000 ml

### 3.2.2.1.3. Demir amonyum sitrat kullanımı

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları, aşağıda verilen demir amonyum sitrat besi yeri bulunan tüplere ekimleri yapılmıştır. Tüpler inkibatörde  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün inkübe edilmiş ve tüplerin üzerinde oluşan kiremit renginde bir tabaka pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

Demir amonyum sitrat	10,0 g
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5 g
$\text{CaCl}_2$	0,2 g
Saf su	1000 ml

Besiyerinin pH'ı 7,0'e ayarlandıktan sonra  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika, 1,5 atm.'de, otoklavda sterilize edilmiştir.

### 3.2.2.1.4. %2 NaCl içeren besi yerinde gelişme

Bakteri izolatları, %2 NaCl ilave edilmiş Nutrient Glikoz Agar (NGA) besi yeri içeren petri kaplarında  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün inkübe edilmiştir. Her petri 4 bölüme ayrılmış ve her bir petriye 4 farklı bakteri izolatı ve her bir izolat 3 farklı petriye ekilmiştir. Besi yerinde koloni gelişimi gösteren izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001; Jones, 1994).

%2'lik NaCl içeren NGA besiyeri;

NaCl	2 gr
Glikoz	0,1 gr
Nutrient agar	2gr
Saf su	100ml

Yukarıdaki besi yeri hazırlanarak ve  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika 1,5 atm.'de otoklavda sterilize edilmiştir.



### 3.2.2.1.5. Sakkaroz ve eritritolden asit üretimi

Asit üretimi için temel besi yerinden 9 birim üzerine %10'luk filtre ile steril edilmiş eritritol ve sakkaroz ayrı ayrı ilave edilerek tüp içerisinde hazırlanan besi yerine urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatlarının ekimi yapılmış ve 2 gün  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır. Besi yerinin rengini sarıya çevirerek ortamın asitleşmesini sağlayan izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 gr
KCl	0,2 gr
Yeast ekstrakt	1 gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 gr
Agar	1,5 gr
Bromthymol blue,	3 ml (% 50' lik etanol içinde %1' lik)

Hazırlanan besiyerinde  $\text{pH}=7.1$ 'e ayarlanmış ve agar ilave edilmiştir. otoklavdan sonra 1 kısım steril filtreden geçirilmiş % 10 luk eritritol ve sakkoroz, 9 kısım soğutulmuş basal besiyerine eklenilmiştir. Daha sonra kapaklı steril tüplere 5'er ml konulmuştur. İnkübasyondan sonra sarı renk asit oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

### 3.2.2.1.6. Oksidaz testi

Taze hazırlanmış %1'lik  $\text{N}_2\text{N}_2\text{N}_2\text{N}_2$  - Tetrametil- 1.4 fenilen diamonyum diklorid eriyiği steril filtre kağıdına bir damla damlatılmıştır. GNA (glukoz %1, beef ekstrakt %0,1, Yeast ekstrakt %0,2, bakteriyolojik pepton %0,5, NaCl %0,5, agar %1.5  $\text{pH}$ : 7,2-7,4) besi yerinde geliştirilen bakteri izolatlarının 48 saatlik kültürü steril kürdan ile yukarıdaki eriyik damlatılmış kurutma kağıdına çizilmiş ve 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif, 10 ile 60 saniye arasında koyu mor olanlar zayıf pozitif ve mor renk oluşturmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956; Klement, 1990).

### 3.2.2.1.7. Sitrat kullanımı

Bakteri izolatlarının eğik olarak tüplerde hazırlanan ve aşağıda verilen sitrat besi yeri üzerine her bir izolat 3 tekerrürlü olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Tüpler inkubatörde  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün geliştirilmiş ve tüplerdeki besi yerinin rengi koyu maviye dönenler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark.,2001).

Sitrat besiyeri;

Sodyum sitrat	2,0 g
$\text{Mg}_2\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,0 g
NaCl	5,0 g
Bromthymol blue	15,0 ml (%50 etanol içerisinde %1 (w/v))
Agar	1,5 g
Saf su	1000 ml

Agar ilave edilmeden önce pH'ı 6,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika  $1,5\text{ atm.}$ 'de otoklavda sterilize edilmiştir.

### 3.2.2.1.8. Litmus süt testi

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatlarının, litmus süt besi yeri içine özeye ekimi yapılmıştır. Tüpler inkubatörde  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün geliştirilmiş ve tüplerdeki besi yerinin rengini maviye dönüştürenler alkali, kırmızıya dönüştürenler ise asit oluşturan olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

Litmus süt besiyeri;

Toz skin milk	100,0 g
Bromcresol purple	4,0 mg
Saf su	1000 ml

pH'ı 7,0'e ayarlanan besiyeri birbirini takip eden 3 gün  $100^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

### 3.2.2.1.9. Malonik asitten alkali oluşturma

Bakteriyel izolatlar, malonik asit besiyeri içeren tüplere ekilmiş inkibatrde  $27\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 2 hafta geliştirilmiş ve tüplerdeki besi yerinin rengini maviye dönüştüren izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$	2,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,4 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,6 g
NaCl	2,0 g
Yeast ekstrakt	0,1 g
Malonik asit, sodyum tuzu	3,0 g
Bromthymol blue	2,5 ml (%50 etanol içerisinde %1 (w/v))
Saf su	1000 ml

Besiyerinin pH'ı 7,0'e ayarlanarak. Daha sonra  $121^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika 1,5 atm.'de otoklav edilmiştir.

### 3.2.2.1.10. Mucic ve L-tartarik asitten alkali oluşturma

Test tüplerinde hazırlanan ve aşağıda verilen mucic ve L-tartarik asit içeren besi yerine izolatların ekimi yapılmıştır. Bakteriler inkibatrde  $27\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 2 hafta geliştirilmiş ve tüplerdeki besi yerinin rengini maviye dönüştüren izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001; Kulkarnı, 2000).

$\text{NaNH}_4\text{PO}_4$	0,5 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,17 g
KCl	0,2 g
Bromthymol blue	2,5 ml (%50 etanol içerisinde %1 (w/v))
Saf su	1000 ml

Besiyerinin pH'ı 7,0'e ayarlandıktan sonra her bir tüpe 5'er ml dökülmüş ve  $121^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika 1,5 atm.'de otoklavda sterilize edilmiştir. Her tüpe daha sonra her izolat için 0,5 ml filtre ile steril edilmiş %1'lik mucic asit veya L- tartarik asit ilave edilmiştir.

### 3.2.2.1.11. PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerinde asit temizleme

Bakteriyel izolatların PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerine çizgi ekim yapılarak 25±1°C'de kültüre alınmıştır. 2 gün sonra koloni etrafında besi yerinde saydamlaşma görülen izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001). Test için aşağıda verilen besiyeri hazırlanmıştır.

Patates dekstroz agar	39,0 g
CaCO <sub>3</sub>	5,0 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri 121°C'de 15 dakika 1,5 atmosfer basınçta, otoklavda sterilize edilmiş ve 50°C' ye soğutularak petrilere dökülmüştür.

### 3.2.2.1.12. Asit üretimi için temel besi yeri

Bu test için aşağıda verilen besiyeri hazırlanmış ve izolatlar için denemeye alınmıştır(Moore ve ark., 2001).

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
KCl	0,2 g
Yeast ekstrakt	1,0 g
Bromthymol blue	3,0 ml (%50 etanol içerisinde %1 (w/v))
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Agar	1,5 g
Saf su	1000 ml

Besiyerinin pH'ı 7,1'e ayarlanarak 121°C'de 15 dakika 1,5 atm.'de otoklavda sterilize edilmiştir. *Agrobacterium vitis* izolatları asit üretmedikleri için yeşil renk olan orijinal besiyerinin rengini değiştirmeyenler negatif, besiyerini sarı renk yapan izolatlar ise pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.2.1.13. Roy ve Sasser besi yeri

*Agrobacterium vitis* için seçici besiyeri olarak aşağıda içeriği verilen besiyeri kullanılmıştır (Roy ve Sasser, 1983).

Roy ve Sasser besiyerinin içeriği;	
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,2 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7 gr
Adonitol	0,4 gr
Yeast ekstrakt	0,14 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9 gr
NaCl	0,2 gr
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 gr
Agar	15 gr
Chlorothalonil %4 sıvı	0,5 ml

Besiyerinin pH değeri 7,2 ye ayarlanır ve otoklavda sterilize edilir. 50 °C' ye soğuduktan sonra aşağıdaki kimyasallar aseptik olarak birkaç ml damıtık suda eritilir ve filtreden geçirilip besiyerine eklenir.

Trimethoprim	20 mg
Tripheniltetrazolium klorid	80 mg
D- cycloserine	20 mg

*A. vitis* kolonileri 27 °C' de 4 günlük inkübasyondan sonra, merkezleri genelde kırmızı, kenarları ise beyaz renkte koloniler oluşmaktadır. Mukayese için orijinal bir kültür kullanılarak ekimler yapılmıştır.

### 3.2.2.1.14. YGCA besiyerinde gelişim

Yeast ekstrakt	10.0 g
Glucose	20.0 g
*CaCO <sub>3</sub>	20.0 g

\*CaCO<sub>3</sub> ayrı bir kaptaki eritilir, sonra pH' sı 7.2 ye ayarlanır ve eritilerek tüplere 7.0 ml konulur. Sonra tüpler kapatılır ve otoklavdan sonra eğik agar olarak dondurulur.

Bu besiyeri aynı zamanda bakteri kültürlerinin saklanması amacıyla da kullanılmış, izolatlar tüplere aşılmalı ve geliştikten sonra kısa süreli saklamalar için +4 °C' de, uzun süreli depolama amacıyla tüplerin üstüne eklenen mineral yağda -30 C' de saklanılmıştır.

### 3.2.2.2. Tütünde hipersensitif reaksiyon (aşırı duyarlılık) testi (HR)

Elde edilen *A. vitis* izolatlarının hipersensitif reaksiyon oluşturma durumları incelenmiştir. Aşırı duyarlılık ve sürgün nekrozu çalışmaları, izolatların bazı özelliklerinin ortaya çıkarılması amacı ile yapılmıştır (Burr ve ark.,1983; Nadolny, 1980).

Buna göre;

**Bitkilerin hazırlanması:** Denemelerde *Nicotiana tobaccum* cv. White Burley tütün çeşidi kullanılmıştır. Tütünler iklim odası koşullarında (%60-70 nispi nem ve 23-25 C sıcaklıkta 16 saat ışıklı ve 8 saat karanlıkta) yetiştirilmiştir. Ancak inokulasyon yapılacak bitkilerin çiçeklenme dönemine henüz ulaşmamış genç bitkiler olmasına özen gösterilmiştir.

**İnokulumun hazırlanması:** İnokulum hazırlamak amacıyla *A. vitis* izolatları, PDA (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde geliştirilmişlerdir. PDA besi yerinde 28 °C' de 24 saat geliştirilen kültürlerden steril saf su ile, spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda 0.15 OD' de 10<sup>8</sup> hücre/ml lik süspansiyonlar hazırlanmıştır.

**İnokulasyon:** Çiçeklenme döneminden önceki tütün bitkilerinin inokulasyona uygun yaprakların (çok fazla ince damar içermeyen düzgün hatlı yapraklar) damar

aralarındaki alanlara 0.46 çapındaki enjektör yardımıyla bakteriyel süspansiyon enjekte edilmiştir. Bu işlem her bir damar arası için göz kararı yaklaşık 1cm çapa erişene kadar devam etmiştir. Bitki yada yaprak yapısından kaynaklanan farklılıkları engelleyebilmek amacıyla, izolatlar farklı bitkilerin farklı yapraklarına ayrı ayrı inokule edilmiştir. Her bir yaprağa ortalama 3 farklı izolat inokule edilirken, bir izolat en az 3 farklı yaprağa inokule edilmiştir.

İnokulasyondan sonraki 2 gün içerisinde doku nekrozuna sebep olan izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.2.3. Patojenisite testleri

Elde edilen izolatların patojenisite testleri için, asmanın (*Vitis vinifera*) yanı sıra domates (*Lycopersicon esculentum*) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus*) bitkileri kullanılmıştır. İzole edilen bakteriler PDA besi yerinde  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün geliştirildikten sonra 2- 3 haftalık domates bitkilerine ve ayçiçeği bitkilerine steril bir kürdan yardımı ile inokule edilmiştir. İnokule edilmiş bitkiler 24 saat klima odasında (16 saat ışık, 8 saat karanlık) plastik torbalar içerisinde konularak yüksek nem sağlanmıştır. Bitkiler 3 hafta sonra ur oluşturup oluşturumamasına göre değerlendirilmiştir (Siddigui, 2002; Yan, 2002).

Asmada patojenisite çalışmaları klima odasında köklendirilen bitkilerin taze, yeşil sürgünün altındaki iki boğum arasındaki kısma bir bisturi yardımıyla açılan yaraya bir kürdan yardımıyla PDA besi yerinde geliştirilmiş bakteri izolatından bir miktar alınarak inokulasyon yapılmış ve üzeri bir ıslak pamuk ve parafilm ile sarılmıştır. Daha sonra 16 saat ışık 8 saat karanlık sağlanan klima odalarında gelişmeye bırakılmış ve üç ay sonra ur oluşturup oluşturumamasına göre değerlendirilmiştir.

#### 3.2.2.3.1. Yaprak nekrozu

Çiçeklenme döneminden önceki ayçiçeği bitkilerinin inokulasyona uygun yaprakları işaretlenerek toplu iğne yardımıyla damar aralarına birer delik açılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan, 1ml' lik insülin iğneleri kullanılarak damar

aralarındaki deliklerden iki epidermis arasına enjekte edilmiştir. 2 hafta sonra yaprakta oluşan nekrotik simptomlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.2.3.2. Kök ve sürgün nekrozu**

Sultani çekirdeksiz asma çubukları ve ayçiçeği fide haline geldikten sonra asmanın kök bölgesine hipodermik enjektör yardımıyla bakteri verilmiştir ve ayrıca asmanın kök bölgesine ve toprağına bir miktar bakteri solüsyonu dökülmüştür. 2-3 hafta sonra belirtiler gözlenmiştir.

Domates, ayçiçeği, asma bitkilerinin yeni gelişmekte olan sürgülerine yaprak sapı ile sürgün arasına hipodermik enjektör yardımıyla ve sürgünlerde yaralar açılarak bakteri verilmiştir. Bitkinin bakteriye olan tepkisi 3 hafta sonra görülmeye başlanmıştır. Ayçiçeği ve domateste 4-5 hafta sonra asmada ise 1,5-2 ay sonra ur gelişimi değerlendirilmiştir.

### **3.2.2.4. Moleküler tanılama**

#### **3.2.2.4.1. DNA izolasyonu**

Urlu dokulardan izole edilen *Agrobacterium vitis* izolatları, Nutrient Broth sıvı besi yerinde 200 dev./dk. dönen çalkalayıcıda gece boyu 27±1°C’de geliştirilmiştir. Bakteri DNA’sı, De Boer ve Ward (1995)’a göre izole edilmiştir. Buna göre;

1. Nutrient broth sıvı besi yerinde gelişen bakterilerden 1 ml steril ependorf tüplere alınmış ve 14.000 dev/dak.’da 20 dakika santrifüj edilmiştir.

2. Pellet alınarak hücreleri parçalamak için üzerine %1’lik SDS+TAE bufferdan 100 µl eklenmiş ve tüp karıştırıcıda iyice karıştırılmıştır. Ependorf tüpler 50°C’de su banyosunda 3 saat bekletildikten sonra üzerine 50 µl 7,5 M amonyum asetat ilave edilmiş ve 14.000 dev/dak.’da 10 dakika santrifüj edilerek amonyum asetat artıklarının altta toplanması sağlanmıştır.



3. Ependorf tüpün üst kısmında toplanan DNA kesik bir pipet ucu ile alınmıştır (yaklaşık 130 µl). Eşit miktarda (yaklaşık 130 µl) soğutulmuş isopropanol ilave edilmiş ve -20°C'de 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra ependorf tüpler 10.000 dev/dak.'da 10 dakika santrifüj edilmiş ve pellet alınarak üzerine soğuk %70'lik alkolden 100 µl ilave edilmiştir.

4. Ependorf tüpler 10.000 dev/dak.'da 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra ependorf tüpler ters çevrilerek alkol uzaklaştırılmış ve 1 saat steril kabin içerisinde kurutulmaya bırakılmıştır. Daha sonra ependorf tüpler içerisine 50 µl didistile su (ddH<sub>2</sub>O) ilave edilerek DNA iyice eritilmiştir.

