



**TOKAT İLİ BAĞLARINDA ASMA UR  
HASTALIĞININ (*Agrobacterium* spp.)  
BELİRLENMESİ VE TANILANMASI**

**Hacı DURAK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı**

**Prof. Dr. Rüstem CANGİ**

**2016**

**Her hakkı saklıdır**

T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

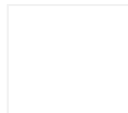
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TOKAT İLİ BAĞLARINDA ASMA UR HASTALIĞININ (*Agrobacterium* spp.)  
BELİRLENMESİ VE TANILANMASI**

Hacı DURAK

TOKAT  
2016

Her hakkı saklıdır




Prof. Dr. Rüstem CANGİ ve Prof. Dr. Yusuf YANAR danışmanlığında, Hacı DURAK tarafından hazırlanan bu çalışma 13 Mayıs 2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Rüstem CANGİ

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Sabriye BELGÜZAR

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bülent KÖSE

İmza: 

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**



Prof. Dr. Mehmet Ali SAKİN  
Enstitü Müdürü

14.06.2016



**Bu tez çalışması;**

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2015/80 nolu proje ile desteklenmiştir.**



## TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Hacı DURAK**

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## TOKAT İLİ BAĞLARINDA ASMA UR HASTALIĞININ (*Agrobacterium* spp.) BELİRLENMESİ VE TANILANMASI

Hacı DURAK

Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Rüstem CANGİ

Bu çalışma ile, Tokat ili bağ alanlarında asma ur hastalığının belirlenmesi ve hastalık etmeni *Agrobacterium* spp.'nin tanılanması amaçlanmıştır. 2015 yılında Tokat ili Merkez, Erbaa, Zile, Niksar, Pazar ve Turhal ilçelerinde bulunan bağ alanları incelenmiş ve hastalıklı asmalardan ur örnekleri alınmıştır. 6 ilçede, 49 köydeki 238 bağda tarama yapılmış olup, iki dönemde toplam 297 adet ur örneği alınmıştır. Hastalıklı omcalardaki urlu dokulardan yapılan izolasyonlar sonucu toplam 150 adet bakteri elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar klasik tanılama testleri (Gram Reaksiyon, Oksidaz, PDA+CaCO<sub>3</sub> Besi Yerinde Asit Temizleme, %2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme, Demir Amonyum Sitrata Kullanımı) ve tanıyı destekleyici PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi yapılmıştır. Yapılan testler sonucu, 150 izolattan 149 tanesi gram negatif, 141 tanesi oksidaz pozitif, 55 tanesi PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerinde pozitif, 148 tanesi %2 NaCl içeren besi yerinde pozitif, 93 tanesi demir amonyum sitrat kullanımı testinde pozitif sonuç vermiştir. 120 adet izolat ile yapılan PCR çalışmasında ise, 43 izolat 224 bp büyüklüğünde bant oluşturarak *Agrobacterium* spp. olarak tanılanmıştır.

2016, 50 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Vitis vinifera*, Asma ur hastalığı, *Agrobacterium* spp., tanı, Narince üzüm çeşidi

## ABSTRACT

Ms Thesis

### IDENTIFICATION AND DETERMINATION GRAPE CROWN GALL DISEASE (*Agrobacterium* spp.) IN VINEYARD OF TOKAT PROVINCE

Hacı DURAK

Gaziosmanpaşa University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Rüstem CANGİ

Determination of grape crown gall disease in vineyard of Tokat province and identification of disease agent *Agrobacterium* spp. were aimed by this study. In 2015, vineyards in Central, Erbaa, Zile, Niksar, Pazar and Turhal districts of Tokat were surveyed and infected plant samples with crown gall were collected. Total of 238 vineyards in 49 villages in the 6 districts were surveyed and in two survey periods 297 gall samples were collected. 150 bacterial isolates were isolated from the galls samples. Classic bacteriological techniques (Gram reaction, oxidase, acid purification in PDA+CaCO<sub>3</sub> medium, growth in medium including %2 NaCl, use of ferric ammonium citrate) and PCR (Polymerase Chain Reaction) were applied to isolates. Based on the results, 149 of 150 isolates were Gram negative, 141 isolates were oxidase positive, 55 isolates were positive in PDA+CaCO<sub>3</sub> medium, 148 isolates were positive in medium including %2 NaCl, 93 isolates were positive in use of ferric ammonium citrate. 43 of 120 isolates were identification as *Agrobacterium* spp. by 224 bp in PCR.

2016, 50 pages

**Keywords:** *Vitis vinifera*, grape crown gall disease, *Agrobacterium* spp., identification, Narince grape cultivar

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tezin her aşamasında bilgi, öneri, yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Rüstem CANGİ ve Prof. Dr. Yusuf YANAR başta olmak üzere, laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Sabriye BELGÜZAR ve Yrd. Doç. Dr. Şerife TOPKAYA'ya, Yrd. Doç. Dr. Adem YAĞCI, Ziraat Müh. Hale KARADENİZ ve Ziraat Müh. Muhsin AY'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, tüm hayatım boyunca attığım her adımda benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen ve çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi desteğini gördüğüm ve varlığından dolayı bana kendimi her zaman şanslı hissettiren değerli aileme teşekkür ederim.

**Hacı DURAK**

**2016**



## İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	Vi
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b> .....	Vii
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	7
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Survey çalışmaları .....	17
3.2.2. Asma ur hastalık etmeninin ( <i>Agrobacterium vitis</i> ) izolasyonu.....	18
3.2.3. Asma ur hastalık etmeninin ( <i>Agrobacterium spp.</i> ) tanılanması.....	19
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA</b> .....	23
4.1. Tokat İlinin Genel Özellikleri.....	23
4.2. Tokat İlinde Survey Yapılan Bağlara Ait Genel Özellikler.....	24
4.3. Örnek Alınan ve Survey Bağlarda Hastalığın Bulunma Oranı.....	27
4.4. Asma Ur Hastalık Etmeninin ( <i>Agrobacterium spp.</i> ) Tanınmasına Yönelik Bulgular .....	33
4.4.1. İzole edilen izolatlardan gram testi sonuçları.....	33
4.4.2. Oksidaz Testi.....	34
4.4.3. PDA+CaCO <sub>3</sub> besi yerinde asit temizleme.....	34
4.4.4. %2 NaCl içeren NGA besi yerinde gelişme.....	35
4.4.5. Demir Amonyum Sitrata kullanımı.....	36

4.4.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile <i>Agrobacterium</i> spp. izolatlarının tanılanması.....	36
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>43</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>48</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>50</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Asma taç uru ( <i>A. vitis</i> )'nun hastalık döngüsü .....	9
Şekil 2.2. Verim yaşındaki asmaların gövdelerinde, yenice asmalarda yatırma telinde genç sürgünde ve fidanların aşı bölgesinde taç uru hastalığının görünüşü	10
Şekil 4.1. Survey yapılan bağlarda asmalarda <i>Agrobacterium spp.</i> Zararı...	29-32
Şekil 4.2. Örneklerde gram testi uygulaması.....	33
Şekil 4.3. Örneklerde oksidaz testi uygulaması.....	34
Şekil 4.4. Örneklerde PDA testi uygulaması.....	35
Şekil 4.5. Örneklerde NGA testi uygulaması.....	35
Şekil 4.6. Örneklerde Demir Amonyum Sitrat testi uygulaması.....	36
Şekil 4.7. Örneklerde PCR testi uygulaması.....	42

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Tokat yöresi mevcut bağ alanları, gezilen köy ve örnek alınan köy sayısı sayısı ve bağlardan alınan numune sayısı .....	18
Çizelge 4.1. Tokat ili uzun yıllara (1950-2015) iklim verileri.....	23
Çizelge 4.2. Tokat ilinde survey yapılan bağlara ait genel bilgiler.....	24-26
Çizelge 4.3. Survey yapılan bölgelerdeki bağlarda hastalıklı asma oranı	27
Çizelge 4.4. Asmalardan izole edilen <i>Agrobacterium</i> izolatlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları.....	37-40

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ç.K.K.:	Çift kollu kordon
g:	gram
mg :	Miligram
ml :	Mililitre
mM :	Milimolarite
PDA :	Patates Dekstroz Agar besi yeri
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH :	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
sp:	tür
spp.:	türler
µg :	Mikrogram
µl :	Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Üzüm Dünya’da, 7 155 211 ha alanda, 77 181 122 ton üretim miktarı ile en fazla üretilen meyvelerin başında gelmektedir (FAO, 2015). Kültür asmasının (*Vitis vinifera* L.) anavatanları içerisinde yer alan Anadolu’da, bağcılığın geçmişi M.Ö. 3500 yıllarına kadar dayanmakta olup, Türkiye bağcılık tarımı açısından Dünya’da önemli ülkelerden birisidir. Türkiye 2015 yılı verilerine göre, Dünya’da 467 092 ha bağ alanı ile beşinci, üzüm üretim miktarı bakımından ise 3 650 000 ton ile altıncı sırada yer almaktadır (Anonim, 2016a).

Üzüm, ülkemizde üretilen 17.5 milyon tonluk meyve üretiminde, %22’lik payla ilk sırada yer almaktadır. Bu durum, halkımızın toplumsal yaşamı ve beslenmesinde bağcılığın önemini ortaya koymaktadır. Bağcılık konusunda çok köklü bir geçmiş ve tecrübeye rağmen, günümüzde sektörde bağ tesisinden üzümün pazarlanmasına kadar çözüm bekleyen birçok sorun bulunmaktadır. Birim alandan elde edilen verim ve kalite düşüklüğü bağcılık sektörünün temel sorunlardan birisidir. Filoksera ile bulaşık eski bağ alanları ve Çiftçi Kayıt Sistemi’nde kayıtlı bazı bağların bakımsızlık nedeniyle üretim dışı kalması, yeni tesis edilen bağlara dikilen fidanların kalitesi ile kültürel işlemlerin yeterince yapılmaması üzüm verim ve kalitesine etki eden en önemli unsurlardır.

Bağcılık sektöründe üretim, verim ve kaliteyi sürdürülebilir kılabilmek için, ticari değeri yüksek çeşitlerle, ismine doğru ve sağlıklı asma fidanları ile bağ tesisinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Ülkemiz bağcılığının en önemli sorunlarından biri asma fidanı üretiminde yaşanan problemlerdir. 2015 yılında ülkemizde 4 981 436 adet sertifikalı asma fidanı üretilmiştir (Anonim, 2016a). Bu miktar talep edilen fidan miktarını karşılamaktan uzak olması yanında, ülkemizde üzüm üretiminin temel materyali olan fidan üretimi sırasında genellikle kalite özellikleri belli olmayan, hastalık ve zararlılarla ilgili durumu dikkate alınmayan materyalin kullanılmasıdır. Mevcut standart çeşitlerimizde fidan üretiminde genellikle klonal materyaller kullanılmamakta, fidan üretiminde kullanılan bitkisel materyallerim ülkemiz sertifikasyon sisteminde saptanmış olan virüslerden ve *Agrobacterium vitis* yönünden genellikle ari olmaması,

farklı zamanlarda olgunlaşan ve farklı amaçlara yönelik yetiştiriciliği yapılan yeni üzüm çeşitlerinin geliştirilmesi çözüm bekleyen sorunlar olarak karşımızda durmaktadır.

Tübitak tarafından desteklenen 107G116 Kod'lu "Ülkemizde Yetiştiriciliği Yapılan Ekonomik Öneme Sahip Bazı Üzüm Çeşit ve Amerikan Asma Anaçları İle Klonlarının Virüsler ve *Agrobacterium vitis* Yönünden Arındırılması, Tanımlanması ve Yeni Üzüm Çeşitlerinin Geliştirilmesi" isimli proje 2012 yılında tamamlanmış olması, bu sorunların çözümüne yönelik önemli adımlardan birisidir. 2016 yılı itibari ile hala asma fidanı sektörü sağlıklı fidan üretimi açısından olması gereken noktadan çok uzaktadır.

Günümüzde bağcılığın gelişmesini tehdit eden hastalıklar arasında en önemlilerinden birisi de bağ uru hastalığıdır. Asmada ur oluşumu çok eskiden beri bilinmekle birlikte ilk kez 1897'de bir bakterinin (*Bacillus ampelopsarae*) ura neden olduğu bildirilmiştir (Cavara, 1897). Kerr ve Panagopoulos (1977) asmadan izole edilen tümörülenik bakterileri *A. tumefaciens* biovar 3 olarak sınıflandırmışlardır. Sonraki yıllarda Dünya'nın birçok yerinde araştırmacılar asmada biovar 3 izolatlarını belirlemişlerdir. Ophel ve Kerr (1990) yaptıkları taksonomik çalışmalar (biyokimyasal, monoklonal antibody ve DNA bağlanma seviyeleri) sonucunda biovar 3'ü *Agrobacterium vitis* olarak isimlendirmişlerdir. Günümüzde *A. vitis* asmada ur oluşturan en baskın tür olarak bilinmekle birlikte *A. tumefaciens* de nadiren asmalardan izole edilmektedir (Knauf ve ark., 1983; Salomone ve ark., 1996; Ride ve ark., 2000; Argun ve ark., 2002).

Bakteri asmalara yara yerlerinden girmektedir. 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 yaralar da 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).

Hastalık etmenlerine karşı etkili bir mücadele yönteminin olmamasından dolayı, iklim koşullarının hastalık gelişimi için uygun olduğu bölgelerde, önemli verim ve gelişme kayıplarına neden olmaktadır. Ayrıca yapılan bilinçsiz ve gereksiz ilaçlama çevreyi olduğu kadar insan sağlığına olumsuz yönde etkilemektedir (Çelik ve ark., 2000). Ayrıca, hastalığın yayılmasında bilinçsiz bir şekilde üretilen asma fidanları, budama döneminde üreticilerin sanitasyon kurallarına uymaması örnek verilebilir. Tarım Bakanlığı çıkardığı yönetmelik ve tebliğlerle *A. vitis* in yayılmaması için yoğun çaba sarf etmektedir.

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

Mersin, Gaziantep, Kahramanmaraş ve Hatay illerinde belirlenen ve asma uru hastalığına neden olan *Agrobacterium vitis* Opel and Kerr’in etkisi nedeniyle verim ve kalitede önemli düşüşler söz konusudur (Küsek, 2007).

Konya Hadim, Bozkır ve Güneysınır ilçelerinde birçok köy ve beldenin asıl geçim kaynağını bağ ürünlerinin oluşturduğu, tüm bağ alanların filoksera (*Dnaktulosphaera vitifoliae*) ve asma kanseri (*Agrobacterium vitis*) ile bulaşık olduğu bildirilmektedir (Eşitken ve ark., 2012).

Canik ve ark. (2011), Trakya, Ege, İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgelerini kapsayan toplam 12 ilde, 2009-2010 yıllarında yaptıkları arazi çalışmalarında 108 adet urlu örnek toplanmışlardır. Patojen *Rhizobium vitis* için seçici ortam kullanılarak izole etmişlerdir. Patojenisite testleri *Datura*, tütün ve ayçiçeği bitkileri üzerinde üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm izolatlar 3-ketolaktöz, L-tartarattan alkali, Dulcitol, Melezitöz, Arabitol ve Sukrozdan asit oluşumu, 37°C’de gelişme ve %2 NaCl’de gelişme testlerini içeren biyokimyasal karakterler bakımından incelemişlerdir. Ayrıca



tüm izolatların teşhisi *Rhizobium radiobacter*'e spesifik VirD2A/2C ve *Rhizobium vitis*'e spesifik PGF/PGR primerleri kullanılarak doğrulanmışlardır. Test edilen tüm örneklerin *R. vitis* ile enfekteli olduğu bulunmuş olup, *R. radiobacter*'e rastlanmamışlardır. Ayrıca *R. vitis* izolatları farklı opin tipleri yönünden spesifik primerleri ile incelemişler ve izolatlar arasında en yaygın opin tipi oktopin; en düşük olarak vitopin tipi opin olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde bağlarda *A. vitis*'in yayılma durumu, değişik yöntemlerle tanınması, mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi ve klonların hastalık yönünden arındırılması konusunda araştırmalar yapmışlardır.

Küsek (2007) tarafından Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde bulunan bağ alanlarında yapılan çalışmada, hastalıklı asma bitkilerindeki urlu dokulardan toplam 47 adet ur oluşturan patojen bakteri izole etmiştir. Klasik bakteriyolojik tanılama teknikleri, PCR, yağ asit analizi ve patojenite testlerine göre izole edilen tüm izolatlar *A. vitis* olarak tanınmıştır.

Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü öncülüğünde yürütülen “Ülkemizde Yetiştiriciliği Yapılan Ekonomik Öneme Sahip Bazı Üzüm Çeşit ve Amerikan Asma Anaçları ile Klonlarının Virüsler ve *Agrobacterium vitis* Yönünden Arındırılması, Tanımlanması ve Yeni Üzüm Çeşitlerinin Geliştirilmesi” isimli Tübitak projesinde, 46 üzüm çeşidi, 8 Amerikan asma anacı ile bunlara ait 109 klon üzerinde çalışılmıştır. Proje ile çalışma kapsamında seçilen klonlar Avrupa Birliği ülkelerinde ve ülkemiz sertifikasyon sisteminde belirlenmiş olan ve *A.vitis* yönünden arındırılmış ve temiz materyaller elde edilmiştir (Ünal, 2012). Fidan üreticileri Alt Birliğinin Adana ve Karacabey de Manisa Bağcılık Araş. Enstitüsünden temin ettiği bazı materyallerle 2016 yılında kurmuş olduğu damızlık tesisler bu konuda ümit verici gelişmelerdir.

Ülkemizin önemli bağcılık bölgelerinden biriside Tokat'tır. Tokat ilinde 6 218 hektarlık alandan yaklaşık 35 902 ton üzüm üretilmekte olup, bölgede yaklaşık 8 000-10 000 ton civarında salamuralık yaprak toplanmaktadır (Anonim, 2015).

Bölgede yaş üzüm; sofralık, şıralık (pekmez, köme, tarhana, sirke vb.) olarak ve alkollü içki üretiminde değerlendirilmektedir. Bölgede yapılan çalışmalarda 44 üzüm çeşidinin yetiştiği saptanmış olsa da, yoğun olarak yetiştirilen üzüm çeşidi Narince'dir. Bu üzüm çeşidinin yaprağının salamuralık kalitesinin yüksek olması ve yaprağa olan talebin artması ile ticari açıdan bağcılığın önemi bölgede her geçen gün artmaktadır (Cangi ve ark., 2005; Kılıç ve ark., 2007; Çelik ve ark., 2010). Salamuralık asma yaprağının son yıllarda bölgeye yaptığı ekonomik katkının yaklaşık 50-60 milyon TL ( 8-10 000 ton x 6-7 TL) civarında olduğu tahmin edilmektedir.

Bölgede bağlar 230 m ile 1100 m rakımları arasında yer almakta olup, bu durum iklimden kaynaklanabilecek zararlanmaların yaşanmasına ve hastalıkların yayılmasına neden olabilmektedir. Yine değişik kaynaklardan gelen aşılı asma fidanlar ile bağların tesisinin devam etmesi, üreticilerin hastalık/zararlı konusundaki yeteri düzeyde bilinçli olmaması yöre bağlarında pek çok hastalık ve zararlının etkili olmasına ve yayılmasına yol açmaktadır.

Ülkemizde üretilen aşılı asma fidanları içerisinde çeşit olarak Sultani Çekirdeksiz açık ara ile ilk sırada yer almakta olup, bunun bir kısmı K-7 klonundan üretilmektedir. 2010 yılı verilerine göre fidan üretiminde yalnızca %11'lik paya sahip olan şaraplık çeşitler arasında açık ara ilk sırada yer alan Narince (185 000), aynı zamanda tüm çeşitler içerisinde Aphonse Lavallee çeşidi ile dönüşümlü olarak ikinci sırada yer almaktadır (Çelik, 2012). Tokat ilinde 2014 yılından itibaren bölgede fidancılık sektöründe yaşanan gelişmeler ve değişik kaynaklardan sağlanan destekler bölgede bağcılığın hızlı bir şekilde gelişmesine imkan vermektedir. Ayrıca, salamuralık asma yaprağının getirisinin yüksek olması nedeniyle, eski bağlarda boş yerler doldurulurken, yeni bağ tesisi de hızlı bir şekilde artmaktadır. 2015 yılında bölgede yaklaşık 300 000 adet asma fidanı dikilirken, 2016 yılında bu rakamın 600 000 adete ulaşması beklenmektedir.

Bölgede yaygın olan çeşit Narince olup, Gaziosmanpaşa Üniversitesi ve Orta Karadeniz Geçit Kuşağı Araştırma Enstitüsü tarafından bu çeşitte yürütülen klon

seleksiyon çalışmasının yaklaşık 5 yıl sonra sonuçlandırılabilceği bildirilmektedir. Yoğun bir şekilde fidanı üretilen Narince çeşidinden kalemler, genellikle Tokat ilindeki üretici bağlarından temin edilmekte, bu kalemlerin özellikle *Agrobacterium spp.* açısından ne derece ari olduğu bilinmemektedir. Ayrıca, fidan üretim işletmelerinin termoterapi uygulayıp uygulamadıkları veya ne kadar etkili uygulandığı meçhüldür. Ayrıca ABD ve İtalya'da yapılan termoterapi çalışmalarında, 0 C<sup>0</sup> ve 30-60 dakikalık sıcak su uygulamalarının *A. vitis*'i büyük ölçüde azalttığı, ancak tamamen elimine etmediğini bildirmişlerdir (Burr ve ark., 1996). Tokat bölgesi iklim verileri incelendiğinde düşük sıcaklıkların sıkça yaşandığı, bu nedenle de bağların yaklaşık 10 yılda bir ciddi zarar gördüğü görülmektedir (Topçu ve ark., 2015). Bölgenin iklim koşulları bağlarda kanser hastalığının yayılmasına oldukça müsait olduğunu göstermektedir.

Son 20 yıldır Tokat bölgesi bağlarında *Agrobacterium spp.* hastalığı sıkça görülmekte olup, yaygınlığı ve bağ bölgelerine göre durumun ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bölge tarımında lokomotif dallarından birisi olan bağcılığın verim ve kalite düzeyinin düşmemesi, hastalığın yayılımına yönelik önlem ve mücadelesi açısından bir survey çalışması ile durum tespiti önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, 2015 yılında Tokat ilinde Merkez, Pazar, Turhal, Zile, Niksar ve Erbaa ilçelerindeki bağ alanlarında survey yapılarak asma ur hastalığının belirlenmesi ve hasta bitki örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik, biyokimyasal testleri ve moleküler (PCR) analizler ile tanısının yapılması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

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 (*V. vinifera* sp. *sativa*) ait olmak üzere çok zengin bir asma gen potansiyeline sahiptir. Ülkemizin bütün bölgelerinde bağcılık yapılmakta ve elde edilen ürünler sofralık, kurutulmuş ve şıralık olarak değerlendirilmektedir (Ağaoğlu ve ark., 1997; Çelik ve ark., 1998).

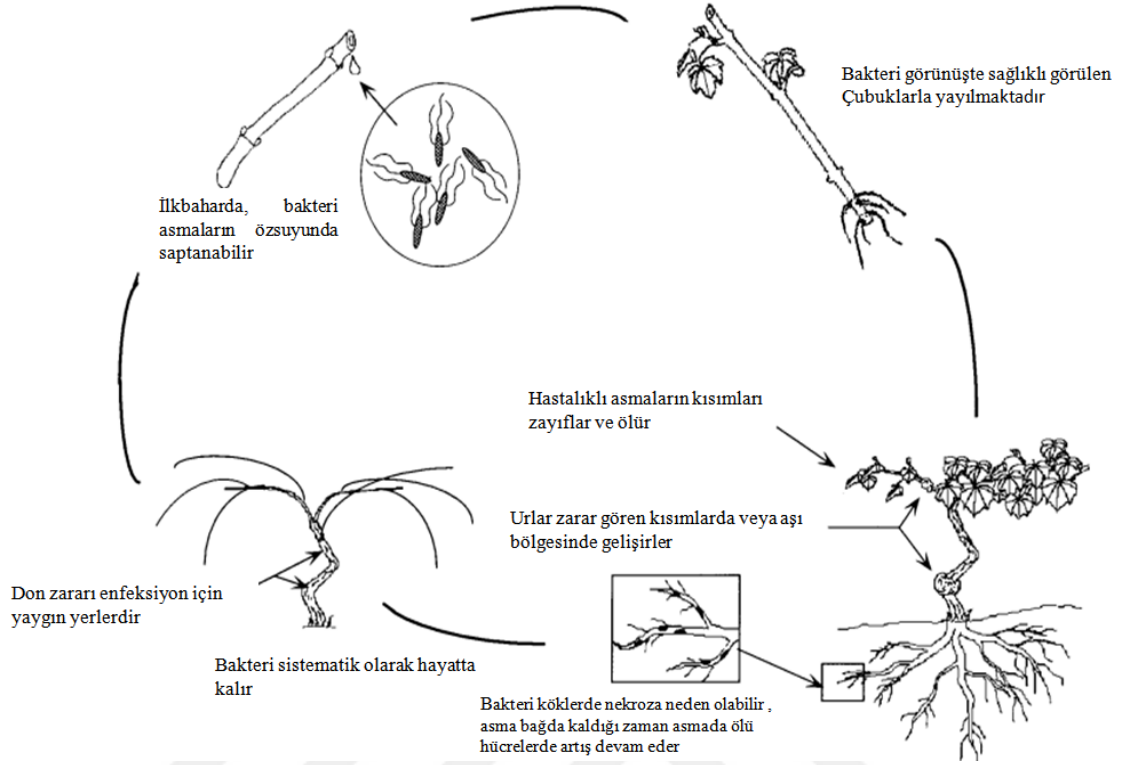
Ülkemizin en önemli tarım kollarından birisi olan bağcılık, hastalık ve zararlılardan kaynaklanan verim ve kalite kayıplarını eskiden beri yaşamaktadır. Ticari anlamda üzüm üretiminde verim ve kalite ilgili yaşanan biyotik faktörlerin başında hastalık ve zararlılar ilk sırada gelmektedir. Bağlarda görülen başlıca 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 vebasası (*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*) sayılabilir (Alleweldt ve Possingham, 1988; Çelik ve ark., 1998).

Bağ kanseri dünyada bağcılığın yapıldığı her yerde görülmektedir. Özellikle düşük kış sıcaklıklarının yaşandığı bölgedeki bağlar bu hastalığa karşı daha hassastır (Stewart ve ark., 2014). Tokat bölgesi iklim verileri incelendiğinde düşük sıcaklıkların sıkça yaşandığı, uzun yıllara dayalı kayıtlara göre min. sıcaklığın 4 farklı ay içerisinde -20 C nin altına düştüğü görülmektedir (Anonim, 2016b ).

Bağ uru dünyanın her tarafına yayılmış önemli bir bakteriyel hastalıktır. Burr ve ark. (1998) bildirdiğine göre, ilk kez İtalya'da Cavara (1897), bağ uruna neden olan bakterinin (*Bacillus ampelopsorae*) oluşturduğu doğal enfeksiyonu gözlemlenmiştir. Daha sonra Smith ve Townsend (1907), papatya (*Argyranthemum frutescens* (L.) Sch. Bip.) 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. Hedgcock (1910) asmalardaki urlardan izole ettiği strainleri şeftali ve kayısılar üzerinde denemiştir. Conn (1942), bitkilerde kök boğazı uruna ve aşırı saçak kök hastalığına neden olan bakterilerin yeni bir cins içerisinde yer alması gerektiğini ileri sürmüş ve bu etmeni *Agrobacterium* olarak tanımlamıştır.

Bugün için, *Agrobacterium vitis* asmalarda taç uruna neden olan baskın tür olarak kabul edilmektedir. Çin, Japonya, Güney Afrika, Avrupa'daki değişik ülkeler, Ortadoğu, Kuzey ve Güney Amerika ülkelerinde bağlarda asma taç uruna 1970'li yıllardan beri rastlandığı rapor edilmektedir. OİV (Office International de la Vigne et du Vin, France) tarafından 1996'da yapılan çalışmalarda asma taç uruna en fazla rastlanan ülkelerin sırasıyla Fransa, İspanya, Almanya, İtalya, Şili ve İsrail olduğu bildirilmektedir (Burr ve ark., 1998).

Asma taç urununun hastalık döngüsündeki en önemli nokta asmada *A. vitis*'in sistematik olarak hayatta kalmasıdır (Şekil 2.1). Lehoczkzy (1968) asmalarda çubuklarda yarılma ve yaralanma sonrasında taç uru zararını teşvik ettiği ve asmalarda sistematik olarak hayatta kalmasına neden olduğunu kanıtlamıştır. Daha sonra değişik araştırmacılar bağ kanserini asma öz suyunda izole etmişlerdir (Lehoczkzy, 1968, 1971, 1978; Malenin, 1970).