5. İzole edilen DNA'lar -20°C'de daha sonra PCR çalışmalarında kullanmak için muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2.4.1.1. *Agrobacterium vitis*'in DNA amplifikasyonu için spesifik primerlerin kullanımı

#### 3.2.2.4.1.1.1. *vir A* geni için spesifik primer

PCR çalışmalarında *A. vitis*'e spesifik *virA* geninin amplifikasyonu için;

F5' TTCAGTCGCGCAAGCAGTT 3' ve R5' CGGCAATTCGTATCACGGA 3' olarak sentezlettilen primerler kullanılmıştır (Eastwell ve ark., 1995).

#### *VirA* Gen Bölgesi

```

1  atcatgaagctcggcgcgaaacgagaaaaatcgtggagggtgaaaccgtatcgacaggctct
61  ctcagcctcgatatcgcgctcggcattggtggtcccaaaggccgtatcattgaaatt
121  tatggaccggaaagctccggtaaaacgacgcttgcggttgcaaaccattgccgaggcccag
181  aaaaaaggcggcgtttgcgcttttgatgcatgcccagcatgagctggatccggtttatgcc
241  cgcaaaactgggtggtgatctccagaatgtgctgatctcacagccagataccggcgagcag
301  gcaactggaaatcacggatacgcctggtgcggttcagtcgcaagcaggttctggtgatcgat
361  tcggtcgcggccttgacaccgaaagctgaaatagaaggcgaaatgggcatagcctgccg
421  ggcattgcaggcacggttgatgagccaggaagccactatgcttaaccgctcgatctcgct

```

### 3.2.2.4.1.1.2. 16S-23S rRNA gen bölgesi için spesifik primer

*Agrobacterium vitis*' in 16S–23S gen bölgesi için sentezletirilen spesifik primerler F5'-GGTCGGTAGTTCAAGTC-3' ve R5'-CTGTCACCCACTATGGC-3' dir. (Momol, ve ark., 1998; Dong, 1992; Tan, 2003; Willems, 1993).

#### 16S-23S rRNA Gen Bölgesi

```

1 aacacatgcaagtcgagcgcggcccgcaaggggagcggcagacgggtgagtaaacgcgtggga
61 atctaccgtaccctaccggtagttcaagtcaaaactggaattaataaccgtattacgccttc
121 gggggaaagatttatcggggatgatgagcccggttgattagctagttggtggggttaa
181 aggcctaccaaggcgaaggatcaccactgtctgagaggatgatcagccacattgggact
241 gagacacggcccaactcctacgggaggcagcagtggggaatattggaca atgggcgcaa
301 gcctgatccagccatgccgcgtgagtgatgaaggctcttagagattgtaaagctctttcacc
361 gatgaagataatgacggtagtcggagaagaagccccggctaacttcgtgc cagcagccgc

```

### 3.2.2.4.1.1.3. *peh A* geni için spesifik primer

*Agrobacterium vitis*' in *peh A* gen bölgesi için sentezletirilen spesifik primerler; F-5'CGATGGCGGCGAGGATTT-3' ve R-5'ATCGGGCGTGAAACAAGT3' dir (Eastwell ve ark., 1995).

#### *pehA* Gen Bölgesi

```

421 cgcggtcgcctttgcgccctgacgcgggtgacagcctgggcggcggagccggctgttgc
481 cacccaatggggggcagtcaccgtgccggaggctccctccagcctctgcgcgacattgac
541 ggctggcctgacggctaaggacgggtccctcgatcctgccgatgccgatggcaaatcccc
601 ccatccagaccagatgcgcttgacaggctgccatcgatggcggcgaggattttgccgtcaa
661 gctcgtccccggggctgaggggcaggatgcgctttttgagcggaccctgagccttgaagag
721 cggcgtcgtggttgatcgacaagggcgtcacgctgcttgcctcccgcgatcccaagga
781 ttacgacagcgggtgctggcgattgcggtaacggccaatagctcttccaccaagacctgcaa
841 gccgctgattatggccaaggacaccaaaggcagcggcatcgcttgccgagggaaagatcga
901 tggacgcggcggctcgtgctgcttgaacaaagtgcgggctataaagcggctcctggtggga
961 tgtggcctggcaatccaagcaggattgatccagcatgtgttccggctggtggaaatcga
1021 tggcggcgaggatttcaccctgcaccggatcacgctattgaacagcccgaattttcatgt
1081 ggtgagcaatggtgtgacgggcctgaccgcttgggggatcaagatccttagccccagtgcc
1141 cgtctatacccggccgattatgcctgccccgggagaccacggcagacaagctgacgcc

```

### 3.2.2.4.1.1.4. *Ab3-F3* ve *Ab3-R4* gen bölgesi için spesifik primer

*Agrobacterium vitis*' in *Ab3-F3* ve *Ab3-R4* gen bölgesi için sentezlettilen spesifik primerler;

*Ab3-F3* 5'-ATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCC-3' ve *Ab3-R4* 5'-CTGTCTCTGTGTCCCCGAAAGG-3'(Kawaguchi ve ark., 2004).

### *Ab3-F3* ve *Ab3-R4* Gen Bölgesi

```

351 ccatgccgcgctgagtgatgaaggtcttaggattgtaaagctctttcaccg
401 atgaagataatgacggtagtcggagaagaagccccggctaacttcgtgcc
451 agcagccgcggttaatacgaaggggctagcgttggttcggaattactgggc
501 gtaaagcgcacgtagggcgataattaagtcaggggtgaaatcccgacgct
551 caactgcggaactgcctttgatactggttatcttgagtatggaagaggta
601 agtgggaattgcgagtgtagaggtgaaattcgtagatattcgcaggaacac
651 cagtggcgaaggcggcttactggtccattactgacgctgaggtgcgaaag
701 cgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtcccacgccgtaaaca
751 tgaatgtagccgctcggcaagttgacttgctcggcggcgacgtaacgcat
801 taaacattccgcctggggagtagcggcgcgaagattaaaactcaaaggaat
851 tgacggggggcccgcaacgagcggtagcatgtggtttaattcgaagcaac
901 gcgcagaaccttaccagctcttgacatcctgtgaccgcagcagcagctgg
951 ttttcccttctgtagaaacggccctgtgtctctgtcatggctgtctcgt
1001 cgtgtcgtgagatggttggttaagtcccgcaacgagcgcgaaccctcgccc

```

### 3.2.2.4.2. Moleküler tanıma kullanılan kimyasallar

#### Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%1)

TAE buffer 1000 ml

Sodyum dodesil sülfat (SDS) 10 g

Sıcak su bulunan büyük bir beher içerisine içinde TAE buffer bulunan beher konur ve içine SDS ilave edilerek iyice eriyene kadar karıştırılır.

**7,5 M Amonyum Asetat**

57,75 g amonyum asetat 100 ml saf su içerisinde çözülmüştür.

**TAE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 8,3)**

Tris-HCL	0,24 g
EDTA	0,074 g
Saf su	200 ml

**6,5X Loading Dye**

Bromofenol mavisi	30,0 mg
5XTBE	4,25 ml
Gliserin	5,75 ml

**TBE Buffer**

Tris	107,89 g
Borik asit	55,0 g
EDTA	7,44 g
Saf su	1000 ml
pH:	8,0

**3.2.2.4.3. *Agrobacterium vitis*'in DNA amplifikasyonu için Polymerase Chain Reaction (PCR) karışımının hazırlanması**

PCR karışımı 0.2 ml ependorf tüplerde hazırlanmıştır. Karışımın içeriği aşağıda verilmiştir;

Bakteri DNA	2 µl
*PCR Master Mix	12.5 µl
Forward primer	2 µl
Revers primer	2 µl
Steril saf su	6.5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>25 µl</b>

\*PCR Master Mix 0.05 ünite/ µl *Taq* DNA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP ayarlanıp hazırlanmıştır.

#### **3.2.2.4.4. *Agrobacterium vitis*'in DNA amplifikasyonu için spesifik primerlerle uygulanan PCR protokolleri**

##### **3.2.2.4.4.1. *vir A* geni PCR protokolü**

*Agrobacterium vitis*'in tanısında kullanılan *virA* geninin PCR protokolü aşağıda verildiği şekilde Termal cycler (Eppendorph mastercycler personal)' da programlanarak uygulanmıştır:

96°C'de 2 dakika birinci denetürasyon adımıyla başlatılmış ve 94°C'de 1 dakika, 50°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye 1 döngü olacak şekilde toplam 40 döngüye tamamlanmıştır. En son olarak 72°C'de 5 dakika bekletilerek tamamlanmıştır. Amplifiye edilen bölge için 480 bp bant oluşturması beklenilmiştir (Eastwell ve ark., 1995).

##### **3.2.2.4.4.2. *16S – 23S* geni PCR protokolü**

*Agrobacterium vitis*'in tanısında kullanılan *16S – 23S* geninin PCR protokolü aşağıda verildiği şekilde Termal cycler (Eppendorph mastercycler personal)' da programlanarak uygulanmıştır:

94°C'de 2 dakika birinci denetürasyon adımıyla başlatılmış ve 94°C'de 1 dakika, 52°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika 1 döngü olacak şekilde toplam 35 döngüye tamamlanmıştır. En son olarak 72°C'de 5 dakika bekletilerek tamamlanmıştır. Amplifiye edilen bölge için 100 bp bant oluşturması beklenilmiştir (Eastwell ve ark., 1995).

##### **3.2.2.4.4.3. *pehA* geni PCR protokolü**

*Agrobacterium vitis*'in tanısında kullanılan *pehA* geninin PCR protokolü aşağıda verildiği şekilde Termal cycler (Eppendorph mastercycler personal)' da programlanarak uygulanmıştır:

96°C'de 2 dakika birinci denetürasyon adımıyla başlatılmış ve 94°C'de 1 dakika, 50°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye 1 döngü olacak şekilde toplam 40 döngüye

tamamlanmıştır. En son olarak 72°C’de 5 dakika bekletilerek tamamlanmıştır. Amplifiye edilen bölge için 200 bp bant oluşturması beklenilmiştir (Eastwell ve ark., 1995).

#### **3.2.2.4.4.4. *Ab3-F3* ve *Ab3-R4* geni PCR protokolü**

*Agrobacterium vitis*’in tanısında kullanılan *Ab3-F3* ve *Ab3-R4* geninin PCR protokolü aşağıda verildiği şekilde Termal cycler (Eppendorph mastercycler personal)’ da programlanarak uygulanmıştır:

95°C’ de 8 dakika birinci denetürasyon adımıyla başlatılmış ve 95°C’de 30 saniye, 62°C’de 60 saniye ve 72°C’de 90 saniye 1 döngü olacak şekilde toplam 30 döngüye tamamlanmıştır. En son olarak 72°C’de 7 dakika bekletilerek tamamlanmıştır. Amplifiye edilen bölge için 570 bp bant oluşturması beklenilmiştir (Kawaguchi ve ark., 2004).

#### **3.2.2.4.5. PCR ürünlerinin elektroforez sisteminde belirlenmesi**

##### **3.2.2.4.5.1. Agaroz jelin ve elektroforez tampon solüsyonunun hazırlanması**

% 2’ lik Agaroz jel hazırlanması; 200 ml TAE buffer solüsyonu, 4 gr agaroz (SeaKem) tartılır ve solüsyonda agaroz ısıtılarak eritilir.

Elektroforez tampon solüsyonunun hazırlanması (1X TBE buffer); Tris 107,89gr, borik asit 55,0 gr, EDTA 7,44 gr, Saf su 1000 ml ölçülür ve pH: 8,0’ e ayarlandıktan sonra elde edilen solüsyon 5X olduğu için üzerine 4000ml steril saf su ilave edilir ve elde edilen karışımın 1X olması sağlanır.

##### **3.2.2.4.5.2. Amplifiye edilen bakteriyel DNA örneklerinin elektroforez sisteminde yürütülmesi**

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde Sambrook ve ark., (1989)’a göre yapılmıştır.

Bunun için hazırlanan %2’ lik agaroz jel yaklaşık 50°C’ye kadar soğutulduktan sonra taraklar yerleştirilmiş jel tepsisine dökülmüştür. Agaroz jel donduktan sonra içinde 1X TBE buffer bulunan elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. Daha

sonra tarak jelden dikkatlice çıkarılmış ve oluşan çukurlara 2 µl loading dye ve 8 µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımıyla karıştırılarak çukurlara yüklenilmiştir. PCR ürünleri 75 volt elektrik verilerek yaklaşık 3 saat yürütülmüştür. Oluşan bantların moleküler ağırlıklarını belirlemek amacıyla 100 bp'lik moleküler işaretleyici (marker, Fermantas SM 0243) kullanılmıştır.

### 3.2.2.4.5.3. Agaroz jelin görüntülenmesi ve sonuçların incelenmesi

1. **jelin boyanması:** Bantların UV ışık altında görülebilmesi için etidyum bromit ile (10 mg/ml) 10 dakika bekletilerek boyanmış ve daha sonra 10 dakika steril saf su ile çalkalanmıştır.
2. **jelin görüntülenmesi:** Etidyum bromit ile boyanan jeller üzerindeki bantlar transiliminatörde oluşan bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Konya İlinde Asmalarda *Agrobacterium vitis*' in varlığını belirlemek amacıyla Cihanbeyli, Güneysınır, Meram, Hüyük, Seydişehir, Hadim, Beyşehir, Akören, Ahırlı, Yalınhüyük, Derebucak, Bozkır, Selçuklu, Ilgın, Derbent, Karadiğın, Çayırbağı, Doğanhisar, Yunak, Akşehir, Tuzlukçu, Çumra, Kadınhanı ve Taşkent ilçeleri ve mevkilerindeki bağ alanları ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında gezilmiş simptomlu ve simptomsuz bitkilerden örnekler alınarak incelenmiştir.

Yapılan biyokimyasal ve moleküler testleri sonucunda toplam 309 bitki örneğinden 280 bakteriyel izolat elde edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, il genelindeki asmalardaki etmenle bulaşıklılığın %90,61' lik oranla büyük önem taşıdığı patojenin mevcut çeşitler içinde en fazla Sultani çekirdeksiz, Kardinal, Hafızali ve en az Ekşikara çeşitlerinde bulunduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.1)

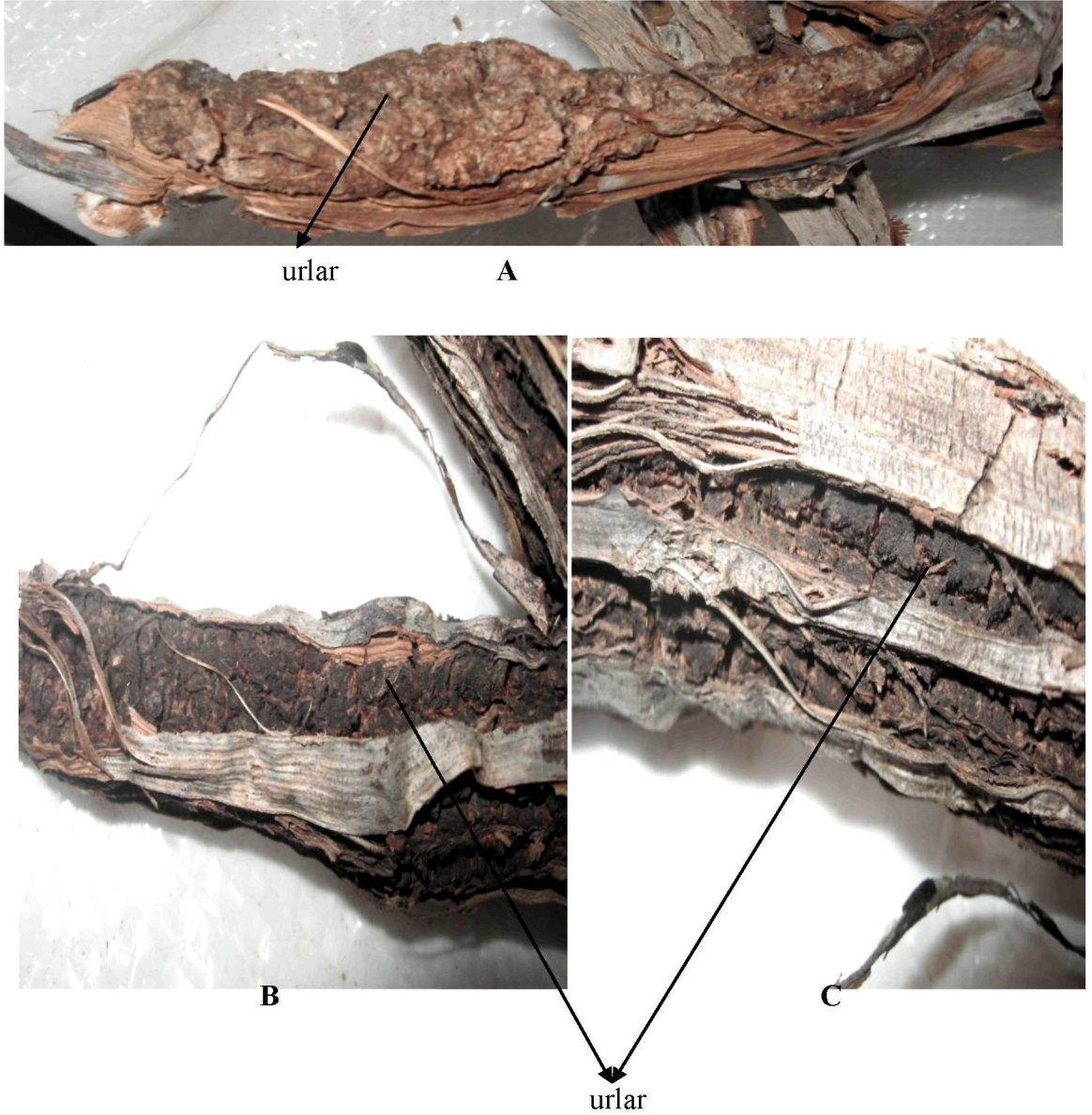
**Çizelge 4.1** Konya ilinde bakteriyel taç uru (*Agrobacterium vitis*) hastalığının belirlendiği örnekler, toplanılan ilçeler, asma çeşitleri ve sayıları