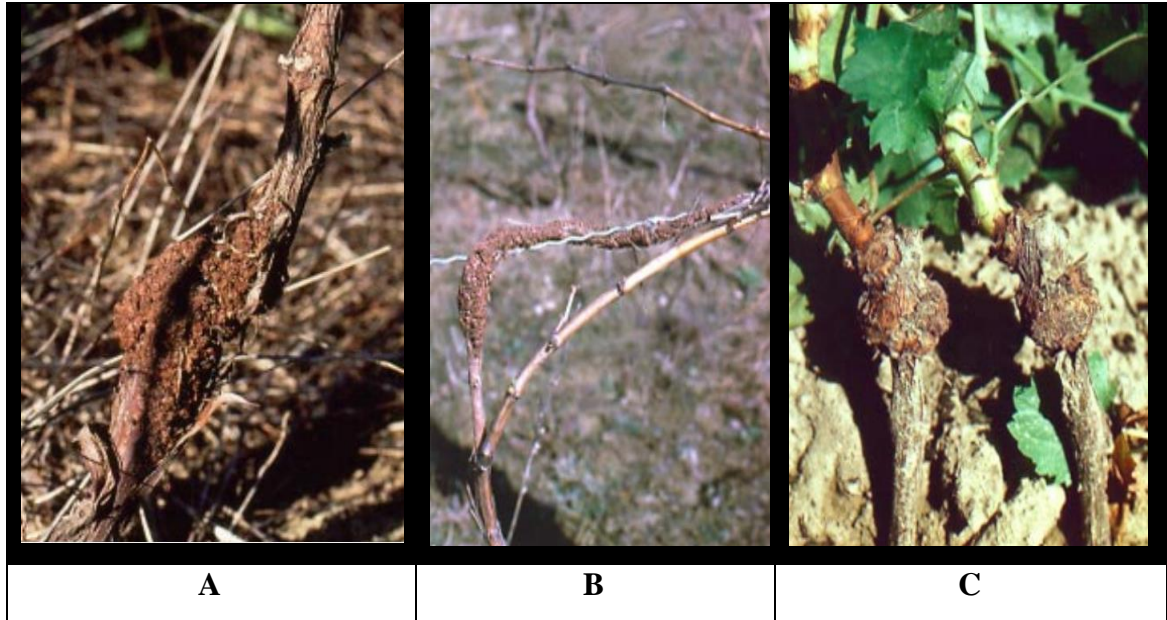


**Şekil 2.1.** Asma taç uru (*A. vitis*)'nin hastalık döngüsü

*Agrobacterium vitis* hastalığının tipik simptomsu, asmanın kök boğazında, gövde üzerinde ve yeni sürgünlerde oluşan uurlardır. Uurlar ilk oluştuğu zaman yüzeyleri düz, soluk renkli ve düzensiz şekilli hücreler yığılından ibarettir. Büyüyüp genişlediklerinde renkleri koyulaşmakta ve yüzeyleri pürüzlü bir hal almaktadır. Yumrular yaşlandıkça renkleri iyice koyulaşarak çatlamaktadır (Burr ve ark., 1987).

*Agrobacterium vitis*'i tümör oluşturan ve oluşturmayan ırkları, asmanın iletim demetlerinde uzun yıllar canlı kalabilirler. Toprakta her zaman mevcuttur. Taç urunun bitkilerde zararlanma nedenleri ile ilgili değişik sebepler ileri sürülmektedir. Soğuk bölgelerde taç uru başlangıcı için başlıca neden olarak don zararının etkili olduğu ileri sürülürken, Güney Afrika ve İsrail'de yüksek derecede sıcaklık ve nemin eşit şekilde önemli etkenler olduğu ileri sürülmektedir. Taç uru yaygın olarak asmaların gövdelerinde, bağda asmaların yıllık dallarında, bunlardan üretilen aşılı asmaların aşı bölgesinde fidanlıklarda görülebilmektedir (Şekil 2.2.).

Bakteri, asmanın köklerinde ve çevresindeki toprakta yaşayabilirse de kökler öldükten ya da topraktan uzaklaştırıldıktan sonra, popülasyonu zamanla azalır. *A. vitis*, asmaya özgü olmasıyla diğer *Rhizobium* türü bakterilerden ayrılır. *A. 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. Nemli koşullar hastalığın gelişmesini hızlandırır (Lehoczky, 1968; Liang, 1990).



**Şekil 2.2.** Verim yaşındaki asmaların gövdelerinde (A), yenice asmalarda yatırma telinde genç sürgünde (B) ve fidanların aşı bölgesinde taç uru hastalığının görünüşü (C) ( Burr ve ark., 1998).

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 fidanların bağa dikilmeleri sırasında, dikim budaması yapılarak köklerin yaralanması, kanser etmeni için önemli bir giriş kapısı oluşturmaktadır (Burr ve ark., 1995b).

*Agrobacterium vitis* bağlarda sistemik olarak yayılmakta ve simptom oluşturmadan yıllarca canlı kalabilmektedir. Bulaşık dallarda *A. vitis* dondan veya başka bir nedenden dolayı meydana gelen yaralanmadan sonra bitkide ur oluşturabilmektedir. *Agrobacterium* cinsi bakteriler genelde toprak kökenlidir. Ancak topraktan izole edilen *Agrobacterium*'ların büyük çoğunluğu ur oluşturma özelliğinde değildir (Bouzar ve Moore, 1987). Bununla birlikte *A. vitis* bağ kalıntılarında en az iki yıl ur oluşturma yeteneğini kaybetmeden yaşayabilmektedir (Burr ve ark., 1995a).

*Agrobacterium vitis* asmalarda öz su ile taşınan ve belirti vermeksizin bitkide bulunabilen bir bakteridir. Bu yüzden 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 su içinde bulunması ve taşınması, budama ve diğer kültürel işlemler sırasında bulaşmaları da artırmaktadır. Bu durum bağcılığın önemli bir dalı olan fidancılık sektörü için önemli bir tehlike arz etmektedir. Çünkü erken dönemde fidanlıklarda oluşabilecek urlar fidan ölümlerine dahi sebep olmaktadır (Lehoczky, 1968).

Hastalığın bağlarda yayılmasının en önemli nedenlerinden birisi asma fidanlarının bulaşık olmasıdır. Tarım Bakanlığının “Fidanlık, Fidelik, Süs Bitkileri ve Çiçek Soğanı Üretilen Yerlerin Ruhsatlandırılmasına İlişkin “ yönetmeliğine göre, asma fidanı üretilen yerde *A. vitis* riskine karşı (en az 5 yıl bağcılık yapılmaması ve fidan üreten işletmelerden her kombinasyon için 10’ar adet fidan numunesi *A. vitis* yönünden analiz edilmek üzere alınarak enstitüye gönderilmektedir. Yine 28.06.2006 tarih ve 26212 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan “İç Karantinaya Tabi Bitki Hastalık Ve Zararlıları Hakkında Tebliğ”de, *A. vitis* asma üretim materyali için dikkate alınan hastalık listesinde yer almaktadır.

Bakteri hastalıklı asma artıklarında ve hatta diğer bitki artıklarında uzun yıllar canlılığını koruduğu bildirilmektedir. Buna karşın bugüne kadar özellikle asma artığı olmayan topraktan bakteriyi izole etmek pek mümkün olmamıştır (Burr ve ark., 1987;1995a).



Bu bakteri asma gövdesinin %50'si ırla çevrelendiğinde bitki gelişiminde ve veriminde önemli azalmalara neden olmaktadır (Schroth ve ark., 1988). *A. tumefaciens*'in neden olduğu kök boğazı uru Zinfendal asma (*V. vinifera*) çeşidinde ürün ve asmanın gelişimini etkilediği bildirilmiştir. 4 yıllık bir periyotta yapılan gözlemlerde başlangıçta hastalık oranı ile salkım verimi, budanan dalların ağırlığı ve gövde ölçüleri karşılaştırılmış ve kök boğazı bölgesinin %50'den fazlası ırla kaplanan asmalarda ur oluşturmayanlardan daha az salkım verimi ve gelişme belirlenmiştir (Schroth ve ark., 1988).

*Agrobacterium vitis* 'e karşı alınacak en önemli önlem sağlıklı fidanlarla bağ kurmaktır. Yine riskli bölgeler için *A.vitis*'e dayanıklı 3309C, 101-14 Mgt ve Riparia Glorie anaçları tercih edilmelidir (Burr ve ark., 1998; Sule ve Burr, 1998). Bağ yeri seçerken don riski olan, nemli ve ağır toprak içeren alanlardan uzak durulmalıdır. Toprak kökenli nematod içeren alanlarda yetişen asmaların bağ uru hastalığına daha sık rastlandığı göz önüne alınmalıdır. Dikim sonrası asmaların fazladan mekanik yaralanmamasına özen gösterilmelidir. Soğuk bölgelerde çeşit seçimine dikkat edilmelidir. Yeni kurulan bağlarda genç asmaları kışa girmeden kümbetlenmesi önerilmektedir. Kış budamasında aşırı kesimden kaçınmalı, özellikle soğuk bölgelerde azotlu gübre yerine potasyumlu gübrelemeye önem verilmelidir. Soğuk bölgelerde kuvvetli gelişen çeşitler tercih edilmemelidir. Kanserle bulaşık ancak gövdesi çatlamayan asmalar yeniden terbiye edilerek verime kazandırılabilir. Gövde yenilemesi yapan asmalarda sorun devam ederse, asma kökü ile birlikte bağdan uzaklaştırılmalıdır. Ur ve yara yerlerine bakırlı bileşikler sürerek enfeksiyon azaltılabilir (Steward, 2014).

Bu hastalık etmenine karşı etkili bir kimyasal mücadele bulunmamakla birlikte, çiftçiler tarafından bilinçsizce ilaç kullanılmaktadır. Son yıllarda hastalık etmenine karşı biyolojik bir preparat olan Nogall kullanılmaya başlamasına rağmen *A. vitis* tarafından oluşturulan hastalık oluşumu yeterince engelleyemediği bildirilmiştir (Burr ve ark., 1998). Hastalık etmenine karşı etkili bir mücadele yönteminin bulunmaması, bilinçsizce tarımsal ilaçların kullanılması, bu ilaçların çevreye ve insan sağlığına olan olumsuz etkilemesi ve son yıllarda bilinçlenen tüketicilerin organik tarıma olan ilgileri nedeniyle

araştırcılar hastalık etmenine karşı ilaçlı mücadeleye alternatif mücadele yöntemlerinin araştırılmasına yöneltilmiştir.

Benlioğlu ve zakman (1998), lkemizde üretim materyali olarak kullanılan bağ çeliklerinde bağ kanseri etmeni *Agrobacterium tumefaciens*'in varlığını belirlemek, asma fidanı üretiminde, indeksleme çalışmaları ve sertifikasyon işlemlerinde pratik ve güvenilir bir yöntemi uygulamaya koyabilmek amacıyla araştırma yapmıştır. Orta Anadolu Bölgesinde Karaman, ankırı ve Ankara illerinde bağ tesisi amacıyla getirilen aşılı asma fidanlarını, yurt dışında çeşitli kaynaklardan temin edilen ve Türkiye'de izole edilmiş *A. tumefaciens* izolatları ve diğer bakteri kültürlerini kullanmıştır. Nevşehir ve Kırşehir'de bağ alanlarından hastalık belirtisi gösteren ve göstermeyen omcalardan toplam 158 sürgün incelenmiştir. Hastalık belirtisi gösteren omcalardan alınan 8 sürgünün 6 tanesinde, belirti göstermeyen omcalardan alınan 150 sürgünden 7 tanesinde de patojenik *A. tumefaciens*'in varlığı saptanmıştır. Orta Anadolu'da Karaman ilinde bağ tesisi amacıyla kullanılacak olan bağ fidanlarından; Hafızali, Amasya, Razakı, Hamburg Misketi, Amerikan asma anacı 41 B ve 5 BB esitlerini içeren 7 örnek; ankırı'da Cardinal, Mandagz, Erenköy, Amasya, Hamburg Misketi (3 parti), Kozak, Muscat, avus, Royal, Amerikan olmak üzere toplam 12; Ankara ilinde ise Hafızali, Mskle, avus (2 parti), Hamburg Misketi, Beyaz Kozak, Muscat, Amasya esitlerini kapsayan 8 olmak üzere 3 ilden toplam 27 rnek *A. tumefaciens*'in varlığı yönünden testlenmiştir. Toplam 27 esit bağ fidanına ait örneklerin incelenmesinden 13 tanesinden *A. tumefaciens* izole edilmiş diğerlerinde ise rastlanmamıştır.

Mohammadi ve Fatehi-Peykani (1999) İran'ın Karaj ve Takesta bölgesindeki bağlarda toprak, bitki öz suyu ve taze yumrulara *Agrobacterium* spp. izole etmişlerdir. Yapılan patojenisite ve moleküler tanılamar sonrasında, *A. vitis*'in İran izolatlarının tamamının fenotipik olarak heterojen ve fark edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Argun (2001), yaptđđ çalışmada Ankara, Kırıkale, Konya, Karaman ve Nevşehir illerinde 1000 da üzerinde bağ alanında 55 köyü *agrobacterium vitis* yönünden incelemiştir. Bu bağlardan 6' sı Ankara 7' si Nevşehir, 9' u Konya, 2' si Kırıkale ve 3'  Karaman' a ait olama üzere 27 köyün bağlarının *A. vitis* ile bulaşık olduğunu tespit etmiştir. Taze olması koşulu ile yılın her döneminde alınan urlardan yapılan

izolasyonlarda daha fazla izolat elde edildiğidilmiştir. Ancak taze urların, en yoğun şekilde bahar aylarında oluştuğu gözlenmi bildirmiştir. İki özsudan olmak üzere toplam 57 *Agrobacterium vitis* izolatı elde edilmiş ve hepsinin asma dallarında ur, sürgün ve kökte nekroz ve ayrıca tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu (HR) oluşturduğunu belirlemiştir.

Altınparmak (2011) 2007-2008 yıllarında Konya bağlarında yetiştirilen 14 adet farklı asma çeşidinde bakteriyel hastalıkları belirlemek amacıyla çalışma yapmıştır. Toplam 309 asma örneğinden 280'inde *A. vitis* belirlenirken, izolatların çoğunluğunun tümörojenik karakterde olduğunu saptamıştır. Konya ili genelinde asmalardaki etmenle bulaşıklığın %90.61' lik oranla büyük önem taşıdığı, patojenin mevcut çeşitler içerisinde en fazla Sultani Çekirdeksiz, Cardinal, Hafızali ve en az Ekşi Kara çeşitlerinde görüldüğünü belirlemiştir.

Abdellatif ve arkadaşları (2013) Tunus bağlarında bağ kanserine yönelik yaptıkları araştırmada kuzey ve merkez bölgesinde bağ kanserinin düşük yoğunluklu olduğunu (%9.72) saptamışlardır. Morfolojik olarak *Agrobacterium* simptomu gösteren asma ve toprak örneklerinden 380 adet izolat elde etmişlerdir.

Ergönül ve Öztürk (2015), 14 üzüm çeşidi (*Vitis vinifera* L.) ile 6 Amerikan asma anacının toplam 60 klonunda termoterapi ve meristem kültürü ile virüslerden arındırılmasına yönelik çalışma yapmışlardır. Dört yıl boyunca asma patojeni virüs ve *A. vitis* bakterisinin arındırılması amacıyla sürdürülen bu araştırmada 60 asma klonundan virüs ve *A. vitis* testlemeleri yapılmış, 30 klon temiz, geri kalanı ise en az bir virüs veya *A. vitis* yönünden bulaşık bulunmuştur

Genov ve ark. (2015) Bulgaristan da 9 farklı bağ bölgesinden ve Bulgaristan'ın Güney Doğusundaki ormanlardaki yabancı asmalarda yaptıkları çalışmada, 20 farklı *Agrobacterium* spp.' yi saptamışlardır. Simptom gösteren *V. Vinifera* asmalarında ur ve sürgün örnekleri alınırken, yabancı asmalarda ise simptom göstermeyen bitkilerden sürgün örnekleri toplanmıştır. Toplanan örneklerde fizyolojik, kimyasal testler ve izolatlarda virüs analizleri yapılmıştır. Elde edilen 20 izolattan 2 tanesi patojen içermeyen *A.tumefaciens* olarak saptanırken, diğerleri *A. vitis* olarak saptanmıştır.

İgnatov ve ark. (2015) Rusya'nın Karadeniz kıyısında şaraplık üzüm yetiştirilen 15 bağın dokuzunda taç ürünü gözlemlemeye yönelik bir survey çalışması yapmışlardır. Asmalardan alınan ur örnekleri RS ortamında ekildikten sonra Roy ve Sasser (1983)'e göre tanımlamışlardır. Elde edilen sonuçları PCR analizleri ile *virD2* genindeki *virD2A/2C* ile teyit etmişlerdir. PGF/PGR primerleri ile *A. vitis* ve *A. tumafeciens* izolatlarını ayırt etmekte kullanılmıştır. PCR da test sonrası 69 adet izolatin 18 tanesi *A. vitis* 'e ait olarak saptamışlardır. Bu durumu biokimyasal testlerde teyit etmiştir.

*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. Asma çubuklarından *A. vitis* DNA'sını elde etmek için dört farklı ekstraksiyon/saflaştırma yöntemi kullanmıştır (Eastwell ve ark., 1995).

Küsek (2007) tarafından yapılan çalışmasında elde ettiği bazı izolatlarının asmada ur ağırlığını önemli düzeyde azalttığını belirlemiştir. *A. vitis* izolatından elde edilmiş lipopolisakkarid (LPS)'lerin asma çubuklarına 10 g/l konsantrasyonda infiltre edildiğinde ur büyüklüğünü %91.5 oranında azaltmıştır.

Değişik yıllarda farklı araştırmacılar, bazı asma anaçlarının ve üzüm çeşitlerine ait kalemlerin hassas veya dayanıklı olduğuna dair araştırmalar yapmışlardır. Cardinal, İtalia, İskenderiye Misketi gibi çeşitlerin taç uruna hassas, Semillion, Riesling, Regina gibi çeşitlerin dayanıklı olduğu; Teleki 5BB, 110R, 99R, Ramsey, 140 Ru anaçlarının hassas, 1103 P3309 C, 101-14 Mgt gibi anaçların dayanıklı olduğu rapor edilmiştir. Bazı üzüm çeşitleri (Chardonnay) ve asma anaçlarının (Kober 5BB) farklı ekolojik koşullara sahip ülkelerde tolerans açısından farklılık arz ettiği de ayrıca ileri sürülmüştür (Burr ve ark., 1998).

Araştırmacılar, uzun zamandan beri *Agrobacterium* spp.'leri kontrol altında tutmak için değişik yöntemler denemişlerdir. Bunlara hastalıktan ari baz materyallerle fidan üretimi, kültürel uygulamalar, kimyasal ve biyolojik kontrol yöntemleri örnek verilebilir. Khalif

(2006) ta uru ile biyolojik mücadele kapsamında *Bacillus subtilis*, *Penicillium* sp. K84 ve *Trichoderma harzianum* izolatlarının başarılı sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

Usanmaz (2012) Kahramanmaraş ilindeki bağ alanlarındaki asmalardan sağlıklı olanları seçerek, kök bölgelerinden köklerle birlikte 15 toprak rneği alarak elde ettiği 468 bakteri izolatını *Agrobacterium vitis*'e karşı engelleme zonu oluşturup oluşturulmadığını araştırmıştır. Topraktan izole edilen 8 adet izolatın engelleme zonu oluşturduğunu, engelleme zonu oluşturan 8 izolatın tanılama testleri olan gram boyama, oksidaz, katalaz, KOH ile gram reaksiyonu, biolog ve floresan özelliklerini belirlemiştir.

Elena (2016) bağda ve serada *Agrobacterium tumafeciens* içeren asmalarda patojenin yaygınlaşmasını önlemek için, sarımsaktan elde edilmiş iki farklı reçete uygulamıştır. Her iki reçete de rların büyüklüğü, sayısı ve çoğalma potansiyelini sınırlandırması açısından kontrolle kıyaslandığında olumlu yönde etki ettiği bildirilmiştir.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Çalışmanın ana materyalini Tokat ili Merkez, Niksar, Erbaa, Turhal, Zile ve Pazar ilçelerinde 238 adet bağ alanından toplanan, hastalık şüphesi olan 200 adet ur örneği oluşturmuştur.

İzolasyon çalışmalarında King B, Nutrient Glikoz Agar (NGA), Potato Dextrose Agar+CaCO<sub>3</sub>, demir amonyum sitrat, Nutrient Broth besi yerleri (EK-A), çeşitli kimyasallar ve tanılama testlerinde PCR (Iontek, Fermantes, Thermo marka) malzemeleri kullanılmıştır.

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Survey Çalışmaları**

Asma ur hastalığının bölgedeki bulunma oranının belirlenmesi için 2015 yılında Tokat ili Merkez, Niksar, Erbaa, Turhal, Zile ve Pazar ilçelerinde bağ alanlarında surveyler yapılmıştır. Survey çalışmaları yaz (Haziran–Ağustos) döneminde asmalarda yıllık sürgünler 10-15 cm'e ulaştığında yapılmıştır. Tokat ilinde 6 ilçeden 48 köyde 238 adet bağ alanı gezilerek incelemeler yapılmıştır. GÜdümlü örnekleme ile (Argun, 2001) 42 adet bağdan toplam 297 adet ur örneği alınmıştır (Çizelge 3.1.). Örnekler toplanırken özel bir örnekleme metodu kullanılmamış, örnekleme sayısı bağ alanı büyüklüğüne göre değil bağdaki hasta asma sayısına göre değişmiştir (Argun, 2001). Aynı zamanda incelenen alanlarda omca yaşı, terbiye şekli, üzüm/anaç çeşidi gibi veriler de kaydedilmiştir. Bölgelerdeki hastalıkların dağılımına yönelik değerlendirmeler bağ alanına düşen hastalıklı asma sayısına morfolojik gözlemlere göre yapılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Tokat yöresi mevcut bağ alanları, gezilen köy ve örnek alınan köy sayısı sayısı ve bağlardan alınan numune sayısı

İlçe adı	Bağ alanı (ha)	Gezilen Köy sayısı	Gezilen Bağ Sayısı	Örnek Alınan Köy Sayısı	Örnek Alınan Bağ sayısı	Bağlardan Alınan Toplam Örnek Sayısı (adet)
<b>MERKEZ</b>	2020	9	37	4	5	69
<b>ZİLE</b>	1770	14	63	4	12	54
<b>ERBAA</b>	1335	13	69	9	14	81
<b>NIKSAR</b>	693	7	37	3	6	71
<b>PAZAR</b>	300	3	20	2	3	10
<b>TURHAL</b>	94	3	12	1	2	12
<b>TOPLAM</b>	<b>6218</b>	<b>49</b>	<b>238</b>	<b>23</b>	<b>42</b>	<b>297</b>

Bağlarda örnekler alınırken kullanılan alet ve ekipmanlar, her seferinde çamaşır suyu içeren su ile dezenfekte edilmiştir. Survey çalışmalarında asma ur hastalığından şüphelenilen bitkiler gazete kağıdı arasına sarılarak etiketlenmiş ve polietilen torba içerisinde laboratuara getirilmiştir.

### **3.2.2. Asma ur hastalık etmeninin (*Agrobacterium vitis*) izolasyonu**

Survey çalışmalarından sonra laboratuara getirilen bitki örneklerinden hastalık etmenini elde edebilmek için izolasyon çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak getirilen örnekler çeşme suyunda yıkanmıştır. Daha sonra %70'lik alkolle yüzeyden dezenfekte edilen örnekler 3 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Bir bistüri veya maket bıçağı ile ürün üst tarafı hafifçe soyulmuş ve alttaki taze canlı dokudan küçük parçalar alınmıştır. Daha sonra alınan parçalar steril porselen havan içerisinde ezilmiş, steril fizyolojik tuzlu su (%8,5 NaCl) içerisinde homojenize edilmiştir. Bir saat bekletildikten sonra bu süspansiyondan bir öze alınarak King B besi yerine ekim yapılmıştır. Petriler 26°C'de inkübatörde inkübe edilmiştir (Küsek, 2007). İnkübasyon süresi sonunda petrilerde gelişen koloniler incelenmiş ve krem renkli kısmen şeffaf, etrafı düz, yuvarlak ve konveks koloni morfolojisine sahip olan koloniler saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar Gliserol ve Nutrient Broth içerisinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.3. Asma ur hastalık etmeninin (*Agrobacterium vitis*) tanınması**

#### **Potasyum hidroksit testi (KOH) ile gram reaksiyon**

KOH testinde %3'lük Potasyum Hidroksit solüsyonu kullanılmıştır. Lam üzerine bir damla solüsyondan damlatılmış, 48 saatlik *Agrobacterium vitis* izolatları bir plastik öze ile alınarak solüsyonla karıştırılmıştır. Öze yukarı doğru kaldırıldığında lam üzerinde viskoz, yapışkanimsi bir uzamanın oluşması ile sonuç Gram negatif, uzamanın oluşmaması ile Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.

#### **Oksidaz Testi**

Çalışmanın bu kısmında, %1'lik N,N,N,N'-Tetramethyl-1.4 phenylene diammonium diclorid eriyiği kullanılmıştır. Taze hazırlanmış eriyik steril filtre kağıdına bir damla damlatılmıştır. King B besi yerinde 48 saat geliştirilen bakteri izolatları steril bir kürdan ile veya steril bir plastik öze ile alınarak eriyik damlatılmış kurutma kağıdına çizilmiş ve mor renk oluşumuna göre pozitif olarak değerlendirilmiştir. 10 saniye içinde oluşan koyu mor renk pozitif, 10 ile 60 saniye arasında koyu mor olanlar zayıf pozitif ve mor oluşturmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956).

#### **PDA+CaCO<sub>3</sub> Besi Yerinde Asit Temizleme**

Çalışmanın bu kısmında, Potato Dekstrose Agar (PDA) içerisine CaCO<sub>3</sub> eklenerek PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yeri (EK-A) hazırlanmıştır. İzolasyonlar sonucu elde edilen bakteri izolatları PDA+CaCO<sub>3</sub> besi yerine ekilmiş ve 26°C'de inkübatörde inkübe edilmiştir. 2 günlük inkübasyon süresi sonucunda koloniler etrafında besi yerinde saydamlaşma görülen izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001; Küsek, 2007).

#### **%2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme**

Çalışmanın bu kısmında, %2 NaCl ilave edilmiş Nutrient Glikoz Agar (NGA) (EK-A) besi yeri kullanılmıştır. Elde edilen bakteri izolatları NGA besi yerine ekilmiş ve 26°C'de inkübatörde inkübe edilmiştir. 2 günlük inkübasyon süresi sonucunda besi yerinde koloni gelişimi gösteren izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001; Küsek, 2007).



## **Demir Amonyum Sitrat Kullanımı**

King B besi yerinde 48 saat geliştirilen bakteri izolatlarının demir amonyum sitrat besi yeri (EK-A) içeren tüplere ekimi yapılmıştır. İnokule yapılan tüpler 26°C’de inkübatörde inkübe edilmiştir. 2 günlük inkübasyon süresi sonucunda, tüplerde oluşan kiremit renginde bir tabaka pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

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

Hastalıklı dokulardan izole edilen ve klasik tanı ile tanılanan 120 adet *Agrobacterium* spp. izolatının Genomik DNA izolasyonu Nejat ve ark. (2009)’a göre yapılmıştır. Bu yöntemde izlenen prosedür aşağıda verildiği gibidir:

1. Bakteri izolatları 9 ml Nutrient broth (EK-A) sıvı besi yerine aşılanarak 200 devir/dakika (dk) çalkalayıcıda gece boyu 27±1 °C’de geliştirilmiştir.
2. Bakteri süspansiyonundan 1ml steril ependorf tüpüne alınmış ve tüplerin ağırlıkları dengelenerek 15 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Pellet alınarak süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine 600 µl CTAB (pH:8,00) (EK-B) eklenerek vortekslenmiştir.
4. Tüpler 65 °C’deki su banyosunda 30 dk bekletilmiştir.
5. Bu sürenin sonunda her bir tüpe 600 µl cloroform isoamyl alkol eklenerek 1’er dk vortekslenmiştir.
6. 13 000 rpm’de 10 dk santrifüj yapılarak süpernatant içinde DNA yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır.
7. Tüplere 600 µl derin dondurucuda soğutulmuş isopropanol eklenmiştir. Tüpler derin dondurucuda (-20 °C’de) 45 dk bekletilmiştir.
8. 12 000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir.
9. Üst sıvı kısım dökülmüş ve soğutulmuş %70’lik alkolden 1000 µl ependorf tüplerine eklenmiştir. 12 000 rpm’de 15 dk santrifüj yapılarak alkolle yıkama yapılmıştır.
10. Ependorf tüpler ters çevrilerek alkol dökülmüş ve steril kabinde bir saat kurumaya bırakılmıştır.

11. Ependorf tüpler içerisine 30 µl TE Buffer (EK-B) konulmuştur. İzole edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.
12. Daha sonra bu DNA'lar %1'lik hazırlanan agarose jele (EK-B) verilerek izole edildikleri tespit edilmiştir.