İlçeler	Asma Çeşitleri													
	Cardinal	Sultani çekirdeksiz	Pembe çekirdeksiz	Hafız ali	Kalecik karası	Kara gevrek	Alphonse Lavallée	Hasan dede	Razakı	İtalia	Gül üzümü	Kadın parmağı	Emir	TOPLAM
Hadim	12	12	8	12	4	5	5	10	5	2	1	8	-	84
Güneysımr	8	9	5	8	2	3	5	-	1	-	-	1	-	42
Derebucak	1	1	-	1	-	1	1	-	2	-	-	5	-	12
Bozkır	3	3	-	3	-	3	-	-	-	1	-	1	-	14
Seydişehir	5	5	2	3	-	3	3	-	5	-	-	4	5	35
Tuzlukçu	1	1	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	6
Çayırbağı	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	6
Karadığın	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	6
Meram +Hatıp	5	3	3	1	-	2	-	3	-	-	-	1	-	18
Cihanbeyli	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3	-	6
Yalıhüyük	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	3
Taşkent	2	1	-	2	1	-	-	2	3	1	-	2	-	14
Doğanhisar	2	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	5
Akören	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	2
Akşehir	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Ahırlı	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
Beyşehir	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4
Derbent	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Çumra	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Hüyük	1	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	4
Yunak	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Selçuklu	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
İlgin	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	4
Kadınhanı	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>52</b>	<b>47</b>	<b>20</b>	<b>41</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>28</b>	<b>6</b>	<b>280</b>
<b>Genel toplam</b>	<b>280</b>													

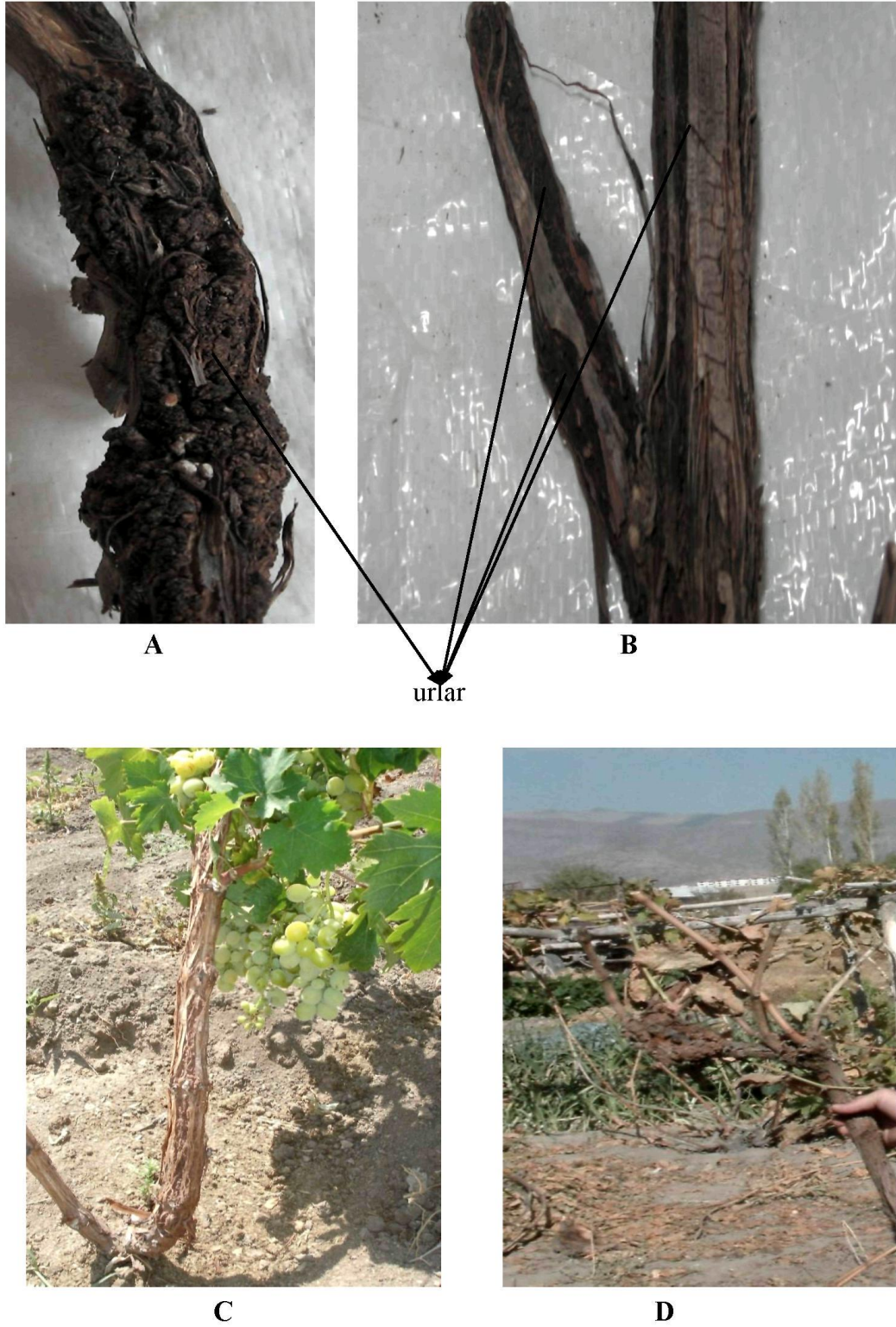


#### 4.1. Simptomatolojik Bulgular

Toplanan asma örneklerinden bazılarında ur oluşumu gözlenirken bazı simptomsuz örneklerden de *A. vitis* izole edilmiştir (Şekil 4.1.1.). Ayrıca farklı asma çeşitlerinde de ur oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.1.2., Şekil 4.1.3.)



**Şekil 4.1.1.** A: Sultani çekirdeksiz (36), B: Cardinal (91), C: Kalecik karası (29) çeşitlerinde *Agrobacterium vitis*' in oluşturduğu urlar



**Şekil 4.1.2.** İzolasyonlarda *Agrobacterium vitis* elde edilen örnekler A: Alphonse Lavallee (42), B: Karagevrek (168), Hafızali (221), Emir (211)



**A****B**

**Şekil 4.1.3.** İzolasyonlarda *Agrobacterium vitis* elde edilen örnekler A: Sultani çekirdeksiz (165) çeşidinde simptomsuz örnek, B: Sultani çekirdeksiz (185) çeşidinde ur oluşturmuş örnek

#### 4.1. *A. vitis*'in Tanısı

##### 4.1.1. Patojenin izolasyonu

Toplanan örneklerden genel yarı seçici ve seçici besiyerlerine yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen bulgulara göre 280 adet bakteriyel izolat elde edilmiş ve tanılama biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle yapılmıştır.

##### 4.1.2. Biyokimyasal yöntemler

İzole edilen 280 bakteriyel izolatın biyokimyasal olarak tanımlanmasında Moore ve ark. (2001)' in önerdiği yöntemler kullanılmıştır (Çizelge 4.1.2.1)

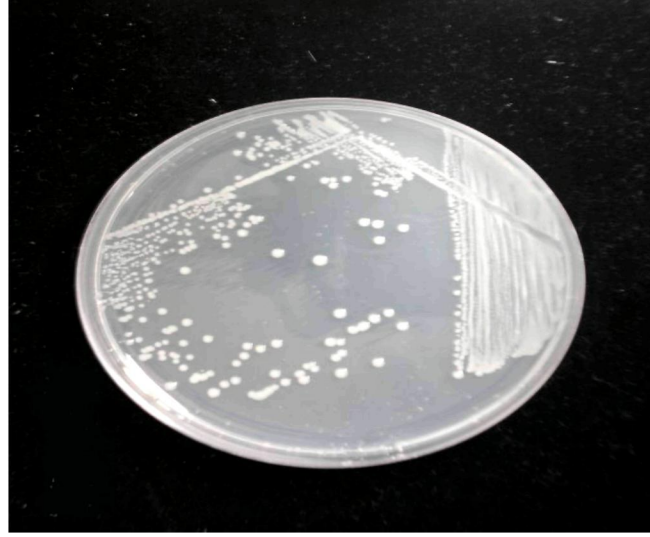
**Çizelge 4.1.2.1** *Agrobacterium* cinsinin biyokimyasal ve fizyolojik testler ile türlere Ayrılması

Biyokimyasal testler	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>
3-Ketolactose oluşumu	+	-	D
%2'lik NaCl' de gelişme	+	-	+
35°C' de gelişme	+	D	D
Litmus milk' de gelişme	ALK	AC	ALK
Asit oluşum Erytritol' den	-	+	-
Melezitose' dan	+		-
Alkali oluşumu:	-	+	+
Malonic asitten	-		-
L- tartarik asitten	-	+	+
Mucic asitten	-	+	-
Demir ammonium citrate	+		-
Oksidaz reaksiyon	+	D	D
Citrate kullanımı	D	+	+
PDA+CaCO <sub>3</sub> ' da asit temizleme	-	+	-
pH:7.0' de hareketlilik	+	+	-
pH:4.5 de pektolitik aktivite	-	-	+

+: %80 ve daha fazla pozitif, D:%21-79 pozitif, -: %80 ve daha fazla negatif, ALK: alkaline, AC:asit

#### 4.1.2.1. 35°C’de gelişim

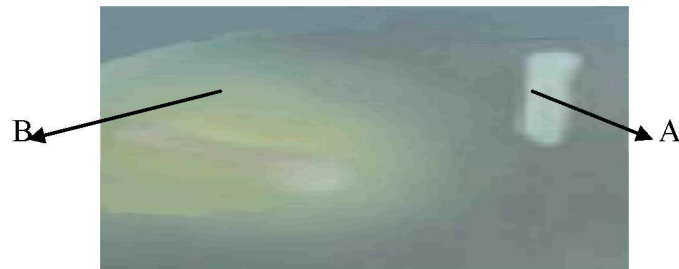
Besi yerine ekilen ve 35°C’de inkübe edilen izolatların tamamı 2 gün içinde gelişmiştir (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.1.).



Şekil 4.1.2.1. 35°C’de Gelişme gösteren *Agrobacterium vitis* izolatı

#### 4.1.2.2. Laktozdan 3-ketolaktöz üretimi

Laktoz içeren besi yerinde 2 gün geliştirilen izolatlarımız ve referans izolatlar üzerine Benedict ayracı dökülerek bir saat bekletildiğinde yalnız 7 ilçeden elde edilen izolatların(273, 284, 259, 267, 229, 218, 135) kolonileri etrafında sarı hale oluşmuştur. Diğer tüm izolatlar bu teste negatif reaksiyon göstermiştir.(Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.2.).

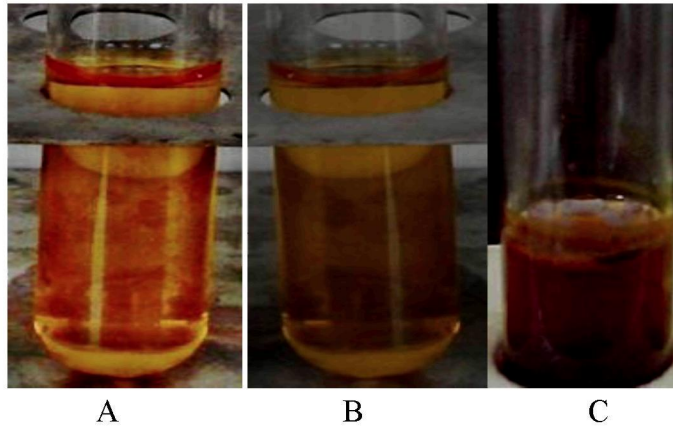




**Şekil 4.1.2.2.** Laktozdan 3-Ketolaktoz Üretimi, A-C: Hale oluşturmayan bakteri(1, 6, 50, 200) B-D: Sarı hale oluşturan izolatlar (273, 284, 259, 267, 229, 218, 135)

#### 4.1.2.3. Demir amonyum sitrat kullanımı

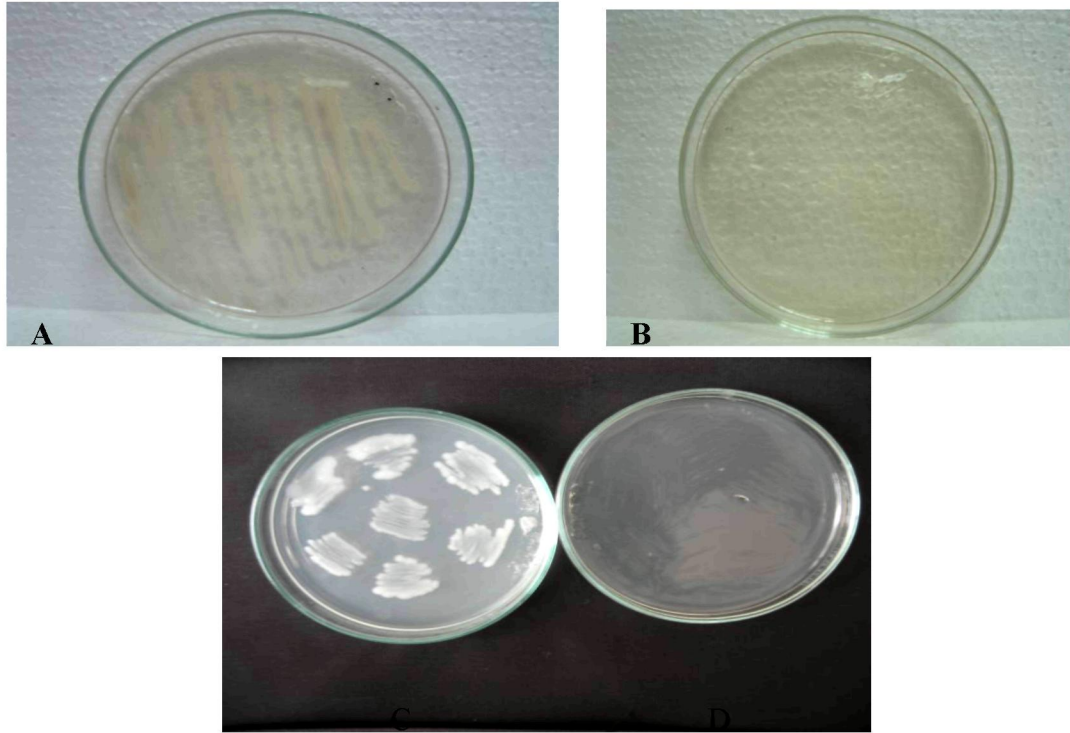
Sıvı demir amonyum sitrat içeren besi yerinde ilçe ve referans izolatları 2 gün geliştirildikten sonra sadece 6 izolat (273, 284, 229, 218, 199, 135) besi yerinin üzerinde kiremit renginde bir kaymak tabakası oluşturmuştur. Diğer izolatlarda besiyerinde değişim gözlenmemiş ve beklenildiği şekilde negatif sonuç elde edilmiştir (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.3.).