Çalışmada ayrıca bakteri kültürleri ile doğrudan PCR çalışması da yapılmıştır. 48 saatlik bakteri izolatlarından bir öze dolusu alınarak steril ependorf tüp içerisine konulmuştur. Bakteri kültürleri üzerine 1000µl Lysis buffer (EK B) eklenerek 95° C'de 10 dk su banyosunda bekletilmiştir (Abolmaaty ve ark., 2000).

PCR çalışmasında *Agrobacterium* spp.'e spesifik olan Prim A ve Prim C primer dizilimleri kullanılmıştır. PCR çalışması Hass ve ark. (1995)'nin bildirdiğine göre yapılmıştır.

PCR çalışması için reaksiyon karışımının içeriği aşağıda verilen değerlere göre ayarlanmıştır:

<b>Reaksiyon Karışımının İçeriği Miktarı</b>	<b>(µl)</b>
ddH <sub>2</sub> O	17
Buffer	2,5
dNTP	0,2
MgCl <sub>2</sub>	2
Primer A	0,5
Primer C	0,5
Taq polimeraz	0,3
g-DNA veya bakteri kültürü	2,0
<b>Toplam</b>	<b>25</b>

Kullanılan primerlerin dizilişleri aşağıda verildiği gibidir:

Prim A: 5'-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT-3'

Prim C: 5'-TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA-3'

Thermalcycler cihazında (BIOER) kullanılan program aşağıda verildiği gibidir:

<b>Program adımları</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (dk)</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
İlk denatürasyon	94	1	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması	50	1	40
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	5	1
Bekleme	4	Süresiz	

Patojene spesifik olan Prim A: 5'-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT-3' ve Prim C: 5'-TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA-3' primer dizilimleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında %1'lik agaroz jel üzerinde Hass ve ark. (1995)'nın bildirdiği gibi 224 bp büyüklüğünde bant oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Tokat İlinin Genel Özellikleri

Tokat, Karadeniz Bölgesi'nin Orta Karadeniz Bölümü'nün iç kesiminde yer almaktadır. Yüzölçümü 9.982 km<sup>2</sup> olup, Türkiye topraklarının % 1.3'ünü kaplamaktadır. 35° 27' - 37° 39' doğu boylamları ile 39° 52' - 40° 55' kuzey enlemleri arasında yer almaktadır. Tokat Merkez ilçenin rakımı 623 m'dir. Tokat İli; İç Anadolu İklimi, İç-Doğu Anadolu İklimi, Karadeniz Ardı İklimi ve Orta Karadeniz İklimi arasında bir geçit özelliği gösterir. Uzun yıllar ortalamasına göre yıllık ortalama sıcaklık; en düşük 1,9 °C en yüksek 22.4 °C'dir. Bağ kanseri için en önemli etkenlerden birisi düşük kış sıcaklıkları olup, ekstrem en düşük sıcaklık değerleri -23,4 °C, ile 20 Ocak 1972 de yaşanmış olup, bağcılık için kritik düşük sıcaklık değeri olan -20 °C nin 4 farklı ay içerisinde yaşandığı meteorolojik kayıtlarda yer almaktadır (Çizelge 4.1.; Anonim, 2016b).

**Çizelge 4.1.** Tokat ili uzun yıllara (1950-2015) iklim verileri

AYLAR	SICAKLIK (°C)				Ort. Yağışlı Gün
	Ort.	Min.	Max.	En düşük sıcaklık	
OCAK	1.9	-1.7	6.2	-23.4	11.0
ŞUBAT	3.4	-0.7	8.2	-22.1	10.6
MART	7.5	2.4	13.1	-21.2	12.3
NİSAN	12.5	6.6	18.9	-6.3	12.7
MAYIS	16.5	10.0	23.4	0	13.6
HAZİRAN	19.9	13.0	26.7	2.7	8.7
TEMMUZ	22.3	15.5	29.0	6.1	3.0
AĞUSTOS	22.4	15.6	29.6	6.7	2.3
EYLÜL	18.8	12.1	26.5	2.4	4.7
EKİM	13.7	8.1	20.6	-3.2	8.1
KASIM	7.9	3.4	13.6	-11.8	9.4
ARALIK	3.8	0.3	7.8	-21.0	11.6

Tokat bölgesi iklim verileri incelendiğinde düşük sıcaklıkların sıkça yaşandığı, bu nedenle de bağların yaklaşık 10 yılda bir ciddi zarar gördüğü görülmektedir (Topçu ve ark., 2015). Haliyle bölgenin iklim koşullarının bağlarda kanser hastalığının yayılması için oldukça uygun olduğu görülmektedir.

## 4.2. Tokat İlinde Survey Yapılan Bağlara Ait Genel Özellikler

2015 yılı Haziran ve Eylül ayları içerisinde Tokat bölgesindeki bağlarda asma ur hastalığına yönelik survey çalışması yapılmıştır. Araştırma döneminde 6 ilçede 49 köyde 238 bağda tarama yapılmış olup, 23 köyden toplam 42 adet bağdan toplam 200 adet ur örneği alınmıştır (Çizelge 3.1; Çizelge 4.2). Alınan ur örneklerinin taze olmasına özen gösterilmiştir ( yaklaşık %75) (Şekil 4.1).

Araştırmada survey döneminde bazı bağlarda yapılan morfolojik gözlemlerde hastalıklı asmalara rastlanırken bazı bağlarda rastlanmamıştır. Bu nedenle, survey aşamasında ur örneği alınan hastalıklı olan asmalara ait bağlar kodlanarak toplanan urlardan izololatlar elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Tokat ilinde survey yapılan bağlara ait genel bilgiler

İlçe, Köy- Mevki Adı	Bağın Kodu	Bağın Yaşı	Alan (da)	Anaç	Üzüm Çeşidi	Terbiye Sistemi
<b>TOKAT MERKEZ</b>						
Büyük yıldız-Kızılyer	M1	6	11	Lot	Narince	Telli Goble
Güryıldız-Dalgındibi	M2	33	3.8	110R	5 Çeşit	Ç.K.K
Küçükbağlar-Köyünü	M3	8	4	1103P	Red Globe	Ç.K.K
Küçükbağlar-Köyünü	M4	8	10	1103P	Red Globe	Ç.K.K
Emirseyit-Kavakyolu	M5	10	5.5	99R	Narince	Ç.K.K
Güzeldere*						
Gülpınar*						
Büyükbağlar*						
Bağbaşı*						
Çamaltı						

**Çizelge 4.2. (devamı). Tokat ilinde survey yapılan bağlara ait genel bilgiler**

<b>ERBAA</b>						
Ballıbağ-Kanalaltı	E1	8	5	5BB	Narince	Ç.K.K.
Üzümlü-Emeraltı	E2	5	5	1103P	Narince	Guyot
Üzümlü-Emeraltı	E3	3	4	1103P	Narince	Guyot
Üzümlü-Belpınarı	E4	4	2	1103P	Narince	Ç.K.K.
Bağpınar-Uzunpara	E5	6	2	1103P	Narince	Ç.K.K.
Bağpınar	E6	5	4	1103P	Narince	Ç.K.K.
Bağpınar-Uluyolaltı	E7	8	8	LOT	Narince	Ç.K.K.
Doğanyurt	E8	6	5	110R	Narince	Ç.K.K.
Doğanyurt-Kösere	E9	6	4	110R	Narince	Ç.K.K.
Merkez-Karabulak	E10	4	1 8	110R	Narince + Alphonse L.	Ç.K.K.
Salkımören-Kabakulak	E11	9	2	110R	Narince	Ç.K.K.
Doğanyurt-Taşlyatak	E12	12	1	110R	Narince	Ç.K.K.
Ağcakeçi-Halburcu	E13	3	5	1103P	Narince	Ç.K.K.
Ağcaalan-Ardıçlık	E14	8	2	99R	Narince	Ç.K.K.
Yoldere *						
Tepekışla*						
Çamdibi*						
Pınarbeyli*						
Karayaka*						
<b>ZİLE</b>						
Kireçli-Sakallı	Z1	15	2	YERLİ	Narince	Goble
Kireçli-Kumocağıyolu	Z2	25	3	99R	Narince+Çavuş	Ç.K.K.
Kireçli-Kumocağıyolu	Z3	25	4	99R	Narince	Ç.K.K.
Olukman	Z4	50	3,2	YERLİ	Narince	Goble
Güzelbeyli-Bağlarmevki	Z5	6	1,5	1103P	4 Çeşit	Ç.K.K.
Güzelbeyli-Bağlarmevki	Z6	7	2	1103P	Narince	Ç.K.K.
Merkez-İstasyon Karşısı	Z7	7	2	1103P	Narince	Goble
Merkez-Arapbağları	Z8	23	2	1103P	Narince	Ç.K.K.
Merkez-Arapbağları	Z9	8	3	1103P	Narince	Ç.K.K.
Merkez-Arapbağları	Z10	10	2	1103P	Narince	Ç.K.K.
Merkez- Karadini	Z11	10	2	1103P	Narince	Ç.K.K.
Merkez-Olukmanyolu	Z12	25	2,5	1103P	Narince	Ç.K.K.
Korucuk*						
Yeniköy*						
Şeyhnurettin*						
Emirören*						
Hacılar*						
Kurşunlu*						
Selamet*						
Özyurt*						
Söğütöz*ü						

**Çizelge 4.2. (devamı).** Tokat ilinde survey yapılan bağlara ait genel bilgiler

<b>NİKSAR</b>						
Gözpınar-Ağılönü	N1	8	4	99R	Narince	Ç.K.K.
Gözpınar-Yanıktepe	N2	8	14	99R	Narince	Ç.K.K.
Gökçeli-Sarıgüllük	N3	10	3	YERLİ	Narince	Goble
Gökçeli-Mezarlıkaltı	N4	5	4	99R	Narince	Ç.K.K.
Gözpınar-Boğamamezarlığı	N5	60	2,5	1103P	Narince	Ç.K.K.
Yakınca-Köyüstü	N6	8	3	99R	Narince+İtalya	Ç.K.K.
Direkli*						
Yolkonak*						
Oluklu						
Hüseyingaziv						
<b>PAZAR</b>						
Üzümören-Çanak Mevki	P1		2.5	LOT	Narince-Çavuş	Ç.K.K.
Dereköy –Bozbağlar	P2		5	99R	Narince+İtalya	Ç.K.K.
Dereköy –Bozbağlar	P3		2.2	1103P	Narince	Ç.K.K.
Bağlarbaşı*					Narince	
<b>TURHAL</b>						
Çarıksız-Oduncuoğlu	T1	23	8	99R	Narince	Ç.K.K.
Çarıksız-Kızıltepe	T2	8	5	YERLİ	Narince	Ç.K.K.
Necip*						
Kalaycık*						

\*:Survey yapılan bağlarda hastalık görülmeyen köyler, bu tabloda yer verilmemiştir.

Bölgede bağ alanlarında parsel büyüklüğü; Tokat Merkez 3.61 da, Turhal 6.07 da, Erbaa 5 da, Zile 3.16 da, Niksar 3.61 da, Pazar ise 3.16 da olarak bildirilmektedir (Anonim, 2012). Çalışma yapılan bağlarda da benzer durum görülmüş olup, bölgede yaygın olarak yetiştirilen Narince çeşidinin survey yapılan bağlarda da yoğun bir şekilde yetiştirildiği saptanmıştır. Survey yapılan bağların yaşı 3-60 arasında değişmektedir. 1970’li yıllarda floksera zararlı nedeniyle bağlarda yoğun tahribat yaşanmış, 1980 li yılların ortasından itibaren bölgede aşılı asma fidanları ile bağ tesisi başlamıştır. 2015 yılında bölgede yaklaşık 300 000 adet aşılı asma fidanı bağlarla buluşmuştur.

Tarama yapılan bağlarda Narince çeşidi dışında, Boduroğlu, Red Globe, Çavuş, Topbaş, Sultani Çekirdeksiz, İtalya ve Alphonse Lavallee üzüm çeşitleri de az da olsa yetiştirilmektedir. Bölgede yerli bağ sayısı oldukça az olup, çeşitler genellikle 110R, 1103P, Lot, 5BB ve 99R anaçları üzerine aşılı fidanlardan oluştuğu görülmüştür. Bölgede Goble geleneksel terbiye şekline sahip bağ sayısı oldukça az olup, yüksek telli

destek sitemi ile uyumlu çift kollu kordon (Ç.K.K.) sistemi daha çok tercih edilmektedir (Çizelge 4.2). Ç.K.K. terbiye sisteminin yoğun olarak tercih nedeni Narince çeşidinden asma yaprağı üretimi için kısa budamanın uygulanmasını ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bölge bağları genel olarak 2. Sınıf arazi üzerinde ve kıraç durumda olup, çok az sayıda ek sulama yapılabilir.

#### 4.3. Survey Yapılan Bağ Alanlarında Hastalığın Belirlenmesi

Bölge bağlarında genellikle aşılı asma fidanları ile bağlar tesis edilmekte olup, nadiren yerli fidanlarla da bağ tesis edilmektedir. Bölgede 1x1 m dikim sıklığından 3x1x75 dikim sıklığına kadar değişik ölçülerde dikimler yapılmaktadır. Ancak bölgede yoğun olarak 3 x 1.5 m dikim sıklığı kullanılmakta olup, ortalama olarak bölgede bağlarda 200 adet asma bulunmaktadır.

Çalışmada bağlarda iki farklı dönemde morfolojik gözlemlere göre, örnek alınan ve alınmayan tüm bağlarda, hastalık belirtisi gösteren veya ur tespit edilen hastalıklı asma sayıları Çizelge 4.3’de verilmiştir. Çizelge 4.3’de görüleceği üzere bölgelere göre surveyde taranan bağ alanı ve hastalıklı örnek saptanan asma sayısı değişmiştir. En fazla hastalıklı asma oranı Tokat Merkez ve Niksar ilçelerinde gözlemlenirken, en az hastalıklı asmaya Pazar yöresi bağlarında rastlanmıştır.

**Çizelge 4.3.** Survey yapılan bölgelerde hastalıklı bitki oranı

<b>Bölge</b>	<b>Survey yapılan Toplam bağ alanı (da)</b>	<b>Hastalıklı örnek sayısı</b>	<b>Hastalık Oranı (%)</b>
<b>Erbaa</b>	347.5	81	14,81
<b>Niksar</b>	154.0	71	15,49
<b>Tokat</b>	152.7	69	8,69
<b>Zile</b>	239.8	54	20,37
<b>Pazar</b>	66.4	12	0
<b>Turhal</b>	76,2	10	40,0

Bölgede yapılan morfolojik gözlemlerde, hastalıklı asmaların daha çok orta yaşa (7-20) sahip olduğu görülmüştür. Ancak, özellikle yenice (3-5) asmalarda hastalıklı asmalara rastlanmıştır (Şekil 4.1). Son yıllarda bölgede bağ tesisinin yoğun olarak gerçekleştiği Erbaa’da bu duruma daha fazla rastlanması, bölgede bağ tesisinde



*Agrobacterium* spp. ile bulaşık sağlıklı fidanların kullanılması ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bu saptama, bu hastalığın en önemli yayılma nedenlerinden birisi olduğunu da teyit etmektedir (Çelik ve ark., 1998). Zira, *Agrobacterium* spp. çoğaltma materyali ile çok rahatlıkla taşınabilmekte, budama ve diğer kültürel işlemler sırasında bulaşmaları da artırmaktadır. Bağcılığın önemli bir dalı olan fidancılık sektörü için önemli bir tehlike arz etmektedir. Çünkü erken dönemde fidanlıklarda oluşabilecek urlar fidan ölümlerine dahi sebep olmaktadır (Lehoczky, 1968). Bölgenin en önemli çeşidi Narince’de klon seleksiyonunun tamamlanması, bu çeşitle fidan üretiminde bağlardan sağlıklı ve kontrolsüz kalemlerle fidan üretimine neden olması, hastalığın yayılma nedenlerinden birisidir.

Güdümlü örnekleme sonucu 297 ur örneğinden ancak, 150 izolat elde edilmiş olup, diğer örneklerden izolasyon gerçekleştirilememesinin nedenleri;

- 1- Saprofitlerin bulaşması sonucu patojen bakterinin gelişiminin baskılanmasından
- 2- Alınan örneklerin bir kısmının gerçek ur olmayıp, ur benzeri yapı olmasından
- 3- Ortamda gelişen bakterilerden görsel olarak koloni morfolojisi, rengi vb. özellikler dikkate alınarak bazı kolonilerin elemine edilmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 4.1.** Survey yapılan bağlarda asma ur hastalığının belirtileri(Orijinal, Hacı DURAK)



**Erbaa**



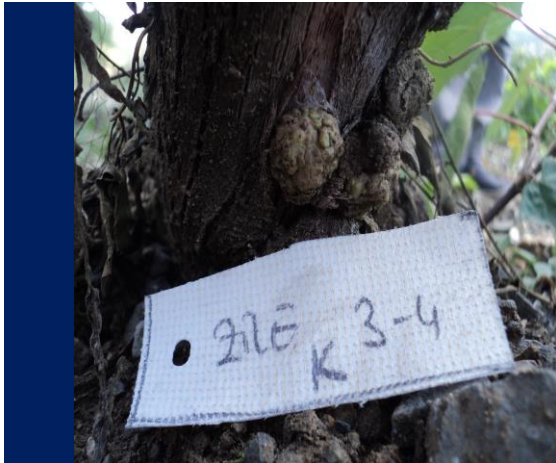
**Erbaa**



**Zile**



**Zile**



**Zile**

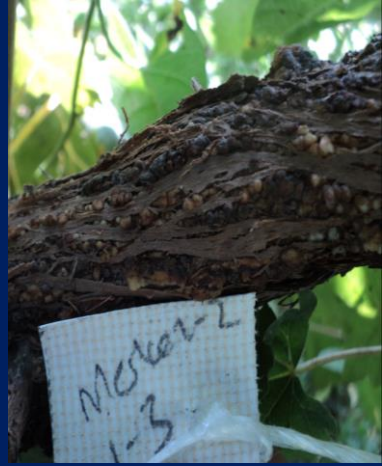


**Zile**

**Şekil 4.1.** Survey yapılan bağlarda asma ur hastalığının belirtileri(Orijinal, Hacı DURAK)



**Tokat Merkez**



**Tokat Merkez**



**Tokat Merkez**



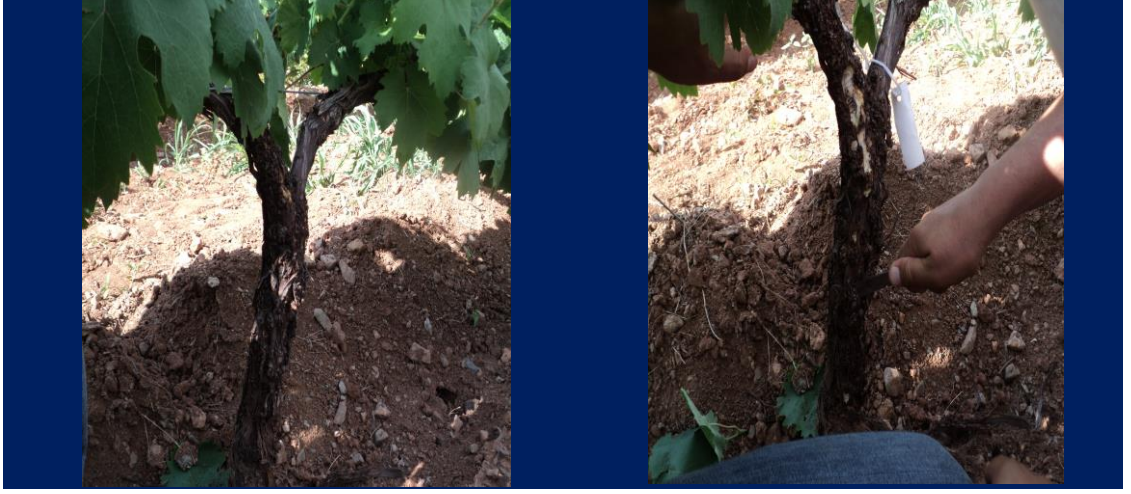
**Tokat Merkez**



**Pazar**



**Pazar**



**Pazar**

**Pazar**



**Turhal**

**Turhal**



**Turhal**

**Turhal**

**Şekil 4.1.** Survey yapılan bağlarda asma ur hastalığının belirtileri(Orijinal, Hacı DURAK)

#### 4.4. Asma Ur Hastalık Etmeninin (*Agrobacterium* spp.) Tanılanmasına Yönelik Bulgular

Tokat bölgesinde bağlardan hastalıklı asma örneklerini toplamak amacıyla Merkez, Zile, Erbaa, Pazar, Turhal ve Niksar ilçelerindeki bağ alanları yaz aylarında gezilmiş ve urlu bitkilerden örnekler alınarak laboratuvara getirilmiştir. Bölgede 49 köyde yapılan surveylerde 26 köydeki bağlarda herhangi bir urlu asma bitkisine rastlanmamıştır. Taze urlu dokulardan King B besi yerinde yapılan izolasyonlarda krem renkli, floresan olmayan, kısmen şeffaf, etrafı düz ve konveks koloniler seçilmiş ve saf kültürleri elde edilmiştir.

Burr ve ark. (1987)'da urlu dokulardan izolasyon için ilkbahar ve yaz aylarının çok uygun olduğunu kaydetmişlerdir. Genç ve taze urlarda izolasyon kolay bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Küsek (2007) yaptıkları çalışmada, Mersin, Gaziantep, Hatay, Adıyaman ve Kahramanmaraş bölgesi bağlarında yapmış olduğu çalışmada, ilkbahar ve yaz aylarındaki taze urlarda izolasyonu kolay bir şekilde yaptıklarını bildirmiştir.

##### 4.4.1. Gram Reaksiyon Testi Sonuçları

Survey çalışmaları sonucu elde edilen izolatlarda yapılan biyokimyasal test sonuçlarına ait veriler Çizelge 4.5.'de verilmiştir. %3'lük potasyum hisroksit ile yapılan Gram testinde örneklerden elde edilen 148 izolatın 146 tanesi (%98.64) Gram negatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Elde edilen izolatlarda Gram Testi uygulaması

#### 4.4.2. Oksidaz Testi

Çalışmada bölge izolatları N; N; N; N' - Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diclorid eriyiği emdirilmiş filtre kağıdına bir kürdan yardımıyla sürülmüş ve 10 saniye içerisinde 148 izolatın 139 tanesinin (%93.91) pozitif sonuç verdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5; Şekil 4.3).

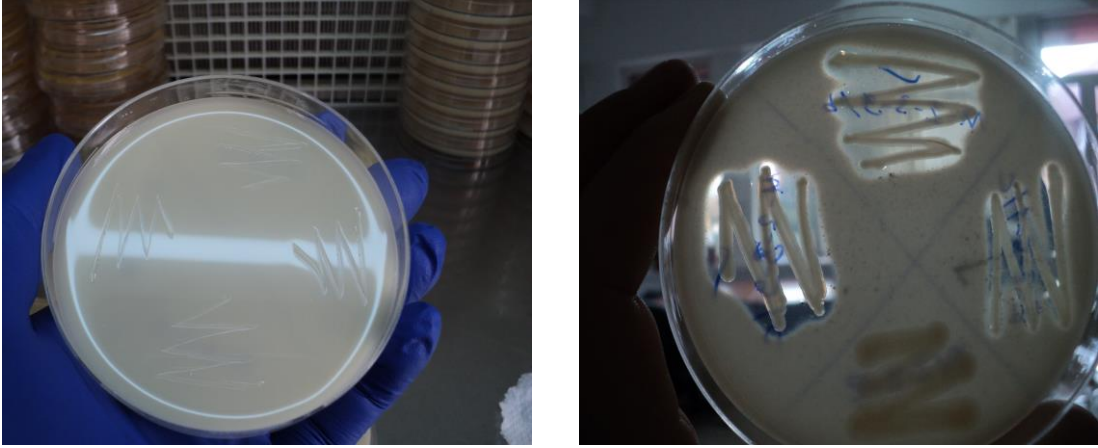
Küsek (2007) tarafından yapılan çalışmada da, elde ettikleri 47 adet izolatın tamamının koyu mor renk oluşturarak pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir.



Şekil 4.3. Elde edilen izolatlarda Oksidaz Testi uygulaması

#### 4.4.3. PDA+CaCO<sub>3</sub> Besi Yerinde Asit Temizleme

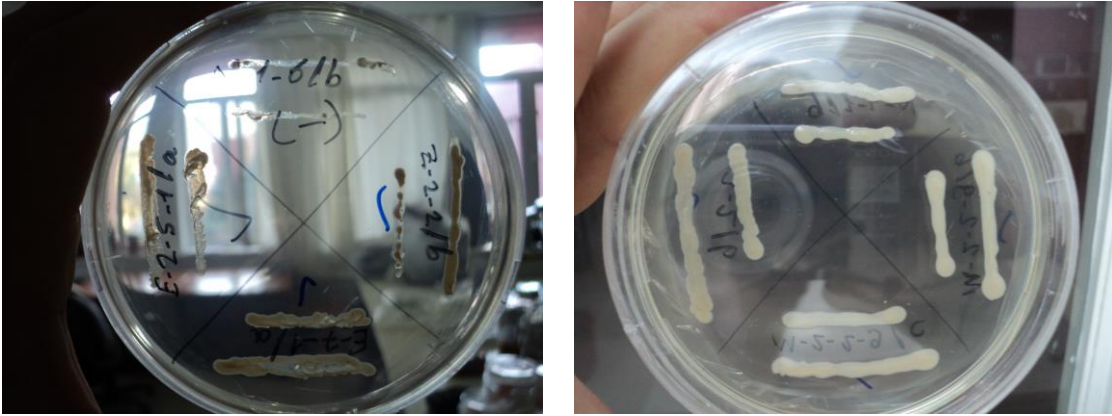
Çalışmada elde edilen 148 izolat ile yapılan PDA+CaCO<sub>3</sub> Besi Yerinde Asit Temizleme testinde 54 izolatta (% 36,48) besi yerinde saydamlaşma gözlenmiş olup, 54 izolat pozitif olarak belirlenmiştir. Bu durum izolatların gelişirken salgıladıkları asitlerden kaynaklanmaktadır. Çalışmada 94 izolat ise besi yerinde saydamlaştırma oluşturmadığından negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5; Şekil 4.4).



Şekil 4.4. PDA+CaCO<sub>3</sub> Besi Yerinde Asit Temizleme testinde belirlenen saydamlaşma

#### 4.4.4. %2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme

Örneklerden elde edilen 150 izolat %2 NaCl içeren besiyerinde 2 gün inkübe edilmiş olup, iki izolat hariç (e-6-5-a; t-1-1-c) 148 izolat besiyerinde gelişmiştir (Çizelge 4.5; Şekil 4.5). Benzer bir çalışma Küsek (2007) tarafından yapılmış olup, çalışmada elde edilen 47 izolatın 3'ü dışında tümü katı %2 NaCl içeren besiyerinde gelişmiştir.