**Şekil 4.1.2.3.** Demir amonyum sitrat kullanımı, A: Hazırlanan besiyeri, B: Demir amonyum sitrat kullanmayan izolat (21), C: Demir amonyum sitrat kullanan izolat (273)

#### 4.1.2.4. %2 NaCl içeren besi yerinde gelişme

%2 NaCl içeren NA besi yerinde 2 gün inkübe edilen izolatlardan 10 izolat (273, 284, 259, 267, 229, 218, 135, 117, 104, 114) dışında diğer tüm izolatlar gelişmiştir (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.4.).

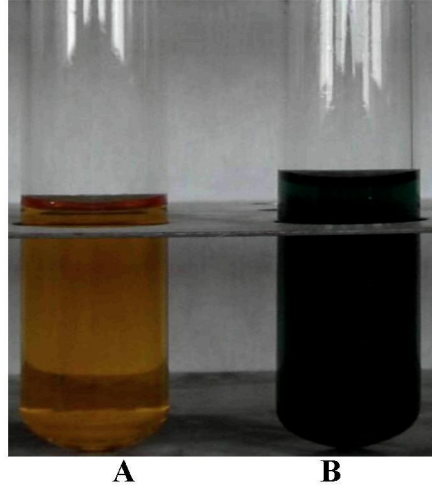


**Şekil 4.1.2.4.** %2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme , A-C:%2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişen izolatlar (273, 284, 259, 267, 229), B-D: gelişim göstermeyen izolatlar (50, 21, 117)

#### 4.1.2.5. Sakkaroz ve eritritolden asit üretimi

Sakkaroz veya Erytritrol içeren besi yerinde ilçe ve referans izolatları 2 gün inkübe edilmiş ve 7 izolat (273, 284, 259, 267, 244, 229, 237) sakkarozdan ve eritritolden asit oluşturmuştur diğer izolatlar oluşturmamıştır (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.5.).

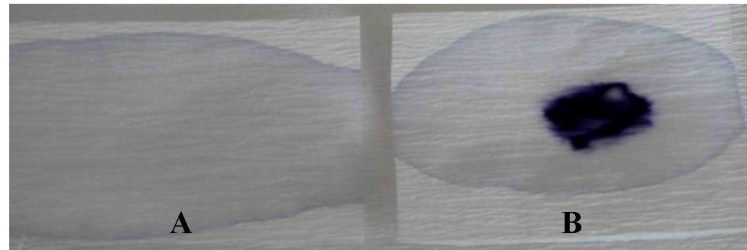




**Şekil 4.1.2.5.** Sakkaroz ve Eritritolden Asit Üretimi, A: 273 numaralı izolat (pozitif) B: 20 numaralı (negatif)

#### 4.1.2.6. Oksidaz testi

Elde edilen ve referans izolatlar N; N; N; N' - Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diklorid eriyiği emdirilmiş filtre kağıdına bir kürdan yardımıyla sürülmüş ve 10 saniye içerisinde 14 ilçesel izolat (273, 284, 259, 267, 251, 224, 237, 218, 192, 180, 163, 172, 135, 117) haricinde diğer izolatlar koyu mor renk oluşturmaları sebebiyle pozitif olarak değerlendirilmiştir(Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.6.)

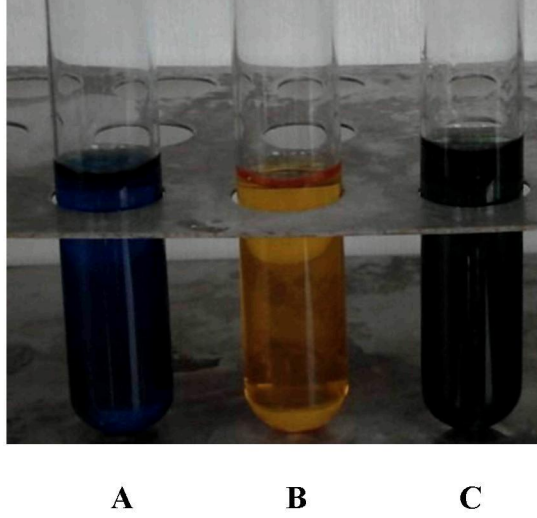


**Şekil 4.1.2.6.** Oksidaz testi, A: 273 numaralı izolat (negatif) B: 20 numaralı izolat (pozitif)



#### 4.1.2.7. Sitrat kullanımı

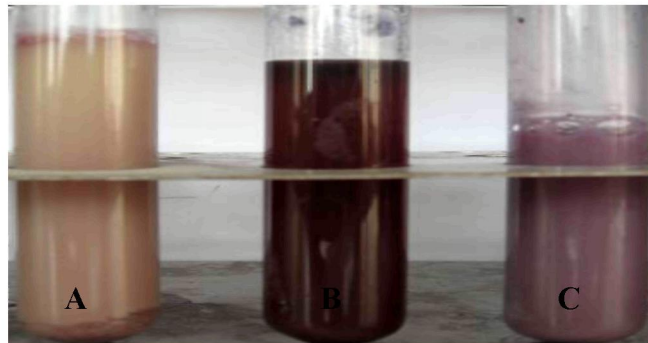
Sitrat içeren besi yerinde elde edilen ve referans izolatlar 2 gün inkübe edilmiş ve yalnız 2 izolat (309, 273) dışında diğer tüm izolatlar sitrati kullanmıştır(Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.7.).



**Şekil 4.1.2.7.** Sitrat kullanımı, A:Sitrat kullanan izolat 309 (pozitif), B:Sitrat kullanmayan izolat 11 (negatif), C: Orijinal besiyeri.

#### 4.1.2.8. Litmus milkte reaksiyon

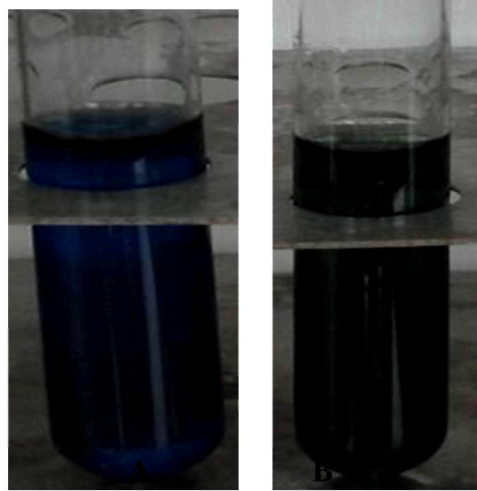
Sıvı litmus milk içeren besi yerinde 2 gün inkübe edilen elde edilen izolatlardan 3 adedi (273, 309, 284) haricinde referans izolat ve diğer ilçe izolatlarının tamamı litmus milk besi yerini alkali yapmıştır (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.8.).



**Şekil 4.1.2.8.** Litmus Milkte Reaksiyon, A: Asit oluşumu 20 numaralı izolat (AC), B: Alkali oluşumu ( ALK) 309 numaralı izolat, C: kontrol besiyeri (kontrol)

#### 4.1.2.9. Malonik asitten alkali oluşumu

Malonik asit içeren besi yerinde elde edilen ve referans izolatla 2 gün inkübe edilmiş ve 3 ilçesel izolat (273, 259, 267) dışında diğer tüm izolatlar besi yerini alkaliye dönüştürmüşlerdir (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.9.).



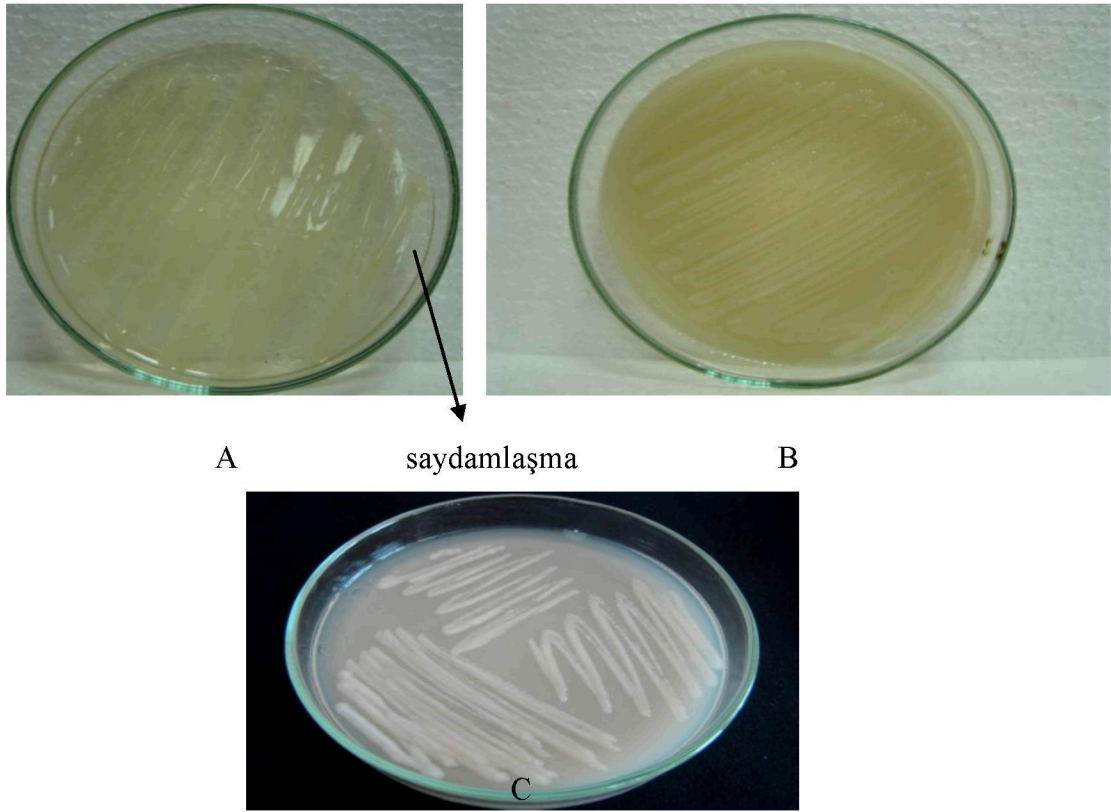
Şekil 4.1.2.9. Malonik Asitten Alkali Oluşumu, A: Alkali oluşumu ( pozitif ), B: 273 numaralı izolat ( negatif )

#### 4.1.2.10. Mucic ve L-tartarik asitten alkali oluşumu

Mucic veya L-tartarik asit içeren besi yerinde elde edilen ve referans izolatlar 2 gün inkübe edilmiş ve L-tartarik asitten hepsi alkali oluştururken, mucic asitten hiçbir izolat alkali oluşturmamıştır (Çizelge 4.1.1.).

#### 4.1.2.11. PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerinde asit temizleme

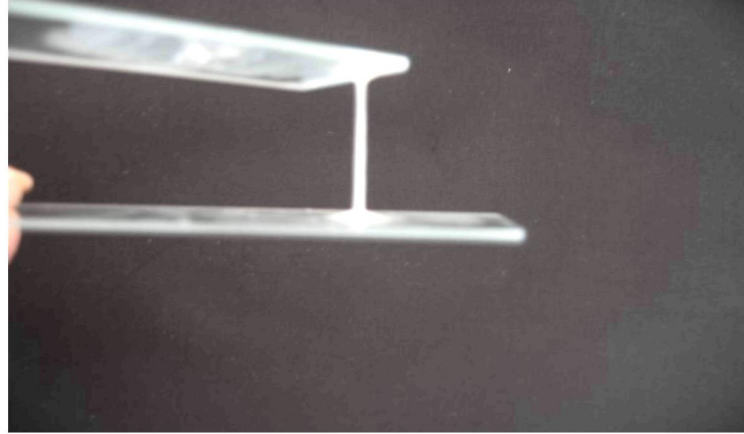
Elde edilen izolatlardan 11 tanesi (273, 284, 309, 259, 267, 251, 224, 237, 218, 192, 180) PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerinde saydamlaşma oluşturduğundan asit temizleme özelliğine sahip olduğu ve diğer izolatların hepsinin ise besi yerinde saydamlaşma oluşturmadığı için asit temizleme özelliğine sahip olmadığına belirlenmiştir (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.11.).



**Şekil 4.1.2.11.** PDA+CaCO<sub>3</sub> Besi Yerinde Asit Temizleme A: besiyerinde saydamlaşma oluşturan 273 numaralı izolat. B-C: besiyerinde saydamlaşma oluşturmeyan 20 numaralı izolat .

#### 4.1.2.12. Potasyum hidroksit testi

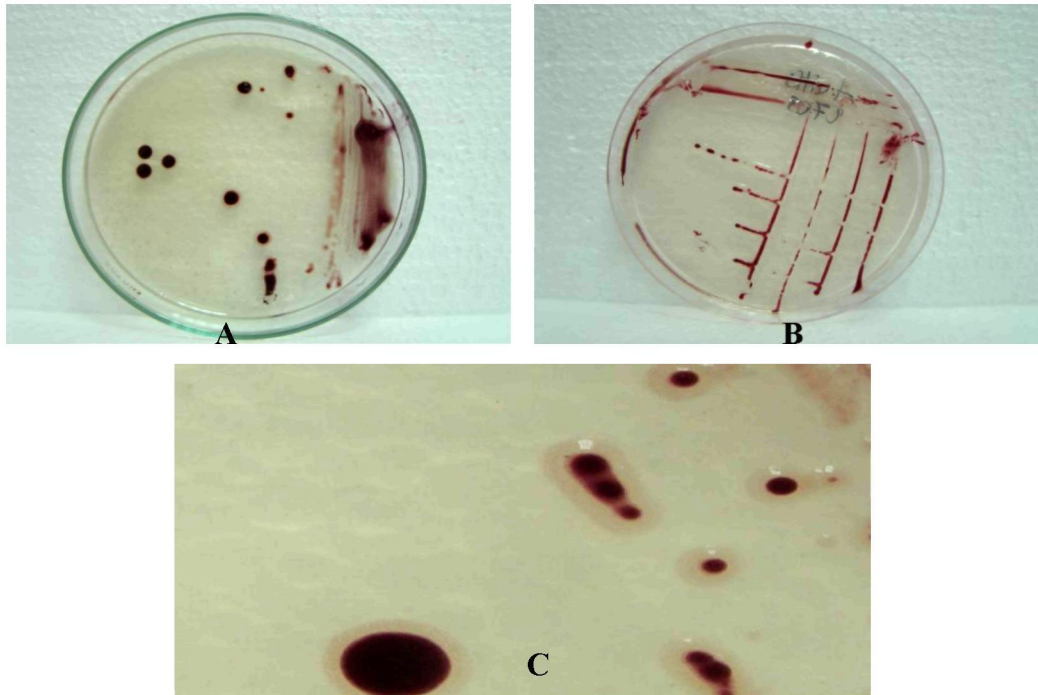
Elde edilen izolatlar bir damla potasyum hidroksit ile karıştırıldıktan sonra hafifçe yukarı kaldırıldığında ipliğimsi şekilde uzadıkları gözlenmiştir. Bundan dolayı urlu dokulardan izole edilen izolatların tamamı gram negatif olarak belirlenmiştir. Araştırılan fizyolojik ve biyokimyasal özellikler için elde edilen sonuçlarda ilçe izolatları ile orijinal *A. vitis* kültür arasında fark yoktur. (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.12.).



**Şekil 4.1.2.12.** Potasyum Hidroksit Testi sonucu *Agrobacterium vitis* izolatlarının ipliğimsi şekilde uzaması

#### 4.1.2.13. Roy Sasser besi yeri

*A. vitis* kolonileri 27 °C’ de 4 günlük inkübasyondan sonra elde edilen izolatların kolonilerinin merkezleri genelde koyu kırmızı, kenarları ise beyaz renkte gelişim göstermektedir. (Çizelge 4.1.1.) (Şekil 4.1.2.13.).