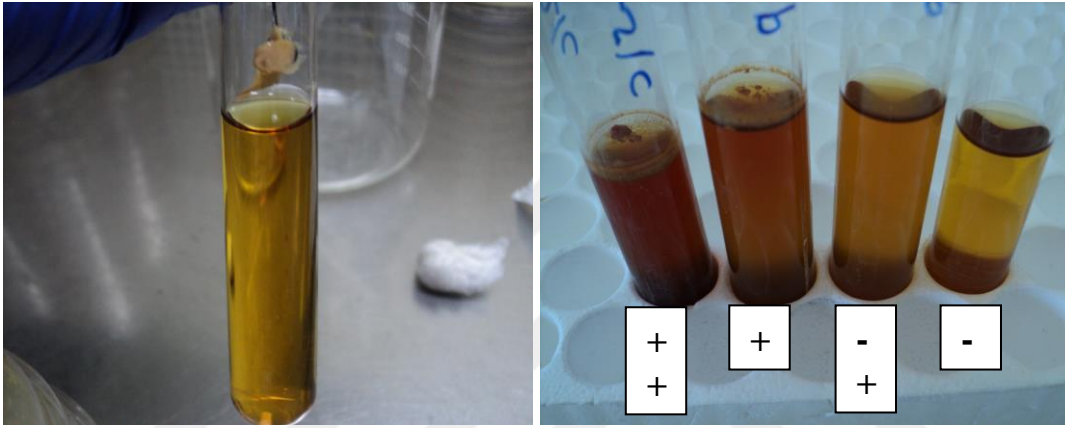


Şekil 4.5. Elde edilen izolatlar ile yapılan testte NGA besiyerinde gelişim görülen izolatlar



#### 4.4.5. Demir Amonyum Sitrat Kullanımı

Yapılan testte, tüp içinde koyu kiremit rengi ve üstü kaymak tabakası oluşturan izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5; Şekil 4.6). Örneklerden elde edilen 123 izolatla yapılan Demir Amonyum Sitrat test sonucunda 93 örneğin pozitif sonuç verdiği (%76) gözlemlenmiştir. Kontrol uygulamasında tüp içerisinde besi yeri daha açık renkte olup negatif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6. Demir Amonyum Sitrat kullanımı testi

(-)=Kontrol; (- +): negatif sonuç veren örnek; (+): orta seviyede pozitif sonuç veren örnek;  
(++): kuvvetli pozitif sonuç veren örnek

#### 4.4.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *Agrobacterium* spp. izolatlarının tanılanması

Hastalıklı dokulardan izole edilen ve klasik tanı ile tanılanan 120 adet *Agrobacterium* spp. izolatı ile Prim A: 5'-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT-3' ve Prim C: 5'-TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA-3' primerleri kullanılarak PCR çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda 120 izolattan 43 tanesinin %1'lik agaroz jel üzerinde 224 bp büyüklüğünde bantlar oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.7.). *Agrobacterium* spp. izolatları ile yapılan PCR çalışmasının sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Asmalardan izole edilen *Agrobacterium* spp. izolatlarına uygulanan klasik bakteriyolojik test sonuçları ve PCR testi sonuçları

Bağın Kodu	İzolat Kodu	Gram Reaksiyonu	Oksidaz testi	Demir Amonyum sitrat kullanımı	%2'lik NaCl'de gelişme	PDA+CaC O3 besi yerinde asit temizleme	PCR
E1	e-1-2-c	-	+		+	-	
E1	e-1-5-a	-	+	ZY	+	-	
E1	e-1-5-b	-	+	O	+	-	+
E1	e-1-2-b	-	+	K	+	+	
E1	e-1-2-a	-	+	O	+	-	
E2	e-2-1-d	-	+	ZY	+	+	
E2	e-2-1-c	-	+	ZY	+	+	
E2	e-2-1-b						
E2	e-2-1-b						
E3	e-3-1-c	-	+	O	+	+	
E3	e-3-2-a	-	+		+	-	
E3	e-3-1-a	-	+		+	-	
E3	e-3-1-b	-	+		+	-	
E4	e-4-2-a	-	+	ZY	+	+	
E4	e-4-2-b	-	+	ZY	+	-	
E4	e-4-1-b	-	+	O	+	+	
E4	e-4-8-a	-	+	O	+	+	
E4	e-4-8-b	-	+	O	+	+	
E4	e-4-8-c	-	+	O	+	-	
E5	e-5-2-a						+
E5	e-5-1-a	-	+	O	+	-	
E6	e-6-1-a	-	+		+	-	
E6	e-6-2-a	-	+	ZY	+	-	+
E6	e-6-2-b	-	+		+	-	
E6	e-6-5-a	-	+	O	-	-	
E6	e-6-5-b	-	+	ZY	+	-	
E7	e-7-1-a	-	+	ZY	+	-	+
E8	e-8-2-a	-	+	O	+	+	+
E8	e-8-2-b	-	+		+	+	
E8	e-8-2-c	-	+	ZY	+	+	
E8	e-8-1-a	-	+	O	+	+	+
E8	e-8-1-b	-	+		+	+	
E9	e-9-4-d						
E9	e-9-6-a	-	+	K	+	-	
E9	e-9-6-b	-	+	ZY	+	-	
E9	e-9-6-c	-	+	K	+	-	
E9	e-9-2-d	-	+	K	+	+	
E9	e-9-4-c	-	+	K	+	+	
E9	e-9-2-b	-	+	K	+	+	
E9	e-9-4-a	-	+	K	+	+	

**Çizelge 4.5.** (devamı) Asmalardan izole edilen *Agrobacterium* spp. izolatlarına uygulanan klasik bakteriyolojik test sonuçları ve PCR testi sonuçları

Bağın Kodu	İzolat Kodu	Gram Reaksiyonu	Oksidaz testi	Demir Amonyum sitrat kullanımı	%2'lik NaCl'de gelişme	PDA+CaC O3 besiyerinde asit temizleme	PCR
E9	e-9-4-b	-	+	K	+	+	
E10	e-2-1-9-a	-	-	K	+	+	
E10	e-2-1-9-b	-	-	O	+	+	
E10	e-2-1-6-a	-	+	K	+	+	
E10	e-2-1-6-b	-	+	K	+	+	
E10	e-2-1-7-b		+	ZY	+	-	
E10	e-2-1-7-a	-	+	O	+	+	
E11	e-2-2-9-a	+	+	O	+	+	
E11	e-2-2-9-b	-	+		+	-	
E11	e-2-7-2						
E11	e-2-7-2						
E12	e-2-3-9-a						
E12	e-2-3-3	-	+		+	-	+
E12	e-2-3-2-b	-	+	O	+	-	
E12	e-2-3-4-a	-	+	ZY	+	-	+
E12	e-2-3-4-b	-	+	ZY	+	-	
E12	e-2-3-4-c	-	+	ZY	+	-	+
E12	e-2-3-4-d	-	+	ZY	+	-	
E14	e-2-5-1-a	-	+	ZY	+	+	+
E14	e-2-5-1-b	-	-	O	+	+	+
E14	e-2-5-1-c	-	+	K	+	+	+
M1	m-1-6-b						+
M2	m-2-4-a	-	+	K	+	-	
M3	m-2-1-2-b	-	+	O	+	-	
M3	m-2-1-2-c	-	+	O	+	-	+
M3	m-2-1-2-a	-	+	O	+	-	+
M4	m-2-2-9-a	-	+	O	+	-	
M4	m-2-2-9-b	-	+	K	+	-	
M4	m-2-2-9-c	-	+	O	+	-	
M4	m-2-2-10-a	-	+	O	+	-	+
M4	m-2-2-10-b	-	+	K	+	-	+
M4	m-2-2-7-b	-	-	K	+	+	
M4	m-2-2-7-c	-	+		+	-	
M5	m-2-3-6-b	-	+	K	+	+	
M5	m-2-3-9-a	-	-	ZY	+	+	
M5	m-2-3-9-b	-	+	O	+	-	
M5	m-2-3-9-c	-	+	O	+	+	+
M5	m-2-3-6-a	-	+		+	-	
N1	n-1-9-a	-	+	K	+	-	
N1	n-1-9-b	-	+	K	+	-	

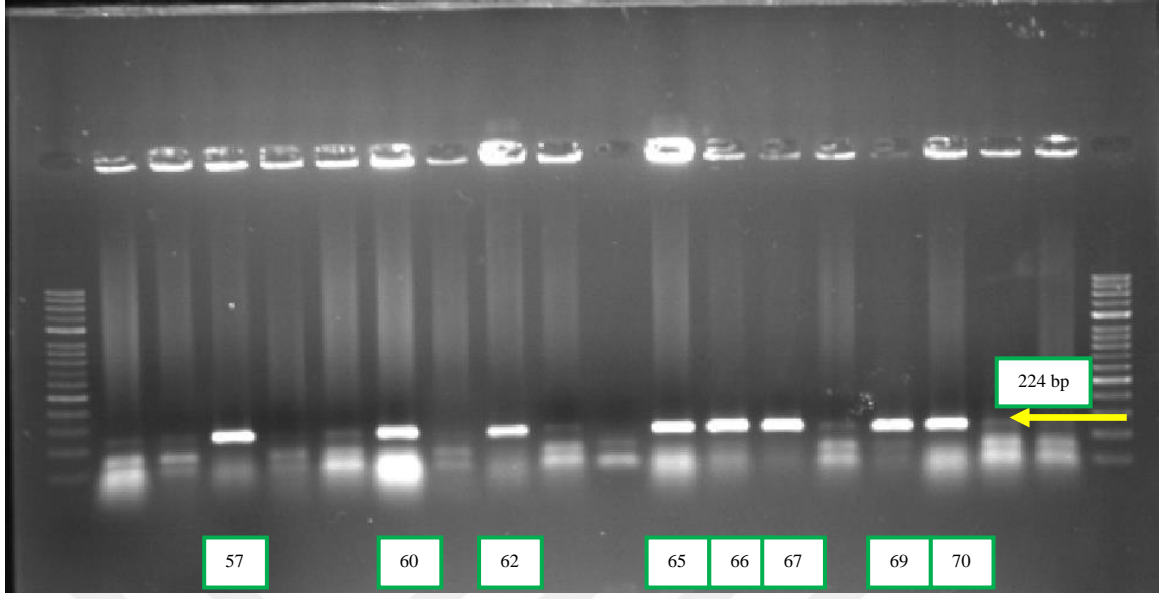
**Çizelge 4.5.** (devamı) Asmalardan izole edilen *Agrobacterium* spp. izolatlarına uygulanan klasik bakteriyolojik test sonuçları ve PCR testi sonuçları

Bağın Kodu	İzolat Kodu	Gram Reaksiyonu	Oksidaz testi	Demir Amonyum sitrat kullanımı	%2'lik NaCl'de gelişme	PDA+CaC O3 besisi yerinde asit temizleme	PCR
N1	n-1-6-b	-	+	O	+	-	
N1	n-1-6-a	-	+		+	-	
N1	n-1-5	-	+		+	-	
N1	n-1-1-a	-	+	O	+	-	
N1	n-1-1-b	-	+	O	+	+	
N1	n-1-1-c	-	+	O	+	+	
N1	n-1-6-a	-	+		+	-	+
N1	n-1-6-b	-	+		+	-	+
N2	n-2-1-a	-	+		+	+	
N2	n-2-1-b	-	+	K	+	+	
N2	n-2-1-c	-	+		+	-	
N2	n-2-3-a	-	+	O	+	-	
N2	n-2-3-b	-	+	O	+	-	+
N2	n-2-5-a	-	+	O	+	-	+
N2	n-2-5-b	-	+	K	+	-	+
N3	n-3-6-a	-	-	O	+	+	
N3	n-3-6-b	-	-	O	+	+	
N3	n-3-4	-	+	O	+	-	+
N3	n-3-2-a	-	+	O	+	+	
N3	n-3-2-d	-	+	ZY	+	+	
N3	n-3-2-b	-	+	ZY	+	-	+
N3	n-3-2-c	-	+	ZY	+	+	
N4	n-4-2-a	-	+	O	+	-	
N4	n-4-2-b	-	+	K	+	-	+
N4	n-4-4-a	-	+	ZY	+	-	
N4	n-4-4-b	-	+	ZY	+	-	+
N4	n-4-3-b	-	+	O	+	+	+
N4	n-4-3-a	-	+	K	+	-	+
N4	n-4-3-c	-	+	O	+	-	
N6	n-2-2-9	-	+	K	+	+	
P1	p-1-5-a	-	+		+	-	
P1	p-1-5-b	-	+	K	+	-	
P1	p-1-5-c	-	+	O	+	-	
T1	t-1-2-a	-	+		+	-	
T1	t-1-2-b	-	+	O	+	+	
T1	t-1-1-a	-	+	O	+	-	+
T1	t-1-1-b	-	+		+	-	
T1	t-1-1-c	-	+	O	-	-	
T2	t-2-1-a	-	+	K	+	-	+
T2	t-2-1-b	-	+	O	+	-	+
Z1	z-1-1-d	-	+		+	-	

**Çizelge 4.5.** (devamı) Asmalardan izole edilen *Agrobacterium* spp. izolatlarına uygulanan klasik bakteriyolojik test sonuçları ve PCR testi sonuçları

Bağın Kodu	İzolat Kodu	Gram Reaksiyonu	Oksidaz testi	Demir Amonyum sitrat kullanımını	%2'lik NaCl'de gelişme	PDA+CaC O3 besiyerinde asit temizleme	PCR
Z1	z-1-1-a	-	+	ZY	+	-	
Z1	z-1-1-b	-	+		+	-	
Z1	z-1-1-c	-	+		+	-	+
Z1	z-1-2-a	-	+	ZY	+	-	
Z1	z-1-2-b	-	+		+	-	+
Z2	z-2-5-a	-	+	K	+		
Z2	z-2-2-b	-	+	ZY	+		
Z2	z-2-2-c	-	+	ZY	+	-	
Z2	z-2-2-a	-	+	K	+	-	+
Z2	z-2-2-d	-	+	K	+	-	
Z2	z-2-5-b	-	+	ZY	+	-	+
Z2	z-2-3-a	-	+	O	+	-	+
Z2	z-2-3-b	-	+	O	+	-	+
Z2	z-2-4-a	-	+	O	+	-	
Z2	z-2-4-b	-	+	O	+	-	+
Z3	z-3-2-a	-	+	K	+	-	
Z3	z-3-2-b	-	+	K	+	+	
Z3	z-3-2-c	-	+	K	+	+	
Z3	z-3-1-a	-	+	O	+	+	
Z3	z-3-1-b	-	-	O	+	+	
Z3	z-3-1-c	-	+	K	+	+	
Z3	z-3-1-d	-	-	K	+	+	
Z3	z-3-3-a	-	+	K	+	-	
Z3	z-3-3-b	-	+	O	+	+	+
Z4	z-4-1-a	-	+		+	-	
Z4	z-4-1-b	-	+		+	+	+
Z4	z-4-1-c	-	+	K	+	+	+
Z5	z-5-5-a	-	+		+	-	
Z5	z-5-5-b	-	+		+	-	
Z5	z-5-3-a			O	+	+	
Z6	z-2-2-1-b	-	+		+	-	
Z6	z-2-2-2-b			ZY	+	-	
Z9	z-2-5-2-a	-	+	K	+	-	
Z9	z-2-5-2-b	-	+	K	+	+	
Z12	z-2-8-5-a	-	+	O	+	-	+
Z12	z-2-8-5-b	-	+	K	+	-	
Z12	z-2-8-5-c	-	+	O	+	-	

\*E: Erbaa, N: Niksar, Z: Zile, T: Turhal, P: Pazar, K:kuvvetli, O: Orta kuvvetli, ZY: Zayıf



**Şekil 4.7.** PCR testinde 224 bp lik bant oluşturan izolatlar

(57: e-7-1-a; 60: n-1-6-a; 62: n-2-3-b; 65: z-2-8-5-a; 66: m-1-6-b; 67: n-4-4-b; 69: z-4-1-b; 70: z-2-4-b)

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde ve dünyada bağlarda en önemli hastalıklardan bir tanesi *Agrobacterium vitis*'tir. Tokat ili ekolojisi bağ kanser için uygun koşullara sahip olup, bağ üreticileri de bağ kanseri konusunda yeterli bir bilgiye sahip değildir. Tokat ilinde özellikle salamura asma yaprak kalitesi ve kaliteli beyaz şaraplık bir üzüm çeşidi olan Narince üzümünden elde edilen gelir, bölge için son derece önemlidir. Bölgede bağcılık son yıllarda hızlı bir şekilde gelişmeye devam etmekte, Narince ülkemizde fidanı en fazla üretilen ikinci çeşit konumuna gelmiştir. Bölgede önemli bir sektör olan bağ alanlarında *Agrobacterium* spp.'nin tanınması, bölgedeki yoğunluğunun ortaya konulması, sürdürülebilir bir üretim için son derece önemlidir.

Bu çalışma ile;

\*Tokat Merkez, Erbaa, Zile, Niksar, Pazar ve Turhal ilçesinde bulunan 238 bağda Haziran ve Ağustos olmak üzere iki dönemde survey çalışması yapılmıştır.

\*İki dönemde 23 köydeki 42 bağdan toplam 297 adet ur örneği alınmıştır.

\*Hastalıklı omcalardaki urlu dokulardan toplam 150 adet patojen bakteri izolatu elde edilmiştir.

\* Klasik bakteriyolojik tanılama teknikleri ve PCR analizi testlerine göre 43 tane izolat *Agrobacterium* spp. olarak tanınmıştır.

\*Hastalıklı asmaya en fazla Turhal ilçesinde rastlanılmıştır.

Bölgede yeni tesis edilen bağlara dikilecek fidanların *Agrobacterium* spp. açısından sıkı kontrolü yapılmalı, bağ üreticilerinin budama ve zirai mücadele konusunda daha bilinçli hareket etmeleri sağlanmalıdır. Bölgede potasyumlu gübreleme fazla yapılmamakta olup, mutlaka potasyumlu gübrenin ihmal edilmemesi için üreticiler bilgilendirilmelidir.

## KAYNAKLAR

- Abdellatif, E., Valentini, F., Janse, J.D., Bourri, M., Rhouma, A., Chebil, S., D'Onghia, A.M., 2013. Occurrence of crown gall of the grapevine in Tunisia and characterization of Tunisian *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* strains. *Journal of Plant Pathology*, 115-126.
- Abolmaaty, A., Vu, C., Oliver, J., Levin, R.E., 2000. Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios* 101, 181-189.
- Ağaoğlu, S., Çelik, H., Çelik, M., Fidan, Y., Güllen, Y., Günay, A., Halloran, N., Koksal, Y., Yanmaz, R., 1997. Genel Bahçe Bitkileri. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Eğitim Araştırma Ve Geliştirme Vakfı Yay. No: 4, Ankara.
- Alleweldt, G., Passingham, P.V., 1988. Progress In Grapevine Breeding. *Theoretical And Applied Genetic*, 75; 669-673.
- Altınparmak, S., Baştaş, K.K., 2011. Konya İlinde Yaygın Olarak Yetiştirilen Asma Çeşitlerinde Bakteriyel Taç Uru (*Agrobacterium vitis*)'nun Tanılanması Üzerine Araştırmalar. *Selçuk Tarım Ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(1), 115-124.
- Anonim, 2012. Tokat tarım İl Müdürlüğü bitkisel üretim kayıtları
- Anonim, 2015. Tokat tarım İl Müdürlüğü bitkisel üretim kayıtları
- Anonim, 2016a. <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf>, Erişim tarihi: 1 Mayıs 2016
- Anonim, 2016b. [www.mgm.gov.tr](http://www.mgm.gov.tr). Tokat ili uzun yıllar iklim verileri.
- 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 Bil. Enstitüsü. 84s.
- Argun, N., Momol, M.T., Maden, S., Momol, E.A., Reid, C.L., Çelik, H., Burr, T.J., 2002. Characterization Of *Agrobacterium vitis* Strains isolated From Turkish Grape Cultivars In The Central Anatolia Region.
- Benlioğlu, K., Özakman, M., 1998. Bağ üretim materyalinde kök uru etmeni *Agrobacterium tumefaciens*'in saptanması. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, 167-174.
- Bouzar, H., Moore, L.W. 1987. Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass prairie. *Appl Environ Microbiol* 53, 717-721
- Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L., 1987. Population Of *Agrobacterium* İn Vineyard And Nonvineyard Soil S And Grape Roots İn Vineyards And Nurseries. *Plant Disease*, 71, 617-620.
- 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., 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.
- Burr, T.J., Reid, C.L., Spittstoesser, D.F., Yoshimura, M., 1996. Effect of heat treatments on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis* in vitro and in dormant grape cuttings. *Am. J. Enol. Vitic.*47:119-123.
- 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.
- Cangi, R., Kaya, C., Kılıç, D., Yıldız, M., 2005. Tokat Yöresinde Salamuralık Asma Yaprak Üretimi, Hasad Ve İşlemede Karşılaşılan Sorunlar Ve Çözüm Önerileri. 6. Ulusal Bağ. Sempozyumu, Bildiri Kitabı (2005), Cilt:2, 632-640, Tekirdağ, 19-23 Eylül 2005.
- Canik, D., Basım, H., Ertunç, F., 2011. Türkiye Bağ Alanlarından Elde Edilen *Rhizobium Vitis* İzolatlarının Biyokimyasal ve Moleküler Olarak İncelenmesi. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş.
- Cavara, F., 1897. Tubercolosi Della Vite. Intorno Alla Eziologia De Alcune Malattie Di Pianta Colvivate. *Stazoni Sperimentali Agrarie Italiane*,30,483487
- Conn, H. J., 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bacteriol.* U.353-360.
- Çelik, H., Ağaoğlu, Y.S., Fidan, Y., Marasalı, B., Söylemezoğlu, 1998. Genel Bağcılık. Sunfidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi: 1, 253 S. Ankara.
- Çelik, H., Marasalı, B., Söylemezoğlu, G., Tangolar, S., Gündüz, M., 2000. Bağcılıkta Üretim Hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği V.Teknik Kongresi Bildirileri, Ankara, (Çilt 2), 645-678.
- Çelik, H., Kunter, B., Söylemezoğlu, G., Ergül, A., Çelik, H., Karataş, H., Özdemir, G., Atak, A., 2010. Bağcılığın Geliştirilmesi Yöntemleri Ve Üretim Hedefleri, Tzm Vii. Teknik Kongresi 11-15 Ocak, 2010. Ankara 493-513.S.
- Çelik, H., 2012. Türkiye Bağcılığı Ve Asma Fidanı Üretimi-Dış Ticareti İle İlgili Stratejik Bir Değerlendirme. *Türktob (Türkiye Tohumcular Birliği) Dergisi*, Yıl:1, Sayı: 4, Sayfa: 10-16, Ankara
- 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.
- Elena, V.D., 2016. The Effect of Treatments with Garlic Tincture on Crown Galls of Grape. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 21, No. 1.
- Ergönül, O., Öztürk, L., 2015. Bazı Asma (*Vitis vinifera* L.) Çeşit Ve Anaç Klonlarının Termoterapi Ve Meristem Kültürü İle Virüslerden Arındırılması. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 16(2).

- Eşitken, A., Pırlak, L., Kara, Z., Bayramoğlu, Z., Sabır, A., 2012. Konya ili meyvecilik ve bağcılık eylem planı". T.C. Mevlana Kalk. Ajansı Konya, 81s.
- FAO, 2015. [www.faostat.org](http://www.faostat.org). Erişim tarihi 5 Mayıs 2016
- Genov, I., Atanassov, I., Tsvetkov, I., Atanassov, A., 2015. Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, *V. vinifera* ssp. *silvestris*. VITIS-Journal of Grapevine Research, 45(2), 97.
- 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
- Hedgecock, C.G., 1910. Field studies of the crown-gall of the grape. U.S. Dep. Agric. Bur. Plant Ind. Bull. 183.
- Ignatov, A., Khodykina, M.V., Vinogradova, S.V., Polityko, V.A., Kornev, K.P., Mazurin, E.S., 2015. First Report of *Agrobacterium vitis* Causing Crown Galls of Wine Grape in Russia. Plant Disease.
- Kerr, A. Panagopoulos, C.G., 1977. Biotypes Of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and Their Biological Control. Phytopathologische Zeitschrift, 90, 172-179.
- Khalif, M., 2006. Characterization and Biocontrol of Crown Gall Disease in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 2 (3), 265-273.
- Kılıç, D., Cangi, R., Kaya, C., 2007. Tokat'ta Üzümün Değerlendirilmesi Ve Üzümünden Elde Edilen Ürünler 5. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi (2007), Kongre Kitabı, Cilt 2: 345-348, Erzurum, 4-7 Eylül 2007.
- 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.
- 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 oxidase reaction. Nature (London), 178,703.
- Küsek, M., 2007. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Ura Neden Olan *Agrobacterium vitis*'in Tanınması Ve Mücadele Olanaklarının Araştırılması Çukurova Üniversitesi Fen Bil Enst, Doktora Tezi, 96 S.
- Lehoczky, J., 1968. Spread Of *Agrobacterium tumefaciens* In The Vessels Of The Grapevine, Afternational Infection. Jour. Of Phytopathology, 63, 239- 246.
- Lehoczky, J., 1971. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. Vitis 10:215-221.
- Lehoczky, J., 1978. Root-system of the grapevine as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bact.

Angers 239-243

- Liang, Y., Di, Y., Zhao, J., Ma, D., 1990. A Biotype 3 Strain Of *Agrobacterium radiobacter* Inhibits Crown Gali Formation .
- Malenin, L., 1970. Etude de la propagation del'*Agrobacterium tumefaciens* le long des vaisseaux de bois de la vigne et la formation de tumeurs secondaires. *Gradinaradka I Lozarska Nauka (Sofia)* 7:127-135.
- Mohammadi, M., Fatehi-Paykani, R., 1999. Phenotypical characterization of Iranian isolates of *Agrobacterium vitis*, the causal agent of crown gall disease of grapevine. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 38(3),115-121.
- Moore, L. W., Bouzar, H., Burr, T., 2001. Gram-negative bacteria, *Agroba cterium*. (N. W. Schaad, J. B. Jones, W. Chun editor).Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, ThirdEdition, APS Press. ST. Paul, Minnesota, S 17-35.
- Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S.N.A., Vadamalai, G. ve Dickinson, M, 2009. Molecular characterization of a phytoplasma associated with Coconut Yellow Decline (CYD) in Malaysia. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (7), 1331-1340.
- 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.
- 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., Sasser, M., 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype-3. In *Phytopathology* (Vol. 73, No. 5, pp. 810-810). 3340 Pilot Knob Road, St Paul, Mn 55121: Amer Phytopathological.
- Salomone, J.Y., Crouzet, P., De Ruffray, P., Otten, L., 1996. Characterization And Distribution Of Tartarate Utilization Genes In Thegrapevine Pathogen *Agrobacterium vitis*. *Molacular Plant-Microbe Interaction*, 9, 401-408.
- Schroth, M.N., Mccham, A.H., Foott, J.H., Huisman, O.C., 1988. Reduction In yield And Vigor Of Grapevine Caused By Crown Gali Disease. *Plant Disease*, 72, 241-246.
- Smith, E.F., Townsend, C.O., 1907. A Plant Tumor Of Bacterial Origin. *Science*, 25, 671-673.
- Sule, S., Burr, T.J., 1998. The Effect Of Resistance Of Rootstocks To Crown Gall (*Agrobacterium* Spp.) On The Susceptibility Of Scions In Grape Vinecultivars. *Plant Pathology*, 47, 84-88.
- Stewart, E.L., Wenner, N.G., Long, L., Overton, B., 2014. Crown Gall Of Grape: Understanding The Disease, Prevention And Management

[Http://Plantpath.Psu.Edu/Research/Faculty-Labs/Grapes/Publications/Disease-Fact-Sheets/Crown-Gall-Grape.Pdf](http://Plantpath.Psu.Edu/Research/Faculty-Labs/Grapes/Publications/Disease-Fact-Sheets/Crown-Gall-Grape.Pdf).

- Topçu, N., Sucu, S., Cangi, R., Yağcı, A., Kılıç, D., 2015. Tokat Bölgesinde Yetiştirilen Narince Üzüm Çeşidinde 2012 Kış Soğuklarının Yol Açtığı Zararlar. Selçuk Tarım Ve Gıda Bilimleri Dergisi A-419.
- Ünal, A., Özer, C., Karahan, A., Söylemezoğlu, G., 2012. Ülkemizde Yetiştiriciliği Yapılan Ekonomik Öneme Sahip Bazı Üzüm Çeşit Ve Amerikan Asma Anaçları İle Klonlarının Virüsler Ve *Agrobacterium vitis* Yönünden Arındırılması, Tanımlanması Ve Yeni Üzüm Çeşitlerinin Geliştirilmesi, Tübitak 1007 Proje Sonuç Raporu.
- Usanmaz, H., 2012. Asma Uru Etmenine Karşı Biyolojik Mücadele Etmenlerinin Toprakta İzolasyonu. K.S.İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 46 S.

## **EK-A**

### **King B Besi Yeri (King ve ark., 1954)**

Proteose Peptone	20 g
Gliserin	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.5 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 20 dakika otoklav edilmiştir	

### **Nutrient Glikoz Agar Besi Yeri**

Nutrient agar	13 g
Glikoz	1 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir	

### **Patates Dekstroz Agar+CaCO<sub>3</sub> (PDA+ CaCO<sub>3</sub>)**

Patates dekstroze agar	39 g
CaCO <sub>3</sub>	5 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir	

### **Demir Amonyum Sitrat Besi Yeri**

Demir Amonyum Sitrat	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
CaCl <sub>2</sub>	0.2 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir	

### **Nutrient Broth Sıvı Besi Yeri**

Nutrient Broth	8 g
Distile Su	1000 ml
121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.	

## **EK-B**

### **CTAB (Cetyl Trimethylammonium Bromide)**

100 ml buffer için;	
1 M Trisbase pH:7,5	10 ml
5 M NaCl	14 ml
0,5 M Edta pH:8,0	10 ml
CTAB	1 g
14 M Beta Merkптоethanol (BME)	1 ml
dH <sub>2</sub> O	65 ml

### **10XTE Buffer**

Tris-HCl pH:8,0	12.1 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O pH:8,0	3.7 g L <sup>-1</sup>

### **%1'lik Agarose Jel (Küçük Boy-37 ml)**

Agarose	0.37 g
5xTBE	7.4 ml
dH <sub>2</sub> O	29.6 ml
Ethidium bromide	4 ml

Ethidium bromide dışındaki tüm malzemeler karıştırılır, mikrodalgada eritilir, en son Ethidium bromide eklenerek tarakları ayarlanmış jel tepsisine dökülür.

### **Lysis Buffer**

100 ml buffer için;	
1 M Trisbase pH:7,5	10 ml
10x Triton	2 ml
Sodium azide	0.25 g
dH <sub>2</sub> O	88 ml

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Hacı DURAK  
Doğum Tarihi ve Yer : 28/03/1990 YOZGAT  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon :5342416145  
e-mail :hacix\_66@hotmail.com

### EĞİTİM

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü	2013
Lise	Çekerek Çok Programlı Lisesi Yozgat	2007