**Şekil 4.1.2.13.** *Agrobacterium vitis*'in Roy Sasser Besi Yerindeki gelişimi A-B: RS Besiyerinde gelişim, C: gelişen tek tek koloniler









































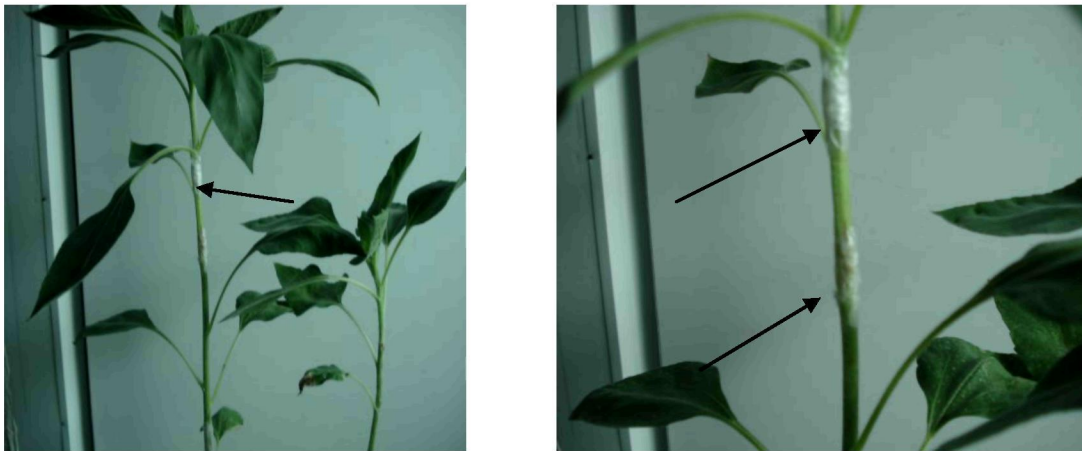


#### 4.2. Patojenisite Testi

Konya ili ve ilçelerinden izole edilen *A. vitis* izolatları, PDA+CaCO<sub>3</sub> besiyerinde 25±1°C'de 2 gün geliştirildikten sonra 2-3 haftalık domates (*Lycopersicon esculentum*) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus*) ve anaç üzeri 1 yaşlı asmalara (*Vitis vinifera*) 10<sup>9</sup> hücre/ml yoğunlukta steril bir kürdan yardımıyla inokule edilmiştir. İnokule edilmiş bitkilere ilk 24 saat için içleri nemlendirilmiş polietilen torbalar geçirilmiş ve daha sonra torbalar çıkarılmıştır. Bitkiler iklim odasında % 75-80 nispi nem ve 16 saat ışıklı 8 saat karanlıktaki fotoperiyotta tutulmuşlardır.

Patojenisite testleri çoğunlukla ayçiçeği ve domates bitkilerinde kök çürüklüğü ve urlara neden olmuştur. Ayçiçeği bitkilerinde ilk urlar, inokulasyondan 9-10 gün sonra, domateste 13-15 gün sonra görülmeye başlanmıştır. Domateste urlar grimsi renkte, ayçiçeğinde ise yeşilimtrak görünüm almıştır.

Asma örnekleri alınan 24 ilçeden elde edilen izolatlardan, tesadüfi olarak seçilen ve her ilçe için 3'er adet olmak üzere toplam 72 adet *A. vitis* izolatu ile patojenisite testleri yürütülmüştür. Bu izolatlar ve referans kültür ile yapılan testler sonucunda oluşan sptomlar arasında farklılık gözlenmemiş ve tipik *A. vitis* urları oluşmuştur. Ancak izolatların virülenslik derecelerine göre sptom gelişim hızı ve şekillerinde bazı farklılıklar belirlenmiştir.



**Şekil 4.2.1.** Ayçiçeği bitkisinin *Agrobacterium vitis* inokule edildikten sonra pamuk ve parafilmle kapatılması





**Şekil 4.2.2.** A: Asma bitkisinin *Agrobacterium vitis* inokule edildikten sonra pamuk ve parafilmle kapatılması

Asmada ise patojenisite çalışmaları klima odasında köklendirilen bitkilerin taze, yeşil sürgünün altındaki iki boğum arasındaki kısma bir bisturi yardımıyla açılan yaraya bir kürdan yardımıyla PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerinde geliştirilmiş bakteri izolatından bir miktar alınarak inokulasyon yapılmış ve üzeri bir ıslak pamuk ve parafilm ile sarılmıştır. Bitkiler yukarıda belirtilen iklim odası koşullarında gelişmeye bırakılmışlar ve üç ay sonra ur oluşturup oluşturumamasına göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.2.2.) (Şekil 4.2.3.).



**A**



**B**

**Şekil 4.2.3.** A: Yetiştirilen asma çubukları, B: *Agrobacterium vitis* inokule edildikten 4ay sonra asmada görülen urlar

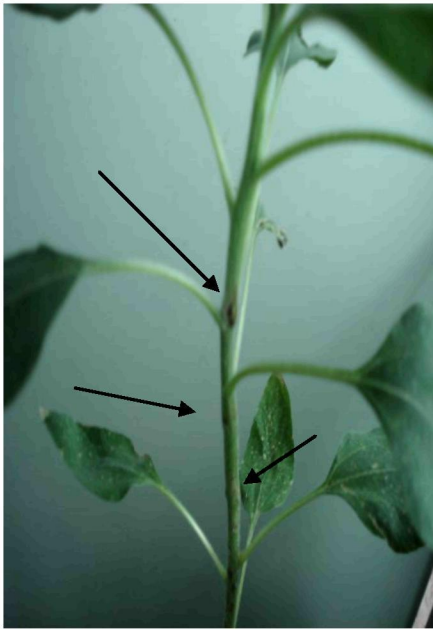


A



B

**Şekil 4.2.2.** A: *Agrobacterium vitis* inokule edildikten 1 ay sonra asmada meydana gelen urlar, B: Hastalık bulaştırılmamış asma ( Kontrol)



A



B

**Şekil 4.2.3.** A: *Agrobacterium vitis* inokule edilmiş ayçiçeği bitkisi, B: Ayçiçeği bitkisinde oluşan ur



A

B

**Şekil 4.2.3.** A: Hastalık bulaştırılmış domates bitkisi ve oluşan urlar, B: Sağlıklı domates bitkisi (kontrol)

#### 4.2.2. Yaprak nekrozu

Çiçeklenme döneminden önceki ayçiçeği bitkilerinin yapraklarında aralarındaki alanlara hipodermik enjeksiyonla  $10^8$  hücre/ml yoğunlukta *A. vitis* izolatları inokule edilmiştir. 2 hafta sonra yaprakta nekrozlar görülmeye başlanmıştır (Şekil 4.2.4.).

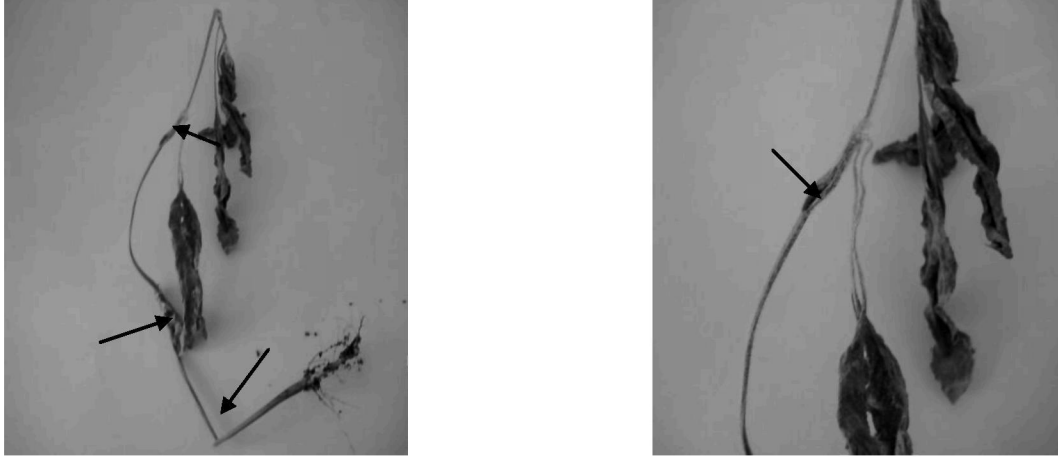


**Şekil 4.2.4.** Ayçiçeği bitkisinin yaprağına *Agrobacterium vitis* enjekte edildikten sonra meydana gelen nekrozlar.



### 4.2.3. Kök ve sürgün nekrozu

Sultani çekirdeksiz asma çubukları ve ayçiçeği fide haline geldikten sonra asmanın kök bölgesine  $10^9$  hücre/ml yoğunlukta ve 10 ml *A. vitis* süspansiyonu bulaştırılmıştır. 2-3 hafta sonra belirtiler gözlenmiştir. (Şekil 4.2.5.)



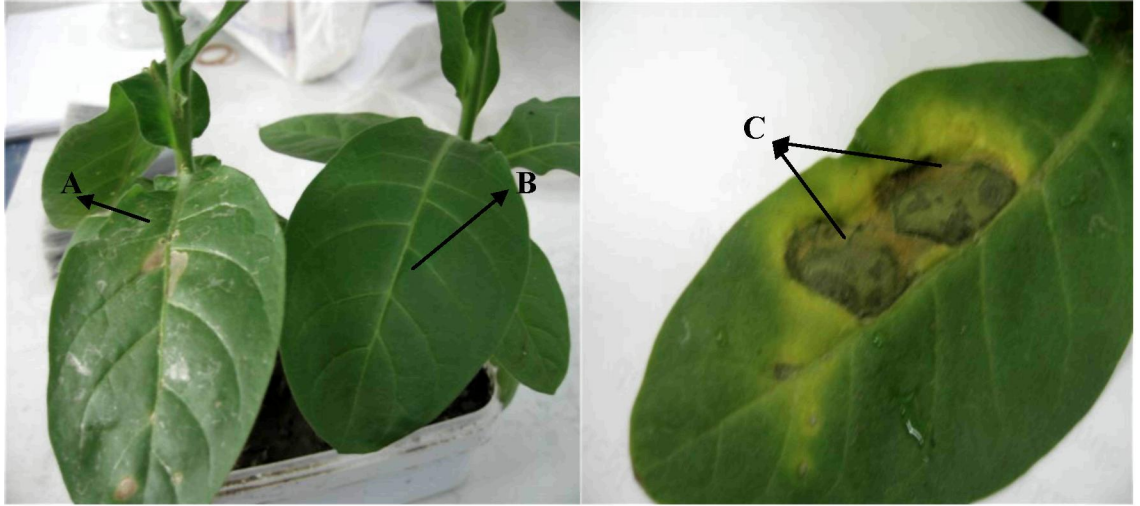
Şekil 4.2.5. *Agrobacterium vitis* bulaştırılmış toprakta ayçiçeği fidelerinin belirtiler görüldükten sonra bitkinin köklerden başlayarak ölümü ve oluşan urlar.

### 4.3. Tütünde hipersensitif reaksiyon (aşırı duyarlılık) testi (HR)

Elde edilen *A. vitis* izolatlarının tütün (*Nicotina tobacum* cv. Burley) bitkisinde hipersensitif reaksiyon oluşturma durumları incelenmiştir (Burr ve ark.,1983). İnokulasyondan sonraki 2 gün içerisinde doku nekrozuna sebep olan izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir. 280 izolatın tamamı doku nekrozuna sebep olmuştur (Şekil 4.3.1.) (Şekil 4.3.2.).



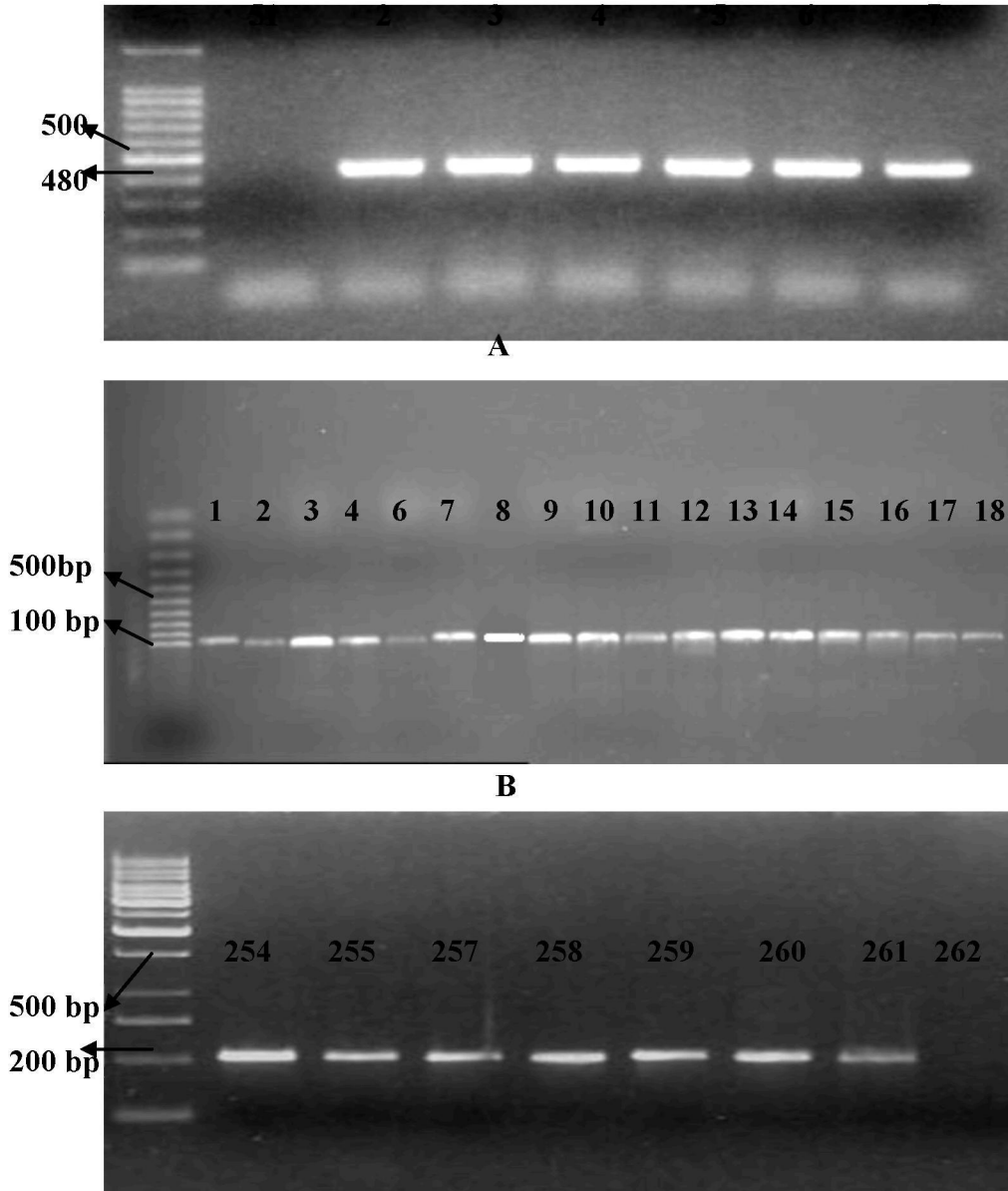
**Şekil 4.3.1.** Tütünde hipersensitif reaksiyon, K: su A: 301, B: 15, C: 250 *Agrobacterium vitis* izolatlarının meydana getirdiği nekrozlar

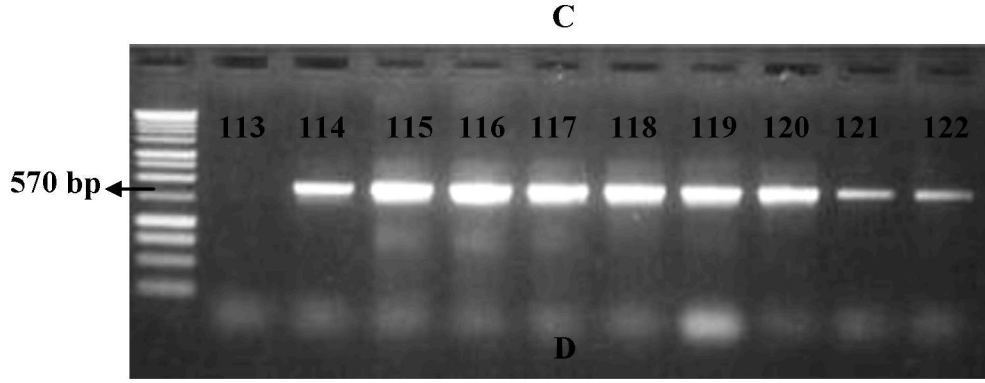


**Şekil 4.3.2.** A: *Agrobacterium vitis* enjekte edilmiş tütün yaprağı, B: kontrol, C: Tütün bitkisinde inokulasyondan sonraki 48 saat içinde meydana getirdiği hipersensitif reaksiyon.

#### 4.4. *Agrobacterium vitis* İzolatlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Tanılanması

PCR çalışmasında *A. vitis*'e spesifik dört farklı primer seti kullanılmıştır. Asmadan izole edilen tüm isolatlar *A. vitis*'e *virA* primer seti kullanıldığında 480 bp, büyüklüğünde spesifik bant oluşturduğu gözlenmiştir diğer primer setlerinde ise *Ab3-F3* ve *Ab3-R4* primerinde 570 bp, *pehA* geninde 200bp, *16S – 23S* Geninde 100 bp (Willems, 1993) büyüklüğünde bant oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.4.1.). Bağ alanlarından izole ettiğimiz 309 izolatın 280 adedi PCR yöntemiyle *Agrobacterium vitis* olduğu saptanmıştır. Burada elde edilen sonuçlar da, daha önce yaptığımız biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik testlerin birbirini desteklediği görülmektedir.





**Şekil 4.4.1.** PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde oluşturduğu bantlar A: *virA* geni 51. örnek *A. tumefaciens*, B: *16S – 23S* geni, C: *pehA* geni 262. örnek *A. tumefaciens*, D: *Ab3-F3* ve *Ab3-R4* primerinde oluşan bantların görüntüsü ve 113. örnek *X. ampelinus*

## 5. TARTIŞMA

2006-2007 yıllarında Konya iline bağlı 24 ilçede (Cihanbeyli, Güneysınır, Meram, Hüyük, Seydişehir, Hadim, Beyşehir, Akören, Ahırlı, Yalılıyük, Derebucak, Bozkır, Selçuklu, Iğın, Derbent, Doğanhisar, Yunak, Çayırbağı, Karadığın, Akşehir, Tuzlukçu, Çumra, Kadınhanı ve Taşkent) yapılan surveylerde 309 adet asma örneği toplanılmıştır. Bir adet referans *Agrobacterium vitis* kültürü (RFR) ile karşılaştırmalı olarak yapılan biyokimyasal, moleküler ve patojenisite testleri sonucunda il genelinde asmaların *Agrobacterium vitis*’ le %90.61 oranında bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda geç ilkbahar ve yaz aylarında yapılan izolasyonlardan en iyi sonuçlar alınmıştır. Burr ve ark. (1987) da urlu dokulardan izolasyon için ilkbahar ve yaz aylarının çok uygun olduğunu bildirmişlerdir. Genç urlara, geç ilkbahar ve yaz aylarında rastlanmış ve urlar ne kadar taze olursa izolasyon da o kadar kolay olmuştur. Yaşlı kurumuş urlardan izolasyon gerçekleştirilememiştir.

Argun (2001), asmalardan çoğunlukla *A. vitis*’i izole etmesine rağmen çok azda *A. tumefaciens* izole etmiştir. Küsek (2007), ise sadece *A. vitis* elde etmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgular, birçok araştırıcının çalışmalarını destekler şekilde olup, asmalarda ura neden olan etmenin çoğunlukla *A. vitis* ve daha sonra ise *A. tumefaciens* olduğu tespit edilmiştir (Knauf ve ark., 1983; Sawada, 1995; Salomone ve ark.,1996; Burr ve ark., 1998; Burr ve Otten, 1999; Ride ve ark., 2000; Ride ve ark., 2000; Argun ve ark., 2002).

Yapılan literatür araştırması, asma bakteriyel etmenleri *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Xylophilus ampelinus*’ un birçok ÷lkede ekonomik kayıplara neden olduğunu göstermektedir (Cavara, 1897; Anderson ve ark., 1979; Burr ve ark., 1984; Staphorst, 1985; Deqın, 1987; Bishop ve ark., 1988; Stefani, 1989; Brisset ve ark., 1991; Canfield ve ark., 1991; Sawada, 1992; Eastwell, 1995; Benlioğlu ve ark., 1998; Burr ve ark., 1998; Bazzi ve ark., 1999; Alexandrova ve ark., 2000; Cubero, 2001; Khlaif, 2003; Kawaguchi ve ark., 2005; Grall, 2005;) Türkiye’nin farklı bölgelerindeki (İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu, Ege ve Akdeniz



Bölgeleri) asma hastalıklarını belirlemek için çeşitli çalışmalar yürütülmüş ve asma bitkisinde *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*'in patojen oldukları saptanmıştır (Benlioğlu ve ark., 1998; Argun, 2001; Demir ark., 2002; Küsek, 2007).

Çalışmamızda, arazi koşullarında belirlenen simptomatolojik bulgular, patojenin mevcut çeşitler içersinde en fazla Sultani Çekirdeksiz, Kardinal, Hafızali ve en az Ekşi Kara çeşitlerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Demir ve ark. (2002), Alphonse Lavellee, Kadın parmağı ve Italia, Sultani çekirdeksiz *A. vitis*'e karşı en hassas çeşit olarak belirlenirken, Kardinal en dayanıklı çeşit olarak belirlenmiştir. Argun (2001), ise çalışmasında Hafızali ve Kardinal üzüm çeşitleri dayanıklı, Kadınparmağı en duyarlı çeşit olarak belirlenmiştir. Szegedi, (1989) ise Pembe Çekirdeksiz ve Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşitini en hassas çeşitler olarak belirlerken Kardinal hastalıktan en az etkilenen çeşit olarak belirlenmiştir. Araştırmacıların bulguları çeşit reaksiyon denemeleri olmakla beraber bizim bu konudaki bulgularımız arazi gözlemlerine dayanmaktadır. Ancak yinede ve özellikle Kardinal asma çeşidinin farklı durum göstermesi incelenmesi gereken bir durum olarak belirlenmiştir.

Anderson (1979), ABD'de 176 asma izolatu toplamış ve bağ kanseri hastalığını 11 farklı asma türüne inokule etmiştir. Anderson ve Moore (1979), 27 izolatin patojenik 70 izolatin ise patojenik olmadığını tesbit etmişlerdir. Deqin ve ark. (1987)'nin yaptıkları bir çalışmada, Kuzey Çin'de asma ularından 13 *Agrobacterium tumefaciens*, 19 *Agrobacterium vitis* izolatu elde etmişler ve asma türleri arasında farklılıklar olmasına rağmen izole edilen izolatların hepsinin ayçiçeğinde ur oluşturduğunu gözlemişlerdir. Demir ve ark. (2002), asma kök uru hastalığının görüldüğü fidan üretim merkezleri ve farklı bölgelerdeki bağlardan alınan toplam 56 örnekten yapılan izolasyonlar sonunda, *Agrobacterium* benzeri 118 izolat elde edilmiş ve bu izolatlardan 82 tanesinin patojen olduğu belirlenmiştir. Tanılanmış *Agrobacterium vitis* izolatlarının karşılaştırmalı olarak denemelere alındığını tür tanılama testleri sonunda asma izolatlarının *Agrobacterium vitis* özelliği gösterdikleri ve asma dışında bazı bitki türlerinde de ur oluşturduklarını belirlenmiştir. Benlioğlu ve ark. (1998) Orta Anadolu bölgesinde sağlıklı görünen

150 asma örneği toplanmış ve 7 örnekte *Agrobacterium vitis* tesbit etmişlerdir. Ayrıca 8 bulaşık asmasının da 6 tanesinin sürgünlerinden *A. vitis* elde etmişlerdir. Toplanan örneklerin 6 tanesinin patojen, 7 tanesinin de non patojen *A. vitis* olduğunu belirlemişlerdir.

Asma örnekleri alınan 24 ilçeden elde edilen izolatlardan, tesadüfi olarak seçilen ve her ilçe için 3'er adet olmak üzere toplam 72 adet *A. vitis* izolatu ile patojenisite testleri yürütülmüştür. Bu izolatlar ve referans kültür ile yapılan testler sonucunda oluşan sptomlar arasında farklılık gözlenmemiş ve tipik *A. vitis* urları oluşmuştur. Ancak izolatların virülenslik derecelerine göre sptom gelişim hızı ve şekillerinde bazı farklılıklar belirlenmiştir. Bu farklılıklar oluşan urun büyüklüğü ve oluşma süresi olarak tespit edilmiştir.

Lehoczky (1968), bağ uru etmeni ile enfekte edilmiş asmalardan, urun 15 ve 80 cm altından kesilen asma çubuklarından akan öz sudan etmeni (*Agrobacterium vitis*) izole etmiştir. Budamayla ve diğer yaralanmalarla asma çubuklarında yeni urların oluştuğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile ilk defa bağ urunun iletim demetleri yoluyla taşındığı ve bitkinin üst kısmında ikincil urlara neden olduğu tespit etmişlerdir. Yaptığımız patojenisite testlerinde kesilen asma çubuklarından izolasyon yapılmış ve başarılı bir şekilde bakteri elde edilebilmiştir.

Asma örnelerinden bakteriyel patojenlerin izolasyonu için, Tarbah ve Goodman (1986), Lehoczky (1968), Burr ve Katz (1984), Küsek (2007), Argun (2001), Demir ve ark. (2002), bitki özsuyu vakumlama ile ve urlu dokuları ise %1'lik sodyum hipoklorit ile 3 dakika yüzeysel dezenfekte edildikten sonra 3 kez steril saf su ile yıkanmışlardır. Bir bistüri yardımıyla urun üst tarafı hafifçe soyularak alttaki taze canlı dokudan küçük parçalar alınmıştır. Bu parçalar daha sonra bir havanda steril fizyolojik tuzlu su (%8,5 NaCl) içerisinde homojenize edilmiştir. Bir saat bekledikten sonra bu süspansiyondan bir öze alınarak içinde King B ve Patates Dekstroz Agar+CaCO<sub>3</sub>, Patates Dekstroz Agar, RS besiyerlerine aktarmışlardır. Bizim çalışmamızda da aynı işlemler uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Elde edilen *A. vitis* izolatlarından bazıları yapılan biyokimyasal testlere beklenilenin tersine farklı sonuç göstermişlerdir. Bunlar içersinde; 273, 284, 259, 267, 229, 218 ve 135 nolu izolatlar laktozdan 3-ketolaktöz üretiminde, 273, 284, 229, 218, 199 ve 135 nolu izolatlar demir amonyum sitrat kullanımında, 273, 284, 259, 267, 229, 218, 135, 117, 104 ve 114 nolu izolatlar %2 NaCl içeren besi yerinde gelişme testinde, 273, 284, 259, 267, 244, 229 ve 237 nolu izolatlar sakkaroz ve eritritolden asit üretimi testinde, 273, 284, 259, 267, 251, 224, 237, 218, 192, 180, 163, 172, 135 ve 117 nolu izolatlar oksidaz testinde, 309 ve 273 nolu izolatlar sitrat kullanımı testinde, 273, 309 ve 284 nolu izolatlar litmus milkte reaksiyon testinde, 273, 259 ve 267 nolu izolatlar malonik asitten alkali oluşumu testinde, 273, 284, 309, 259, 267, 251, 224, 237, 218, 192 ve 180 nolu izolatlar PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerinde asit temizleme testinde değişken sonuçlar vermişlerdir. Benzer sonuçlara ve hatta referans kültürlerden elde edilen bulgular da dahil olmak üzere Argun (2001) ve Küsek (2007)' in çalışmalarında da rastlanılmıştır. Bu durum izolatların biyokimyasal testlere karşı gösterebilecekleri streyne bağlı doğal reaksiyon olarak değerlendirilmektedir. Bu tür farklılaşmalardan doğabilecek tanı hatalarını en aza indirebilmek için test sayısı ve çeşidi fazla yapılmış ve adı geçen izolatların da *A. vitis* olduğuna karar verilmiştir.

Günümüzde mikroorganizmaların tanısında her ne kadar moleküler tekniklerin kullanılması hızla yaygınlaşsa da klasik tanı teknikleri birçok araştırmacı için hala güncelliğini korumaktadır. Bunun en önemli nedeni ise tanılamak istenen mikroorganizma gruplarının belirlenmesi ve takip eden moleküler çalışmalara hız kazandırmasıdır. Bu nedenle bizim çalışmamızda da izole edilen bakteriyel izolatların moleküler tanılarının yanısıra morfolojik ve biyokimyasal karakterleri belirlenmiştir.

Elde edilen *Agrobacterium vitis* izolatlarına, biyokimyasal karakterlerden gram reaksiyon, 35°C' gelişim, 3-ketolactoz oluşumu, %2'lik NaCl' de gelişim, litmus milk de gelişim, eritritol ve melezitoz dan asit oluşumu, malonik asitten, L- tartarik asitten ve musik asitten alkali oluşumu, demir amonyum sitrat testi, oksidaz reaksiyon, sitrat kullanımı, PDA+CaCO<sub>3</sub>' da asit temizleme, pH= 7 de hareketlilik

pH=4,5 de pektolitik aktivite testleri uygulanmıştır. Birçok araştırmacı *A. vitis* için yapmış oldukları biyokimyasal tanılama testlerinde çalışmamızdaki bulgularımıza paralel sonuçlar elde etmişlerdir. (Lehoczky 1968, Anderson 1979, Knauf ve ark., 1982, Burr ve ark.1983, Burr ve Katz 1984, Tarbah ve Goodman 1986, Deqin ve ark. 1987, Benlioğlu ve ark. 1998, Momol ve ark., 1998, Schaad 2001, Argun ve ark., 2002, Demir ve ark.2002, Siddiqui, 2002, Küsek 2007).

Argun ve ark. (2002), Küsek (2007), Benlioğlu ve ark. (1998), Demir ve ark. (2002), Goodman (1986), Burr ve ark.(1983), izole ettikleri bakterileri PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerinde 25±1°C'de 2 gün geliştirildikten sonra bakterinin yoğunluğu aşağı yukarı 10<sup>8</sup> hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. 2- 3 haftalık domates, ayçiçeği ve asma bitkilerine steril bir kürdan yardımı ile inokule etmişlerdir. İnokule edilmiş bitkiler 24 saat klima odasında (16 saat ışık, 8 saat karanlık) polietilen torbalar içerisine konularak yüksek nem sağlanmıştır. Daha sonra klima odasında (16 saat ışık, 8 saat karanlık) gelişmeye bırakılmış ve 3 hafta sonra ur oluşturup oluşturumamasına göre değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda aynı yöntemler uygulanmış ve daha önceki yapılan çalışmaların sonuçlarını destekler bulgular elde edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen 280 izolatin morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları daha önce saptanan bulguları destekler bulunmuştur. Saf olarak elde edilen izolatların patojenisiteleri, Sultani Çekirdeksiz çeşidi asmalarda ve White Burley çeşidi tütünler üzerinde yapılan HR testleri ile belirlenmiştir. Biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanılanan bütün *Agrobacterium vitis* izolatlarımızın tütün bitkisinde HR testine, ayçiçeği domates ve sultani çekirdeksiz patojenisite testine pozitif sonuç verdikleri belirlenmiştir.

Moleküler tekniklerden DNA amplifikasyonu (PCR) son yıllarda bitki patojenlerinin kesin tanıların yapılmasında tercih edilen bir yöntemdir.(Saiki ve ark., 1985; Tarbah ve ark.,1986; Burr ve ark., 1987; Szegedi ve ark.,1988; Eastwell ve ark., 1995; Stover ve ark., 1997; Schaad ve ark., 2001; Kawaguchi ve ark., 2004).

Kawaguchi ve ark., (2004) *Ab3-F3* ve *Ab3-R4* primerlerini kullanarak 570 bp da tek bant, Eastwell ve ark., (1995) *pehA* primerleri kullanılarak 200 bp da tek bant, Momol, ve ark., (1998) 16S-23S rRNA primerleri kullanılarak 100 bp da tek bant, Eastwell ve ark., (1995) *vir A* primerleri kullanılarak 480 bp da tek bant oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da araştırmacıların önerdiği primerler kullanılarak aynı bulgular elde edilmiştir.

Eastwell ve ark. (1995) *virA* gen bölgesinden geliştirilen primer kullanarak *A. vitis* izolatlarına spesifik 480 bp'lik bantlar oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan *A. vitis* izolatlarına spesifik primer, bakterinin taşıdığı plazmidin *virA* gen bölgesinden geliştirilen bir primerdir. Dolayısı ile bakterinin sahip olduğu kromozomda meydana gelen değişikliklerden etkilenmez ama plazmidler üzerinde *virA* bölgesinde meydana gelen mutasyonlardan etkilenerek PCR ürünü oluşmayabilir (Argun, 2001; Küsek, 2007). Asmadan izole ettiğimiz izolatların tamamında, PCR ile amplifiye edilen *virA* gen bölgesi için 480 bp'lik bantlar oluşmuş ve bu sebeple *virA* gen bölgesinde önemli bir değişimin olmadığı düşünülmüştür.

Yapılan çalışmalar moleküler metotların her birinin tanı için kendi başına yeterli olduğunu göstermiştir. Ancak tanı ve karakterizasyonda birden fazla metodun bir arada kullanılmasının sonuçların güvenilirliğini artırdığı ve bir metotla tespit edilemeyen özelliğin diğeriyle belirlenmesini sağladığı görülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Konya ili Cihanbeyli, Güneysınır, Meram, Hüyük, Seydişehir, Hadim, Beyşehir, Akören, Ahırlı, Yalınhüyük, Derebucak, Bozkır, Selçuklu, Ilgın, Derbent, Doğanhisar, Yunak, Çayırbağı, Karadiğın, Akşehir, Tuzlukçu, Çumra, Kadınhanı ve Taşkent ilçeleri tek başlarına ele alındığında, Hadim %100 Güneysınır %93.3, Meram+Hatıp %90, Hüyük %80, Seydişehir %94.6, Cihanbeyli %85.7, Beyşehir %100, Akören %66.6, Ahırlı %100, Yalınhüyük %100, Derebucak %100, Bozkır %82.3, Selçuklu %66.6, Ilgın %80, Derbent %75, Doğanhisar %62.5, Yunak %100, Çayırbağı %66.6, Karadiğın %100, Akşehir %33.3, Tuzlukçu % 85.7, Çumra%75, Kadınhanı %33.3, Taşkent %93.3 oranında bulaşık olduğu ve Konya il geneli ise %90,61 oranında yaygınlık oranı tesbit edilmiştir.

Konya ilinde bulunan bağ alanları genellikle *Agrobacterium vitis* ile bulaşık durumdadır. Bu nedenle çok fazla zaman kaybı olmadan *Agrobacterium vitis* ile mücadele yada korunma yollarının geliştirilmesi ve daha fazla alanlara yayılmasının engellenmesi gerekmektedir.

Konya ilinde belirli anaçlar üzerinde ticari anlamda yetiştiriciliği yapılan çok sayıda üzüm çeşidi bulunmaktadır. Bu çeşit ve anaçlardan bazılarının, *Agrobacterium vitis*' e karşı farklı reaksiyonlar gösterdiği; kiminin hastalıktan çok etkilendiği, kiminin daha az etkilendiği bazılarının ise hiç etkilenmediği belirlenmiştir. Dolayısıyla bu hastalıktan etkilenmeyen veya en az etkilenen çeşit/anaç kombinasyonlarının üreticiye önerilmesi hastalıktan korunmada etkili olacaktır. Ayrıca hassas olarak belirlenen çeşit ve anaçların yetiştirildiği ilçeler ve köylerde bulaşmalara karşı dikkatli olunması da faydalı bir yaklaşım olacaktır.

Çalışmada etmenin urlardan izolasyonun çok kolay olduğu ve yarı seçici besi yeri olan RS' in yanı sıra PDA' nın *Agrobacterium vitis* kolonilerinin ayırımında rahatlıkla kullanılabileceği, ayçiçeği ve domates bitkilerinin gerek bitki gelişimi ve gerekse ur gelişimi göstermesi bakımından patojenisite testlerinde çok pratik olduğu belirlenmiştir.

Hastalıklar bitkisel ürünlerin verim ve kaliteleri üzerinde büyük kayıplara neden olmakta ve bu kayıplar depolama süresince devam etmektedir. Zamanın öngördüğü tarımsal metodlarla daha fazla ürün elde etme çabası gösterilirken, bunların hastalık ve zararlılarından oluşan kayıplarının da daha düşük seviyede tutulması amaçlanmaktadır (Toros ve Maden 1991). Bitki hastalıklarının oluşturduğu kayıplar bitki, ürün, patojen, bölge, çevre ve kontrol yöntemlerine bağlı olarak değişiklik göstermekte ve uygulanan kontrol yöntemleri kültürel, kimyasal ve biyolojik mücadele ve dayanıklı bitki kullanımı olarak üzere 4 kısımda toplanmaktadır (Bora ve Özaktan 1998; Döken ve ark., 2000).

Asmaların taç ve dallarında urlara sebep olan *A. vitis*'ten korunmada temiz çelik ya da anaç kullanımının yeterli olmadığı da bir gerçektir. Çünkü bakteri, hastalıklı asma artıklarında ve hatta diğer bitki artıklarında uzun yıllar canlılığını koruduğu bu zamana kadar ki kayıtlar içerisinde yer almaktadır. Buna karşın bugüne kadar özellikle asma artığı olmayan topraktan bakteriyi izole etmek pek mümkün olmamıştır (Burr ve ark., 1987; Burr ve ark., 1995). Bu durum, temiz çoğaltma materyali kullanılarak daha önceden bağ tesis edilmemiş bir alana yeni bağ tesisinde en azından korunma tedbiri sağlanması bakımından sevindirici bir durumdur.

Hastalıklarla mücadele yöntemleri 5 ana başlık halinde toplanabilmektedir ki bunlar yasal (kanunsal), kültürel, fiziksel, biyolojik, kimyasal mücadele teknikleridir. Erken tahmin ve uyarı çalışmaları ise mücadeleye başlama aşamasında büyük önem taşımaktadır.

Asma bakteriyel hastalıklarıyla mücadele için uygulanan ve önerilen yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

Ülkemiz karantina listelerinde yer alan asma bakteriyel hastalık etmenlerinin bitkisel üretim materyali ile ülkeye girişleri yasaklanmıştır. Ayrıca fidanlarda kök kanseri standardı sıfır (0) olduğundan, böyle fidanlıklardan fidan dağıtımı yapılmaması, şüpheli fidanlıklardan köklü fidan ya da aşı kalemi alınmaması için gerekli yasal önlemler alınarak bu durum kanun ve yönetmeliklerle bildirilmiştir (Burr ve ark., 1989; Toros ve ark., 1999).

Kültürel faaliyetler birinci derecede esas hastalık kaynaklarını azaltmayı ve de ortadan kaldırmayı ayrıca da bitki dayanıklılığını arttırmayı amaçlamaktadır. Bu yöntem, diğer metotlar ile bir arada ele alındığında daha etkili olabilmektedir. Kültürel yöntemlerle elde edilenler, özellikle kimyasal mücadele yönteminde görüldüğü gibi ani ve doğrudan etki göstermezler. Ancak daha düşük harcama gerektiren pratik işlemler olması nedeniyle uygulanmakta ve hastalıklarla mücadelede diğer yöntemlere destek olmaktadır.

Asma bakteriyel hastalıkları ile mücadelede en etkili önlem, yeni bağların bu etmenden ari fidan üretim materyali kullanılarak üretilmiş sağlıklı fidanlarla kurulmasıdır. Eğer bu nitelikte materyal mevcut değilse, fidan üretim materyali en iyi gelişen ve en sağlıklı görünümlü omcalar dan alınmalıdır. Hastalıktan korunmak amacıyla asmanın gövde ve dallarının yaralanmamasına dikkat edilmelidir ve kuruyan enfekteli bitkiler uzaklaştırılıp yok edilmelidir.

Gereğinden fazla azot gübrelemesi yerine soğuğa karşı dayanıklılığı da sağlayan potasyum uygulamaları yapılmalıdır. Toprağa fazla çiftlik gübresi vermek yerine kompoze gübre verilmelidir. Don zararı riski olan yerlerde, geç sonbaharda bitkinin kökleri toprakla kapatılmalı ve daha sonra yan köklerin oluşmasını önlemek için ilkbaharda bu toprakların geri kaldırılması gereklidir. Yeni kurulan bahçeler için nemden don olan alanlarda ağır topraklardan ve kuzeye bakan taraflardan kaçınılmalı ve soğuğa ve ur gelişimine karşı dayanıklı çeşitler ekilmelidir.

*Agrobacterium vitis* ile mücadelede temiz topraklara temiz üretim materyalinin ekimi ile ilk adım olmalıdır. Ayrıca fidanlık veya meyve bahçesi plantasyonu kurulurken ağır ve nemli topraklardan kaçınılmalı, derine dikim yapılmamalıdır ve eğer tesis kurulmuşsa drenaj kanalları açılmalıdır. Fidanlık kurulurken önce fidanlık toprağının bu bakteri ile bulaşık olup olmadığının kontrol edilmesi gerekmektedir. Bunun için ilkbaharda iyi işlenmiş toprağa 1-2 yaşında kökleri traş edilmiş ve temiz asma çubukları dikilmeli, sonbaharda asma çubukları sökülerek köklerde ur olup olmadığı kontrol edilerek çubuklar bulaşık çıkarsa bu topraklarda fidancılık yapılmamalıdır. *Agrobacterium vitis*'siz bağ üretiminin tek



yolu *in vitro*' da sürgün ucu aşılama tekniğinin kullanımı ile olabilmektedir (Burr ve ark., 1988).

Mümkün olduğunca *Agrobacterium* ve *Xylophilus* etmenlerine daha tolerant anaçlar seçilmeli (Goodman ve ark., 1993) kökler şiddetli böcek ve nematod saldırısından korunmalı budama aletleri bir ağaçtan diğerine geçerken mutlaka dezenfekte edilmeli ve budama esnasında mümkün olduğunca az yara açılmalıdır.

Sulamada kullanılan suyun mümkünse kuyu suyu olmasına dikkat edilmelidir. Aşıda anaç kalem uyumuna dikkat edilmeli, yara yerinden bakteri girişini engellemek için aşı yerleri aşı macunu ile kapatılmalıdır.

Dormant dönemdeki aşı kalemlerinin 50°C sıcak su banyosunda 30 dakika bekletilmesi *Agrobacterium vitis*' in büyük ölçüde eliminasyonunu sağlamaktadır (Burr ve ark., 1989). Gözler 56°C sıcaklık uygulamasına kadar dayanmışlardır (Wapple, 1997). Ancak sıcak su uygulamasıyla patojenin tamamen yok edilmesi mümkün değildir. Ayrıca dormant durumdaki fidanların, kökte açılan yaraların iyileşmesi ve *Agrobacterium vitis*' e karşı duyarlılıklarının azalması için 23–24 °C'de 10–14 gün bekletilmesiyle olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

*Agrobacterium vitis* ile bulaşık bağlarda hasat sonrasında, ağustos-eylül aylarında, önce tümörler bağ bıçağı ile sağlam dokuya kadar derinleşerek çıkarılıp ve temizlenir. Yara yerlerine %5'lik göztaşı eriyiği sürülür ve sonra da bitkisel katranla veya aşı macunu ile yara yeri kapatılmaktadır. Eğer urlar bitkinin büyük bir kısmını kaplamışsa hastalıklı bitkiler sökülerek üretim alanından uzaklaştırılmalıdır. Bu sökülen bitkiler bulaşmayı önlemek amacıyla mutlaka imha edilmelidir.

*Agrobacterium tumefaciens* mücadelesinde koruyucu olarak kullanılan *Agrobacterium rhizogenes* K84 izolatu, *Agrobacterium vitis*' e etkisizdir (Burr ve ark., 1998; Cooksey, 1982; Moore, 1979; Shim, 1987; Weller, 1988). Güney Afrika' dan izole edilmiş olan ve ur oluşturmeyen *Agrobacterium vitis* F2/5 kodlu izolatından başarılı sonuçlar alınmıştır (Staphorst ve ark., 1985). F2/5, *in vitro* da birçok ur

oluşturan *Agrobacterium vitis* izolatının büyümesini inhibe eden bir antibiyotik üretmektedir. Bunun yanında antibiyotik üretmeyen mutant F2/5 izolatı bağ urunun kontrolünde mutant olmayanlar kadar etkili olduğu bulunmuştur (Burr ve ark., 1997; Glick, 1997; Kerr, 1977). Biyolojik mücadelede *Agrobacterium rhizogenes*'in K84 izolatı birçok konukçuda kök boğazı uruna karşı etkilidir, fakat etkili olmadığı bazı izolatlar da bulunmaktadır. Zamanlaması çok önemli olan asmada biyolojik mücadele için Htay ve Kerr (1974), tohum ve kök uygulamasının en iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. *Agrobacterium rhizogenes*'in K84 izolatından genetik mühendisliği ile K1026 izolatı geliştirilmiştir. K1026 izolatı K84 ile aynı başarılı etkilere sahiptir (Ryder ve Jones, 1991).

Asma bakteriyel etmenlerinin, aşılama, budama vb. uygulamalar sırasında yayılmasını önlemek amacıyla, kullanılan aletler sodyum hipoklorit (500 mg\lt ) çözeltisine daldırılmalı ve bu şekilde dezenfekte edilen aletler, 5 mg\lt gibi çok seyreltik klor çözeltisi ile durulanmalıdır. Bağlarda kök kanserine karşı ilaçlı mücadele yazın ağustos ve eylül aylarında yapılır. Bakırlı preparatlar erken dönemde ve sezon sonunda uygulanabilmektedir.

Kış aylarında %5 bakır sülfat veya DNOC+bordo bulamacı karışımıyla gövde ve dallara uygulama yapılabilir ( Faivre-A miot, 1984). Toprak kökenli bakteriyel etmenlerle bulaşık olan asmanın söküldüğü yerin taç izdüşümünde 30–40 cm derinlikte tecrit çukuru açılmalı ve içerisi sönmemiş kireçle doldurulmalıdır. Bulaşıklığın görülmediği yerlerde ise koruyucu önlem olarak budama, don ve dolu yaralarından olabilecek bulaşmaları önlemek için bu gibi olaylardan hemen sonra bağlar %3'lük bordo bulamacı ile ilaçlanmalıdır

## 8. KAYNAKLAR

- AĞAOĞLU, Y. S., 1986. Bağcılık. Türkiye İş Bankası Genel Müdürlük, Halkla İlişkiler Müdürlüğü Yayınları, Ankara, s 1-23.
- AĞAOĞLU S, ÇELİK H, ÇELİK M, FİDAN Y, GÜLPEN Y, GÜNAY A, HALLORAN N, KÖKSAL Ý, YANMAZ R.,1997. *Genel Bahçe Bitkileri*. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Eğitim Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları No: 4, Ankara.
- ALEXANDROVA, M., BAZZI, C., HOLST, O., 2000. Protective effect of bacterial lipopolisaccharides in the grapevine-*Agrobacterium vitis* interaction. *Vitis*, 39, 67-70.
- ALLEWELDT, G. And Passingham, P.V.1988. Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetic*, 75; 669-673.
- ANDERSON, A. R., MOORE, L. W., 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 69, 320-323.
- ANONİM, 2006a. [http// www.fao.org](http://www.fao.org)
- ANONİM, 2006b. [http// www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr)
- ANONİM, 2007a. [http// www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr)
- ANONİM, 2007b. [http// www.fao.org](http://www.fao.org)
- ARGUN, N., 2001. Orta Anadolu bağlarında taç uru' na neden olan *Agrobacterium vitis*'in bölgesel dağılımı ve bazı biyolojik özellikleri üzerine araştırmalar. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 84s.
- ARGUN, N., MOMOL, M. T., MADEN, S., MOMOL, E. A., REID, C. L., ÇELİK, H., BURR, T. J., 2002. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in the Central Anatolia region. *Plant Disease*, 86, 162-166.
- BAZZI, C., ALEXANDROVA, M., STEFANI, E., ANACLERIO, F., BURR, T. J., 1999. Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic agrobacteria. *Vitis*, 38, 31-35.

- BENLİOĞLU, K., ÖZAKMAN, M., 1998. Bağ üretim materyalinde kök uru etmeni *Agrobacterium tumefaciens*'in saptanması. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22, 167-174.
- BISHOP, A. L., KATZ, B. H., BURR, T. J., 1988. Infection of grapevines by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population Dynamics in host and nonhost rhizospheres. Phytopathology, 78, 945-948.
- BISHOP, A. L., BURR, T. J., MITTAK, V. L., KATZ, B. H., 1989. A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and it utilization for indexing grapevine propagation material. Phytopathology, 79, 995- 998.
- BORA, T., ÖZAKTAN, H., 1998. Bitki hastalıkları ile biyolojik savaş. Prizma Matbaası, İzmir. 205s.
- BRADBURY, A. 1986 Rotenone and Trout Stocking. N.p: Washington Department of Game, fisheries management division.
- BRISBANE, P. G., KERR, A., 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Applied Bacteriology, 54, 425-431.
- BRISSET, M. N., PALENZUELA, P. R., BURR, T. J. AND COLLMER, A. 1991. Attachment, chemotaxis, and multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 and biovar 3 on grapevine and pea. Applied and Environmental Microbiology, 57 (11); 3178-3182.
- BURR, T. J., BAZZI, C., SÜLE, S., OTTEN, L., 1998. Crown gall of grape, biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. Plant Disease, 82, 1288-1297.
- BURR, T. J., KATZ, B. H., 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. Phytopathology, 73, 163-165.
- BURR, T. J., KATZ, B. H., 1984. Grapevine cuttings as potential of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Disease, 68, 976-978.
- BURR, T. J., KATZ, B. H., BISHOP, A. L., 1987. Population of *Agrobacterium tumefaciens* in vineyard and nonvineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. Plant Disease, 71, 617-620.

- BURR, T. J., OTTEN, L., 1999. Crown gall of grape: Biology and disease management. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 53-80.
- BURR, T. J., REID, C. L., 1994. Biological control of grape crown gall with nontumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 213- 219.
- BURR, T.J., REIN, C.L., ADAMS, C.E., MOMOL, E.A., 1995a. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia*. *Plant Disease*, 79, 102-107.
- BURR, T. J., REID, C. L., TAGLIATI, BAZZI, C., SÜLE, S., 1997. Biological control of grape crown gall by strain f2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment site on grape cells. *Phytopathology*, 87, 706-711.
- BURR, T. J., REID, C. L., YOSHIMURA, M., MOMOL, E. A., BAZZI, C., 1995b. Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. *Plant Disease*, 79, 677-682.
- CANFIELD, M. L., MOORE, L. W., 1991. Isolation and characterization of opineutilizing strains of *Agrobacterium tumefaciens* and fluorescent strains of *Pseudomonas* spp. from rootstocks of *Malus*. *Phytopathology*, 81, 440- 443.
- CAVARA, F., 1897. Tubercolosi della vite. Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. *Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane*, 30, 483-487.
- COMPANT, S., REITER, B., SESSITSCH, A., NOWAK, J., CLEMENT C., BARKA, E. A., 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. By plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1685-1693.
- CONN, H.J., 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. *Journal of Bacteriology*, 44, 353-360.
- COOKSEY, D.A. and MOORE, L. W. 1982. Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology*, 72; 9919-921.
- CUBERO, J., LOPEZ, M. M., 2001. An efficient microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 757- 760.

- ÇELİK, H., AĞAOĞLU, Y.S., FİDAN, Y., MARASALI, B. VE SÖYLEMEZOĞLU, G. 1998. Genel Bağcılık. SUNFİDAN A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi: 1, 253 s. Ankara
- ÇELİK, H., MARASALI, B., SÖYLEMEZOĞLU, G., TANGOLAR, S., GÜNDÜZ, M., 2000. Bağcılıkta üretim hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi Bildirileri, Ankara, (Çilt 2), 645-678.
- DE BOER, S. H., SASSER, M., 1986. Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *E. carotovora* ssp. *atroceptica* on the basis of cellular fatty acid composition. Canadian Journal of Microbiology, 32, 796-800.
- DE BOER, S. H., WARD, L. J., 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroceptica* associated with potato tissue. Phytopathology, 85, 854-858.
- DE CLEENE, M. AND DELEY, J. 1976. The host range of crown gall. Bot. Rev. 42:389-460.
- DEMİR, G., ÜSTÜN, N., ALTIN, N., 2002. Bitki Sağlığı Araştırmaları Bitki Hastalıkları Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı Kararları Bornova/İZMİR 420-421
- DEQIN, M.A., MARTIN, F.Y., MILTON, P.G., EUGENE, W.N., 1987. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* Strains Isolated from Grapevine Tumors in China. Applied and Environmental Microbiology, 53, 1338-1343.
- DONG, L. C., SUN, C. W., THIES, K. L., LUTHE, D. S., GRAVES, C.H., JR., 1992. Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. Phytopathology, 82, 434-439.
- DÖKEN, M. T., DEMİRCİ E. Ve ZENGİN H., 2000. Fitopatoloji. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 729, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 314, Ders Kitapları Seri No: 66, S256.
- EASTWELL, K. C., WILLIS, L. G., CAVILEER, T. D., 1995. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. Plant Disease, 79, 822-827.
- FERREIRA, J.H.S., and VAN ZYL F.G.H., 1986. Susceptibility of grapevine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. S. Afr. J. Enol. Vitic. 7, 101-104.

- GLICK, B. R., BASHAN, Y., 1997. Genetic manipulation of plant growthpromoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*, 15, 353-378.
- GOODMAN, R. N., GRIMM, R. and FRANK, M. 1993. The influence of grape rootstocks on the crown gall infection process and on tumor development. *American J. Enol. Vitic.*, 44 (1); 22-26.
- GRALL, S., ROULLAND, C., GUILLAUME, J., Manceau, C., 2005. Bleeding Sap and Old Wood Are the Two Main Sources of Contamination of Merging Organs of Vine Plants by *Xylophilus ampelinus*, the Causal Agent of Bacterial Necrosis. *Applied and Environmental Microbiology*.s 8292–8300
- HAAS, J. H., MOORE, L. W., REAM, W., MANULIS, S., 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2879-2884.
- JARVIS, B. D. W., SIVAKUMARAN, S., TIGHE, S. W., GILLIS, M., 1996. Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. *Plant and Soil*, 184, 143-158.
- JOHRI, J.K., SURANGE, S., NARULA, C. S., 1999. Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39, 89-93.
- JONES, D. L., DARRAH, P. R., 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil*, 166, 247- 257.
- KADO, C.I., HESKETT, M.G., 1970. Selective media from isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60, 969-976.
- KARADENİZ, T. 2004. Şifalı Meyveler (Meyvelerle Beslenme ve Tedavi Şekilleri) Kitabı. KTÜ, Ordu Ziraat Fakültesi, Ordu.280 s.
- KAWAGUCHI, A. , SAWADA, H., NASU, H., KAJU, I., 2004. PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains s 54-59
- KAWAGUCHI, A., INOUE, K., NASU, H., 2005. Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *Journal of General Plant Pathology*, 71, 422-430.

- KERR, A. PANAGOPOULOS, C. G., 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathologische Zeitschrift*, 90, 172-179.
- KERSTERS, K. AND DE LEY, J. (1975) Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *Journal of General Microbiology* 87, 333-342.
- KHLAIF, H., 2003. Effect of soil solarization on total *Agrobacterium* spp. population, inoculated *Agrobacterium tumefaciens*, and on the development of crown gall. *Journal of Plant Pathology*, 85, 117-122.
- KING, E. O., WARD, M. K., RANEY, D. E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301-307.
- KLEMENT, Z., MAVRIDIS, A., RUDOLPH, K., VIDAVER, A., PEROMBELON, M. C. M., MOORE, L. W., 1990. Inoculation of plant tissue. *Methods in Phytopathology*, Akademiai Kiado, Budapest, 95-124.
- KLOPPER, J. W., LEONG, J., TEINTZE, M., SCHROTH, M. N., 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
- KNAUF, V. C., PANAGOPOULOS, C. G., NESTER, E. W., 1982. Genetic factors controlling the host range of *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, 72, 1545-1549.
- KNAUF, V. C., PANAGOPOULOS, C. G., NESTER, E. W., 1983. Comparison of Ti plasmids from three different biotypes of *Agrobacterium* isolated from grapevine. *Journal of Bacteriology*, 153, 1535-1542.
- KOVACS, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (London)*, 178, 703.
- KRISHNAMURTHY, K., GNANAMARICKAM, S. S., 1998. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf-14: evaluation of a marker gene and formulations. *Biological Control*, 13, 158-165.
- KULKARNI, S., NAUTIYAL, C. S., 2000. Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant *Rhizobium* sp. NBRI330 nodulating *Prosopis juliflora*. *Current Microbiology*, 40, 221-226.



- KÜSEK, M., 2007. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Ura Neden Olan *Agrobacterium vitis*'in Tanınması ve mücadele olanaklarının araştırılması. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 81s.
- LEACH, J. E., SHERWOOD, J., FULTON, R. W., SEQUEIRA, L., 1983. Comparison of soluble proteins associated with disease resistance induced by bacterial lipopolysaccharide and viral necrosis. *Physiological Plant Pathology*, 23, 377-385.
- LEHOCZKY, J., 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the Vessels of the Grapevine, after Natural Infection. *Journal of Phytopathology*, 63, 239-246.
- LELLIOTT, R. A., STEAD, D. E., 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications, 216s.
- LIANG, Y., DI, Y., ZHAO, J., MA, D., 1990. A biotype 3 strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits crown gall formation on grapevine. *Acta Microbiologica Sinica*, 30, 165-171.
- MCGUIRE, R.G., PALENZUELA, P.R., COLLMER, A. and BURR, T. J. 1991. Polygalacturonase production by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *applied and environmental microbiology*, 57 (3); 660-664
- MOMOL, M.T., NORELLI, J. L., PICCIONI, D.E., MOMOL, E.A., GUSTAFSON, H.L., CUMMINS, J.N., ALDWINCKLE, H.S., 1998. Internal movement of *Erwinia amylovora* through symptomless apple scion tissues into the rootstock. *Plant Disease* 82 (6): 646-650.
- MOORE, L. W., BOUZAR, H., BURR, T., 2001. Gram-negative bacteria, *Agrobacterium*. (N. W. SCHAAD, J. B. JONES, W. CHUN editor). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, Third Edition, APS Press. ST. Paul, Minnesota, S 17-35.
- MOORE, L. W., WARREN, G., 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Annual Review of Phytopathology*, 17, 163-179.
- NADOLNY, L., SEQUEIRA, L., 1980. Increases in peroxidase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco. *Physiological Plant Pathology*, 16, 1-8.

- OPHEL, K., KERR, A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. International Journal of Systematic Bacteriology, 40, 236-241.
- ORAMAN, M. N., 1965. Yeni Bağcılık A.Ü. Ziraat Fak. Yay. No:253. s.347.
- PANAGOPOULOS, E.F., PSALLIDAS, P.G., 1973. Characteristics of Grek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E. F. Smith and Townsend) Conn. Journal of Applied Bacteriology, 36, 233-240.
- PONSONNET, C., NESME, X., 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Archives of Microbiology, 161, 300-309.
- PU, X.A. and GOODMAN, R, N. 1993. Effects of fumigation and biological control on infection of indexed crown gall free grape plants. American J, Enol. Vitic., 44 (3); 241 -248.
- RIDE, M., RIDE, S., PETIT, A., BOLLET, C.,DESSAUX, Y., GARDAN, L., 2000. Characterization of plasmid borne and chromosome encoded trait of *Agrobacterium* biovar 1, 2 and 3 strains from France. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1818-1825.
- ROY. M.A., AND SASSER, M.A medium selective *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 (Abstr) Phytopatpology 73: 810. 1983.
- SACHADYN, P., KUR, J., 1997. A new PCR system for *Agrobacterium tumefaciens* detection based on amplification of T-DNA fragment. Acta Microbiologica, 46, 145-156.
- SALOMONE, J. Y., CROUZET, P., DE RUFFRAY, P., OTTEN, L., 1996. Characterization and distribution of tartarate utilization genes in the grapevine pathogen *Agrobacterium vitis*. Molacular Plant-Microbe Interaction, 9, 401-408.
- SAİKİ, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLİS, K.B., HORN, G.T., ERLİCH, H.A., ARNHEİM, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 1350-1354

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning a laboratory manual, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SAWADA, H., IEKI, H., MATSUDA, I., 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Applied and Environmental Microbiology, 61, 828-831.
- SAWADA, TAKIKAWA, H., H., IEKI, 1992. Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*. Annals of the Phthopathological Society of Japan, 58, 46-51.
- SCHAAD, N. W. 1988. Initial identification of common genera. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. ed. By N. W. Schaad, pp 1-15, American Phytopath. Soc., St. Paul., MN, USA.
- SCHAAD, N.W., 2001. Identification Schemes (Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria). Third Edition, The American Phytopathological Soc., St. Paul, Minesota, 1-16 pp.
- SCHROTH, M. N., McCHAIN, A. H., FOOTT, J. H., HUISMAN, O. C., 1988. Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. Plant Disease, 72, 241-246.
- SCHROTH, M. N., THOMPSON, J. P., HILDEBRAND, D. C., 1965. Isolation of *Agrobacterium tumecaciens*- *A. radiobacter* group from soil. Phytopathology, 55, 645-647.
- SHIM, J. S., FARRAND, S. K., KERR, A. 1987. Biological control of crown gall: construction and testing of new biocontrol agents. Phytopathology, 77, 463-466.
- SIDDIQUI, I. A., SHAUKAT, S. S., 2002. Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. Journal of Phytopathology, 150, 469-473.
- SMITH, E. F., TOWNSEND, C. O., 1907. A plant tumor of bacterial origin. Science, 25, 671-673.
- STAPHORST, J. L., VAN ZYL, F. G. H., STRIJDOM, W. B. and Groenewold, Z. E. 1985. Agrocin-producing Pathogenic and nonpathogenic biotype-3 strains of

- Agrobacterium tumefaciens* activite against biotype-3 pathogens. Current Microbiology, 12; 45-52.
- STEFANI, E., RUDOLPH, K., 1989. Induced resistance in bean leaves pretreated with extracellular polysaccharides from phytopathogenic bacteria. Journal of Phytopathology, 124, 189-199.
- STOVER, E. W., SWARTZ, H. J. and BURR, T.J. 1997. Crown gall formation in a diverse Collection of Vitis Genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. American j. enol. Vitic., 48; 26-32.
- SÜLE, S., BURR, T. J., 1998. The effect of resistance of rootstocks to crown gall (*Agrobacterium* spp.) on the susceptibility of scions in grape vine cultivars. Plant Pathology, 47, 84-88.
- SZEGEDI, E., KORBULY, J. and OTTEN, L., 1989. Types of resistance of grapevine varieties to isolates of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. physiological and molecular Plant pathology. 35;35- 43.
- SZEGEDI, E., CZAKO, M., OTTEN, L. And KONCZ, C.S., 1988. Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. Physiological and molecular Plant pathology, 32; 237-247.
- SZEGEDI, E., 2003. Opines in naturally infected grapevine crown gall tumors. Vitis, 42, 39-41.
- SZEGEDI, E., BOTTKA, S., MIKULAS, J., OTTEN, L., SULE, S., 2005. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. Vitis, 44, 49-54.
- TAN, B.S., YABUKI, J., MATSUMOTO, S., 2003. PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan. Journal of General Plant Pathology, 69, 258-266.
- TARBAH, F. A., GOODMAN, R. N., 1986. Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system. Plant Disease, 70, 566-568.
- TIGHE, S. W., LAJUDIE, P. DE, DIPIETRO, K., LINDSTROM, K., NICK, G., JARVIS, B. D. W., 2000. Analysis of cellular fatty acid and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 787-801.
- TOROS, S. ve MADEN, S., 1991. Tarımsal Savaşım Yöntem Ve İlaçları. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları: 1222, Ders Kitabı: 352. Ankara, S 332.
- WANG, H. M., WANG H. X., NG, T. B., LI, J. Y., 2003. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis* strain E26 with activity against *A. tumefaciens*. Plant Pathology, 52, 134-139.
- WELLER, D. M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26, 379- 407.
- WILLEMS, A., COLLINS, M. D., 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 43, 305-313.
- XIANYING, C., WANGNIAN, X., 1986. A strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits growth and gall formation by biotype III strains of *Agrobacterium tumefaciens* from grapevine. Acta Microbiologica Sinica, 26, 193-199.
- YAN, Z., REDDY, M. S., RYU, CHOONG-MIN, MCLNROY, R. J., WILSON, M., KLOEPPER, J. P., 2002. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting Rhizobacteria. Phytopathology, 92, 1329-1333.
- YOUNG, J. M., KUYKENDALL, L. D., MARTINEZ-ROMERO, E., KERR, A., SAWADA, H., 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *A. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 89-103.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kırşehir ilinin Kaman ilçesinde doğdum. Yeni Hayat İlköğretim okulunda ilkokul eğitimimi aldıktan sonra ortaokul eğitimimi Kaman Merkez İlköğretim okulunda tamamladım. Lise eğitimimi Kaman Lisesinde bitirdim. 2002 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Bölümünü kazandım. 2005 Yılında Bitki Koruma Bölümünü seçerek 2006 senesinde Ziraat Mühendisi olarak mezun oldum. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım.