

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Mustafa KÜSEK

**ASMADA (*Vitis vinifera* L.) URA NEDEN OLAN *Agrobacterium vitis*'İN
TANILANMASI VE MÜCADELE OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2007

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASMADA (*Vitis vinifera* L.) URA NEDEN OLAN *Agrobacterium vitis*'İN
TANILANMASI VE MÜCADELE OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Mustafa KÜSEK
DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 28.02.2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Prof. Dr. Özden ÇINAR	Prof. Dr. Hikmet SAYGILI	Prof. Dr. Mehmet BİÇİCİ
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

İmza.....	İmza.....
Doç. Dr. Yeşim AYSAN	Yrd. Doç. Dr. Soner SOYLU
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi ve TUBİTAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2005D1, ZF2005KAP10 (Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi) ve 105O007 (TUBİTAK)

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

ASMADA (*Vitis vinifera* L.) URA NEDEN OLAN *Agrobacterium vitis*'İN TANILANMASI VE MÜCADELE OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Mustafa KÜSEK

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Özden ÇINAR

Yıl : 2007, Sayfa: 103

Jüri : Prof. Dr. Özden ÇINAR

Prof. Dr. Hikmet SAYGILI

Prof. Dr. Mehmet BİÇİCİ

Doç. Dr. Yeşim AYSAN

Yrd. Doç. Dr. Soner SOYLU

Bu çalışmada Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde bulunan bağ alanları incelenmiş ve hastalıklı bitkilerden örnek alınmıştır. Mersin, Gaziantep, Hatay, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde hastalıklı asma bitkilerindeki urlu dokulardan toplam 47 adet ur oluşturan patojen bakteri izole edilmiştir. Klasik bakteriyolojik tanılama teknikleri, PCR, yağ asit analizi ve patojenite testlerine göre izole edilen tüm izolatlar *Agrobacterium vitis* olarak tanılanmıştır. Patojenite testlerinde, tüm izolatlar bağda ur oluştururken, 7 izolat domatestte (*Lycopersicum esculentum* Mill. cv. Heinz 2274) ve 8 izolat kalonşe (*Bryophyllum daigremontianum* (Raym.-Hamet & E.P. Perrier) Berger) bitkilerinde ur oluşturmamıştır.

Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep ve Kahramanmaraş illerinde bulunan bağ alanlarından asma bitkisi büyümesini teşvik eden rizobakterileri (PGPR) izole etmek için 39 toprak örneği alınmıştır. Toprak örneklerinden 464 adet bakteri izole edilmiştir. Katı NBRIP besi yeri kullanılarak bu bakteri izolatlarından 63'ünün fosforu çözdüğü belirlenmiştir. Nicel olarak izolatların fosforu çözme miktarı belirlenmiş ve en yüksek fosfor çözen 10 izolat seçilerek saksı çalışmalarında kullanılmıştır. Saksı çalışması ile Ga7/3-6 (%45), Ga10/2-5 (%97), Os1/3-1 (%80), OsD1/3-1 (%98) ve HaD6/3-1 (%75) izolatlarının asmada ur ağırlığını önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir. *A. vitis* izolatından elde edilmiş lipopolisakkarid (LPS)'lerin asma çubuklarına 10 g/l konsantrasyonda infiltre edildiğinde ur büyüklüğünü %91,5 oranında azalttığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bağ, LPS, ur, *Agrobacterium vitis*, PGPR

ABSTRACT

PhD THESIS

IDENTIFICATION OF GRAPE CROWN GALL DISEASE CAUSED BY <i>Agrobacterium vitis</i> AND RESEARCH ON POSSIBLE CONTROL OF THE DISEASE
--

Mustafa KÜSEK

**UNIVERSITY OF ÇUKUROVA
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

Supervisor : Prof. Dr. Özden ÇINAR

Year : 2007 Page: 103

Jury : Prof. Dr. Özden ÇINAR

Prof. Dr. Hikmet SAYGILI

Prof. Dr. Mehmet BİÇİCİ

Associate Prof. Dr. Yeşim AYSAN

Assistant Prof. Dr. Soner SOYLU

In this study vineyards in Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adiyaman and Kahramanmaraş provinces were surveyed and infected plant samples by crown gall agent were collected. Infected plants were recorded in vineyards of Mersin, Gaziantep, Hatay, Adiyaman and Kahramanmaraş provinces. Forty-seven tumorigenic bacterial isolates were isolated from galls of infected plants. All isolates were identified as *Agrobacterium vitis* by classical bacteriological techniques, PCR, fatty acid analysis and pathogenicity tests on grape, tomato and kalanchoe plants. All isolates caused crown gall on grape shoots. No gall formation observed on tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill. cv. Heinz 2274) and kalanchoe (*Bryophyllum daigremontianum* (Raym.-Hamet & E.P. Perrier) Berger) plants by seven and eight isolates, respectively.

Totally 464 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) were isolated from 39 soil samples collected from vineyards of Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep and Kahramanmaraş. Sixty-three candidates PGPR isolates solubilized phosphorus on solid NBRIP medium. Ten candidate PGPR isolates which have solubilized phosphorus with the highest ratio were used in pot experiments. PGPR isolates, Ga7/3-6 (%45), Ga10/2-5 (%97), Os1/3-1 (%80), OsD1/3-1 (%98) ve HaD6/3-1 (%75), significantly reduced galls weight on grape plants in pot experiments. When lipopolysaccharide (LPS) extracted from *A. vitis* applied to cutting grapevine, gal size was reduced by 91.5% rate.

Key words: Grape, LPS, crown gall, *Agrobacterium vitis*, PGPR

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana “Bağlarda Ura Neden Olan *Agrobacterium vitis*’in Tanılanması ve Mücadele Olanaklarının Araştırılması” konulu Doktora Tezini veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özden ÇINAR’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın tüm aşamasında bana yol gösterici ve olumlu katkılarından dolayı Doktora Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Hikmet SAYGILI ve Sayın Doç. Dr. Yeşim AYSAN’a teşekkür ederim.

Doktora çalışmam içerisinde bulunan yağ asit metil ester analizleri için Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı olanaklarından yararlanmamı sağlayan ve engin deneyimlerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN’e ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığına şükranlarımı sunarım.

Doktora çalışmam için tüm bölüm olanaklarından yararlandıran ÇÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı’na, maddi destek veren ÇÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne (Proje no: ZF2005D1 ve ZF2005KAP10) ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)’na (Proje no: TOVAG 105 O 007) en içten teşekkürlerimi sunarım.

PCR çalışmalarımı yapmamda yardımcı olan ve Viroloji laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU’na, Yrd. Doç. Dr. Muharrem KANBEROĞLU’na, Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR’a ve Arş. Gör. Gökmen KOÇ’a teşekkür ederim.

Kahramanmaraş ili bağ alanlarını incelenmesinde yardımlarını gördüğüm Kahramanmaraş Tarım İl Müdürlüğü Bitki Koruma Şube Müdürü Sayın Hüseyin GÖK’e, Gaziantep ilinde bağ alanlarını incelenmesinde yardımlarını gördüğüm Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü müdürü, Zir. Yük. Müh. Fatma VAKKASOĞLU’na ve Zir. Yük. Müh. Kamil SARP KAYA’ya, Gölbaşı (Adıyaman) bağ alanlarının incelenmesinde yardımlarını gördüğüm Gölbaşı Tarım İlçe Müdürlüğüne ve Sayın Zir. Müh. Ali ARSLAN’a ve Hatay ili bağ alanlarını incelenmesinde yardımcı olan Sayın Zir. Müh. Yusuf ÇİL’e, teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında emeği geçen değerli arkadaşlarım Dr. Mustafa MİRİK'e, Arş. Gör. Raziye ÇETİNKAYA-YILDIZ'a, Zir. Yük. Müh. Hacer TEKMAN'a, Zir. Yük. Müh. Hatice ÖRNEK'e ve Zir. Müh. Sencen ÜNLÜ'ye ve tarla denemelerim sırasında emekleriyle katkıda bulunan Bitki Koruma Bölümü Araştırma ve Uygulama Parseli çalışanlarından Talip OKUTUCU, Bekir DAL, Cemal YILDIZ'a çok teşekkür ederim.

Çalışmamın aday PGPR izolatlarının sıvı ortamda çözdüğü fosfor miktarını belirlemek için bana ÇÜ Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü'nde laboratuvarını kullanıma açan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayfer TORUN'a, laboratuvar çalışmasında yardımcı olan Halil ERDEM'e ve saksı çalışmasında kullandığım toprakların analizini yapan Sayın Arş. Gör. Ebru KARNEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam esnasında tüm zorluklara rağmen bana manevi desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen sevgili eşim Serpil KÜSEK ve kızım Sude Melek KÜSEK'e sonsuz teşekkürler dilerim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. <i>Agrobacterium</i> 'un Sınıflandırılması, İzolasyonu ve Karakterizasyonu	5
2.1.1. <i>Agrobacterium</i> 'un Sınıflandırılması	5
2.1.2. <i>Agrobacterium</i> 'un İzolasyonu ve Karakterizasyonu	6
2.2. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rhizobakteriler (PGPR)	18
2.3. Lipopolisakkaritler (LPS).....	23
2.4. Biyolojik Mücadele	25
2.5. <i>Agrobacterium</i> spp. 'nin Epidemiyolojisi	28
3. MATERYAL VE METOD	32
3.1. Materyal.....	32
3.2. Metod.....	32
3.2.1. <i>Agrobacterium vitis</i> 'in İzolasyonu	32
3.2.2. <i>Agrobacterium vitis</i> 'in Tanısı	33
3.2.2.1. Klasik Yöntemler	33
3.2.2.1.(1). PDA+CaCO ₃ Besi Yerinde Asit Temizleme	33
3.2.2.1.(2). Laktozdan 3-Ketolaktoz Üretimi	33
3.2.2.1.(3). Demir Amonyum Sitrat Kullanımı	34
3.2.2.1.(4). %2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme	34
3.2.2.1.(5). Sakkaroz ve Eritritolden Asit Üretimi	34
3.2.2.1.(6). Oksidaz Testi	34
3.2.2.1.(7). Sitrat Kullanımı	35
3.2.2.1.(8). Litmus Milkde Reaksiyon	35

3.2.2.1.(9). Malonik Asitten Alkali Oluşturma	35
3.2.2.1.(10). Mucic ve L-tartarik Asitten Alkali Oluşturma	35
3.2.2.1.(11). 35°C’de Gelişme	35
3.2.2.2. Yağ Asit Analizleri ile Bakterilerin Tanılanması.....	36
3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile <i>Agrobacterium</i> ’un Tanılanması	37
3.2.3. Patojenin Hücre Süspansiyonundaki Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	38
3.2.4. Patojenite Testi	39
3.2.5. <i>Agrobacterium vitis</i> ’in Mücadelesi ile İlgili Çalışmalar	39
3.2.5.1. Dayanıklılığı Teşvik Edici PGPR’ların İzolasyonu ve Tanısı	39
3.2.5.2. Seçilen PGPR İzolatların Antagonistik ve Siderefor Etkilerinin Belirlenmesi.....	41
3.2.5.3. Bakteriyel Lipopolisakkaritlerin (LPS) Ekstraksiyonu.....	42
3.2.5.4. Saksı Çalışması	42
4. BULGULAR VE TARTIşMA	44
4.1. <i>Agrobacterium vitis</i> ’in İzolasyonu	44
4.2. <i>A. vitis</i> ’in Tanısı	46
4.2.1. Klasik Yöntemler.....	46
4.2.1.1. PDA+CaCO ₃ Besi Yerinde Asit Temizleme	47
4.2.1.2. Laktozdan 3-ketolaktoz Üretimi	49
4.2.1.3. Demir Amonyum Sitrat Kullanımı	49
4.2.1.4. %2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme	51
4.2.1.5. Sakkaroz ve Eritritolden Asit Üretimi	51
4.2.1.6. Oksidaz Testi	51
4.2.1.7. Sitrat Kullanımı.....	52
4.2.1.8. Litmus Milkte Reaksiyon.....	53
4.2.1.9. Malonik Asitten Alkali Oluşumu.....	54
4.2.1.10. Mucic ve L-tartarik Asitten Alkali Oluşumu	54
4.2.1.11. 35°C’de Gelişme	54
4.2.1.12. Potasyum Hidroksit Testi.....	55
4.2.2. Yağ Asit Analizleri ile Bakterilerin Tanılanması	56

4.2.3. <i>Agrobacterium</i> İzolatlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	
ile Tanılanması	60
4.3. Patojenin Hücre Süspansiyonundaki Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	61
4.4. Patojenite Testi	61
4.5. <i>A. vitis</i> 'in Mücadelesi ile İlgili Çalışmalar	65
4.5.1. Dayanıklılığı Teşvik Edici Aday PGPR'ların İzolasyonu	65
4.5.2. Aday PGPR'lerin Seçimi	65
4.5.3. Seçilen PGPR İzolatlarının Siderefor ve Antagonist Etkisi	72
4.5.4. Seçilen PGPR İzolatlarının <i>A. vitis</i> 'e Karşı Etkisi.....	72
4.5.5. Bakteriyel Lipopolisakkaritlerin (LPS) <i>A. vitis</i> 'e Karşı	
Etkinliğinin Belirlenmesi.....	76
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	95
EKLER.....	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	FAO verilerine göre 2004 yılı dünyanın önemli bağ ekim alanları, üretim ve verim değerleri.....	1
Çizelge 1.2.	TÜİK verilerine göre 2004 yılı ülkemiz bağ ekim alanları, üretim ve verim değerleri.....	2
Çizelge 3.1.	Saksı çalışmalarında kullanılan toprağın kireç, fosfor ve pH değerleri	43
Çizelge 4.1.	<i>Agrobacterium</i> cinsinin biyokimyasal ve fizyolojik testler ile türlere ayrılması	46
Çizelge 4.2.	Asmalardan izole edilen <i>Agrobacterium</i> izolatlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları.....	47-48
Çizelge 4.3.	<i>Agrobacterium</i> izolatlarından elde edilen yağ asitleri, bunların bulunma oranları (%) ve bu yağ asitlere sahip olan izolat sayısı.....	57
Çizelge 4.4.	<i>Agrobacterium</i> izolatlarının oluşturduğu kümeye göre içerdikleri yağ asitlerinin oranları (%) ve izolat sayısı	58
Çizelge 4.5.	Asmalardan izole edilen <i>Agrobacterium</i> izolatlarının domates, kalonşe ve asmada ur oluşumu; (+) pozitif, (-) negatif.....	62-63
Çizelge 4.6.	İzole edilen PGPR aday bakterilerin sıvı NBRIP-BPB besi yerinde kültüre alınmasından sonra besi yerinde değişen pH, 400, 600, 680 ve 800 nm dalga boyunda absorbans değerleri ve 1 ml’de çözülmüş P miktarları	67
Çizelge 4.7.	İzole edilen PGPR aday bakterilerin katı NBRIP besi yerinde oluşturduğu koloni ve zon çapı ve P çözme indeksi	69-70
Çizelge 4.8.	Seçilen 29 izolatın katı NBRIP besi yerindeki fosfor çözme indeksi, bakterinin koloni çapı ve sıvı NBRIP besi yerinde çözülen fosfor miktarı	71
Çizelge 4.9.	Seçilen PGPR izolatların King B besi yerinde oluşturduğu koloni rengi, gram ve oksidaz testi	72

Çizelge 4.10. PGPR izolatları uygulanmış asmalarda oluşan urların sayısı, büyüklüğü ve ağırlığı	74
Çizelge 4.11. PGPR izolatları uygulanmış asmalarda 3,5 ay sonra oluşan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğu, yaş ve kuru ağırlığı	77
Çizelge 4.12. Farklı dozlarda uygulanan LPS'in asma çubuklarında ur oluşumuna etkisi	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1. Çözülebilir fosfor indeksinin hesaplanması	41
Şekil 4.1. Asmada <i>Agrobacterium</i> 'un oluşturduğu urlar: izolasyon amacıyla kullanılan yeni oluşmuş taze urlar (A, B, E, F, G, H); bir yıl önce oluşmuş yaşlı urlar (C, D)	45
Şekil 4.2. PDA+CaCO ₃ besi yerinde asit temizleme özelliği gösteren izolatlar (pozitif) (a, b, c) ve asit temizleme özelliği göstermeyen izolat (negatif) (d)	49
Şekil 4.3. Laktozdan 3-ketolaktoz üretimi; laktozu 3-ketolaktoza dönüştüren izolat (pozitif) (a, e); laktozu 3-ketolaktoza dönüştüremeyen izolat (negatif) (b, c, d, f)	50
Şekil 4.4. Demir amonyum sitrat kullanımı; a) orijinal besi yeri, b) demir amonyum sitrat kullanan izolat (pozitif), c) demir amonyum sitrat kullanamayan izolat (negatif)	50
Şekil 4.5. %2 NaCl içeren besi yerinde gelişen izolatlar (pozitif) (a, b, c) ve gelişemeyen izolat (negatif) (d)	51
Şekil 4.6. Sakkarozdan asit oluşumu sonucu oluşan renk değişimi (pozitif) (a) ve orijinal besi yeri (negatif) (b)	52
Şekil 4.7. Oksidaz testi a) negatif, b) pozitif	52
Şekil 4.8. Sitrat kullanımı; a) orijinal besi yeri, b) sitrat kullanan izolat (pozitif), c) sitrat kullanamayan izolat (negatif)	53
Şekil 4.9. Litmus milkte reaksiyon sonucu oluşan renk değişimi; a) orijinal besi yeri, b) alkali oluşumu (ALK), c) asit oluşumu (AC)	53
Şekil 4.10. Malonik asitten alkali oluşumu; a) orijinal besi yeri, b) alkali oluşturan izolat (pozitif), c) alkali oluşturmeyen izolat (negatif)	54
Şekil 4.11. L-tartarik asitten alkali oluşumu; a) orijinal besi yeri (negatif), b) alkali oluşumu (pozitif)	55
Şekil 4.12. Mucic asitten alkali oluşumu sonucu oluşan renk değişimi; a) orijinal besi yeri (negatif), b) asit oluşumu (pozitif)	56

Şekil 4.13. Potasyum hidroksit testinde gram negatif kültürlerin oluşturduğu iplik gibi uzama	56
Şekil 4.14. İzolatların yağ asit profillerine göre oluşturduğu küme	59
Şekil 4.15. PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde oluşturduğu bantlar (çukurlar: 1; 1 kb'lik marker, 2; Referans kültür S4 (<i>A. vitis</i>), 3; Referans kültür GSPB-7 (<i>A. tumefaciens</i>), 4; Referans kültür MFD-75 (<i>A. tumefaciens</i>), 5-12; Bölge izolatları, I. Primer: <i>A. vitis</i> 'e spesifik primer, II. Primer: <i>A. tumefaciens</i> 'e spesifik primer).....	60
Şekil 4.16. Fizyolojik tuzlu su içerisinde hazırlanan <i>Agrobacterium</i> izolatlarının yoğunluğunu belirlemek için ekim yapılan besi yerindeki gelişimi	62
Şekil 4.17. <i>Agrobacterium vitis</i> izolatlarının patojenite testi sonucunda domates (A) ve kalonşe (B) bitkilerinde oluşturduğu urlar.....	64
Şekil 4.18. <i>Agrobacterium vitis</i> izolatlarının patojenite testi sonucunda asmada oluşturduğu urlar.....	65
Şekil 4.19. Toprakten izole edilen aday PGPR'leri King B besi yerinde geliştirdikleri koloniler	66
Şekil 4.20. Toprakten izole edilen PGPR aday izolatların seçiminde kullanılan sıvı NBRIP-BPB besi yerinde meydana gelen renk açılması; a, b ve c) topraktan izole edilen farklı PGPR aday izolatları, d) içine bakteri inokule edilmemiş besi yeri (kontrol).....	68
Şekil 4.21. Toprakten izole edilen bakterilerin katı NBRIB besi yerinde fosforu çözmesinden dolayı oluşturduğu açık zon ve bakteri kolonisi	68
Şekil 4.22. PGPR izolatlarının <i>Agrobacterium vitis</i> 'e etkinliğinin belirlenmesi için kurulan denemenin farklı zamanlardaki genel görünümü	73
Şekil 4.23. Toprakten izole edilen farklı PGPR izolatları uygulanmış asmalarda oluşan ur sayısı, ur ağırlığı ve ur büyüklükleri.....	73

Şekil 4.24. Asmada ur oluşumuna PGPR izolatlarının etkisi.....	76
Şekil 4.25. Farklı dozlarda LPS uygulanmış asmalarda oluşan urlar:	
Kontrol (A, C) , 10 g/l dozunda LPS uygulanmış (B, D).....	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	: Asidik
AHL	: <i>N</i> -acyl-homoserine laktone
ALK	: Alkali
AT	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AT	: <i>Agrobacterium tumefaciens</i> biovar 3
BABA	: β -amino butirik asit
bp	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
CT	: Coumaroyl-tyramine
dak.	: Dakika
ddH ₂ O	: Bidestile su
dev.	: Devir
DF	: Difüze olabilir faktörün
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSF	: Difüze olabilir sinyal faktörü
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic asid
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
M	: Molarite
MIS	: Mikrobiyal Tanılama Sistemi (Microbial Identification System)
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolarite

NBRIP	: National Botanical Research Institute's phosphate growth medium
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 Sülfat-Polyacrilamid Gel Elektrophorezi
sp.	: Tür
spp.	: Türler
syn.	: Sinonim
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
T-DNA	: Tranfer Deoksiribonükleik Asit
Ti	: Tümör teşvik edici
TSA	: Tryticase Soy Agar
YDC	: Yeast Ekstrakt Kalsium Karbonat Besi Yeri
µg	: Mikro gram
µl	: Mikro litre

1. GİRİŞ

Ülkemiz, coğrafi durumu, iklim ve toprak yapısından dolayı bağcılık için dünyada en uygun yerlerden biridir. Ayrıca bağın ana vatanı olması nedeniyle önemli bir gen merkezidir.

Bağın ana ürünü olan üzüm tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sadece sofralık olarak kullanılmamakta, bununla birlikte şarap, kuru üzüm, pekmez, sirke, pestil, sucuk ve şıra olarak da kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra budama sonucu elde edilen çubukların yakacak olarak kullanılması ve yaprakları sarmalık ve salamura olarak değerlendirilmesi de diğer yararları arasında belirtilebilir (Ağaoğlu, 1986).

Ülkemiz FAO'nun 2004 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 (Çizelge 1.1) (Anonymous, 2006a).

Çizelge 1.1. FAO verilerine göre 2004 yılı dünyanın önemli bağ ekim alanları, üretim ve verim değerleri

Ülkeler	Ekim Alanı (ha)	Üretim (ton)	Verim (ton/ha)
İspanya	1.176.130	7.286.300	6,20
Fransa	851.970	7.563.360	8,88
İtalya	839.720	8.691.970	10,35
Türkiye	530.000	3.500.000	6,60
Çin	438.130	5.532.880	12,63
ABD	377.570	5.660.860	14,99
Diğerleri	3.196.110	28.161.030	8,81
Toplam	7.409.630	66.396.400	8,96

TUİK (Türkiye İstatistik Kurumu) 2004 verilerine göre 520.000 ha toplam üretim alanının; 265.000 ha'ı sofralık çekirdekli, 35.000 ha'ı sofralık çekirdeksiz, 75.000 ha'ı kurutmalık çekirdekli, 75.000 ha'ı kurutmalık çekirdeksiz ve 70.000 hektarını da şaraplık bağ alanı oluşturmaktadır. 3.500.000 ton üzüm üretiminin ise 1.500.000 tonunu sofralık çekirdekli, 400.000 tonunu sofralık çekirdeksiz, 350.000

tonunu kurutmalık çekirdekli, 880.000 tonunu kurutmalık çekirdeksiz ve 370.000 tonunu ise şaraplık üzüm üretimi oluşturmaktadır (Çizelge 1.2) (Anonymous, 2006b).

Çizelge 1.2. TÜİK verilerine göre 2004 yılı ülkemiz bağ ekim alanları, üretim ve verim değerleri

Çeşit	Ekim Alanı (ha)	Üretim (Ton)
Sofralık çekirdekli	265.000	1.500.000
Sofralık çekirdeksiz	35.000	400.000
Kurutmalık çekirdekli	75.000	350.000
Kurutmalık çekirdeksiz	75.000	880.000
Şaraplık	70.000	370 000
TOPLAM	520.000	3.500.000

Günümüzde bağcılığın gelişmesini tehdit eden pek çok hastalık ve zararlı vardır. Bunlar arasında en önemlilerinden biri de bağ uru hastalığıdır. Bağlarda genel olarak ura neden olan bakteriyel hastalık etmeni *Agrobacterium vitis* Ophel and Kerr olsa da, bu hastalık nadiren de *Agrobacterium tumefaciens* bakterisi tarafından oluşturulur. Bu hastalık etmenlerine karşı etkili bir mücadele yönteminin olmamasından dolayı, iklim koşullarının hastalık gelişimi için uygun olduğu bölgelerde, onlar önemli verim ve gelişme kayıplarına neden olmaktadır (Çelik ve ark., 2000).

Asmada ur oluşumu uzun yıllardır bilinmekle birlikte ilk defa 1897'de bir bakterinin (*Bacillus ampelopsarae*) ura neden olduğu bildirilmiştir (Cavara, 1897). Kerr ve Panagopoulos (1977) asmadan izole edilen tümörügenik bakterileri *A. tumefaciens* biovar 3 olarak sınıflandırmışlardır. Sonraki yıllarda dünyanın 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 nadir olarak asmalarda izole edilmektedir

(Knauf ve ark., 1983; Salomone ve ark., 1996; Ride ve ark., 2000; Argun ve ark., 2002).

A. vitis bağlarda sistemik olarak yayılmakta ve simptom oluşturmada yıllarca canlı kalabilmektedir. Bu nedenle kolaylıkla vejetatif üretim materyali ile yayılmakta, hastalık etmeninin varlığı ancak ur oluşumu gözlenince fark edilmektedir. 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).

Bu bakteri asma gövdesinin %50'si urla çevrelendiğinde bitki gelişiminde ve veriminde önemli azalmalara neden olmaktadır (Schroth ve ark., 1988). Bu hastalık etmenine karşı etkili bir kimyasal mücadele bulunmamakla birlikte, çiftçiler tarafından bilinçsizce ilaç kullanılmaktadır. Son yıllarda hastalık etmenine karşı biyolojik bir preperat 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 araştırmacılar hastalık etmenine karşı ilaçlı mücadeleye alternatif mücadele yöntemlerinin araştırılmasına yöneltmiştir.

Bu hastalıkla mücadelede biyolojik mücadele yöntemleri hakkında oldukça çok araştırma yapılmış olmasına rağmen, PGPR (Bitki Büyümesini Teşvik Edici Rhizobakteriler) kullanarak bitkilerde sistemik teşvik edilmiş dayanıklılık çalışmaları oldukça sınırlıdır. PGPR bakteriler birçok bitkide birçok bitki hastalığına karşı bitkilerde dayanıklılığı teşvik etmekte ve bunun yanında verimde de önemli artışlar sağlamaktadır (Weller, 1988).

Gram negatif bakterilerin hücre dışı zarını kaplayan hücre yüzeyi bileşiklerinden olan lipopolisakkaritler (LPS) bitkilerde bazı savunma ile ilgili tepkileri tetikleyebilirler (Dow ve ark., 2000). LPS uygulanmasından sonra bakteri

inokulumuna karşı bitkide üretilen bazı patogeneze ile ilgili (PR) proteinler hydroxycinnamol-tyramine antimikrobiyal bileşikler sentezi teşviki ve avirulent bakteriler tarafından neden olunan aşırı duyarlılık reaksiyonunu engellenmesi gibi bazı değişikliklere de neden olabilir.

Sıcaklıkla öldürülmüş *Ralstonia solanacearum*'un tütün (*N. tabacum*) yaprakları içine infiltre edildikten sonra, uygun bir patojen bakterinin inokule edilmesi sonucunda hastalık belirtilerinin ortaya çıkmaması veya gecikmesinde LPS'lerin (özellikle lipid A-merkez yapı) rolü olduğu bilinmektedir (Graham ve ark., 1977).

Benzer şekilde *R. solanacearum*'dan elde edilen LPS'ler tütünde 31,8 kD büyüklüğünde bir polipeptid ve peroksidaz aktivitesinin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Leach ve ark., 1983; Nadolny ve Sequeira, 1980).

LPS'ler bitkilerde hücre zarı ve hücreler arası boşlukta spesifik değişikliklere neden olurlar. Elektron mikroskobu gözlemleri sonucunda LPS uygulanan tütünlerde bitki hücre duvarının hücre zarından ayrıldığı tespit edilmiştir (Graham ve ark., 1977). Bu tip yapısal değişiklikler, sıcaklıkla öldürülmüş bakteriler tarafından teşvik edilmiştir .

Bu çalışmada Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde yetiştiriciliği yapılan asmalarda görülen urlardan bakteriyel patojen *Agrobacterium* izolatlarının elde edilmesi, izolatların fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal testler ve moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır. Ayrıca, sağlıklı asmaların kök bölgesindeki topraklardan izole edilen bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri (PGPR) izolatlarının *Agrobacterium vitis*'e karşı mücadelede kullanım olanakları araştırılmıştır. Bununla birlikte *A. vitis* izolatından elde edilen LPS'in asma bitkilerinde ur gelişimini engellemedeki etkisi araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Agrobacterium*'un Sınıflandırılması, İzolasyonu ve Karakterizasyonu

2.1.1. *Agrobacterium*'un Sınıflandırılması

Bağ uru dünyanın her tarafına yayılmış önemli bir bakteriyel hastalıktır. Burr ve ark., (1998) bildirdiğine göre, ilk defa İtalya'da Cavara (1897), bağ uruna neden olan bakterinin (*Bacillus ampelopsorae*) oluşturduğu doğal enfeksiyonu gözlemiştir. 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.

Conn (1942), bitkilerde kök boğazı uruna ve aşırı saçak kök hastalığına neden olan bakterilerin yeni bir cins içerisinde yer alması gerektiğini bildirmiş ve bu etmeni *Agrobacterium* olarak belirlemiştir.

Panagopoulos ve Psallidas (1973), bağlardan izole ettikleri *Agrobacterium* izolatlarının biotip 1 ve konukçuya spesifik 3. bir grup olduğunu bildirmişlerdir.

Ophel ve Kerr (1990), önceden biovar 3 olarak karakterize edilen bağdaki *Agrobacterium* izolatlarını *Agrobacterium* cinsinin *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes* ve *Agrobacterium rubi* olarak daha önceden tanımlanan 4 türün tip izolatları ile karşılaştırmışlardır. Biovar 3 olarak belirlenen on bağ izolatını, diğer *Agrobacterium* türlerinden bazı biyokimyasal testlerin yanı sıra biovar 3'den geliştirilmiş bir monoklonal antibody ile ayırt etmişlerdir. Daha önce tanımlanan türlerin tip izolatları ile 3 bağ izolatı arasında DNA bağlanma seviyelerini yeniden ilk DNA oluşma oranlarının optik ölçümü ile belirlemişlerdir. Bağ izolatları arasında DNA bağlanma seviyeleri %78-92 olurken, diğer tip izolatlarında bu değeri %7-47 oranında olmuştur. Çalışmalarında bağ izolatlarının daha önceden belirlenen *Agrobacterium* türlerinin tip izolatlarından farklı olduğunu ve bu nedenle onları yeni bir türü *Agrobacterium vitis* olarak isimlendirmişlerdir. Karakterize edilen hastalık etmeni referans izolat olarak da NCPPB 3554 koduyla İngiltere'deki kültür koleksiyonunda (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria) saklanmıştır.

Rhizobium, *Agrobacterium*, *Allorhizobium* ve *Sinorhizobium* cinsleri Rhizobiaceae familyası içerisinde. *Allorhizobium undicola*, *Agrobacterium tumefaciens* (syn. *Agrobacterium radiobacter*), *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi* ve *Agrobacterium vitis*'in 16S rDNA analiz karşılaştırılmasına göre tüm *Rhizobium* türleri ile aynı soydan gelen bir grubu oluştururlar. *Agrobacterium* bitki patojen türleri kapsayan yapay bir cinstir. Young ve ark. (2001) tarafından doğal olarak aynı soydan gelen *Agrobacterium*, *Allorhizobium* ve *Rhizobium*'un tek bir *Rhizobium* cinsi içerisinde toplanması gerektiğini, yeniden güncellenen sınıflandırmada önceden bildirilen türlerin *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi* ve *Rhizobium vitis* olarak adlandırılması gerektiğini önermişlerdir.

2.1.2. *Agrobacterium*'un İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Schroth ve ark. (1965)'nin, topraktan *Agrobacterium tumefaciens*-A. *radiobacter* grubunun izolasyonu için geliştirdikleri seçici besi yerinde, seçici olmayan besi yerine göre gelişen bakterilerin %99'dan fazlasını elemine etmiştir. *Agrobacterium* türleri için oldukça yüksek spesifik özelliğe sahip olan bu besi yerinde gelişen *Agrobacterium* kolonilerini, diğer bakterilerden kolaylıkla ayırt etmişlerdir.

Lehoczky (1968), bağ uru etmeni ile infektelenmiş asmalardan, urun 15 ve 80 cm altından kesilen asma çubuklarından akan öz sudan etmeni (*Agrobacterium tumefaciens*) 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.

Kado ve Heskett (1970), *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* cinsleri içindeki bitki patojeni bakteriler için beş seçici besi yeri geliştirmişlerdir. Bakteri membranının geçirgenliğini etkilediği bilinen lithium klorit, sodyum dodesil sülfat, polimiksin ve glisin gibi aktif bileşenleri içeren ve bir cinsin büyümesine izin veren, diğerlerinin gelişmesini engelleyen bu seçici besi yerlerindeki bu bileşikler tek veya kombineli olarak dizayn

etmişlerdir. Bu besi yerinin etkinliklerini belirlemek amacıyla farklı bakterilerin bir karışımını içeren inokulum kullanmışlar ve aşağıdaki sonuçları elde etmişlerdir: Kaplama Etkinliğini [(seçici besi yerindeki koloni sayısı/seçici olmayan besi yerindeki koloni sayısı)X100] D1 besi yerinde *A. tumefaciens* için %90,3; D2 besi yerinde *C. michiganense* için %27,1; D3 besi yerinde *E. amylovora* için %77,7; D4 besi yerinde *P. syringae* için %6,5; D5 besi yerinde *X. campestris* için %78,4 olarak bulmuşlardır. Bir bakteri karışımı ile inokule ettikleri topraktan bakterilerin yeniden kazanılma değerini [(seçici besi yerinde topraktan elde edilen koloni sayısı/aynı seçici besi yerinde direkt gelişen koloni sayısı)X100] D1’de %48,1, D2’de %79,8, D3’de %57, D4’de %26,9 ve D5’de %79,9 olarak elde etmişlerdir. Hastalıklı dokulardan patojenik bakterinin tekrar izolasyonları bu ortamlar aracılığı ile kolaylaştırmışlardır.

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 edilmiştir. Anderson ve Moore (1979), 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 infekte 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 patojenite 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 infektelendiği fakat domatesi infekte eden tüm izolatların daturada (*Datura* sp.) enfeksiyona neden olmadığı bildirilmiştir.

Asmalardan izole edilmiş 34 *A. tumefaciens* izolatı ile yapılan konukçu dizisi çalışmasında 6 farklı konukçu saptanmıştır. Virü lent tümör oluşturan (Ti) plazmid aktarılmış *Agrobacterium* izolatının doğal *A. tumefaciens* izolatı ile aynı konukçu

dizisi sergilediği ve böylece konukçu dizisinin genişliği veya darlığını tayin eden faktörlerin Ti plazmid olduğu belirlenmiştir. İki konukçu bitkide virulent olan iki doğal tip izolattan alınan Ti plazmidi taşıyan izolatların avirulent olduğu ve buna göre bakteri kromozomunun da konukçu dizisini etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca asmadaki tepkinin, testlenen asma çeşidine bağlı olduğu, *A. tumefaciens* izolatının bazı asma çeşitlerinde ur oluşturmadığı bildirilmiştir (Knauf ve ark., 1982).

Brisbane ve Kerr (1983), *Agrobacterium*'un 3 biovarlarının izolasyonu için 3 seçici besi yeri geliştirmişlerdir. Besi yerindeki seçiciliğin karbon ve azot kaynaklarına bağlı olduğu ve biovar 1 için L(-)-arabitol, biovar 2 için erythritol ve biovar 3 için tartarat ve D-glutamate'nin bir kombinasyonunu kullanmışlardır. Yeni besi yerlerinin mevcut seçici besi yeri ile karşılaştırıldığında, topraktan *Agrobacterium*'ların izole edilmesinde çok etkili olduğunu ve üç biovarın ayırımında, bazı biovar 1 izolatları hariç, besi yerinin seçiciliğinin yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

A. tumefaciens biovar 3 (AT3) seçici bir besi yeri kullanılarak asma urlarından, asmanın öz suyundan ve bağ toprağından izole edilmiştir. Urlardan izole edilen en yaygın biovarların AT3 olduğu, 24 infekteli asmanın yedisi ve sağlıklı görünen 17 asmanın birinin öz suyundan elde edilmek suretiyle belirlenmiştir. 10 öz su izolatu AT3 olarak belirlenmiş ve hepsinin asma ve ayçiçeğinde patojen olduğu tespit edilmiştir. 30 bağ toprağından yapılan izolasyonlarda *Agrobacterium*'un 244 tipik kolonisi seçilmiş, bu izolatların 5'inin patojen ve 5 izolattan 3'ünün AT3 ve 2'sinin de *A. tumefaciens* biovar 1 olduğu saptanmıştır. Urlardan, öz sudan ve topraktan izole edilen AT3 izolatların hemen hemen hepsi domates, ayçiçeği ve asmada ur oluşturmuştur (Burr ve Katz, 1983).

Burr ve Katz (1984), *A. tumefaciens* (AT) biovar 3 ve biovar 1'i bağ uru ile bulaşık asmanın symptom göstermeyen 1 yaşındaki asma dallarında tespit etmişlerdir. Seçici besi yeri yardımıyla her iki biovarı steril bir saksıda köklenen çubukların yüzeysel sterilizasyonu ile küçük köklerden ve kalluslardan elde etmişlerdir. Patojenik izolatları inokule ettikleri Gewurtztraminer, Pinot Chardonnay, Pinot Noir ve White Reisling gibi asma çeşitlerinden tekrar izole etmişlerdir. AT biovar 3, bağ

ur semptomlu asmanın çevresinden toplanan 10 toprak örneğinin birinden elde edilmiştir.

Beş asma çeşidi ve 10 anacın sert gövde parçalarından toplanan öz sularından seçici bir besi yeri kullanarak bir çok *A. tumefaciens* biovar 3 izolatı izole edilmiştir. Elde edilen 36 *A. tumefaciens* izolatının %86'sı fizyolojik ve virülenslik özelliklerine göre biovar 3 olarak belirlenmiştir. Bu yöntemle asma dal örneklerinin büyüme bölgelerinin %90'ının *A. tumefaciens* ile bulaşık olmadığı tespit edilmiştir (Tarbah ve Goodman, 1986).

Burr ve ark. (1987), *A. tumefaciens* ve *A. radiobacter* biovar 3'ün en yüksek popülasyonunu hastalanmış asmaların köklerinden veya bulaşık ve bulaşık olmayan asmaların köksüz toprak örneklerinden ve daha çok asma uru ile hastalanmış asmaların köklerinden izole etmişlerdir. Biovar 3'ü seçici besi yeri kullanarak infektelenmemiş bağ toprağından elde edememişlerdir. Görünüşte sağlıklı anaçların ve aşısız asma çeşitlerinin köklerini tümörögenik ve tümörögenik olmayan izolatlarla inokule etmişler ve köklerin belirli kısımlarını biovar 3 için taradıklarında etmeni çoğunlukla kökün küçük, koyu, çökük lezyonlarından izole etmişlerdir.

Deqin ve ark. (1987)'nin yaptıkları bir çalışmada, Kuzey Çin'de asma ularından 13 *Agrobacterium tumefaciens* izolatı elde etmişler ve konukçu dizisinde farklılıklar olmasına rağmen izole edilen izolatların hepsinin asmada ur oluşturduğunu gözlemişlerdir. Bu izolatların 12'sinin biyotip 3 olduğunu ve 11 izolatın tümör dokusunda oktopin sentezlediğini saptamışlardır. İlginç olan 1 izolatın neden olduğu ur dokusunda başlangıçta herhangi bir opin belirlenememesine karşın, arginin birikimi olduğunu tespit etmişlerdir. Bu izolatların çoğundaki DNA'ların önceden belirlenen transfer DNA ve *vir* bölgesi ile homolog olmasına rağmen bazı virulent izolatların bu bölgelerinin daha az homolog veya hiç homolog olmadığı ve bundan dolayı bu izolatların bazılarının *Agrobacterium* sp. örneklerinden farklı olduğunu açıklamışlardır. Çoğu izolatın DNA'sının geniş bir konukçu dizisine sahip *virA* bölgesi ile çok az veya hiç homolog bir görüntü sergilemediği, fakat dar bir konukçu dizisine sahip *virA* bölgesi ile kuvvetli bir benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Bağlarla ilgili *Agrobacterium* izolatlarının spesifik bir *virA* bölgesine sahip olacağı fikrini öne sürmüşlerdir.

Serada konukçu olan *Vitis vinifera* ve konukçu olmayan *Avena sterilis* ‘Astro’ bitki artıklarıyla karıştırılmış toprakta AT3 canlılığı üzerine yapılan bir çalışmada, konukçu bitkilerin olduğu toprakta konukçu olmayan bitkilerin bulunduğu toprağa oranla daha yüksek popülasyona ulaşmıştır. Popülasyonun hem nadasa bırakılan toprakta ve hem de yulafli toprakta zamanla azaldığı, fakat bağ rhizosferinde değişmediği görülmüştür. Rifampicine dayanıklı AT3 popülasyonunun *Vitis labrusca* L.’nin Concord çeşidinde 10 haftada değişmediği, 10^6 cfu/g yoğunluğunda toprağa karıştırıldığında Concord fidanlarının %60’da sistemik bir infeksiyonun olduğu, fakat daha düşük yoğunlukta toprağa karıştırıldığında herhangi bir infeksiyonun meydana gelmediği bildirilmiştir (Bishop ve ark., 1988).

Bouzar ve ark. (1988)’nin yaptıkları bir çalışmada, *A. tumefaciens* izolat B6’dan hazırlanan bir Lipopolisakkaritden (LPS) tavşan antiserumları ve hücrelerin su-fenol ekstraksiyonu ile jel imminodifizyonundan spesifik çökelti bandı elde etmişlerdir. B6 LPS’in bu antiserumunun, diğer 38 *Agrobacterium* izolatı veya 8 başka cinsten 12 bakteri türünün su-fenol ekstraktı ile reaksiyona girmedeği, çok ince ilave bir çökelti bandını, B6 ve testlenen 38 *Agrobacterium* izolatından 9’unda gözlemişlerdir. Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda açıklanan ribozomal preparatlar ile ilgili izolat spesifik antijenlerin karışmış olan LPS belirlemişlerdir. LPS’yi %20 amonyum sülfat ile birinci çökeltme ve 0,6 M amonyum sülfatta ribozomların çökeltmesiyle ribozomal kalıntılardan uzaklaştırmışlardır.

Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya’dan tümörögenik olup olmadığına bakılmadan bir monoklonal antiserum (AbF21-1D3G7C8) ile asma uruna neden olan *A. tumefaciens* biovar 3 izolatları ile ELISA’da reaksiyon elde edilmiştir. AbF21-1D3G7C8’in *A. tumefaciens* biovar 1 veya 2 ile veya diğer bitki patojenleri, simbiyotik veya saprofitikler ile reaksiyona girmedeği bildirilmiştir. AbF21-1D3G7C8’in *A. tumefaciens* biovar 3’ün laboratuvar tanınması için uygun olduğu ve böylelikle karantinada ve üretim materyallerinin bağ uruna karşı taranmasında ve belirlenmesinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Bishop ve ark., 1989).

Hem asma uruna hem de asma köklerinin çürümesine neden olan *A. tumefaciens* biovar 3 izolatların hepsi tümörögenik olmasına bağlı olmadan kültürde tek bir polygalacturonase üretirler. *A. tumefaciens* biovar 3 CG49 izolatı vektör

olarak pSUP2021 kullanarak Tn5 ile mutasyona uğratılmış ve CG50 polygalacturonase aktivitesini kaybetmiş mutant izolat elde edilmiştir. Polygalacturonase kodlayan *pehA* geni vektör olarak pBluescript plazmidi kullanılarak *Escherichia coli*'ye kopyalanmıştır. Gel analizi ile kültürde CG49 tarafından üretilen enzim gibi benzer polygalacturonase üreten pCPP2067 plazmidi taşıyan *E. coli* hücresi kanıtlanmıştır. *pehA* geninin 2,5 kb HindIII-Sall parçası içine lokalize olduğu ve bu parçanın Southern Hibridizasyon analizinde bir prop olarak kullanıldığı, ancak *A. tumefaciens* biovar 1 veya 2, *Rhizobium leguminosarum* veya *Bradyrhizobium japonicum* ile yakın ilgili bir gen olmadığı gözlenmiştir. Polygalacturonase mutantının bağda (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) kök çürüklüğüne neden olmadığı ve düşük inokulum kullanıldığında doğal izolatlardan daha az ur oluşturmaya rağmen her iki izolatin da patates disk denemesiyle eşit oranda tümörögenik olduğu kanıtlanmıştır (Rodriguez-Palenzuela ve ark., 1991).

Canfield ve Moore (1991), elma (*Malus* sp.)'nın köklerinden ve urlardan *Agrobacterium* ve floresan *Pseudomonas* spp. izole etmek için opin içeren besi yerlerini kullanmışlardır. Washinton eyaletinde iki fidanlıkta yaptıkları tarla denemesinde, *A. tumefaciens*'in B49C izolatu ile elma anaçları Mark, EMLA 7 ve Red Delicious fidanlarını inokule etmişler ve kök boğazı uru her iki lokasyonda inokule edilmemiş kontrolden daha fazla ur oluşturmuştur. İzole edilen 12 *Agrobacterium* izolatinın üçünün mannopini, dördünün nopalini ve dördünün de hem mannopini hem de nopalini kullandığını, 12 izolatin hiç biri oktopini ve 12 izolattan birinin testlenen 3 opinden hiç birini kullanmadığını, *Pseudomonas* spp.'nin 41 izolatu oktopini, 48'i nopalini, birinin hem oktopin hem de nopalini kullandığını ve hiç birinin mannopini kullanmadığını, *Pseudomonas* spp. izolatlarının 77'sinin in vitro koşullarında *A. tumefaciens*'in gelişmesini engellediğini bildirmişlerdir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *Vitis* spp.'den izole edilen 34 *Agrobacterium* izolatında T-DNA'nın varlığı belirlenmiştir. *A. tumefaciens*'in geniş ve dar konukçu aralığına sahip izolatların T-DNA bölgesinin homologlarının oligonükleotid primerlerini T-DNA kısmının amplifikasyonu ile yapılan çalışmada patojenite çalışmalarını destekleyen sonuçlar alınmıştır (Dong ve ark., 1992).

Agrobacterium cinsine bağlı 16 izolatın yağ asit metil esterinin (FAME) profilini gaz-liquid kromatografi ile belirleme çalışmasında izolatları 3 farklı gruba ayırmak mümkün olmuştur. FAME profilleri, her bir biovarın benzer olduğu ve diğerlerinden ayrıldığı belirlenmiştir. Biovar 1, biovar 3'den 16:1 ve 18:1 yağ asitlerinin nicel olarak farklı olması ve 17:0 CYCLO yağ asidinin bulunması ile ayrıldığı, 19:0 CYCLO'nun nicel farklılığı, 15:0 ISI 3OH'ın olması ve 18:1 3OH'ın olmaması ile biovar 1 ve 3'den biovar 2'yi ayırdığı bildirilmiştir. NCPPB 1650 ve 2 *A. rubi* (IFO 13261 ve 13260) izolatının FAME'leri 17:0 CYCLO hariç biovar 3'e benzer bulunmuştur. Sadece kividan (K-Ag-3, 4) ve kirazdan (Ch-Ag-4, 5, 7 ve 8) izole edilen 6 *A. tumefaciens* izolatının FAME profilleri biovar 2'ye benzemiştir. Böylelikle FAME profillerinin kullanımının biovarları belirlemede hızlı ve uygun bir metod olduğu bildirilmiştir (Sawada ve ark., 1992).

Willems ve Collins (1993), *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* cinsleri üyelerinin fillogenetik ilişkisini 16S rRNA gen amplifikasyonunun gen dizilişi ile çalışmışlardır. Gen dizilişi verilerinin karşılaştırma analizleri, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* cinslerinin fillogenetik olarak aynı soydan geldiğini desteklemiştir. *Rhizobium* ve *Agrobacterium* cinslerinin fillogenetik olarak heterogen olduğunu, *Rhizobium* ve *Agrobacterium* cinslerinin türler arası karışık ve birkaç alt grup oluşturduğunu belirlemişlerdir. Sonuçta bu organizmaları içeren cins ve türlerin taksonomilerinin yeniden revize edilmesi gerektiğini olduğunu göstermiştir.

A. tumefaciens (biovar 1), *A. rhizogenes* (biovar 2), *A. vitis* (biovar 3) ve *A. rubi*'nin patojenik ve patojenik olmayan izolatlarının BIOLOG (Gram Negatif) sisteminde var olan 95 farklı karbon kaynağını kullanabilme yeteneği ve MIDI gaz-sıvı kromatografi sistemi kullanılarak yağ asit metil ester analizleri yapılmıştır. Birçok karbon kaynağının tanı değerinin olduğu belirlenmiş ve *A. rubi*'nin istisnaları ile hydroxy-L-prolin ve i-erythritol sırasıyla *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* tarafından özel olarak metabolize edildiği bulunmuştur. Yağ asit bileşiklerinin analizleri cis-vaccenic asitin (18:1 ω cis) tüm *Agrobacterium* izolatlarında hakim yağ asidi olduğunu desteklemiştir. 3-hydroxypalmitic asit (16: 3-OH) miktarının *A. rhizogenes*, *A. tumefaciens* ve *A. vitis*'te değişik oranda olduğu, ancak ayırımın

ölçülmesini sağlayan bu yağ asidi, *A. rubi* ICPB TR2’de saptanamamıştır. *A. rhizogenesis* hücrelerinde bulunan 15:0 iso 3-OH yağ asidinin ayırımı sağlayan bir kriter olduğu bildirilmiştir. 4 *Agrobacterium* türünün üyeleri arasında fenotipik farklılıkları destekleyen metabolik belirleyiciler ve yağ asit kompozisyonuna dayanan küme analizi araştırmalarında her iki sistem kendi türlerine göre izolatları gruplamıştır (Bouzar ve ark., 1993).

Ponsonnet ve Nesme (1994), *Agrobacterium* biovar 1, 2, 3 ve *Agrobacterium rubi* türlerini içeren 41 *Agrobacterium* izolatının kromozomal ve Ti plazmidleri PCR ile amplifiye edilen DNA’larını RFLP ile karakterize etmişler ve 16S rDNA amplifikasyonunun analizi ile elde edilen profiller o türlere ait izolatların aynı grup içerisinde olduğunu desteklediğini bildirmişlerdir. İzolatların etkili ayırımını sağlayan 16S rDNA ve 23S rDNA arasında intergenik boşluklarda daha yüksek polimorfizm belirlemişler ve hızlı tanımlama için PCR-RFLP metodu ile genomik çeşitliliğin izolatların ve konjigativ Ti plazmidlerin kullanışlı olduğunu göstermişlerdir.

Burr ve ark. (1995b), asmaları *A. vitis*’in 6 izolatının bir karışımı ile inokule ettikten 23 ay sonra canlı ve çürüyen asmanın köklerinden ve dallarından bakteriyi tekrar elde etmişler ve her izolatın tek bir benzersiz plazmid içerdiğini saptamışlardır. İnokulasyonu takiben bazı bitkilerin ölmesi ve çürüyüp dağılması için Roundap (%41,0 glyphosate, Monsanto, St. Louis, Mo.) herbisiti uygulamışlardır. Köklerin ve dalların incelenmesinde ve elde ettikleri izolatların plazmid profillerini karşılaştırarak inokulum karışımında kullanılan *A. vitis* izolatlarının diğerlerine göre daha çok sıklıkta elde edildiğini belirlemişlerdir. 133 plazmid profilini gözlemişler ve yalnızca 18’nin inokulum karışımında kullanılan izolatların herhangi birine benzemediğini, kök ve dallardan yeniden elde edilen 333 izolatın 321’i tümörögenik bulmuşlardır. İzolat CG49 belirleyen plazmid profiline sahip 6 izolatın bir grubunu 16 aylık periyodun sonunda yeniden elde edilmiştir.

Agrobacterium türlerinin *virA*, *pehA* ve *6a* genlerinin amplifikasyonu için tasarlanan oligonukleotid primerlerin *Agrobacterium vitis*’in tanımlanmasında kullanımı değerlendirilmiştir. *pehA* spesifik primer çifti polimeraz zincir reaksiyonu ile testlenen tüm *A. vitis* izolatlarını kolayca tanımlamıştır. Asma çubuklarından *A. vitis*

DNA'sını elde etmek için dört farklı ekstraksiyon/saflaştırma yöntemi kullanmıştır. En etkili hücreleri parçalamak için mikro dalgaya maruz bıraktıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu inhibitörlerinin asma örneklerinden uzaklaştırılması olayını iyon değiştirme kromatoğrafisi yönteminin izlediği bildirilmiştir. Bu yöntemin hem duyarlı hem de hızlı olduğu vurgulanmıştır (Eastwell ve ark., 1995).

Ti ve Ri plazmidlerde *virC* operon bölgesinin gen dizilişine dayanan PCR analizi için bir universal primer seti (VCF/VCR) fitopatojenik *Agrobacterium* izolatlarından bu plazmidleri belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. VCF (5'-ATC ATT TGT AGC GAC T-3') ve VCR (5'-AGC TCA AAC CTG CTT C-3') primer seti ile 10 rhizogenik ve 65 tümörögenik *Agrobacterium*'larda 730 bp uzunluğunda parça amplifiye edilmiştir. DNA gen dizilimi ve Southern hibridizasyon analizi, amplifikasyon bölgelerinin hedef bölgeye uyduğunu desteklemiştir (Sawada ve ark., 1995).

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 oligonükleotit 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.

Agrobacterium, *Rhizobium* ve *Sinorhizobium* cinslerinde fillogenetik olarak belirlenen türlerin sayısının artması nedeniyle bu türleri birbirinden ayırt etmek için hızlı bir tanılaması sistemine ihtiyaç olduğu ileri sürülmüş ve *Agrobacterium tumefaciens* (34 izolat), *A. rhizogenes* (16 izolat), *A. vitis* (10 izolat), *A. rubi* (2 izolat) ve bazı sınıflandırılmayan izolatlarından oluşan toplam 65 *Agrobacterium* izolatı ve *Rhizobium etli* (21 izolat), *R. galegae* (20 izolat), *R. huakuii* (17 izolat), *R. leguminosarum* (20 izolat), *R. loti* (16 izolat), *R. topici* (18 izolat), *Sinorhizobium fredii* (19 izolat) ve *S. meliloti* (20 izolat) izolatlarından oluşan toplam 150

Rhizobium ve *Sinorhizobium* izolatu tanılama çalışmasında kullanılmıştır. Yağ asit profilleri kaydedilmiş, karakteristik yağ asitleri not edilmiş ve her bir türün yağ asit profilleri arasındaki benzerlikler hesaplanmıştır. Türler arasındaki akrabalık yağ asit verilerinden sağlanmıştır. *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. topici*, *A. rhizogenes*, *S. fredii* ve *S. meliloti* bir süper küme içerisinde gösterilmiştir. *A. tumefaciens*, *A. rubi*, *A. vitis* ve *R. galegae*'nin ikinci bir süper küme oluşturduğu ve *R. loti* ve *R. huakuii* diğer izolatların hepsinden iyi ayrılan üçüncü bir küme oluşturduğu bildirilmiştir. Yağ asit profilleri *R. etli* hariç koleksiyondaki her türün izolatlarını en az %94 oranda belirlemede kullanılmıştır. *R. etli* izolatları (%23,8) *R. leguminosarum* olarak hatalı tanılanmıştır (Jarvis ve ark., 1996).

Benlioğlu ve Özakman (1998), *A. tumefaciens* biovar 3'e karşı üretilen poliklonal antiserum ile yapılan immunofluoresan test ile Orta Anadolu bölgesindeki bağ uru etmeni ile pozitif reaksiyonlar elde etmişlerdir. Kullandıkları anti serumun biovar 1 ve 2'nin yanısıra diğer bitki patojeni veya simbiyotik bakterilerle reaksiyona girmedikini bildirmişlerdir. Dormant dönemde 1 yaşındaki asma çubuklarının iletim demetlerinde bulunan *A. tumefaciens* belirlemek amacıyla vakum ekstraksiyon işlemi ile IFAS ve seçici besi yeri kullanmışlardır. Sağlıklı görülen 150 asmadan 7'sinden ve bulaşık olan 8 asmanın 6 tanesinden *A. tumefaciens* biovar 3'ü izole etmişlerdir. Elde ettikleri 28 *A. tumefaciens* izolatından fizyolojik karakteristiklerine göre 25 tanesini biovar 3, 3 tanesini de biovar 1 olarak tanılamışlardır.

Agrobacterium, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* ve *Sinorhizobium* cinslerine ait 600'den fazla izolatın yağ asit profilleri gaz kromatografisine dayalı Sherlock Microbial Identification System (MIS) kullanarak değerlendirilmiştir. MIS ile toplanan veriler *Mesorhizobium* cinsine ait türlerin kolaylıkla ayrılan üç farklı alt küme oluştururken *Agrobacterium* cinsinin daha önce tanılanan üç fillogenetik biovarları farklı kümeler oluşturduğunu göstermiştir. *Mesorhizobium* cinsine ait bu alt kümeler, *M. ciceri* ve *M. mediterraneum* birinci alt kümeyi, *M. tianshanense* ve *M. plurifarum* ikinci alt kümeyi ve *M. huakuii* ve *M. loti* üçüncü alt kümeyi oluşturmaktadır. *Sinorhizobium* cinsi tek bir *S. meliloti* ve *S. fredii*, *S. saheli*, *S. terangae*, *S. kostiense* ve *S. arboris* kapsayan geniş bir kümeden oluşmuştur. *Sinorhizobium meliloti* yüksek miktarda 19:0 cyclo omega 8cis yağ asiti

içerdiği ve *Rhizobium* sp. (*Hedysarum coronarium*) ile küme oluşturduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte *Sinorhizobium* ve *Rhizobium* cinslerini ayırmada 16:0 3-OH'ın konsantrasyonu belirlediğini tespit etmişlerdir. *Rhizobium* cinsi *Rhizobium* sp. (*Hedysarum coronarium*), *R. gallicum*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. giardinii*, *R. tropici*, *R. galegae* ve *R. hainanense*'yi içine alan tek bir küme oluşturduğunu belirlemişlerdir. *R. galegae*, *Agrobacterium* biovar 1 ile benzerken *R. tropici* ve *R. hainanense* ile *Agrobacterium* biovar 2 ile benzerlik sergilediğini belirtmişlerdir. *R. giardinii* diğer türler ile çok az benzerlik göstermesi ile tek olduğu gösterilmiştir. *Bradyrhizobium* cinsinin analizi çalışılan diğer cinslerden oldukça farklı olduğunu göstermişlerdir (Tighe ve ark., 2000).

Çok sayıda *Agrobacterium* izolatlarının biovar karakterizasyonu basitçe analiz etmek için bir microtiter sistem tanımlanmıştır. Bu yöntem farklı *Agrobacterium* biovarları tarafından spesifik olarak kullanılan besi yeri ile önceden yerleştirilen mikropate çukurlarında bakteriyel izolatların inkubasyonuna dayanır. Birçok konukçu bitkiden izole edilen 150'den fazla saf *Agrobacterium* izolatu microtiter sistemi ile analiz edilmiş ve geleneksel metotlarla karşılaştırıldığında inkubasyon için daha az zaman ve yer gerektiren mükemmel bir yöntem olduğu ispatlanmıştır (Cubero ve Lopez, 2001).

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 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 urunu önemli ölçüde kontrol altına aldığını gözlemişlerdir. 16S ve 23S rRNA genleri arasında intergenik bölgenin restriksiyon 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.

Doğal olarak infektelenmiş yedi asma varyetesinin urları toplanarak opinler analiz edilmiş ve 90 örneğin 85'inde bilinen *Agrobacterium vitis*'in teşvik ettiği opinleri içerdiği bulunmuştur. En genel olan octopin 50 örnekte belirlenmiştir. 28 asma urunda nopalin belirlenirken 8'inde vitopin tespit edilmiştir. Yalnız bir urda 2 oktopin nopalin ve vitopinin bulunduğu, 5 örnekte ise herhangi bir opine rastlanmamıştır. PCR ile yapılan çalışmalarda bu urların çoğunda *A. vitis*'in bulunduğu doğrulanmıştır (Szegedi, 2003).

Llop ve ark. (2003), polimeraz zincir reaksiyonu-rast gele çoğaltılmış polimorfik DNA (PCR-RAPD) yöntemine dayanan bir metodla *Agrobacterium* izolatlarının tanılanması için bir moleküler tip sistemini geliştirmişlerdir. Denedikleri 39 *Agrobacterium* izolatlarının her biri için 4 primer ile oluşan bantlar, izolatları birbirinden ayırmak için yeterli olmuştur. C58 ve A281 izolatları gibi farklı plazmid içeren fakat benzer kromozomlu izolatlar tüm primerlerde benzer bantlar vermiştir. On konukçu bitkiyi 8 *Agrobacterium* izolatı ile inokule etmişler ve tümör oluşturan izolatları geliştirdikleri RAPD sistemi ile değerlendirmişlerdir. RAPD analizinde kullanılan saf bakteri hücre süspansiyonu, izole edilmiş DNA ile aynı sonucu vermiştir.

Asma uru etmeni dominant olarak *A. vitis* olmasına rağmen nadiren de olsa *A. tumefaciens* bu hastalığa neden olmaktadır. Szegedi ve ark. (2005)'nın yaptıkları çalışmada, farklı asma çeşitlerinden ve farklı bölgelerden 18 *Agrobacterium tumefaciens* izolatı elde etmişlerdir. Bu izolatların 7'si tartarate kullandığı, *A. vitis* tipi octopin/cucumopin Ti plazmid taşıdığı, bezelyede avirulent olduğu ve *virC* spesifik PCR primeri ile tepki oluşturmadığı belirlenmiştir. Ayrıca on sekiz izolatın 11'i *A. tumefaciens* tip Ti-plazmid taşıdığı, tartrate'da büyümediği, bezelyede virulent olduğu, *virC* spesifik PCR primeri ile 730 bp bant oluşturarak pozitif reaksiyon verdiğini belirlemişlerdir. Asma ve/veya *Kalanchoe tubiflora* bitkisinde oluşan urlarda bu izolatların ikisi oktopin/agropin ve iki izolatın da agropini teşvik ettiği, geriye kalan 7 izolatında *A. tumefaciens* nopalin izolatlarının karakteristik özelliğini gösterdiğini ve agrosin 84'e duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

A. rubi, *A. vitis* ve *Agrobacterium* biovar 1 ve 2'nin ayrılmasını ve belirlenmesini amaçlayan çok yönlü PCR için bir universal forward ve 4 takson (tür/biovar) spesifik reverse primerler dizayn edilmiştir. *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ve *Phyllobacterium*'a ait 119 bakteri izolatının DNA'sı ile reaksiyonda *A. vitis*, *A. rubi* veya *Agrobacterium* biovar 1'i belirlemek için geliştiren primerlerde yalnızca bu taksaların izolatların DNA'sı ile amplifiye olduğunu ve sırası ile 478, 1006 ve 184 bp büyüklüğünde parçalar oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte *Agrobacterium* biovar 2'yi belirlemek için geliştiren primerlerde karakteristik 1066 pb PCR ürünü yalnız bu biovarda oluşmamış aynı zamanda 3 atipik biovar 1 izolatında ve bazı rhizobial izolatlarda da oluştuğu belirtilmiştir. *Agrobacterium* biovar 2 ile diğer izolatları ayırmada bu ürünün *Alw261* endonükleaz enzimi ile restriksiyon analizi kullanılarak mümkün olduğu belirtilmiştir (Pulawska ve ark., 2006).

2.2. Bitki Büyümesini Teşvik Eden Rhizobakteriler (PGPR)

Rhizobium ve *Bradyrhizobium* izolatlarının kaya fosfatını çözme potansiyeli *in vitro*'da denenmiş ve test edilen tüm organizmaların kaya fosfatını etkili olarak çözdüğü ve besi yerinin pH'ını düşürdüğü belirlenmiştir. Besi yerinde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ varlığı ve yokluğu arasında kaya fosfatını çözmede çok az farklılık bulunmuştur. İzolatlar arasında *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* BICC635 en etkili olduğu ve maksimum fosfat çözümü ile asit üretimi inokulasyonun 3. gününden sonra elde edilmiştir. Besi yerinde 2-ketogluconic asit üreten izolatın kaya fosfatının çözülmesinin önemli nedeni olmuştur. Besi yerinde çözülmeyen *Purulia* kaya fosforunun miktarı, çözülen fosfor miktarının artışına çok az etkili olurken besi yerine CaCl_2 , CaCO_3 ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gibi kalsiyum bileşiklerinin eklenmesi çözülen fosfor miktarında azalmaya neden olmuştur. pH değerindeki değişikliklerin fosfor çözülmesinde çok az önemli olduğu belirlenmiştir (Halder, ve ark., 1990).

Taiwo ve Oso (1997), insektisit pyrethrin, atrazin ve metobromuron ve metolacher karışımı uygulanmış kumlu ve tınlı iki toprak tipi ile toprak mikrobiyal popülasyonuna ve onların mineralizasyon aktivitelerinde bu kimyasalların etkilerini belirlemek için laboratuarda 8 hafta gözlem yapmışlardır. Ayrıca yapılan çalışma ile

pestisit uygulamasının topraktaki besin maddesi seviyesinde oluşan değişikliklerin belirlenmesini de amaçlamışlardır. Her iki toprak tipinde hem mikrobiyal popülasyonda hem de karbon, azot, potasyum ve pH'da başlangıçta bir artıştan sonra önemli bir azalma kaydetmişlerdir. Sekiz bakteriyel izolat, iki actinomycetes ve beş fungal türü tınlı kumlu pestisitler uygulanmamış toprakta tespit etmişlerdir. Türlerin sayısında uygulama yapılan toprakta kontrole göre azalma kaydetmişlerdir. Uygulama yapılan topraktan izole edilen *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* spp., *Aspergillus niger* ve *Streptomyces* sp. ile kontrol topraktan izole edilen benzer organizmaların türlerinin fosforu daha az çözdüklerini belirlemişlerdir.

Kültür besi yerine suda çözülmeyen kalsiyum fosfat ilave edilerek mangrove (siyah; *Avicennia germinans* L. ve beyaz; *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.) rizosferik mikroorganizmalarında fosfor çözme potansiyeli kanıtlanmış ve mikroorganizmalar siyah (*Avicennia germinans* L.) ve beyaz (*Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.) mangrove kökleri ile inkübe edilmiştir. Yapılan reizolasyon sonucunda on üç fosfat çözen bakteri izolatı (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus atrophaeus*, *Paenibacillus macerans*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter taylorae*, *Enterobacter asburiae*, *Kluyvera cryocrescens*, *Pseudomonas stutzeri* ve *Chryseomonas luteola*) her iki mangrove rizosferinden tekrar izole edilmiştir. İzolatların fosfor çözme aktivitesi tek fosfor kaynağı olarak kalsiyum fosfat içeren katı besi yerinde büyüyen kolonilerin etrafında oluşan zon ölçülerek nitel olarak değerlendirme yapılmıştır. Tüm bakteriyel türlerin ve *A. niger*'in çözülmeyen fosfat içeren sıvı bir besi yerinde çözdükleri fosfor miktarı spektrofotometrik olarak belirlendiği çalışmada *V. proteolyticus*'un en fazla fosforu çözen bakteri olduğu saptanmıştır. Farklı bakterilerin sıvı besi yerinde oluşturduğu organik asitleri belirlemek amacıyla kullanılan gaz kromatografisi cihazı ile uçucu ve uçucu olmayan organik asitlerden 11'i tanımlanmıştır. Farklı türler tarafından genel olarak üretilen laktik, siksinik, isovalerik, isobutirik ve asetik asittir. Bakteri türlerinin çoğu bir organik asitten daha fazla üretirlerken *A. niger* yalnızca suksinik asit ürettiği bildirilmiştir (Vazquez ve ark., 2000).

Alkali toprakta gelişen *Prosopis juliflora* bitkisinin kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* sp. NBRI330 izolatının özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada bu izolatın *P. juliflora*'da nodül oluşturabildiği, fidanlıklardaki inokule edilmiş bitkiler inokule edilmeyenlerle karşılaştırıldığında bitki kuru ağırlığında %60,6 oranında artış gözlenmiştir. NBRI330 izolatının %32 tuz içeren besi yerinde 8 saat ve 55°C'de 3 saat canlılığını koruduğu, tuz stresi altındaki NBRI330 izolatının hücrelerinin (3,04 µm) stres altında olmayanlarından (1,75 µm) önemli ölçüde daha uzun olduğu, bunun aksine pH stresi altında (1,40 µm) kısaldığı, sıcaklık stresi altındaki hücrelerin küresel ve 0,42 µm boyutunda, stres altında olmayanların çubuk şeklini aldığı belirlenmiştir (Kulkarni ve Nautiyal, 2000).

Nautiyal ve ark. (2000), alkali topraktan ve nohut rhizosferinden fosforu çözen bakteri NBRI0603, NBRI2601, NBRI3246 ve NBRI4003'ü izole etmişler ve tüm izolatların farklı karbon ve azot kaynağı varlığında *in vitro* koşullarda fosforu çözme aktivitelerinin değişik seviyelerde olduğunu göstermişlerdir. Asit üretimi fosforu çözmeye katkı sağlamasına karşın besi yerinde fosforun serbest kalmasının tek nedeninin olmadığını belirtmişlerdir. Dört izolat arasında NBRI2601'in %10 tuz varlığında, pH 12 veya 45°C'de fosfor çözme kapasitesi en etkili izolat olduğu, değişik azot kaynaklarında izolatların fosfor çözme seviyelerinde farklılıklar gösterdiği ve düşük oranda Ca^{2+} ve EDTA içeren besi yerinde fosfor çözülmesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bitki büyümesini teşvik eden iki rhizobakter (PGPR) *Bacillus pumilus* SE34 ve *Pseudomonas fluorescens* 89B61 domateste geç yanıklığına karşı sistemik korumayı sağladığı ve sera çalışmalarında *Phytophthora infestans* ile teşvik edilmiş dayanıklılık veya kimyasal teşvik edici β-amino butirik asit (BABA) tarafından lokal teşvik edilmiş dayanıklılık ile hastalık şiddetini azalttığı belirlenmiştir. İki PGPR izolatı, patojen ve kimyasal BABA uygulanan domates bitkilerinin yaprak yüzeyinde *P. infestans*'ın sporangium ve zoospor çimlenmesini kontrol ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde azalttığı tespit edilmiştir. PGPR, patojen ve BABA tarafından sağlanan teşvik edilmiş dayanıklılığın sinyal aktarım yolunu belirlemek için üç domates hattını [salisilik asit (SA) hidroksilaz transgenik domates (*nahG*), etilene duyarsız mutant (*Nr/Nr*) ve jasmonik asit duyarsız mutant (*def1*)] kullanılmıştır. Hem

Basillus hem de *Pseudomonas* PGPR izolatları tarafından sağlanan teşvik edilmiş dayanıklılığın SA, etilen ve jasmonik asitle ilgili olduğu oysa patojen tarafından sağlanan sistemik dayanıklılığın ve BABA'nın neden olduğu lokal teşvik edilmiş dayanıklılığın sadece SA'ya bağlı olduğu görülmüştür. 89B61 izolatı uygulanmış domates yapraklarında patojenin kolonize olmaması sistemik dayanıklılık olarak değerlendirilmiştir (Yan ve ark., 2002).

Siddiqui ve Shaukat (2002), köklerin daldırılması veya toprağın ıslatılması şeklinde uygulanan iki rhizobakter izolatının *Pseudomonas aeruginosa* IE-6S⁺ ve *P. fluorescens* CHA0 sera koşullarında domates köklerinde *Meloidogyne javenile* penetrasyonunu büyük ölçüde azalttığını saptamışlardır. Antagonizmin nedenini daha iyi anlayabilmek için bakteriyel antagonistlerin davranışlarını incelemişlerdir. Nematodlara karşı teşvik edilmiş sistemik dayanıklılığı bakteriyel inokulantların kabiliyetlerine ayrılmış kök deneyleri ile (bir domatesin kök sistemi iki kısma ayrılmış) kanıtlamışlardır. Ayrılmış kök sisteminin bir kısmına uygulanan IE-6S⁺, ayrılan diğer kök sisteminde nematod penetrasyonunu önemli ölçüde azalttığı (%42 oranında), aynı şekilde CHA0 uygulamasının da benzer şekilde nematod infeksiyonunda bir azalmaya neden olduğunu (%29 oranında) saptamışlardır. Rhizosferde CHA0 izolatlarının popülasyonu domatesin erken büyüme döneminde daha yüksek olmasına rağmen geç büyüme döneminde IE-6S⁺'nin daha fazla kolonize olduğunu belirlemişlerdir. Ancak izolat IE-6S⁺'i kökün içinden izole etmişlerdir. Bakteri uygulanmamış domates köklerinin diğer yarısının rhizosferinden ve doku içerisinden bakterilerin hiç birini izole edememişlerdir.

Kangwon-do'da Paro gölünde çorak bir alandaki topraktan izole edilen bazı mikroorganizmaların bitki büyümesini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Elektron transport sistemi ve floresan diasetat yöntemi ile ölçülen canlı toprak bakterileri sayısı ve toprak mikrobiyal aktivitesinin bu bakterilerle inokule edilmiş toprakta daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu inokulasyonun bitki büyümesini teşvik edici etkisi fitohormon üretimi ile ve inokule edilen bakteriler tarafından çözülmeyen fosforu çözmesinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. *Pseudomonas fluorescens*'in inokule edilen üç izolatın bitki büyümesini teşvik edici bazı fitohormonları (ince tabaka kromatografi ve GC/MS ile doğrulanan indol-3-asetik

asit) ürettiği bildirilmiştir. *P. fluorescens*'in B16 ve M45 izolatları $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 'dan sırasıyla 502,4 ve 206,1 mg/l çözülebilir fosfor ürettiği belirlenmiştir (Jeon ve ark., 2003).

Silva ve ark. (2004), tarla koşullarında verimi arttırmanın yanında doğal olarak oluşan hastalıklara karşı domates bitkilerini korumak amacıyla domates tohumlarına Rhizobakteriler ile inokule etmiştir. Doksan günden fazla bir gelişme periyodunda mikroorganizma uygulanmış veya uygulanmamış tohumlardan gelişen domates bitkilerine değişik aralıklarla fungusit (chlorothalonil) uygulamışlardır. Tarlada yetişen domates bitkilerinde doğal olarak gelişen erken yanıklık (*Alternaria solani*), geç yanıklık (*Phytophthora infestans*) ve septoria yaprak lekesi (*Septoria lycopersici*) olmak üzere üç hastalık saptamışlardır. Kontrol ile karşılaştırıldığında tüm uygulamaların hastalık şiddetini azalttığını, en yüksek meyve veriminin mikroorganizma uygulanmamış tohumlardan gelişen bitkilere 90 günde 20 kez fungusit uygulandığında ve mikroorganizma uygulanmış tohumdan gelişen bitkilere 10 kez fungusit uygulandığında elde edilmiştir. Ancak, tüm uygulamaların kontrolden daha fazla ürün artışı sağladığını bildirmişlerdir. Rhizobakterilerle kimyasalların kombine edilmesi sonucu ilaçlama sıklığında bir azalma ve verimde bir artış gözlemlenmiştir.

Bitki büyümesini teşvik edici bakteri *Burkholderia* sp. PsJN izolatı tarafından *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay bitkilerinin kolonizasyonu kontrollü koşullar altında araştırılmıştır. Yabani tip izolat PsJN ve genetik mühendislikle geliştirilmiş *gfp* (PsJN::*gfp2x*) veya *gusA* (PsJN::*gusA11*) geni ile işaretlenmiş bu izolat saymada ve doku kolonizasyonunun görülmesinde kullanılmıştır. Gelişmiş 5 yapraklı 4-5 haftalık bitkilerin rhizosferi bakteri süspansiyonu ile inokule edilmiştir. Organların bakteriler ile epifitik ve endofitik kolonizasyonu mikroskopik gözlemlerle ve sulandırma sistemi ile kronolojik olarak önce kök yüzeyinde, daha sonra kök dokusu içinde ve en sonunda 15 internod ve 15 yaprak dokusunda belirlenmiştir. PsJN kolonizasyon deneyleri bu izolatın asma kök yüzeyine kolonize olduğunu göstermiştir. Hücrelerin yan köklerin çıktığı bölgelerde ve kök ucunda da çoğaldığı tespit edilmiştir. Konukçu savunma reaksiyonunun eksodermiste ve birkaç kabuktaki hücre tabakasında görüldüğü, bakterilerin gövde ve yaprak yüzeyinde bulunmadığı fakat bitkilerin 15

internod ve 15 yaprağın ksilem iletim demetinde görüldüğü bildirilmiştir. Bakterilerin 15 internod dokusundan çok, 15 yaprakta daha fazla olduğu ve stomanın altındaki boşlukta bulunduğu belirlenmiştir. Bununda *Burkholderia* sp. PsJN izolatının lokal konukçu savunma reaksiyonunu teşvik ettiği ve transprasyon akıntısı ile havayı kısımlara sistemik olarak dağıldığı ileri sürülmüştür (Compant ve ark., 2005).

2.3. Lipopolisakkaritler (LPS)

Galanos ve ark. (1969), R form bakterilerden Lipopolisakkaritlerin (LPS) ekstraksiyonu için spesifik bir metot geliştirmişlerdir. Tek fazlı ekstraksiyon karışımını sıvı fenol, kloroform ve petrolium eterinden oluştuğunu ve R form LPS'lerin (glikolipid) doğal lipofilik olmasından dolayı tamamen karışımda çözülmediğini, proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritler kadar iyi S ve T form LPS'lerin çözülmediğini ve onların ekstraktan ayrıldığını bildirmişlerdir. Verim genellikle fenol-su ekstraksiyonundan elde edilenden daha fazla olmuş ve kazanılan ürünler genellikle suda erimiştir. LPS'ler o zamana kadar denedikleri R form bakterilerin hepsinden başarı ile ekstrakde etmişlerdir.

Agrobacterium tumefaciens'den izole edilen LPS'in virulent bakterilerin teşvik ettiği urları engellediği, avirulent izolatlarından elde edilen LPS'nin bunu başaramadığı, bununla birlikte LPS ve *Agrobacterium* virulens plazmidini kaybetmiş NT1 ve IIBNV6 avirulens izolatların tüm hücresinin de engelleyici etkide bulunduğu belirtilmiştir (Whatley ve ark., 1976).

Hitchcock ve Brown (1983) tarafından yapılan bir çalışmada, *Salmonella* mutantları arasında farklı kimyasal tipli LPS'lerin morfolojik farklılıkları poliakrilamid jel gümüş boyama ile analiz edilmiştir. LPS kimyasal tiplerinde biyokimyasal farklılıkları saflaştırılan LPS'lerin eşsiz profillerinde yansıtmışlardır. Lizize olan tüm hücrelerde saflaştırılan LPS'lerin profillerinin de her bir kimyasal tip için eşsiz olduğunu bulmuşlardır.

Newman ve ark. (2000), bitki patojeni ve bağırsak bakterilerinin LPS'leri uygulanmış biber (*Capsicum annuum*) cv. ECW10R yapraklarına sonradan inokule edilen fitopatogenik *Xanthomonas*'lara karşı bitkinin tepkisinin birçok yönden farklı

olduğu, LPS ön uygulamasının yapıldığı *avrBsI* avirülens geni taşıyan biber bitki yaprağında *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (gen için gen intereaksiyonu) ve *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (konukçu olmayan intereaksiyon) tarafından neden olunan hipersensitif reaksiyonunun engellendiği bildirilmiştir. Ortaya çıkan bitki dayanıklılığının muhtemelen sebebinin potansiyel antimikrobiyal feruloyl- ve coumaroyl-tyramine fenoliklerin önceden sentezlenmiş olması ve alternatif olarak da bazı patogeneze ile ilgili (PR) protein genlerinin ekspresyonundaki değişimlerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Benzer etkiler fenolik sentezinin zamanlamasında *X. campestris* pv. *campestris* ile uygun intereaksiyonda da görülmesine rağmen tepkinin seviyesi daha az olmuştur. Bitkiler tarafından LPS'in tanınması aşırı doku zararlanmasının olmamasına, dayanıklılığın sağlanmasına ve bununla birlikte fitopatogenik bakterilerin bitki hücrelerinde LPS'in (ve diğer nonspesifik bakteriyel elisitorlerin) etkisini bastırmak için mekanizmalar geliştirmiş olabileceği düşüncesini ileri sürmüşlerdir.

Reitz ve ark. (2000), canlı ve sıcaklıkla öldürülmüş *Rhizobium etli* izolat G12 rhizobakterisinin hücreleri patates kist nematodu *Globodera pallida* enfeksiyonuna karşı patates köklerinin sistemik dayanıklılığını teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Teşvik edilmiş dayanıklılığın daha iyi anlaşılması için araştırmacılar çalışmalarını teşvik edici etkenin belirlenmesi üzerine yoğunlaştırmışlardır. Ekstraselüler polisakkaritler (EPS) ve LPS gibi bakteriyel yüzey karbonhidratlarının *Rhizobium* ve baklagiller arasında oluşan simbiyotik ilişkide oynadıkları rolü açıklamaya çalışmışlardır. Bakteriyel kültürden ekstrakte ettikleri EPS ve LPS'yi patates köklerine uygulayarak bitki parazitik nematoduna karşı dayanıklılık teşvik edilmiştir. EPS *G. pallida* enfeksiyonuna etki etmediği halde LPS 1 ve 0,1 mg ml⁻¹ kadar düşük konsantrasyonda dahi nematod enfeksiyonunu önemli düzeyde azalttığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar bölünmüş kök deneyleriyle kök sisteminin yarısına LPS uygulamasının diğer yarısındaki *G. pallida* enfeksiyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Alexandrova ve ark. (2000), *Agrobacterium vitis*'in bir nopalın izolatından LPS fenol-kloroform-petrolüum eter ekstraksiyon metodu (PCP) ile ekstrakte etmişler, DNase/RNase, proteinase K ve dializ ile saflaştırmışlar, poliakrilamid gel elektroforez (SDS-PAGE) ile karakterize etmişler ve asma sürgün nodul

segmentlerinde denemişlerdir. 25-1000 µg/ml konsantrasyonda LPS karışımının infiltrasyonunun bir ay içerisinde asmada doku nekrozuna ve kallus oluşumuna neden olmadığı, LPS uyguladıktan 24 saat sonra virü lent bir *A. vitis* kültürü düşük konsantrasyonda (5×10^2 hücre/ml yoğunluktan 5 µl damlatarak) inokule edildiğinde doku nekrozu ve tümör oluşumunu önlediği fakat yüksek konsantrasyonda (5×10^5 hücre/ml yoğunluktan 5 µl damlatarak) patojen inokule edildiğinde LPS uygulamasının ur oluşumunu önleyemediğini söylemişlerdir.

Lipopolisakkaritler eukaryotik hücrelerde bir takım çeşitli biyolojik etkilere sahip Gram negatif bakterinin genel bir bileşiği olduğu ve memeli ve böcek hücreleri üzerine yapılan kapsamlı çalışmalarla karşılaştırıldığında bitki hücrelerinde LPS'in etkilerinin çok az araştırıldığı ve LPS bitkilerde savunma mekanizmasını teşvik edebileceği fakat birçok durumda bu doğrudan etkilerin zayıf olduğu görülmüştür. Biber (*Capsicum annuum*) yapraklarında fitopatojenik *Xanthomonas*'lar tarafından bitki savunması ile ilgili tepkilerin teşvikinde LPS'in önceden inokulasyonunun etkisi araştırılmış ve *X. campestris* pv. *campestris* veya uygun olmayan *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatlarına karşı biberin dayanıklılığının hydroxycinnamoyl-tyramine conjugatı, feruloyl-tyramine (FT) ve coumaroyl-tyramine (CT)'nin artan sentezi ile ilgili olduğu saptanmıştır. *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* uyumlu izolatına karşı tepkide yalnızca eser miktarda FT ve CT üretildiği ve bazı bakterilerin LPS'inin yapraklara uygulanması FT ve CT'nin sentezlenmesini teşvik etmediği fakat sonradan bakteri inokulasyonunun teşvik kinetiğini değiştirdiği, uygun olmayan intereaksiyonda CT ve FT sentezinin hızlandığı ve uygun ilişkide de sentezin oldukça arttığı bildirilmiştir. Dokularda en hızlı tepkinin LPS uygulamasının 4. saati içinde alındığı ve potansiyel durumun en az 38 saat devam ettiği tespit edilmiştir. LPS uygulanmasının erken dönemlerinde asidik β-1,3-glukonaz kodlayan genlerin transkripsiyonu gibi diğer savunma tepkilerinin de oluşmasının mümkün olduğu vurgulanmıştır (Newman ve ark., 2002).

2.4. Biyolojik Mücadele

Bir agrocın üreten *Agrobacterium vitis*'in tümörögenik olmayan (F2/5) izolatı *in vitro*'da 25 *A. vitis* izolatından 21'inin ve 10 *A. tumefaciens* biovar 1 izolatının

2'sinin büyümesini engellediği ve 9 biovar 2 izolatının hiçbirine etki etmediği bildirilmiştir. Serada asma (*Vitis vinifera* L. cvs. Chardonnay ve Riesling) gövdelerine yaralayarak uygulandığında ur büyüklüğünü 10 *A. vitis* izolatından 7'sinin ve 2 *A. tumefaciens* biovar 1 izolatının 1'inin ve 1 biovar 2 izolatının birinde önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. İnokulasyon bölgesindeki ur sayısında bir *A. vitis* izolatı hariç hepsinde azalma görülmüştür. Patojen ile F2/5'in birlikte uygulanmasının patojen verilmeden önce yapılan F2/5 uygulamasından daha etkili olduğu, patojen F2/5 uygulanmadan önce inokule edildiğinde kontrol seviyesinin önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır. F2/5 ve patojenin eşit miktarda inokule edilmesinde en fazla etkinin elde edildiği ve 1:10 ve 1:100 (F2/5: patojen) oranlarında bir azalmanın meydana geldiği görülmüştür (Burr ve Reid, 1994).

Tümörögenik olmayan *Agrobacterium vitis* izolatı F2/5'in agrocine oluşturmamayan mutanlığı doğal tip izolatı kadar iyi asma urunu kontrol ettiği ve bundan dolayı da biyolojik kontrol mekanizmasında agrocine önemli bir faktör olmadığı ileri sürülmüştür. Ayrıca tümörögenik ve biokontrol izolatlarının asma hücrelerine tutunma seviyelerinin ilişkisi de ölçmüştür. Tümörögenik (CG49 ve K306) ve biyolojik kontrol izolatların (F2/5 ve agrosine oluşturmamayan mutant 1077) tutunmasının, izolatların karışık uygulanmasında genellikle azaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte tüm izolatların yüksek popülasyonları (10^3 - 10^5 hücre/ml) karışık inokulasyonu takiben tutundukları, tutunma bölgesi için yarışmanın biyolojik kontrolün bir mekanizması olmadığı ileri sürülmüştür. CG49 tarafından asmalara T-DNA'nın aktarılması GUS geninin ekspresyonunun ölçülmesi ile F2/5 veya 1077 varlığında önemli derecede azaldığı veya engellediği belirlenmiştir. F2/5 ile inokule edilen sürgün eksudatları tarafından Ti plazmidin virülens genleri teşvik edildiği ve F2/5 ve 1077'nin otoklavla ve sonik dalgalarla hazırlanması T-DNA'nın aktarımını inhibe etmemiş ve ur oluşumunu kontrol edememiştir. F2/5 tarafından domates, ayçiçeği ve *Kalanchoe daigremontiana*'da ur oluşumunun engellenmemesi bunun asmalara spesifik olduğunu göstermiştir (Burr ve ark., 1997).

Bazzi ve ark. (1999), İtalya'da asma urunun biyolojik kontrolünde tümörögenik olmayan *Agrobacterium*'ların kullanım potansiyelini belirlemek amacıyla 420A anacına duyarlı *Malvasia Istriana* bağ çeşidini aşıları bitkilerde *Agrobacterium*

radiobacter ve *Agrobacterium vitis*'in 4 izolatının koruyucu etkisi araştırılmıştır. Ayrıca her bir uygulamanın asmanın canlılığı ve büyümesi üzerine etkisini de değerlendirilmiştir. Antagonist uygulaması ile patojen tarafından dokuların kolonizasyonunun oldukça azaldığını fark etmişlerdir. Diğer önemli etkinin de kullanılan CG49 nopalin izolatının yüksek konsantrasyonu ile teşvik edilen nekroz oluşumunun azalmasıdır.

Moleküler ağırlığı 761 olan bir antimikrobiyal bileşik Ar26, patojenik olmayan *Agrobacterium vitis* E26 izolatının kültüründen izole edilmiştir. Ar26 aktif karkolla absorpsiyon, %70 etanol ile ekstraksiyon ve sırasıyla DEAE-Separose, SP-Sepharose ve Mono S iyon değiştirme kromatografi ile saflaştırılmıştır. Ar26, kültür kaplarında *A. vitis* M13-2 ve *A. tumefaciens* CY4'nin büyümesini oldukça fazla engellediği saptanmıştır (Wang ve ark., 2003).

Japonya'da fidanlıklardan toplanan asmaların aşı bölgesinde patojenik ve patojenik olmayan *Agrobacterium* izolatları elde edilmiş ve klasik tanı testleri, gen dizilim analizi ve multipleks polimeraz zicir reaksiyonu ile patojenik izolatlar *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 ve patojenik olmayan *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 olarak tanılanmıştır. Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fidelerinin gövdeleri hem patojen olarak *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 izolat G-Ag-27, hem de kontrol olarak asmadan izole edilen kontrol izolatlarından biri veya *A. radiobacter* biovar 2 K84 izolatı ile inokule edilmiştir. 1:1 patojen/patojen olmayan hücre oranıyla yapılan bir testte tüm *A. radiobacter* biovar 3 izolatları yalnızca patojenle inokule edilen pozitif kontrolle karşılaştırıldıklarında ur oluşumunda ve büyüklüğünde azalmanın meydana geldiği görülmüştür. İzolat VAR03-1'in asmada ur oluşumunun ve ur büyüklüğünün azalmasına özellikle etkili olduğu saptanmıştır. Test edilen birçok patojen olmayan biovar 3 izolatlarının, bakteriosinogenik olduğu ve YMA besisi yerinde *A. tumefaciens* biovar 3 izolatlarına karşı bir inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir (Kawaguchi ve ark., 2005).

Vitis vinifera çeşitleri don zararına oldukça duyarlıdır. Don koşulları asma bitkilerinde *A. vitis*'in infeksiyonu için gerekli olan yaralara neden olurlar. Sürgünlerin en üstteki gözlerde yaralar ur oluşumunda önemli yer tutmaktadır. Gözün aşağısındaki yaraların inokulasyonunda ur oluştuğu, oysa gözün ters

tarafındaki yaralarda ur oluşumuna katkıda bulunan indole-3-asetik asidin akması sonucu urların meydana gelmediği, ancak *A. vitis* ile inokulasyondan önce yara yerlerine indol asetik asit uygulanmasının ur oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. Patojen uygulanmasından önce bir biyolojik kontrol ajanı olan *A. vitis* F2/5 izolatu ile inokule edilen yara bölgesinde ur meydana gelmeme nedenini yaraların iyileşmesi süresince patojen tarafından gen aktarımına duyarlı olan kambiumda oluşan kallus hücreleri olduğu belirlenmiştir. F2/5'in gen aktarımının mekanizması bilinmemesine rağmen gözlemlere göre kambiumda normal yara iyileşmesini engelleyen nekroz oluşumuna karşı F2/5 uygulaması önerilmiştir (Creasap ve ark., 2005).

2.5. *Agrobacterium* spp.'nin Epidemiyolojisi

Agrobacterium tumefaciens'in neden olduğu kök boğazı uru Zinfendal asma (*Vitis 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 urla kaplanan asmalarda ur oluşturmayanlardan daha az salkım verimi ve gelişme belirlenmiştir. 4 yıllık bir periyotta kontrolle karşılaştırdıklarında salkım veriminin ve budama dallarının sırasıyla %20- 40 ve %10- %40 azaldığı ve gövde ölçülerinin ortalama %9 daha az olduğu tespit edilmiştir. Hafif hastalıklı bitkilerde verimde ve asmanın gücünde önemli bir azalmanın olmadığı gözlenmiştir. Test periyodu boyunca bağ uru hastalığının meydana gelme oranı ve şiddetinde değişiklikler olduğu, başlangıçta bazı sağlıklı bitkilerde yeni urların meydana geldiği ve bazen hastalıklı bitkilerdeki urların çürüdüğü ve yerine yeni urların ortaya çıkmadığı belirlenmiştir (Schroth ve ark., 1988).

İki asma anacı üzerine asma uruna (*Agrobacterium vitis* ve *Agrobacterium tumefaciens*) duyarlı aşı kalemin etkisi sera ve arazi çalışmalarında incelenmiştir. 2 aylık sera denemesi sonucunda duyarlı aşı kaleminin (*Vitis vinifera* cv. Kiralyleanyka) dayanıklı (*Vitis riparia* cv. Gloire) veya duyarlı bir anaç (*V. berlandieri* X *V. riparia* cv. Teleki5C) üzerine aşılınmış olmasının bağ urunun oluşumu üzerine bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Sekiz *Agrobacterium* izolatının altısının neden olduğu urların ağırlıklarında önemli bir farklılığın ortaya çıkmadığı

ancak *A. tumefaciens* izolat 16/6 ve *A. vitis* izolat 2/3 aşısız veya 5C'ye aşılı Kiralyeanyka asmasında Gloire üzerine aşılı olanlardan önemli ölçüde daha büyük urlar olduğu bildirilmiştir. Aynı asma çeşidi dikilmiş bağda ve 4 yıllık bir periyotta yapılan gözlemlerde Gloire'ye aşılı asmalarda 5C üzerine aşıl原因 asmalardan daha az ur meydana geldiği gözlenmiştir. Diğer bir arazi çalışmasında doğal infekteli *V. vinifera* cv. Blau Frankisch (duyarlı) aşı kalemi her iki anaç üzerine aşıl原因 asmalarda 2 yıl sonra urlara neden olduğu, 5 yılda 5C'de %79 ur oluşurken Gloire'de %9 oranında ur meydana geldiği bildirilmiştir. Tipik doğal simptomlar ortaya çıktıktan sonra tüm omcanın ve gövdenin kuvvetinin azaldığı, 5C üzerindeki birçok omcanın ve Gloire üzerindeki çok az omcanın tamamen öldüğü gözlenmiştir. Altı yılın sonunda 5C üzerine aşıl原因 omcaların %13'ü Gloire üzerindeki %82'inin canlı kaldığı ve bununla birlikte *Agrobacterium*'un birçok patojenik izolatının 5C'nin köklerinden izole edildiği, Gloire'den bu işlemin başarıl原因ı bildirilmiştir (Süle ve Burr, 1998).

Agrobacterium spp. popülasyonu üzerine solarizasyonun etkisini belirlemek amacıyla Ürdün'ün farklı iki bölgesinde yapılan çalışmalarda kullanılan 3 *A. tumefaciens* Ürdün izolatının popülasyonunun önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bakteriyel popülasyonda azalmanın toprak tipi ve sıcaklıkla ilişkili olduğu ve *Agrobacterium* spp. popülasyonunun inokulasyondan sonra ilk 3 hafta içinde %99 azaldığı belirlenmiştir. Ürdün vadisinde (killi kumlu ve 39-51°C sıcaklık aralığı) ve yaylalarda yapılan karşılaştırma denemelerinde (killi ve 29-46°C sıcaklık aralığı) daha düşük oranda bakteriler yeniden elde edilmiştir. Solarizasyonun topraktan tamamen *Agrobacterium* spp.'yi elemine edemediği fakat GF677 ve acı badem anaç fidanlarındaki kök boğazı uru, Ürdün vadisi ve yaylalarında solarizasyon yapılan alanlarda önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Khlaif, 2003).

Bölgemizde bağlarda *Agrobacterium* ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamasına rağmen diğer bitkilerde bu konu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Aysan ve Şahin (2003), Akdeniz bölgesinde güllerde *A. tumefaciens*'in patlama yaptığını bildirmişlerdir. Adana ve Mersin illerindeki 6 farklı gül serasını inceleyerek yaklaşık %40'ında ur oluşturduğunu gözlemişlerdir. King B besi yeri kullanarak floresan olmayan, gram negatif bakterileri izole etmişler ve 25 izolatın aerobik, spor

oluşturmadığı, hareketli, çubuk şeklinde, oksidaz negatif ve katalaz pozitif olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca yağ asit analizi ile bu izolatların %72 ile %91 arasında *A. tumefaciens*'e benzediğini belirlemişlerdir.

Aysan ve ark. (2003), Türkiye'de kaysıda *A. tumefaciens*'i izole ettiklerini ilk defa rapor etmişlerdir. 2002 yılında Adana ve Mersin illerinde iki farklı bahçede 2 yaşındaki kaysıların yaklaşık %30'unun ur oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Urulu dokulardan elde ettikleri izolatların fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini ve yağ asit profillerini belirlemişlerdir. Bu izolatların yağ asit profiline göre %94,6 ile %98,2 oranları arasında *A. tumefaciens*'e benzer olduğunu saptamışlardır. Elde ettikleri izolatları havuç dilimlerine ve domates bitkilerine inokule etmişler ve havuç dilimlerinde 8 günde domates bitkisinde ise 15-20 günde ur oluştuğunu gözlemişlerdir.

Türk poleni ve kara mum ekstraktlarının *in vitro*'da antibakteriyel aktiviteleri *A. tumefaciens*, *A. vitis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *E. carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas corugata*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (*P. syringae* pv. *phaseolicola*), *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ve *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*'yı içeren 13 farklı bitkil bakteriyel patojen türlere karşı araştırılmıştır. Test edilen bakteriler arasında 1/5 polen ekstraktına *A. tumefaciens* en fazla duyarlı olduğu ve duyarlılığın azalan sırasıyla *A. tumefaciens* > *P. syringae* pv. *tomato*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* > *Erwinia amylovora*, *P. corugata*, *R. solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* > *A. vitis*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* > *E. carotovora* pv. *carotovora*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. syringae* pv. *phaseolicola* > *P. syringae* pv. *syringae* şeklinde olduğu belirlenmiştir. Kara mum ekstraktının 1/10 konsantrasyonuna en duyarlı *P. syringae* pv. *syringae* olduğu ve duyarlılığın azalma sırasıyla *P. syringae* pv. *phaseolicola* > *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. corugata*, *R. solanacearum* > *E. carotovora* pv. *carotovora*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Erwinia amylovora*, *A. tumefaciens*, *A. vitis*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* gibi olduğu belirlenmiştir. En az aktivite

1/100 polen aktivitesinde ve 1/1000 kara mum konsantrasyonunda elde edilmiştir (Basım ve ark., 2006).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Mersin, Hatay, Gaziantep, Adıyaman (Gölbaşı) ve Kahramanmaraş illerindeki bağ alanlarından toplanan urlu asma örneklerinden izole edilen *Agrobacterium*'un bölge izolatları, toprak örneklerinden izole edilen PGPR izolatları, Dr. S. Sule'den (Budapest, Macaristan) (S4 ve AT-1), Dr. K. Rudolph'dan (Göttingen, Almanya) (GSPB 7) ve Dr. M. F. DÖNMEZ'den (Atatürk Üniversitesi) (MFD-75) temin edilen referans izolatlar oluşturmuştur. Patojenite çalışmalarında asma (*Vitis vinifera* cv. Honüsü), domates (*Lycopersicon esculentum* cv. Heinz 2274) ve kalonşe (*Bryophyllum daigremontianum*) bitkileri kullanılmıştır. Ayrıca besi yerleri, çeşitli kimyasallar ve PCR malzemeleri bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. *Agrobacterium vitis*'in İzolasyonu

Urlu asma örneklerini toplamak amacıyla Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman (Gölbaşı) ve Kahramanmaraş illerindeki bağ alanlarına bahar ve yaz aylarında gidilerek taze ur oluşturmuş bitkilerden örnekler alınmış ve bir gazete kağıdına sarılarak naylon torbalara konmuştur. Koyu yeşil grimsi veya açık kahverengi ve henüz kuruma belirtisi göstermeyen urlar taze ur olarak kabul edilmiştir. Taze urlar 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). 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 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 (KB) (Ek 1) ve Patates Dekstroz Agar+CaCO₃ (PDA+CaCO₃) (Ek 1) besi yeri

bulunan petrilere çizilerek ekim yapılmış ve petrilere $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün inkübatörde inkübe edilmiştir. Tipik *A. vitis* kolonileri (krem renkli kısmen şeffaf, etrafı düz, yuvarlak ve konveks) bu petrilere seçilerek saf kültür elde edene kadar PDA+CaCO₃ besi yerine çizilerek ekim yapılmıştır. Saf kültürler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere cam tüplerde eğik olarak hazırlanmış Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat (YDC) agar (Ek 1) içeren besi yerinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987).

3.2.2. *Agrobacterium vitis*'in Tanısı

3.2.2.1. Klasik Yöntemler

Agrobacterium izolatlarının türlerini belirlemek için PDA+CaCO₃ besi yerinde asit temizleme, laktozdan 3-ketolaktoz üretimi, demir amonyum sitrat kullanımı, %2 NaCl içeren besi yerinde gelişme, erythritol, melezitos 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 gibi testlemeler Moore ve ark. (2001)'na göre yapılmıştır.

3.2.2.1.(1). PDA+CaCO₃ Besi Yerinde Asit Temizleme

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları PDA+CaCO₃ besi yerine üç tekrarlı olarak çizgi ekim yapılarak $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır. 2 gün sonra koloni etrafında besi yerinde saydamlaşma görülen izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.1.(2). Laktozdan 3-Ketolaktoz Üretimi

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları ile %1 α -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 ve her izolat 3 kez tekrarlanmıştır. Petrilere $27\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün kültüre alındıktan sonra agarlı besi yerinin üzerini kapatacak şekilde Benedict ayırıcı (Ek 1) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında

bir saat bekledikten sonra kolonilerin etrafında oluşan sarı bir hale pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.1.(3). Demir Amonyum Sitrat Kullanımı

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları demir amonyum sitrat besi yeri (Ek 1) içeren tüplere üç tekerrürlü olarak ekim yapılmıştır. Tüpler inkubatorde $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün inkübe edilmiş ve tüplerin üzerinde oluşan kiremit renginde bir tabaka pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.1.(4). %2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları %2 NaCl ilave edilmiş Nutrient Glikoz Agar (NGA) (Ek 1) besi yeri içeren petri kaplarında $25\pm1^{\circ}\text{C}$ '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).

3.2.2.1.(5). Sakkaroz ve Eritritolden Asit Üretimi

Asit üretimi için temel besi yerinden (Ek 1) 9 birim üzerine %10'luk filtre ile steril edilmiş eritritol, melezitoz veya sakkaroz ilave edilerek tüp içerisinde hazırlanan besi yerine urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları ile 3 tekerrürlü olarak ekim yapılmış ve 2 gün $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır. Besi yerinin rengini sarıya çeviren izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.1.(6). Oksidaz Testi

Taze hazırlanmış %1'lik N; N; N; N' - Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diclorid eriyiği steril filtre kağıdına bir damla damlatılmıştır. NGA besi yerinde geliştirilen urlu dokulardan izole edilen 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 oluşturmayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs, 1956).

3.2.2.1.(7). Sitrat Kullanımı

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları eğik olarak tüplerde hazırlanan sitrat besi yeri (Ek 1) üzerine her bir izolat 3 tekerrürlü olacak şekilde ekim yapılmıştır. Tüpler inkubatörde $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün geliştirilmiş ve tüplerdeki besi yerinin rengi koyu maviye dönenler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.1.(8). Litmus Milkde Reaksiyon

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları litmus milk besi yeri (Ek 1) içine bir özeyle her bir izolat 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapılmıştır. Tüpler inkubatörde $27\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün geliştirilmiş ve tüplerdeki besi yerinin rengini maviye dönüştürenler alkali, kırmızıya dönüştürenler ise asit oluşturan olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.1.(9). Malonik Asitten Alkali Oluşturma

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları ile test tüplerinde hazırlanan malonik asit besi yeri (Ek 1) içine bir özeyle her bir izolat 3 tekerrürlü olacak şekilde ekim yapılmıştır. Tüpler inkubatörde $27\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 hafta geliştirilmiş ve tüplerdeki besi yerinin rengini maviye dönüştürenler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.1.(10). Mucic ve L-tartarik Asitten Alkali Oluşturma

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları ile test tüplerinde hazırlanan mucic ve L-tartarik asit besi yeri (Ek 1) içine bir özeyle 3 tekerrürlü olarak ekim yapılmıştır. Tüpler inkubatörde $27\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 hafta geliştirilmiş ve tüplerdeki besi yerinin rengini maviye dönüştürenler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.1.(11). 35°C’de Gelişme

Urlu dokulardan izole edilen bakteri izolatları Nutrient Glikoz Agar (NGA) (Ek 1) besi yeri içeren petri kaplarında 3 tekerrürlü olarak $35\pm 1^\circ\text{C}$ ’de 2 gün geliştirilmiştir. Besi yerinde koloni gelişimi gösteren izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Moore ve ark., 2001).

3.2.2.2. Yağ Asit Analizleri ile Bakterilerin Tanılanması

Çalışmanın bu kısmı Atatürk Üniversitesi, Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde (Erzurum) Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN danışmanlığında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan bazı *Agrobacterium* izolatları De Boer ve Sasser (1986)’in yöntemine göre yağ asitleri hazırlanmış ve yağ asit metil esterler gaz kromatografisi (HP6890, Hewlettpackard, Palo Alto, CA) aracılığıyla birbirinden ayrılarak tanılanmıştır. Türlerin tanısında Mikrobiyal Identifikasyon Sistemin (Shelock MIS version 4.5, Microbial ID, Inc., Newark, Delaware) bilgisayar programı kullanılmıştır. Çalışmada aşağıdaki yöntem izlenmiştir.

Asmadaki urlardan izole edilen *Agrobacterium* izolatları önce Tryticase Soy Agar (TSBA) besi yerine (Ek 2) 4 fazlı çizilerek ekim yapılmış ve $25\pm 1^\circ\text{C}$ ’de 24 saat geliştirilmiştir. Gelişen bakteri kolonilerinin 3. ve 4. fazları bir öze yardımıyla toplanarak ağzı teflon kapaklı steril cam tüplere konulmuştur. Hücreleri parçalamak için her bir test tüpüne 1 ml Çözelti 1’den (Ek 2) eklenmiştir. Tüpler 10 saniye tüp karıştırıcı ile çalkalandıktan sonra 100°C ’deki su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpler tekrar 10 saniye tüp karıştırıcı ile çalkalandıktan sonra 100°C ’deki su banyosunda 25 dakika durdurulmuştur. Test tüplerine Çözelti 2’den (Ek 2) 2 ml ilave edilmiş ve tüp karıştırıcı ile 10 saniye çalkalandıktan sonra tüpler 80°C ’deki su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpler -20°C ’de 10 dakika bırakılmıştır. Soğutulmuş tüplerin her birine Çözelti 3’den (Ek 2) 2,5 ml ilave edilmiş ve 10 dakika çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Tüplerin üstünde oluşan faz başka bir tüpe pastör pipeti aracılığı ile alınmış ve Çözelti 4’den 3 ml ilave edilmiştir. Tekrar çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika

bekletilerek tüpün üstünde oluşan faz alınarak 2 ml'lik gaz kromotografisi tüplerine aktarılmış ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Bu tüpler Mikrobiyal Tanılama Sistemi (Microbial Identification Sistem) (MIS) cihazı (HP6890, Hewlettpackard, Palo Alto, CA) üzerindeki örnek depolama birimine yerleştirilmiş ve daha sonra MIS'in bilgisayar paket programı (Shelock MIS version 4.5, Microbial ID, Inc., Newark, Delaware) kullanılarak her izolat tanılanmıştır.

3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile *Agrobacterium*'un Tanılanması

Urlu dokulardan izole edilen *Agrobacterium* izolatları nutrient broth sıvı besi yerinde 200 dev./dak. dönen çalkalayıcıda gece boyu $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de geliştirilmiştir. Bakterilerin DNA'ları De Boer ve Ward (1995)'a göre izole edilmiştir. Nutrient broth sıvı besi yerinde gelişen bakterilerden 1 ml steril ependorf tüplere alınmış ve 14.000 dev/dak.'da 20 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet alınarak hücreleri parçalamak için üzerine %1'lik SDS+TAE bufferdan (Ek 3) 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 (Ek 3) ilave edilmiş ve 14.000 dev/dak.'da 10 dakika santrifüj edilerek amonyum asetat artıklarının altta toplanması sağlanmıştır. Ependorf tüpün üst kısmında toplanan DNA kesik bir pipet ucu ile alınmış (yaklaşık 130 µl) ve yeni bir ependorf tüpe konmuştur. 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. 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 bidestile su (ddH_2O) ilave edilerek DNA iyice eritilmiştir. İzole edilen DNA'lar -20°C 'de daha sonra PCR çalışmalarında kullanmak için muhafaza edilmiştir.

PCR çalışmaları için iki farklı primer seti (*A. vitis*'e spesifik virA 5' TTCAGTCGCGCAAGCAGTT 3' ile 5' CGGCAATTCGTATCACGGA 3' ve *A. tumefaciens*'e spesifik tms2a 5'-CGC CAC ACA GGG CTG GGG GTA GGC-3' ve tms2b 5'-GGA GCA GTG CCG GGT GCC TCG GGA-3') kullanılmıştır (Eastwell

ve ark., 1995; Sachadyn ve Kur, 1997; Tan ve ark., 2003). PCR karışımı 2 µl DNA örneği, 12,5 µl PCR Master Mix (Promega, M7502) 20 pmol primer seti ve steril saf su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. *Agrobacterium vitis*'e spesifik primerler için PCR işlemlerinde amplifikasyon 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. *Agrobacterium tumefaciens*'e spesifik primerler için ise PCR işlemlerinde amplifikasyon 94°C'de 1 dakika birinci denetürasyon adımıyla başlatılmış ve 92°C'de 1 dakika, 54°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1,5 dakika 1 döngü olacak şekilde toplam 30 döngüye tamamlanmıştır. En son olarak 72°C'de 3 dakika bekletilerek PCR işlemi tamamlanmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde Sambrook ve ark., (1989)'a göre yapılmıştır. Bunun için %1,5 agaroz, TAE buffer tamponu (Ek 3) içerisinde ısıtılarak eritilmiştir. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra taraklar yerleştirilmiş jel tepsisine dökülmüştür. Agaroz jel donduktan sonra içinde TAE buffer bulunan elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra tarak jelden dikkatlice çıkarılmış ve oluşan çukurlara 2 µl loading buffer (Ek 3) ve 8 µl PCR ürünü karışımı bir mikropipet yardımıyla yerleştirilmiştir. Oluşan bantların ağırlıklarını ölçmek için 100 bp'lik moleküler ağırlık işaretleyici (marker, Fermentas SM 0632) kullanılmıştır. PCR ürünleri 80 volt elektrik verilerek yaklaşık 3 saat yürütülmüştür. 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. Etidyum bromit ile boyanan jeller üzerindeki bantlar transiliminatörde (302 nm) bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.3. Patojenin Hücre Süspansiyonundaki Yoğunluğunun Belirlenmesi

PDA+CO₂ besisi yerinde 48 saat geliştirilen bölge izolatlarından fizyolojik tuzlu su içerisinde hücre süspansiyonu hazırlanmış ve spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0,2 absorbans değerine ayarlanmıştır. Ayarlanan süspansiyondan 1,0 ml alınarak içerisinde 9,0 ml fizyolojik tuzlu su olan steril tüpe ilave edilmiş ve bu işlem 7 kere tekrarlanmıştır. -5, -6 ve -7 sulandırma serilerinin her birinden 100 µl

alınarak içerisinde NGA besi yeri olan her petriye ayrı ayrı ilave edilmiş ve bir baget ile ortam yüzeyine iyice yayılmıştır. Her bir seyreltme serisinden 3 tekrarlı olarak ekim yapılmıştır. 25°C’de iki gün kültüre alındıktan sonra gelişen koloniler sayılmış ve seyreltme serilerinin katsayısı ile çarpılarak ml’deki hücre sayısı belirlenmiştir (Klement ve ark., 1990).

3.2.4.Patojenite Testi

Hastalıklı bitki örneklerinden izole edilen bakterilerin patojenite testleri için asmanın (*Vitis vinifera*) yanı sıra domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Heinz 2274) ve kalonşe (*Bryophyllum daigremontianum*) bitkileri kullanılmıştır. İzole edilen bakteriler PDA+CaCO₃ besi yerinde 25±1°C’de 2 gün geliştirildikten sonra 2-3 haftalık domates bitkilerine ve kalonşe 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. Daha sonra klima odasında (16 saat ışık, 8 saat karanlık) gelişmeye bırakılmış ve 3 hafta sonra ur oluşturup oluşturumamasına göre değerlendirilmiştir.

Asmada ise patojenite çalışmaları klima odasında köklendirilen bitkilerin taze, yeşil sürgünün altındaki iki boğum arasındaki kısma bir bisturi yardımıyla açılan yaraya bir kürdan yardımıyla PDA+CaCO₃ 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.

3.2.5. *Agrobacterium vitis*’in Mücadelesi ile İlgili Çalışmalar

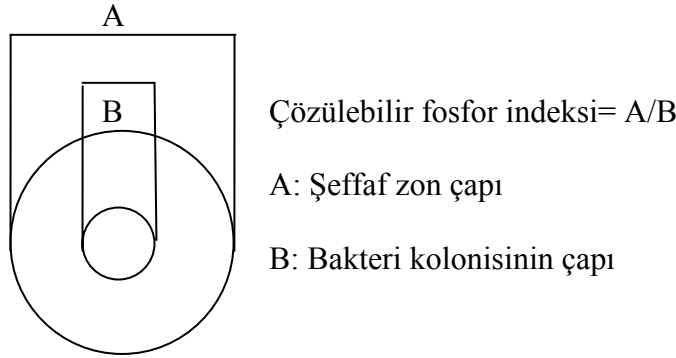
3.2.5.1. Dayanıklılığı Teşvik Edici PGPR’ların İzolasyonu ve Tanısı

Bitkilerde dayanıklılığı teşvik edici PGPR bakterilerinin izolasyonu amacıyla Adana, Mersin, Hatay, Osmaniye, Gaziantep ve Kahramanmaraş illerindeki bağ alanlarından diğerlerine göre daha iyi gelişmiş ve sağlıklı asmaların kök bölgesinden toprak örnekleri toplanmıştır. Laboratuara getirilen topraklar serilerek iki gün

kuruması için bekletilmiştir. Kuruyan topraklar 1 mm çaplı eleklerden elendikten sonra 10 g toprak alınarak 90 ml fosfat buffer-tuz tamponu (PBS) (1 lt: 8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,1 g Na_2HPO_4 ve 0,2 g KCl, pH: 7,4) içerisinde iki saat 100 dev./dak.'da çalışan çalkalayıcılarda çalkalanmıştır. Süspansiyondan 1 ml alınıp içinde 9 ml fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) bulunan tüpe ilave edilmiş ve tüp karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra içinden 1 ml alınarak tekrar içinde 9 ml fizyolojik tuzlu su (%0,85 NaCl) olan tüpe ilave edilmiştir. Bu şekilde 10 kat sulandırma serileri hazırlanmıştır. Bu 10 katlık seriler halinde hazırlanan süspansiyonlardan ikinci, üçüncü ve dördüncü sulandırma serilerinden 100 µl alınarak King B (KB) (Ek 1) besi yerine ekim yapılmış ve $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besi yerinde gelişen koloniler incelenmiş ve farklı morfolojik gelişim gösteren koloniler seçilerek saf kültür elde edinceye kadar KB besi yerine ekim yapılmıştır.

Topraktan izole edilen bakterilerin fosforu (P) çözme yeteneklerini belirlemek için sıvı NBRIP-BPB ve katı NBRIP (Ek 4) (Nautiyal, 1999) olmak üzere iki farklı besi yerleri kullanılmıştır. Bunun için rasgele topraktan izole edilmiş 14 farklı izolat seçilmiştir. Katı NB besi yerinde geliştirilen bu izolatlar fizyolojik tuzlu su içerisinde yoğunluğu 600 nm dalga boyunda absorbans değeri 0,1'e ayarlanmıştır. NBRIP-BPB sıvı besi içeren her bir tüpe yukarıdaki şekilde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl ilave edilmiş ve 80 dev./dak.'da çalkalayıcı üzerinde bir hafta $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de kültüre alınmıştır. Bu tüpler 10.000 dev./dak.'da santrifüj edilerek supernatantı alınmıştır. Bu supernatantın pH'ları ölçülmüş, 400, 600, 680 ve 800 nm dalga boyunda absorbans değerleri karşılaştırılarak ve 1 ml'de çözülmüş fosfor miktarları Barton (1948)'a göre belirlenmiştir.

Diğer yöntemde ise topraktan saf olarak izole edilen bakterilerin fosforu çözebilme yeteneklerini belirlemek için steril kürdan ile katı NBRIP besi yeri içeren her bir petriye 9 izolat olacak şekilde ekim yapılmıştır. Deneme 3 tekrarlı olarak kurulmuştur. Bir hafta sonra besi yerinde bakteri kolonisinin etrafındaki şeffaf zonun çapı ve bakteri kolonisinin çapı ölçülerek Şekil 3.1'deki formüle göre fosfor çözme indeksi belirlenmiştir. Fosfor çözme indeksi yüksek olan bakteriler seçilmiştir (Johri ve ark., 1999).



Şekil 3.1. Çözülebilir fosfor indeksinin hesaplanması

Bu izolatlardan fosfor çözme indeksi en yüksek olan 29 izolat seçilerek NBRIP sıvı besi yerinde çözebildiği fosfor miktarlarını belirlemek için kullanılmıştır. Seçilen 29 izolat sıvı NBRIP besi yerinde çalkalayıcı üzerinde bir hafta kültüre alınmıştır (Nautiyal ve ark., 2000). Daha sonra bakterileri ve suda çözülmeyen katı maddeleri $[Ca_3(PO_4)_2]$ çöktürmek için 10.000 dev./dak.'da 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Supernatant alınarak içinde çözülen fosfor miktarı Barton (1948) yöntemine göre belirlenmiştir. Sıvı besi yerinde en fazla fosfor çözen 9 izolat ve fosfor çözme indeksi en yüksek olan 1 izolat seçilerek saksı çalışmalarında kullanılmıştır. Seçilen bu PGPR izolatların karakterizasyonu için KB besi yerinde gelişme özelliği, gram reaksiyonu ve oksidaz testi yapılmıştır.

3.2.5.2. Seçilen PGPR İzolatların Antagonistik ve Siderefor Etkilerinin Belirlenmesi

Saksı çalışmasında kullanılmak üzere seçilen 10 PGPR izolat KB besi yerinde *A. vitis*'e karşı antibiyosis etkileri Krishnamurthy ve Gnanamarickam (1998) ve siderefor etkisi ise Kloepper ve ark. (1980) ile Bora ve Özaktan (1998)'a göre belirlenmiştir.

KB besi yeri içeren 9,0 cm'lik petri kaplarına PGPR izolatları petrinin üst kısmına doğru düz çizgi şeklinde ekim yapılmış ve 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra gelişen PGPR izolatına dik olacak şekilde dört farklı

noktadan (gelişen izolata temas ettirmeden) 4 düz çizgi şeklinde *A. vitis* ekimi yapılmış ve tekrar 25°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 96 saat sonra *A. vitis*’te engelleme zonları ölçülerek değerlendirilmiştir.

PGPR izolatlarının siderefor etkisi yukarıda anlatılan antibiyosis etkisini belirleme yöntemine göre yapılmıştır. Fakat burada aynı besi yeri içerisine 80 µM Fe⁺³ ilave edilmiştir.

3.2.5.3. Bakteriye Lipopolisakkaritlerin (LPS) Ekstraksiyonu

LPS izolasyonu için *A. vitis*’in G5 (bölgesel izolat) ve S4 (referans izolat) izolatları kullanılmıştır. LPS’ler Bouzar ve ark. (1988)’nın yönteminde bazı değişiklikler yapılarak izole edilmiştir. *A. vitis* izolatları YM (Ek 5) sıvı besi yerinde 28±1°C’de 200 dev./dak. dönen çalkalayıcıda geliştirilmiştir (Miller ve ark, 1990). Sıvı besi yerinde geliştirilen bakteriler 12000 dev./dak.’da 20 dakika santrifüj edilerek bakteri hücreleri tüpün dip kısmında toplanmıştır. Daha sonra 15 ml saf su ilave edilmiş ve 67°C’ye kadar ısıtılmıştır. Isıtılmış bakteri süspansiyonu üzerine 67°C’ye kadar ısıtılmış 15 ml %90’lık sıvı fenol ilave edilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra aynı sıcaklıkta 15 dakika bekletilmiştir. Sıcak sıvı fenol bakteri karışımı 4°C’ye kadar soğutulduktan sonra 9000 dev./dak.’da 20 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra iki faz oluşmuştur. Üstte oluşan sıvı faz yeni bir tüpe aktarılmış ve alttaki fenol fazı 67°C’ye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra üzerine 67°C’ye kadar ısıtılmış saf su ilave edilmiştir. Yukarıdaki yöntem 3 kez tekrarlanmıştır. Tüpün üst kısmında toplanan sıvı faz liyofilize edilmiştir (-50°C’de; CD 52 Hetosicc). Liyofilize edilmiş LPS’ler tartılarak üzerine saf su ilave edilmiş ve 50°C’ye kadar ısıtılarak iyice erimesi sağlanmıştır.

3.2.5.4. Saksı Çalışması

Seçilen 10 PGPR izolatlarının *A. vitis*’e karşı etkinliğini belirlemek için 6 tekerrürlü olarak saksı denemesi kurulmuştur. KB besi yerinde 25±1°C’de 24-48 saat geliştirilmiş olan PGPR bakteri izolatlarının yoğunluğu steril su ile 600 nm dalga boyunda 0,3 absorbans değerine ayarlanmıştır. Daha sonra soğuk odada bekletilen

asma çubukları üç göz içerecek şekilde kesilerek dip kısımları PGPR bakteri izolatları süspansiyonu için daldırılarak 15-20 dakika bekletilmiştir. Bu çubuklar daha önce tespit edilmiş olan fosforca fakir olan toprak (Çizelge 3.1) ile her saksıya 2 çubuk olacak şekilde dikilmiştir. Bir hafta sonra bu çubukların gövdesine 3 mm çaplı matkap ucu ile 3 çukur açılmıştır. Daha önce KB besisi yerinde $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat geliştirilmiş olan *A. vitis* izolatı 600 nm dalga boyunda 0,1 absorbans değerine ayarlanmış ve çubuktaki her bir çukura 100 µl ilave edilmiştir. Bakteri süspansiyonunun doku içine difuze olması için 20-30 dakika bekledikten sonra nem sağlamak amacıyla bu çukurların üzeri ıslak pamuk ve parafilm ile kapatılmıştır. 3 gün sonra parafilm ve pamuklar çıkartılmıştır. Yaklaşık 3,5 ay sonra saksılardan asmalar sökülerek kök uzunluğu, kök kuru ve yaş ağırlığı, sürgün uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlığı, çubuğun ve yeni sürmüş sürgünün birinci boğumunun çapı, oluşan ur sayısı, ur çapı (en, boy, yükseklik) ve ur ağırlığı ölçülerek değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1. Saksı çalışmalarında kullanılan toprağın kireç, fosfor ve pH değerleri

Kireç(%)	pH	Fosfor	
		ppm	kg/da (P_2O_5)
2,7	7,54	11,91	3,75

Ayrıca elde edilen LPS süspansiyonu 0,1, 1,0, 10,0 g/l yoğunluğunda hazırlanarak asma çubuklarına vakum ile 10 dakika infiltre edilmiştir. Kontrol olarak saf su kullanılmıştır. 24 saat sonra LPS uygulanmış asma çubuklarına bir bistüri ile 1 cm uzunluğunda yaralar açılmış ve daha önceden yoğunluğu 600 nm dalga boyunda 0,1'e ayarlanmış G6 bakteri süspansiyonundan 5 µl ilave edilmiştir. 3 ay sonra ur sayısı ve büyüklüğü ölçülerek değerlendirilmiştir.

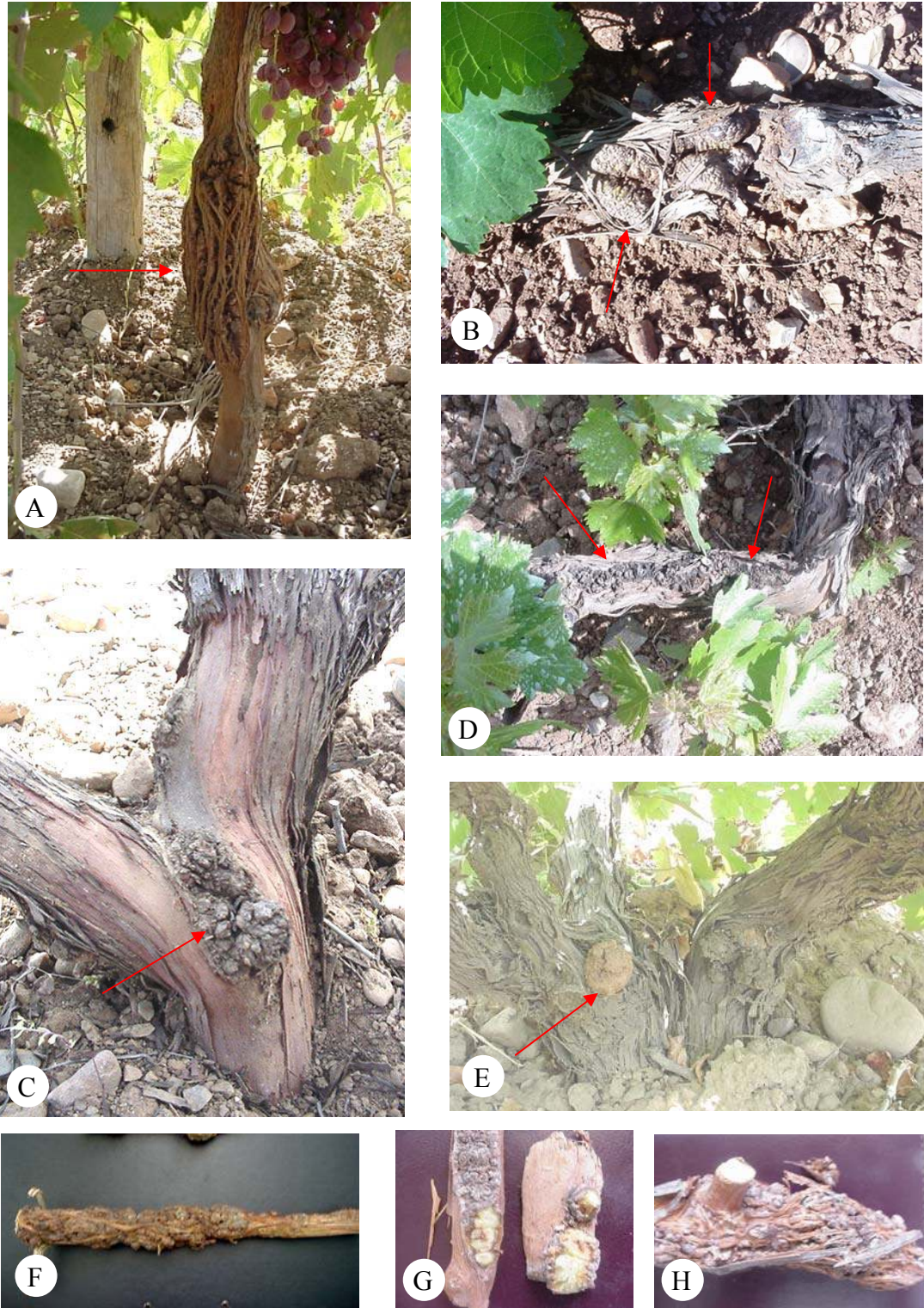
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Agrobacterium vitis*'in İzolasyonu

Hastalıklı asma örneklerini toplamak amacıyla Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman (Gölbaşı) ve Kahramanmaraş illerindeki bağ alanları bahar ve yaz aylarında gezilmiş ve urlu bitkilerden örnekler alınarak laboratuara getirilmiştir (Şekil 4.1). Adana ve Osmaniye illerinde herhangi bir urlu asma bitkisine raslanmamıştır. 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 edilerek, domates, kalonşe ve asmada patojenitesi yapılmıştır. Patojenite sonucunda Kahramanmaraş'tan 14, Gaziantep'ten 6, Mersin'den 4, Hatay'dan 9 ve Adıyaman'dan 14 olmak üzere toplam 47 *Agrobacterium* izolatu elde edilmiştir. Asmadan izole edilen ur oluşturma yeteneğine sahip 47 izolatu tamamı *A. vitis* olarak belirlenmiştir.

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 rastlanmıştır 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. Bizim çalışmamızda ise yalnız *A. vitis* izole edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçları destekler şekilde birçok araştırmacı asmalarda ura neden olan etmenin dominant olarak *A. vitis* (Burr ve ark., 1998; Burr ve Otten, 1999; Ride ve ark., 2000) olduğu, nadir olarak da *A. tumefaciens*'in asmada urlara neden olduğunu belirtmişlerdir (Knauf ve ark., 1983; Salomone ve ark., 1996; Ride ve ark., 2000; Argun ve ark., 2002).



Şekil 4.1. Asmada *Agrobacterium*'un oluşturduğu urlar: izolasyon amacıyla kullanılan yeni oluşmuş taze urlar (A, B, E, F, G, H); bir yıl önce oluşmuş yaşlı urlar (C, D)

4.2. *A. vitis*'in Tanısı

4.2.1. Klasik Yöntemler

Urlu dokulardan izole edilen izolatların biyokimyasal ve fizyolojik testler ile teşhisi Moore ve ark. (2001)'na göre yapılmıştır. Moore ve ark. (2001)'na göre *Agrobacterium*'un türlerinin ayrımında kullanılan biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Testlerde referans izolat olarak AT-1, S4 (*A. vitis*), AT-3 ve MFD-75 (*A. tumefaciens*) izolatları kullanılmıştır. Biyokimyasal ve fizyolojik testler sonucu urlu dokulardan bu çalışmada elde edilen 47 izolatın tamamı *A. vitis* olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *Agrobacterium* cinsinin biyokimyasal ve fizyolojik testler ile türlere ayrılması

Testler	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>
3- ketolaktoz üretimi	+	-	V
%2'lik NaCl'de büyüme	+	-	+
35°C'de gelişme	+	V	V
Litmus milk'de reaksiyon	ALK	AC	ALK
Asit oluşturma			
Eritritol	-	+	-
Melezitose	+	-	-
Alkali oluşturma			
Malonik asit	-	+	+
L-tartarik asit	-	+	+
Mucic asit	-	+	-
Demir amonyum sitrat kullanımı	+	-	-
Oksidaz testi	+	V	V
Sitrat kullanımı	V	+	+
PDA+CaCO ₃ besi yerinde asit temizleme	-	+	-

+, %80 ve üzeri pozitif; V, %21-79 arasında pozitif; -, %80 ve üzeri negatif;
ALK, alkali; AC, asidik

4.2.1.1. PDA+CaCO₃ Besi Yerinde Asit Temizleme

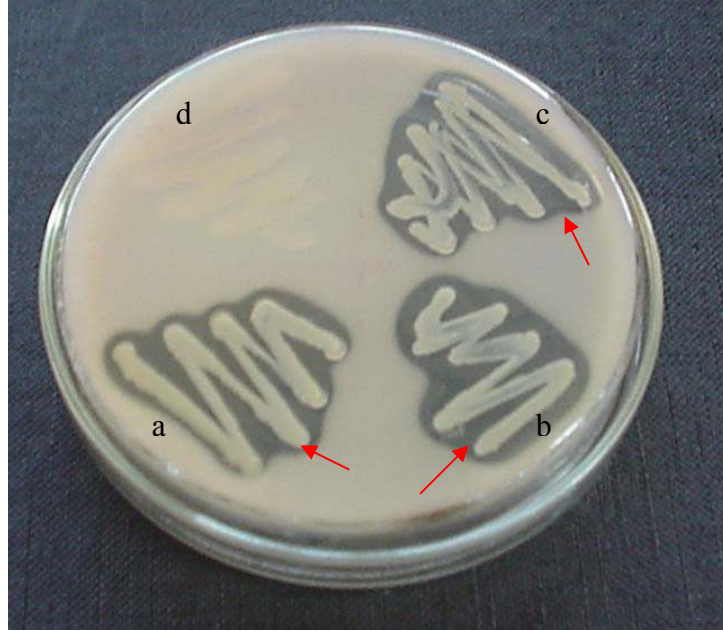
Agrobacterium izolatları gelişirken salgıladıkları asitlerden dolayı besi yerinde bulunan CaCO₃'ı eritmekte ve bundan dolayı da besi yerinde bir saydamlaşma olmaktadır. Bölgesel izolatlardan 6'sı PDA+CaCO₃ besi yerinde saydamlaşma oluşturduğundan asit temizleme özelliğine sahip olduğu ve 41 izolat ise besi yerinde saydamlaşma oluşturmadığı için asit temizleme özelliğine sahip olmadığına karar verilmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Asmadan izole edilen *Agrobacterium* izolatlarının biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları

izole edildiği yer	izolat adı	Gram reaksiyonu	Oksidaz testi	%2'lik NaCl'de gelişme	3-Ketolaktöz üretimi	PDA+CaCO ₃ besi yerinde asit temizleme	Litmus miltte reaksiyon	L-tartarik asitten alkali oluşumu	Malonik asitten alkali oluşumu	Sitrat kullanımı	Demir amonyum sitrat kullanımı	35°C'de gelişme	Sakkarozdan Asit oluşumu	Eritritolden asit oluşumu	Mucic asitten alkali oluşumu
KAHRAMANMARAŞ	K1	-	+	-	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K2	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K3	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K4	-	+	-	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K5	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K6	-	+	+	-	-	Alk	+	+	-	+	+	+	-	-
	K7	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K8	-	+	+	-	+	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K9	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K10	-	+	+	-	-	Alk	+	+	-	-	+	+	-	-
	K11	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K12	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K13	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	K14	-	+	-	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
HATAY	H1	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	H2	-	+	+	-	+	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	H3	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	H4	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	H5	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	H6	-	+	+	-	+	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	H7	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	H8	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	H9	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-

Çizelge 4.2'nin devamı

İzole edildiği yer	İzolat adı	Gram reaksiyonu	Oksidaz testi	%2'lik NaCl'de gelişme	3-Ketolaktöz üretimi	PDA+CaCO ₃ besi yerinde asit temizleme	Litmus miltke reaksiyon	L-tartarik asitten alkali oluşumu	Malonik asitten alkali oluşumu	Sitrat kullanımı	Demir amonyum sitrat kullanımı	35°C'de gelişme	Sakkarozdan Asit oluşumu	Eritritolden asit oluşumu	Mucic asitten alkali oluşumu
MERSİN	M1	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	M2	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	M3	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	M4	-	+	+	-	+	Alk	-	+	+	+	+	+	-	-
GAZİANTEP	G1	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	G2	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	G3	-	+	+	+	-	Alk	+	-	-	-	+	+	-	-
	G4	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	G5	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	G6	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
ADIYAMAN	A1	-	+	+	-	+	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A2	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A3	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A4	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A5	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A6	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A7	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A8	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A9	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A10	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A11	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A12	-	+	+	-	+	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A13	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	A14	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
REFERANS İZOLATLAR	AT-1	-	+	+	-	-	Alk	+	-	+	-	+	+	-	-
	S4	-	+	+	-	-	Alk	+	+	+	-	+	+	-	-
	GSPB 7	-	+	+	+	-	Alk	-	-	-	+	+	+	-	-
	MFD- 75	-	+	+	+	-	Alk	-	-	-	+	+	+	-	-



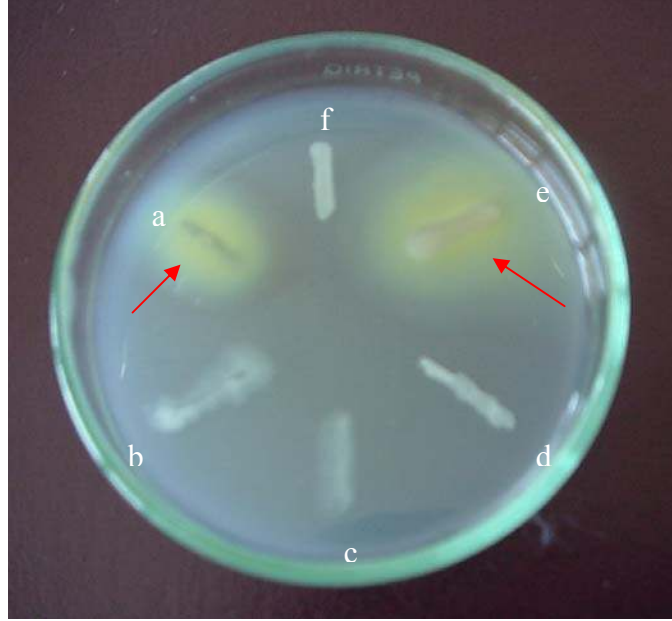
Şekil 4.2. PDA+CaCO₃ besi yerinde asit temizleme özelliği gösteren izolatlar (pozitif) (a, b, c) ve asit temizleme özellik göstermeyen izolat (negatif) (d)

4.2.1.2. Laktozdan 3-ketolaktoz Üretimi

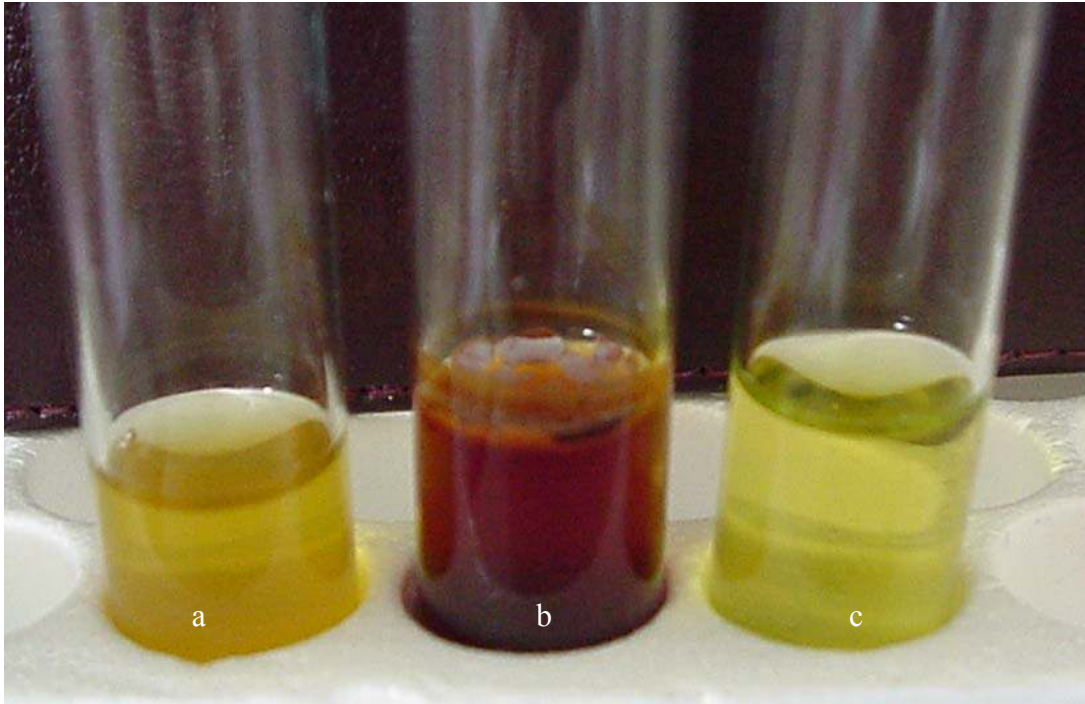
Laktoz içeren besi yerinde 2 gün geliştirilen bölge ve referans izolatları üzerine Benedict ayıracı dökülerek bir saat bekletildiğinde yalnız 1 bölgesel (G3) ve 2 referans izolatın (GSPB 7 ve MFD-75) etrafında sarı hale oluşmuştur (Çizelge 4.2; Şekil 4.3).

4.2.1.3. Demir Amonyum Sitrat Kullanımı

Sıvı demir amonyum sitrat içeren besi yerinde bölge ve referans izolatları 2 gün geliştirildikten sonra sadece 2 bölgesel (K6 ve M4) ve 2 referans izolat (GSPB 7 ve MFD-75) besi yerinin üzerinde kiremit renginde bir kaymak tabakası oluşturmuştur (Çizelge 4.2; Şekil 4.4).



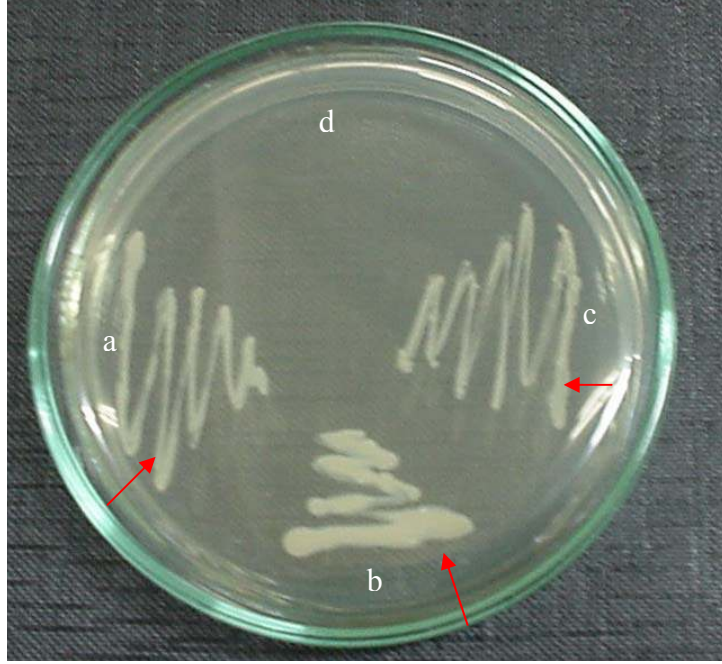
Şekil 4.3. Laktozdan 3-ketolaktoz üretimi; laktozu 3-ketolaktoza dönüştüren izolat (pozitif) (a, e); laktozu 3-ketolaktoza dönüştüremeyen izolat (negatif) (b, c, d, f)



Şekil 4.4. Demir amonyum sitrat kullanımı; a) orijinal besi yeri, b) demir amonyum sitrat kullanan izolat (pozitif), c) demir amonyum sitrat kullanamayan izolat (negatif)

4.2.1.4. %2 NaCl İçeren Besi Yerinde Gelişme

Katı %2 NaCl içeren besi yerinde 2 gün inkübe edilen izolatlardan 3 bölgesel izolat (K1, K4 ve K14) dışında diğer tüm izolatlar gelişmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.5).



Şekil 4.5. %2 NaCl besiyerinde gelişen izolatlar (pozitif) (a, b, c) ve gelişmeyen izolat (negatif) (d)

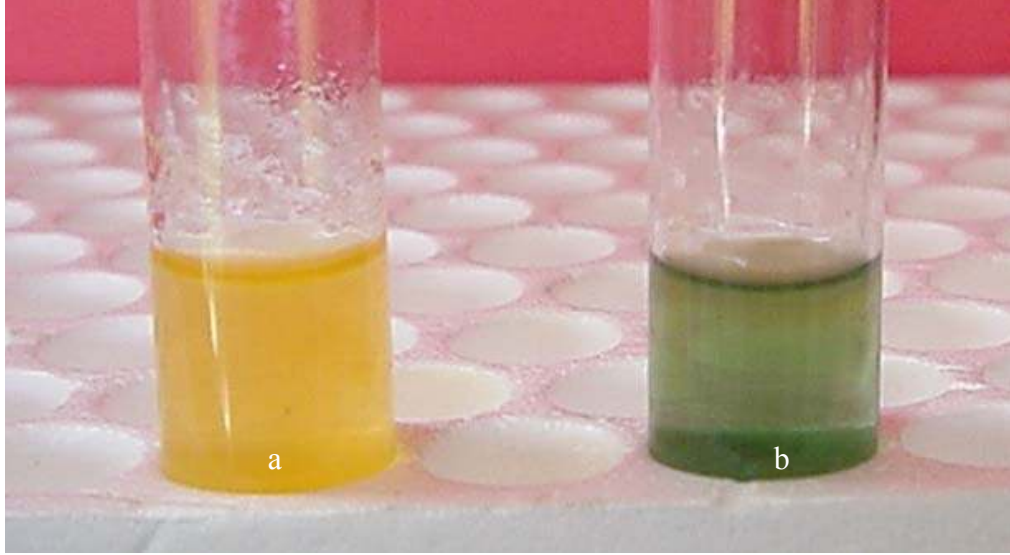
4.2.1.5. Sakkaroz ve Eritritolden Asit Üretimi

Sakkaroz veya eritritol içeren besiyerinde bölge ve referans izolatları 2 gün inkübe edilmiş ve tüm izolatlar sakkarozdan asit oluştururken (Şekil 4.6), eritritolden asit oluşturamamıştır (Çizelge 4.2).

4.2.1.6. Oksidaz Testi

Bölge ve referans izolatlar N; N; N; N' - Tetramethyl- 1.4 phenylene diammonium diclorid eriyiği emdirilmiş filtre kağıdına bir kürdan yardımıyla

sürülmüş ve 10 saniye içerisinde tüm izolatlar koyu mor renk oluşturdıklarından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.7).



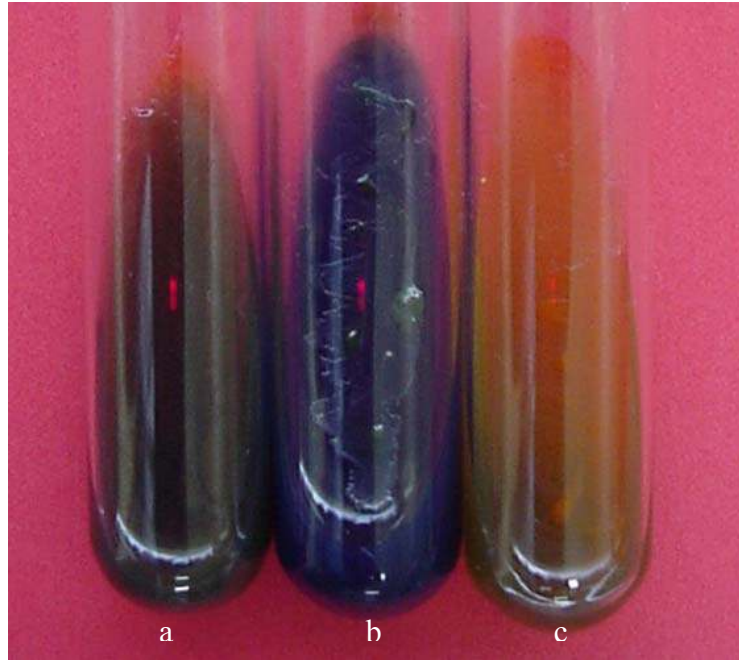
Şekil 4.6. Sakkarozdan asit oluşumu sonucu oluşan renk değişimi (pozitif) (a) ve orijinal besi yeri (negatif) (b)



Şekil 4.7. Oksidaz testi a) negatif, b) pozitif

4.2.1.7. Sitrat Kullanımı

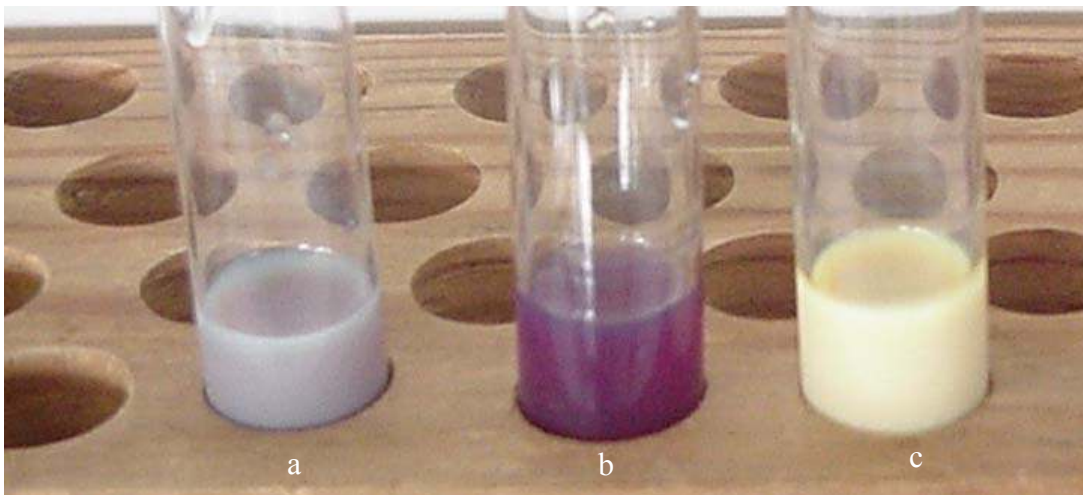
Sitrat içeren besi yerinde bölge ve referans izolatları 2 gün inkübe edilmiş ve 3 bölgesel (K6, K10 ve G3) ve 2 referans izolatı (GSPB 7 ve MFD-75) dışında diğer tüm izolatlar sitratı kullanmıştır (Çizelge 4.2; Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Sitrat kullanımı; a) orijinal besi yeri, b) sitrat kullanan izolat (pozitif), c) sitrat kullanamayan izolat (negatif)

4.2.1.8. Litmus Milkte Reaksiyon

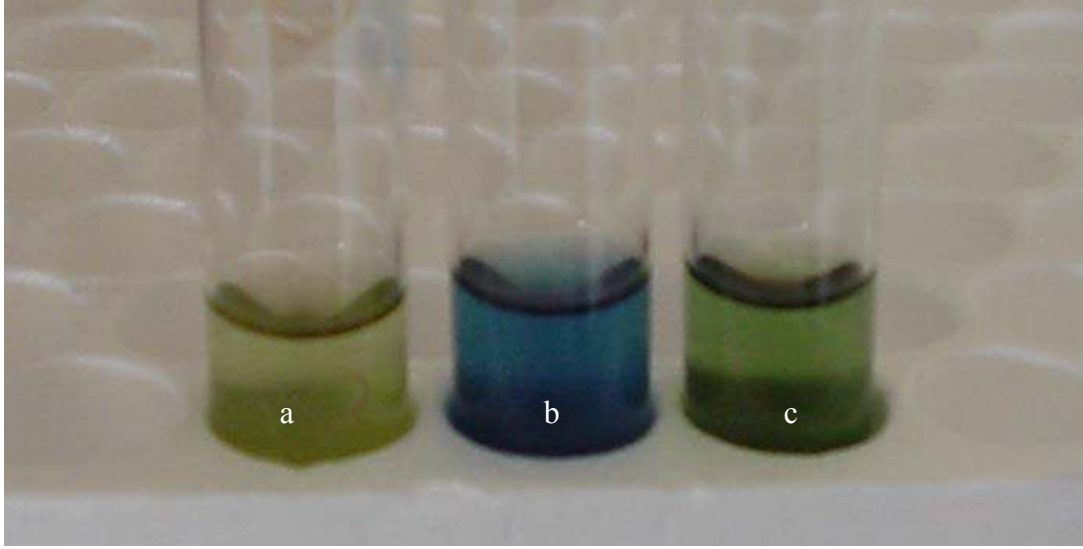
Sıvı litmus milk içeren besi yerinde 2 gün inkübe edilen bölge ve referans izolatların tamamı litmus milk besi yerini alkali yapmıştır (Çizelge 4.2; Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Litmus milkte reaksiyon sonucu oluşan renk değişimi; a) orijinal besi yeri, b) alkali oluşumu (ALK), c) asit oluşumu (AC)

4.2.1.9. Malonik Asitten Alkali Oluşumu

Malonik asit içeren besi yerinde bölge ve referans izolatları 2 gün inkübe edilmiş ve 1 bölgesel (G3) ve 3 referans izolat (AT-1, GSPB 7 ve MFD-75) dışında diğer tüm izolatlar besi yerini alkaliye dönüştürmüşlerdir (Çizelge 4.2; Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Malonik asitten alkali oluşumu; a) orijinal besi yeri, b) alkali oluşturan izolat (pozitif), c) alkali oluşturmeyen izolat (negatif)

4.2.1.10. Mucic ve L-tartarik Asitten Alkali Oluşumu

Mucic veya L-tartarik asit içeren besi yerinde bölge ve referans izolatları 2 gün inkübe edilmiş ve L-tartarik asitten sadece 1 bölgesel (M4) ve 2 referans izolat (GSPB 7 ve MFD-75) (Şekil 4.11) mucic asitten ise hiçbir izolat alkali oluşturmamıştır (Çizelge 4.2; Şekil 4.12).

4.2.1.11. 35°C’de Gelişme

Besi yerine ekilen ve 35°C’de inkübe edilen izolatların tamamı 2 gün içinde gelişmiştir (Çizelge 4.2).

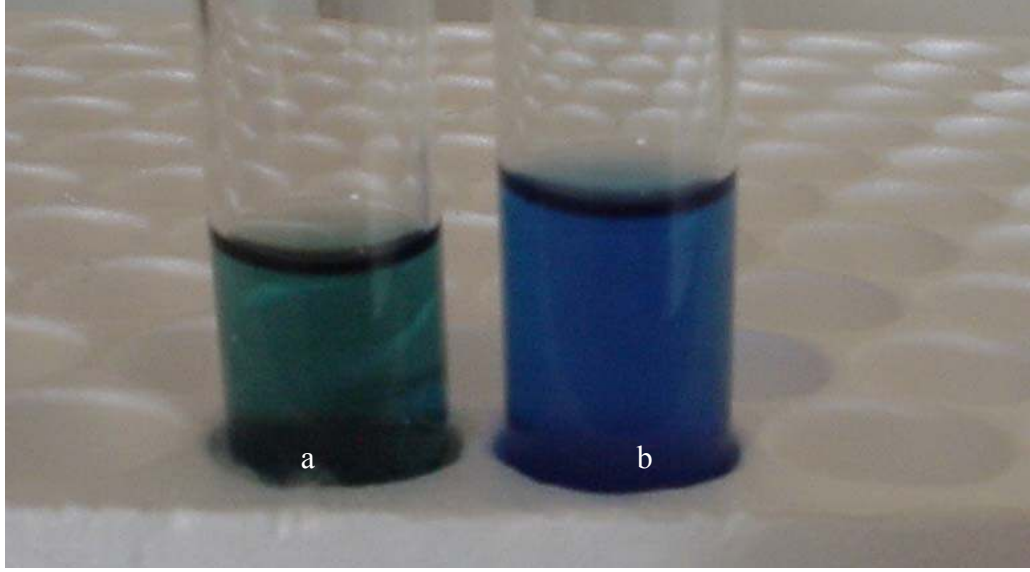


Şekil 4.11. L-tartarik asitten alkali oluşumu; a) orijinal besi yeri (negatif), b) alkali oluşumu (pozitif)

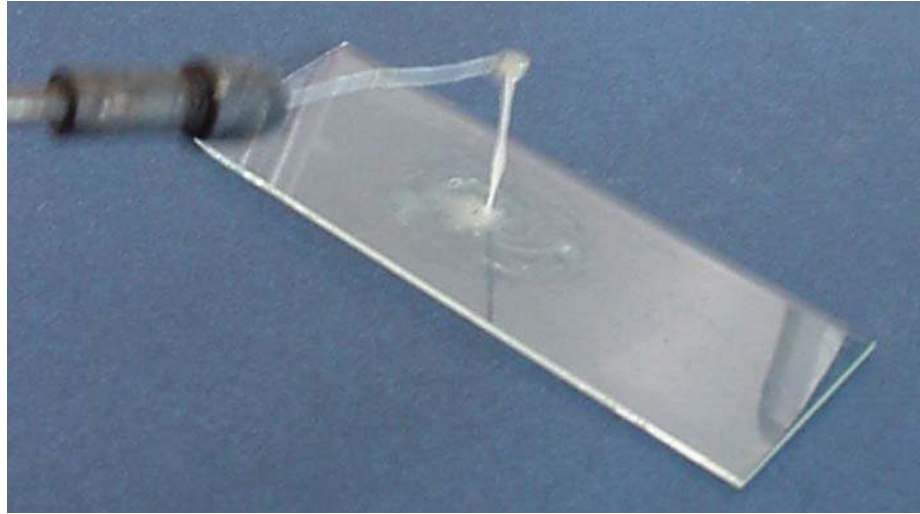
4.2.1.12. Potasyum Hidroksit Testi

Bölgesel izolatları bir damla potasyum hidroksit ile karıştırıldıktan sonra hafifçe yukarı kaldırıldığında bir iplik gibi uzamıştır. Bundan dolayı urlu dokulardan izole edilen izolatların tamamı gram negatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).

Araştırılan fizyolojik ve biyokimyasal özellikler için elde edilen sonuçlarda bölge izolatları ile orijinal *A. vitis* kültür arasında önemli farklılıklar olmazken orijinal *A. tumefaciens* izolatları arasında önemli farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı da urlu dokulardan izole ettiğimiz 47 izolatın tamamının *A. vitis* olduğuna karar verilmiştir. Bu bulgular Argun (2001) tarafından İç Anadolu bölgesinde yapılan çalışmada da hakim türün *A. vitis* olduğunu belirlediği sonuçları desteklemektedir.



Şekil 4.12. Mucic asitten alkali oluşumu sonucu oluşan renk değişimi; a) orijinal besi yeri (negatif), b) asit oluşumu (pozitif)



Şekil 4.13. Potasyum hidroksit testinde gram negatif izolatların oluşturduğu iplik gibi uzama

4.2.2. Yağ Asit Analizleri ile Bakterilerin Tanınması

Çalışmanın bu kısmı Atatürk Üniversitesi, Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır. 6 bölge ve 2 referans olmak üzere toplam 8 izolatın yağ asit profilleri olarak 11 farklı yağ asidi (11:0 ISO 3OH, 16:0, 16:0 3OH,

17:0 CYCLO, 18:0, 18:1 ω 7c, 18:0 3OH, 19:0 CYCLO ω 8c, 19:0 10 methyl, Sum in Feature 2 (14:0 3OH veya 16:1 ISO 1), Sum in Feature 3 (16:1 ω 7c veya 15 iso 2OH)) elde edilmiştir (Çizelge 4.3). İzole edilen yağ asitlerinin, doymuş (16:0 ve 18:0), doymamış (18:1 ω 7c), asit kollu (19:0 10 methyl), propan halkalı (17:0 CYCLO, 19:0 CYCLO ω 8c) ve hidroksi asit içeren (11:0 ISO 3OH, 16:0 3OH ve 18:0 3OH) olmak üzere 5 grup olduğu saptanmıştır. Ayrıca 2 adet tanımlanamayan yağ asidi (Sum in Feature 2 (14:0 3OH veya 16:1 ISO 1) ve Sum in Feature 3 (16:1 ω 7c veya 15 iso 2OH)) içermektedir.

Çizelge 4.3. *Agrobacterium* izolatlarından elde edilen yağ asitleri, bunların bulunma oranları (%) ve bu yağ asitlere sahip olan izolat sayısı

Yağ Asitleri	İzolat Sayısı	Oranı (%)	Ortalama (%)
Sum in Feature 2	8	4,80-18,96	7,89
Sum in Feature 3	8	1,92-10,59	4,98
11:0 ISO 3OH	1	1,37	1,37
16:0	8	6,69-10,30	7,96
16:0 3OH	4	2,25-8,32	4,49
17:0 CYCLO	1	1,49	1,49
18:0	4	3,61-5,83	3,34
18:1 ω 7c	8	57,14-79,02	71,76
18:0 3OH	1	1,63	1,63
19:0 CYCLO ω 8c	3	2,42-9,05	4,71
19:0 10 methyl	3	1,54-2,05	1,82

Sum in Feature 2: 14:0 3OH/16:1 ISO 1; Sum in Feature 3: 16:1 ω 7c/15 iso 2OH

Yağ asit metil ester analizi ile %19,1 ile %89,8 oranları arasında izolatların *Agrobacterium* olduğu ve referans *A. tumefaciens* izolatları ayrı bir küme ve *A. vitis* izolatları ise iki farklı küme oluşturmuştur (Çizelge 4.4). Sum in Feature 2 (14:0 3OH veya 16:1 ISO 1), Sum in Feature 3 (16:1 ω 7c veya 15 iso 2OH), 16:0 ve 18:1 ω 7c olmak üzere dört farklı yağ asiti tüm izolatlarda bulunurken 11:0 ISO 3OH, 17:0 CYCLO ve 18:0 3OH yağ asitleri ise sadece birer izolatla saptanmıştır. *A. vitis*'in yağ asitlerine göre tanımlanmasında kullanılan izolatlar arasında Sum in Feature 2 (14:0 3OH/16:1 ISO 1), Sum in Feature 3 (16:1 ω 7c veya 15 iso 2OH), 16:0 ve 18:1 ω 7c yağ asitlerinin çok önemli olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında en fazla

miktarda bulunan yağ asidi 18:1 ω 7c (%71,76) olduğu saptanmıştır. Bouzar ve ark. (1993) ve Tighe ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada da *Agrobacterium* izolatları için 18:1 ω 7c yağ asidinin dominant olduğunu belirtmiş olup, elde ettikleri sonuçlar bizim sonuçlarla uyum içerisindedir. 11:0 ISO 3OH ve 17:0 CYCLO yağ asitleri sadece *A. tumefaciens* izolatlarında bulunurken *A. vitis* izolatlarında bulunmamıştır.

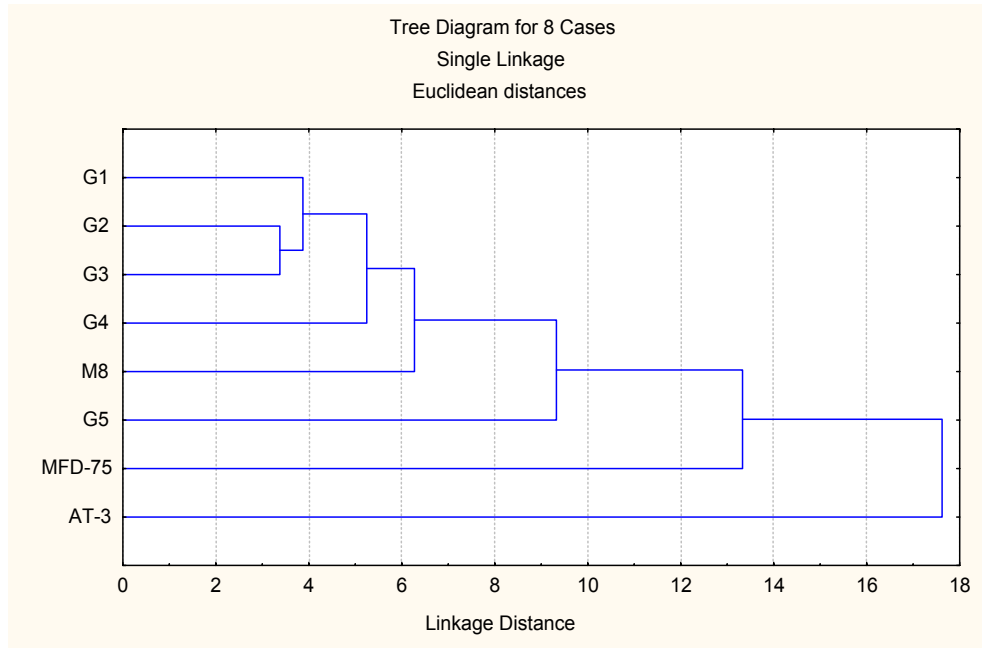
Çizelge 4.4. *Agrobacterium* izolatlarının oluşturduğu kümeye göre içerdikleri yağ asitlerinin oranları (%) ve izolat sayısı

Yağ Asitler	I. Küme		II. Küme		<i>A. tumefaciens</i>	
	İzolat sayısı	Dağılım aralığı	İzolat sayısı	Dağılım aralığı	İzolat sayısı	Dağılım aralığı
Sum in Feature 2	4	5,23-7,24	2	5,94-10,59	2	6,12-18,96
Sum in Feature 3	4	2,43-5,17	2	5,94-10,59	2	1,92-3,77
11:0 ISO 3OH	0	0	0	0	1	1,37
16:00	4	6,95-10,3	2	6,69-8,96	2	7,37-8,95
16:0 3OH	2	2,25-3,98	0	0	2	3,4-8,32
17:0 CYCLO	0	0	0	0	1	1,49
18:00	2	3,61-4,00	2	3,91-5,83	0	0
18:1 ω 7c	4	73,29-79,02	2	72,09-73,97	2	57,14-65,55
18:0 3OH	0	0	1	1,63	0	0
19:0 CYCLO ω 8c	1	2,42	0	0	2	2,67-9,05
19:0 10 methyl	1	1,54	0	0	2	1,88-2,05

Sum in Feature 2: 14:0 3OH/16:1 ISO 1; Sum in Feature 3: 16:1 ω 7c/15 iso 2OH

A. vitis izolatları arasında kümeleri belirleyici rol oynayan yağ asitleri 16:0 3OH olmuştur. 18:0 3OH yağ asidi *A. vitis* izolatlarından sadece birinde belirlenirken 19:0 CYCLO ω 8c ve 19:0 10 methyl yağ asitlerine iki *A. tumefaciens* referans izolatında ve bir *A. vitis* izolatında rastlanmıştır. Bouzar ve ark. (1993) *A. tumefaciens*, *A. vitis* ve *A. rhizogenes* izolatlarının yağ asit bileşiklerini belirledikleri çalışmada *Agrobacterium* cinsleri arasında 16:0 3-OH yağ asidinin miktarında farklılıklar olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmada da 16:0 3-OH yağ asidinin miktarı *A. vitis* bölge izolatlarında *A. tumefaciens* referans izolatına göre oransal olarak daha az olduğu belirlenmiştir.

İzolatların sahip olduğu yağ asidine göre küme analizi yapıldığında *A. tumefaciens* referans izolatları ile asmadan izole ettiğimiz bölgesel izolatlar arasında yaklaşık %13 farklılık olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Asmadan izole edilen bölgesel izolatlar arasında %91 oranında bir birine benzer olduğu saptanmıştır. Küme analizinde %6 fark dikkate alındığında bölgesel asma izolatları arasında 2 farklı küme belirlenmiştir.

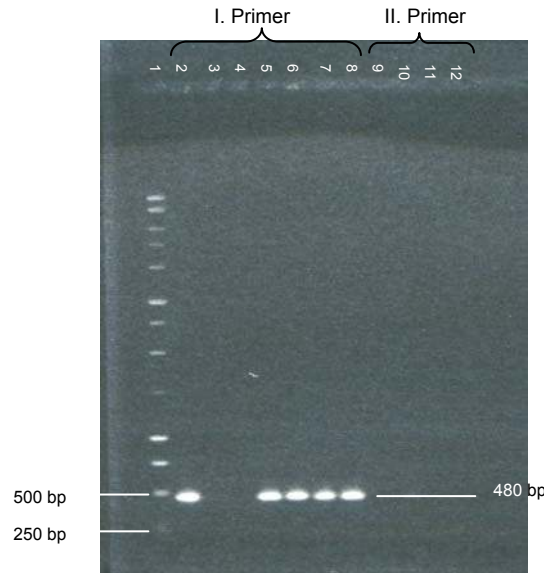


Şekil 4.14. İzolatların yağ asit profillerine göre oluşturduğu küme

Bouzar ve ark., (1993) tarafından yapılan bir çalışmada da *A. vitis* izolatlarından 18:1 ω 7c yağ asidinin baskın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 16:0 3OH yağ asidinin miktarının *Agrobacterium* türleri arasında farklılıklar olduğunu ve en yüksek oranda *A. rhizogenes* izolatlarında ve en düşük oranda da *A. vitis* izolatlarında bulunduğunu bildirmişlerdir. Bizim yaptığımız analizler sonucunda da 16:0 3-OH yağ asidinin *A. vitis* izolatlarında *A. tumefaciens* izolatlarından daha az yoğunlukta bulunduğu saptanmıştır.

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

PCR çalışmasında *A. tumefaciens*'e ve *A. vitis*'e spesifik olmak üzere iki farklı primer seti kullanılmıştır. Asmadan izole ettiğimiz tüm izolatlar *A. tumefaciens*'e spesifik primer seti kullanıldığında hiç spesifik bant oluşturmazken *A. vitis*'e spesifik primer seti kullanıldığında 480 bp büyüklüğünde spesifik bant oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15). Bağ alanlarından izole ettiğimiz tüm (47 adet) izolatların PCR yöntemiyle *Agrobacterium vitis* olduğu saptanmıştır. Burada elde edilen sonuçlar da, daha önce yaptığımız biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik testlerin birbirini desteklediği görülmektedir.



Şekil 4.15. PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde oluşturduğu bantlar (çukurlar: 1; 1 kb'lik marker, 2; Referans kültür S4 (*A. vitis*), 3; Referans kültür GSPB-7 (*A. tumefaciens*), 4; Referans kültür MFD-75 (*A. tumefaciens*), 5-12; Bölge izolatları, I. Primer: *A. vitis*'e spesifik primer, II. Primer: *A. tumefaciens*'e spesifik primer)

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. Asmadan izole ettiğimiz izolatların tamamı PCR ile 480 bp'lik bantlar oluşturduğu için *virA* gen bölgesinde önemli bir değişimin olmadığı sanılmaktadır. Eastwell ve ark. (1995) *virA* gen bölgesinden geliştirilen primer kullanarak *A. vitis* izolatlarına spesifik 480 bp'lik bantlar oluşturduğunu bildirmişler ve yaptığımız çalışmalar sonucunda aynı sonuçlar alınmıştır.

4.3. Patojenin Hücre Süspansiyonundaki Yoğunluğunun Belirlenmesi

NGA besi yerine -5, -6 ve -7 sulandırma serilerinden ekim yapılmış ve petri kaplarındaki koloni sayılarak ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır (Şekil 4.16). NGA besi yerinde dördüncü seyreltmede ortalama 1379, beşinci seyreltmede 207, altıncı seyreltmede 24 ve yedinci seyreltmede ortalama 2 koloni gelişmiştir. Gelişen koloniler hesaplandığında başlangıçtaki 1 ml'deki bakteri sayısı yaklaşık olarak 2×10^8 olarak belirlenmiştir. Bundan dolayı da *A. vitis* ile yapılan tüm çalışmalarda spektrofotometrede OD değeri 0,1'e ayarlanmıştır. OD değeri 0,1'e ayarlandığında bakteri yoğunluğu yaklaşık olarak 10^8 hücre/ml olmaktadır.

4.4. Patojenite Testi

İzole edilen bakteriler PDA+CaCO₃ besi yerinde geliştirildikten sonra 2–3 haftalık domates bitkilerine ve kalonşe bitkisine inokule edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir. İnokule edilmiş kalonşe bitkilerinde ilk urlar 9–10 gün sonra domateste ise 13- 15 gün sonra ortaya çıkmıştır. Domateste urlar grimsi renkte kalonşe de ise yeşilimtırak renkte bir görünüm almıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Fizyolojik tuzlu su içerisinde hazırlanan *Agrobacterium* izolatlarının yoğunluğunu belirlemek için ekim yapılan besi yerindeki gelişimi

Çizelge 4.5. Asmalardan izole edilen *Agrobacterium* izolatlarının domates, kalonşe ve asmada ur oluşumu; (+) pozitif, (-) negatif

İzolatlar	Domates	Kalonşe	Asma
AT-1 (Referans)	+	+	+
S4 (Referans)	+	+	+
GSPB 7(Referans)	+	+	+
MFD-75 (Referans)	+	+	+
K1	+	+	+
K2	+	+	+
K3	+	+	+
K4	+	+	+
K5	+	+	+
K6	+	+	+
K7	+	+	+
K8	+	+	+
K9	+	+	+
K10	+	+	+
K11	+	+	+
K12	+	+	+
K13	+	+	+
K14	+	+	+
G1	+	+	+
G2	+	+	+
G3	+	+	+
G4	+	+	+

Çizelge 4.5'nin devamı

İzolatlar	Domates	Kalonşe	Asma
G5	+	+	+
G6	+	+	+
H1	+	+	+
H2	-	+	+
H3	+	+	+
H4	-	+	+
H5	-	+	+
H6	+	+	+
H7	-	+	+
H8	-	+	+
H9	-	+	+
M1	+	+	+
M2	+	+	+
M3	+	+	+
M4	+	+	+
A1	+	+	+
A2	+	+	+
A3	+	-	+
A4	+	-	+
A5	-	+	+
A6	+	-	+
A7	+	+	+
A8	+	-	+
A9	+	+	+
A10	+	-	+
A11	+	-	+
A12	+	-	+
A13	+	+	+
A14	+	-	+

Hastalıklı asma bitkilerinden alınan örneklerden izole edilen bakteri kültürleri ve referans kültür ile yapılan patojenite testleri sonunda oluşan simptonlar arasında bir fark gözlenmemiştir. Ancak izolatların virülenslik derecelerine göre simptom gelişim hızı ve şeklinde çok az farklılıklar saptanmıştır.



Şekil 4.17. *Agrobacterium vitis* izolatlarının patojenite testi sonucunda domates (A) ve kalonşe (B) bitkilerinde oluşturduğu urlar

İzole ettiğimiz 47 *A. vitis* izolatının 7 tanesi domateste 8 tanesi de kalonşede ur oluşturamamıştır. Diğer tüm izolatlar hem kalonşede hem de domateste ur oluşturmuştur. Domateste ur oluşturamayan izolatlar kalonşede, kalonşede ur oluşturamayan izolatlar ise domateste ur oluşturmuştur.

Klima odasında köklendirilen asma çubukları ile yapılan patojenite çalışmalarında ilk urlar 2 ay sonra gözlenmiştir. Urlu dokulardan izole edilen *Agrobacterium vitis* izolatların tamamı asmada genellikle grimsi ve yeşilimsi renkte urlar oluşturmuştur (Şekil 4.18).

Urlu dokulardan izole ettiğimiz tüm izolatların tümörögenik olduğu ancak konukçular arasında patojenite bakımından farklılıklar olduğu görülmüştür. Yine aynı şekilde Argun (2001) ve Burr ve Katz (1983) tarafından yapılan çalışmalarda urlu dokulardan izole edilen bakterilerin çoğunun tümörögenik olduğu ve hepsinin ayçiçeği ve asmada bir kısmının da domateste ur oluşturduğu kaydedilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.18. *Agrobacterium vitis* izolatlarının patojenite testi sonucunda asmada oluşturduğu urlar

4.5. *A. vitis*'in Mücadelesi ile İlgili Çalışmalar

4.5.1. Dayanıklılığı Teşvik Edici Aday PGPR'ların İzolasyonu

Mersin, Kahramanmaraş, Gaziantep, Hatay, Osmaniye ve Adana illerindeki bağ alanları içerisinde diğerlerine göre daha iyi gelişmiş bitkilerin kök bölgesinden alınan 39 adet toprak örneğinden yapılan izolasyonda farklı morfolojik gelişim gösteren 464 bakteri kolonisi seçilerek saflaştırılmıştır (Şekil 4.19).

4.5.2. Aday PGRP'lerin Seçimi

Bitki gelişimini sağlamak için ilk akla gelen yöntem toprakların uygun gübrelere gübrenmesidir. Bitkilerin en fazla ihtiyaç duyduğu besin maddesi azot ve fosfor olduğundan gübrelemede en fazla bu kimyasallar kullanılmaktadır. Toprakta fazla miktarda fosfor bulunmasından çok alınabilir formdaki fosfor miktarı çok önemlidir. Topraktaki fosforun büyük bir miktarı kalsiyum tarafından tutulur ve

toprağa uyguladığımız fosfor da kısa sürede kalsiyum tarafından tutularak bitkilerin alamayacağı forma dönüşür. Fosfor çözen bakteriler toprağa veya tohumu uygulandığında topraktaki alınamayan formdaki fosforu alınabilir forma dönüştürerek bitkilerin daha iyi gelişmesi sağlanabilir (Abd-Alla, 1994; Jones ve Darrah, 1994). Bu bakteriler şekerleri kullanarak organik asitler üretmekte ve bu asitlerin etkisi ile suda çözilemeyen fosforlar çözülebilir forma dönüşmektedir (Leyval ve Barthelin, 1989).



Şekil 4.19. Topraktan izole edilen aday PGPR'lerin King B besi yerinde geliştirdikleri koloniler

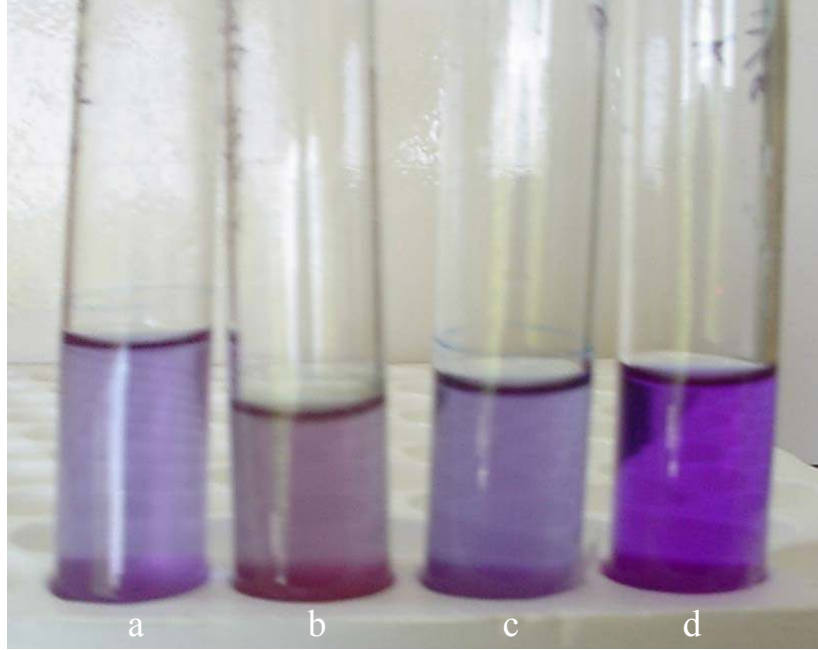
Topraktan izole edilen bakterilerin fosfor (P) çözme yeteneklerini belirlemede kullanılacak yöntemi seçmek için yapılan ön çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'de verilmiştir. Sıvı NBRIP-BPB besi yerinde bakteriler geliştiğinde besi yerinde bir renk açılması gözlenmiştir (Şekil 4.20). Sıvı NBRIP-BPB besi yerinde çözülen fosfor miktarı ile pH, 400, 600, 680 ve 800 nm ölçülen absorban değerleri ve fosfor çözme indeksi arasında çok az farklılıklara rağmen genelde birbirine uyum içinde olduğu görülmektedir. Fosforun çözülme miktarı arttıkça pH değerinin azaldığı, 400, 680 ve 800 nm dalga boyundaki absorbans

değerinde ve fosfor çözme indeksinde bir artışa neden olduğu görülmüştür. Çizelgeden de anlaşılacağı gibi testlenen izolatlar arasında en yüksek fosfor çözen bakteri izolatı 77,75 mg/l ile T2/2-2 olurken en az P çözen bakteri izolatı ise 38,29 mg/ml ile T2/2-1 olmuştur.

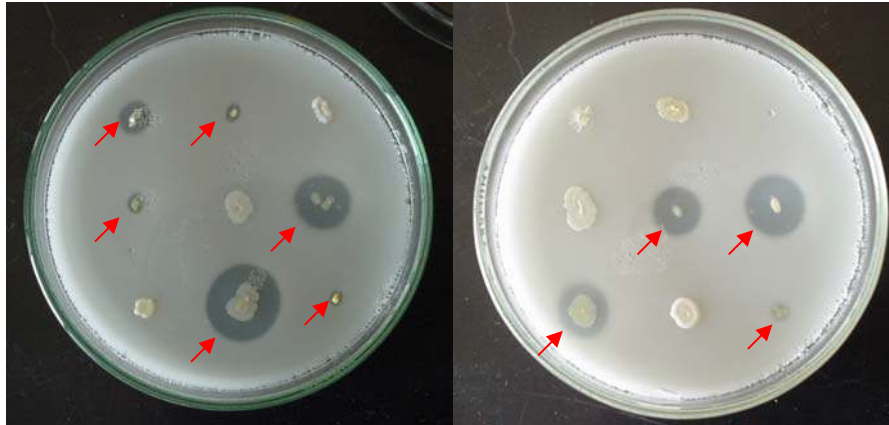
Çizelge 4.6. İzole edilen PGPR aday bakterilerin sıvı NBRIP-BPB besi yerinde kültüre alınmasından sonra besi yerinde değişen pH, 400, 600, 680 ve 800 nm dalga boyunda absorbans değerleri ve 1 ml’de çözülmüş P miktarları

İzolatlar	pH	400 nm	680 nm	800 nm	P çözme indeksi	P (mg/l)
Kontrol	0,566	0,232	0,037	0,026	0,00	41,64
T1/3-6	0,474	0,433	0,082	0,057	1,00	52,95
T1/4-3	0,556	0,236	0,039	0,023	1,00	42,23
T1/4-6	0,475	0,401	0,070	0,048	1,55	58,54
T1/4-10	0,470	0,417	0,081	0,078	1,06	55,79
T2/2-1	0,572	0,223	0,158	0,032	1,07	38,29
T2/2-2	0,450	0,872	0,313	0,196	4,67	77,75
T2/3-1	0,514	yapılmadı	yapılmadı	yapılmadı	1,22	47,99
T2/4-4	0,565	0,434	0,128	0,110	yapılmadı	47,32
T3/2-1	0,570	0,330	0,089	0,069	1,00	41,22
T3/2-2	0,511	0,319	0,135	0,037	1,00	yapılmadı
T3/2-4	0,570	0,381	0,184	0,159	yapılmadı	40,83
T6/3-2	0,510	0,289	0,058	0,043	1,00	50,77
T6/3-3	0,581	0,263	0,059	0,048	1,18	yapılmadı
MB3/3-5	0,573	0,228	0,036	0,027	1,00	41,39

Katı NBRIB besi yeri kullanıldığında fosfor çözen bakterilerin etrafında bir zon oluşmaktadır. Bu uygulama çok pratik ve çok sayıda bakteriler arasından fosfor çözen bakterilerin seçimi için oldukça hızlı ve kolay olduğundan çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde her bir petriye 9 bakteri izolatı ekilmekte ve kısa sürede P çözebilen bakteri kolonilerinin etrafında açık bir zon oluşmaktadır (Şekil 4.21). Bakteri gelişimi sonunda oluşan zon çapının bakteri kolonisine oranlayarak fosfor çözme indeksi belirlenmektedir. Topraktan izole ettiğimiz 464 bakteri izolatından 63’ünün zon oluşturduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7).



Şekil 4.20. Topraktan izole edilen PGPR aday izolatların seçiminde kullanılan sıvı NBRIP-BPB besi yerinde meydana gelen renk açılması; a, b ve c) topraktan izole edilen farklı PGPR aday izolatları, d) içine bakteri inokule edilmemiş besi yeri (kontrol)



Şekil 4.21. Topraktan izole edilen bakterilerin katı NBRIB besi yerinde fosforu çözmesinden dolayı oluşturduğu açık zon ve bakteri kolonisi

Çizelge 4.7. İzole edilen PGPR aday bakterilerin katı NBRIP besiyerinde oluşturduğu koloni ve zon çapı ve P çözme indeksi

İzolatlara	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	P Çözme İndeksi
Ga7/3-6	15,50	1,50	10,33
OsD1/2-2	13,33	2,33	5,89
OsD3/3-1	12,33	2,50	4,99
T2/2-2	10,00	2,17	4,67
HaD3/3-1	9,00	2,00	4,50
OsD2/4-4	10,17	2,50	4,14
HaD6/3-1	9,33	2,33	4,00
T6/3-7	8,00	2,50	3,38
Ga3/3-1	8,00	2,83	2,85
Ga10/2-5	4,33	1,83	2,39
Os2/4-5	2,67	1,83	2,25
Ga1/2-1	5,67	2,67	2,17
Ga20/4-1	4,00	2,00	2,00
Os1/4-5	3,00	1,50	2,00
Os1/4-4	3,33	1,83	1,81
Os1/4-7	3,17	1,77	1,81
HaD5/2-1	14,17	8,00	1,78
Ha3/4-3	2,00	1,17	1,78
Os2/4-9	3,00	2,00	1,71
Ga5/4-4	8,33	5,00	1,70
Os2/4-6	2,17	1,33	1,67
Ha4/3-2	5,00	3,00	1,66
T1/4-6	8,00	5,67	1,55
Os3/4-3	3,33	2,17	1,53
Ga4/3-1	9,50	6,25	1,53
Os1/4-8	2,00	1,50	1,33
Os1/3-1	3,00	2,25	1,33
OsD1/3-1	8,50	6,50	1,31
Ga16/2-1	11,67	9,33	1,26
Os1/4-2	1,25	1,00	1,25
T2/3-1	3,67	3,00	1,22
Ha3/4-4	3,17	2,67	1,19
T6/3-3	4,33	3,67	1,18
MB4/3-9	1,17	1,00	1,17
Ga15/2-6	4,00	3,50	1,14
HaD4/2-1	1,67	1,50	1,11
Ga4/2-6	3,33	3,00	1,11
Ga13/4-2	3,50	3,17	1,10
Ga11/3-4	6,67	6,17	1,09
T2/2-1	3,00	2,83	1,07
Ga2/2-3	5,67	5,33	1,06

Çizelge 4.7'nin devamı

İzolatlar	Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	P Çözme İndeksi
T1/4-10	6,67	6,33	1,06
Os3/4-2	4,17	4,00	1,04
Ga1/3-6	7,33	7,33	1,00
Ga12/3-5	6,33	6,33	1,00
MB3/3-5	3,67	3,67	1,00
Os3/4-5	5,33	5,33	1,00
Ga20/2-3	3,33	3,33	1,00
Ga14/4-2	7,00	7,00	1,00
Ga6/4-1	4,33	4,33	1,00
Ga5/3-7	3,67	3,67	1,00
Ga14/4-1	3,67	3,67	1,00
Ha6/4-5	3,33	3,33	1,00
T6/3-2	3,33	3,33	1,00
T1/3-6	6,67	6,67	1,00
OsD1/4-2	6,33	6,33	1,00
Ha6/3-6	2,67	2,67	1,00
Os3/4-4	4,67	4,67	1,00
Ga8/3-2	3,00	3,00	1,00
T3/2-2	6,33	6,33	1,00
T1/4-3	5,33	5,33	1,00
T3/2-1	1,67	1,67	1,00
T2/3-4	3,00	3,00	1,00

Fosfor çözen bakterilerin seçiminde sadece fosfor çözme indeksi göz önüne alındığında yeterli olmadığı, bununla birlikte bakterinin koloni çapı da önemli olmaktadır. Bunun için bu bakterilerin sıvı besi yerinde çözdüğü fosfor miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Fosfor çözdüğü belirlenen 63 izolattan fosfor çözme indeksi en yüksek olan 29 izolat seçilerek sıvı besi yerindeki fosfor çözme miktarı belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Sıvı besi yerinde 401,27 ppm ile en fazla fosfor çözen GA16/2-1 izolatının fosfor çözme indeksi (1,26) çok düşük olmasına rağmen bakteri koloni çapı (9,33 mm) oldukça fazladır. Bununla birlikte fosfor çözme indeksi (10,33) en fazla olan Ga7/3-6 izolatı sıvı besi yerinde 79,91 ppm fosfor çözebilmiştir. Ga7/3-6 izolatının fosfor çözme indeksi çok yüksek olmasına rağmen koloni çapı çok küçük kalmış, buda bakterinin çok yavaş geliştiğini göstermektedir. Bundan dolayı çözdüğü fosfor

miktarının da az olduğu düşünülmektedir. Oysa Ga16/2-1 izolatının fosfor çözme indeksi çok düşük olmasına rağmen koloni çapı çok geniş olup, bu da bakterinin gelişme hızının çok yüksek olduğunu göstermektedir. Fosfor çözme indeksi çok düşük olmasına rağmen çok hızlı çoğaldığı için en fazla fosforu çözdüğü düşünülmektedir.

Çizelge 4.8. Seçilen 29 izolatın katı NBRIP besi yerindeki fosfor çözme indeksi, bakterinin koloni çapı ve sıvı NBRIP besi yerinde çözülen fosfor miktarı

İzolatlar	P çözme indeksi	Koloni Çapı	P miktarı (ppm)
Kontrol	0	0	9,6
Ga16/2-1	1,26	9,33	401,27
Ga4/3-1	1,53	6,25	277,33
Ga3/3-1	2,85	2,83	269,60
Ga1/2-1	2,17	2,67	194,61
Os1/3-1	1,33	2,25	191,73
OsD1/3-1	1,31	6,50	189,53
Ga10/2-5	2,39	1,83	183,36
HaD6/3-1	4,00	2,33	173,31
OsD3/3-1	4,99	2,50	156,75
T6/3-7	3,38	2,50	138,07
T2/2-2	4,67	2,17	135,19
OsD1/2-2	5,89	2,33	125,46
Ga5/4-4	1,70	5,00	105,54
OsD2/4-4	4,14	2,50	96,56
Ga7/3-6	10,33	1,50	79,91
Os2/4-5	2,25	1,83	66,20
T1/4-6	1,55	5,67	45,29
Os1/4-8	1,33	1,50	34,19
Ga20/4-1	2,00	2,00	32,06
Os2/4-9	1,71	2,00	25,79
Os1/4-4	1,81	1,83	17,67
Os2/4-6	1,67	1,33	16,18
T2/3-1	1,22	3,00	14,30
HaD5/2-1	1,78	8,00	13,06
HaD3/3-1	4,50	2,00	12,89
Os1/4-7	1,81	1,77	12,31
Os1/4-2	1,25	1,00	10,62
Os1/4-5	2,00	1,50	10,23
Ha4/3-2	1,66	3,00	10,15

Fosforu çözdüğü belirlenen izolatlar sıvı besi yerinde geliştirilmiş ve çözdüğü fosfor miktarı yönünden izolatlar arasında çok fark olduğu belirlenmiştir. Kontrolde 9,6 ppm fosfor bulunurken en fazla fosfor çözdüğü belirlenmiş olan Ga16/2-1 izolatında ortalama 401,27 ppm elde edilmiştir. Sıvı besi yerinde en fazla fosfor çözen 9 izolat ve fosfor çözme indeksi en yüksek olan 1 izolat saksı çalışmalarında kullanılmıştır. Seçilen bu PGPR izolatların (Çizelge 4.9) 6'sı Gaziantep, 3'ü Osmaniye ve 1'de Hatay'dan alınan topraklardan izole edilmiştir. Bu bakteri izolatlarının 3 floresan, 3 sarı, 3 krem ve 1 izolatta kırmızı renkte gelişmiştir. İzolatlardan 2'si gram pozitif ve 4'ü ise oksidaz pozitif sonuç vermiştir.

Çizelge 4.9. Seçilen PGPR izolatların King B besi yerinde oluşturduğu koloni rengi, gram ve oksidaz testi

İzolatlar	Toplandığı yer	Koloni rengi	Gram reaksiyon	Oksidaz Testi
Ga1/2-1	G.Antep	Sarı	-	-
Ga3/3-1	G.Antep	Floresan	-	+
Ga4/3-1	G.Antep	Floresan	-	+
Ga7/3-6	G.Antep	Krem	-	+
Ga10/2-5	G.Antep	Floresan	-	+
Ga16/2-1	G.Antep	Sarı	-	-
OsD1/3-1	Osmaniye	Sarı	-	-
Os1/3-1	Osmaniye	Kırmızı	-	-
OsD3/3-1	Osmaniye	Krem	+	-
HaD6/3-1	Hatay	Krem	+	-

4.5.3. Seçilen PGPR İzolatlarının Siderefor ve Antagonist Etkisi

Saksı çalışmasında kullanılmak amacıyla seçilen 10 PGPR izolatının siderefor ve antagonistik etkilerini belirlemek için yapılan ikili kültürlerin hiç birinde *A. vitis* izolatının gelişimi engellenememiştir.

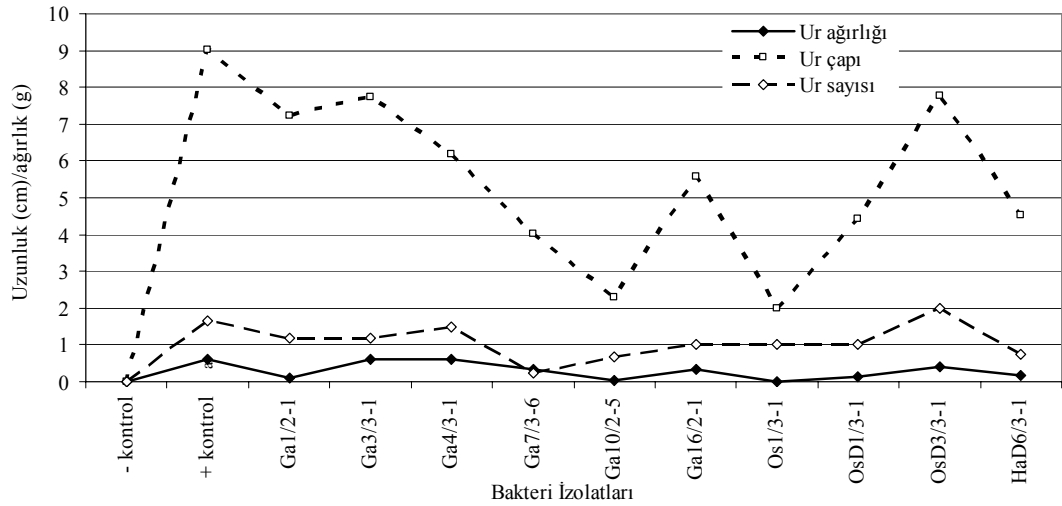
4.5.4. Seçilen PGPR İzolatlarının *A. vitis*'e Karşı Etkisi

Seçilen 10 PGPR izolatının *A. vitis*'e karşı etkinliğini belirlemek amacıyla 6 tekrarlı olarak kurulan saksı denemesinde (Şekil 4.22) *A. vitis* bitkiye inokule edildikten yaklaşık 3,5 ay sonra oluşan ur sayısı, urların çapı (eni, boyu ve yüksekliği) ve urların ağırlıkları ölçülerek değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasında LSD analizine göre %5 önem seviyesinde önemli farklar

olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23; Çizelge 4.10). Ur sayısı bakımından ortalama 0,25 adet ile en az Ga7/3-6 izolatu uygulanan asmalarda gözlenmiştir. Bunu sırasıyla Ga10/2-5 (0,67 adet) ve HaD6/3-1 (0,75 adet) izolatları izlemiştir. En fazla sayıda ur oluşumu ise 2 adet ile OsD3/3-1 ve 1,5 adet ile Ga4/3-1 izolatlarında elde edilmiştir.



Şekil 4.22. PGPR izolatlarının *Agrobacterium vitis*'e etkinliğinin belirlenmesi için kurulan denemenin farklı zamanlardaki genel görünümü



Şekil 4.23. Toprakta izole edilen farklı PGPR izolatları uygulanmış asmalarda oluşan ur sayısı, ur ağırlığı ve ur büyüklükleri

Çizelge 4.10. PGPR izolatları uygulanmış asmalarda oluşan urların sayısı, büyüklüğü ve ağırlığı

Bakteri izolatları	Ur sayısı	Ur Büyüklüğü			Ur çapı (mm)	Ur ağırlığı (g)
		En (mm)	Boy (mm)	Yükseklik (mm)		
- kontrol	0,00 d	0,00	0,00	0,00	0,00 d	0,00 c
+ kontrol	1,67 ab	5,45	5,76	3,97	5,06 abc	0,62 a
Ga1/2-1	1,17 abc	3,95	3,59	1,90	3,14 bcd	0,12 bc
Ga3/3-1	1,17 abc	5,27	6,65	2,38	4,77 abcd	0,62 ab
Ga4/3-1	1,50 ab	6,87	7,47	4,21	6,18 ab	0,63 a
Ga7/3-6	0,25 cd	1,20	1,35	1,47	1,34 cd	0,35 abc
Ga10/2-5	0,67 bcd	1,00	1,56	0,48	1,02 d	0,02 c
Ga16/2-1	1,00 abcd	2,56	3,42	2,25	2,74 bcd	0,32 abc
Os1/3-1	1,00 abcd	1,90	2,26	1,53	1,90 cd	0,01 c
OsD1/3-1	1,00 abcd	1,83	1,82	0,53	1,39 cd	0,12 bc
OsD3/3-1	2,00 a	7,32	10,28	4,70	7,43 a	0,40 abc
HaD6/3-1	0,75 bcd	2,18	2,54	1,97	2,23 cd	0,16 abc

PGPR izolatları uygulanmış asmalarda oluşan ur ağırlıkları karşılaştırıldığında en hafif ur Os1/3-1 (0,01 g) ve Ga10/2-5 (0,02 g) izolatlarında elde edilmiştir. Ağırlık yönünden en fazla ur oluşumu ise Ga4/3-1 (0,63 g) ve Ga3/3-1 (0,62 g) izolatlarından elde edilmiştir. Ur büyüklüğü yönünden karşılaştırıldığında da Ga10/2-5 (çapı 1,02 mm) izolatu en küçük uru oluşturmuştur. Bunu sırayla Ga7/3-6 (çapı 1,34 mm), OsD1/3-1 (çapı 1,39 mm), Os1/3-1 (çapı 1,9 mm) ve HaD6/3-1 (çapı 2,23 mm) izolatları izlemiştir. En büyük ur oluşumu ise OsD3/3-1 (çapı 6,38 mm) ve Ga4/3-1 (çapı 6,18 mm) izolatları uygulanmış asmalardan elde edilmiştir. Ur sayısı, ur çapı ve ur sayısı dikkate alınarak yapılan genel bir değerlendirmede bağlarda *A. vitis* ile mücadelede Ga7/3-6, Ga10/2-5, Os1/3-1, OsD1/3-1 ve HaD6/3-1 izolatlarının ümit var olduğu görülmektedir. Bu izolatların dayanıklılığı teşvik etme mekanizması özellikle tarla denemeleri ile daha detaylı olarak çalışılmalıdır.

Ticari olarak kullanılan patojen olmayan *Agrobacterium rhizogenes* K84 ve bundan geliştirilen K1026 izolatları tüm dünyada kök boğazı uruna karşı mücadelede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Moore ve Warren, 1979; Shim ve ark., 1987; Kawaguchi ve ark., 2005). Fakat K84 ve K1024 izolatları *A. vitis* izolatlarına karşı mücadelede etkisiz olması araştırmacıları yeni izolatların elde edilmesine yönlendirmiştir. Bu güne kadar birçok araştırmacı tarafından bağ uruna karşı değişik seviyelerde kontrol edebilen birçok izolat elde edilmiş olmasına rağmen henüz ticari

biopreperat geliştirilmemiştir (Burr ve ark., 1998; Liang ve ark., 1990; Staphorst ve ark., 1985; Webster ve Thomson 1986; Xianying ve Wangnian, 1986).

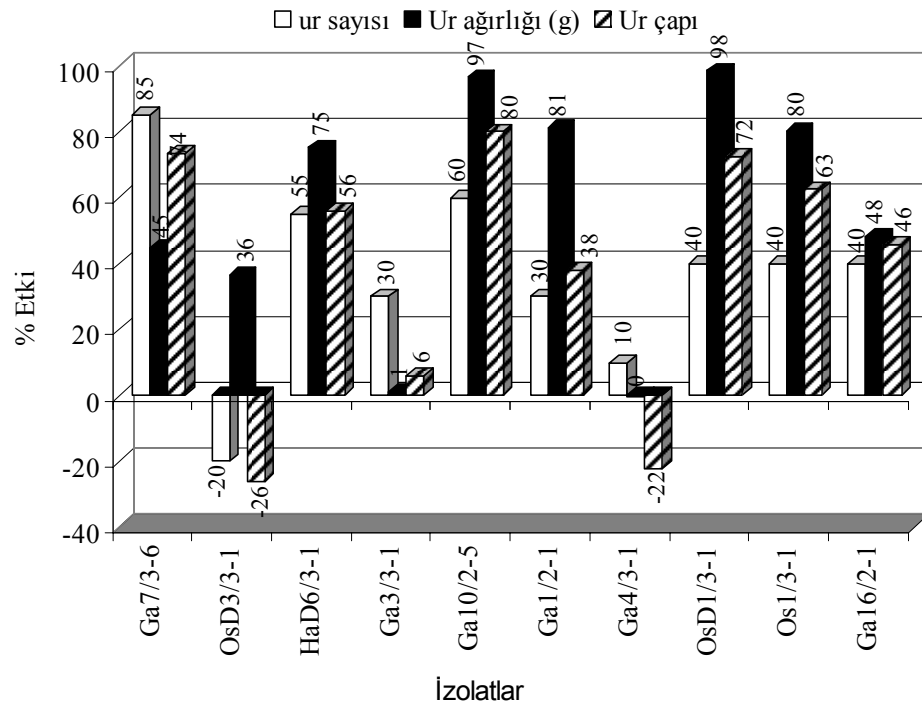
Topraktan izole edilen farklı PGPR izolatları, ya doğrudan bitki hormonlarının analoglarını üreterek, organik maddeleri mineralize ederek, suda erimeyen kaya fosforunu suda eriyebilir forma dönüştürerek, ya da dolaylı olarak teşvik edilmiş dayanıklılığı uyararak bitki gelişmesini teşvik edebilirler (Elad ve Chet, 1987; Tomashow ve Weller, 1988; Sumner, 1990; Glick ve Bashan, 1997). Silva ve ark. (2004)'nın yaptığı bir çalışmada domateste *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans* ve *Septoria lycopersici*'ye karşı mücadelede kimyasal preparatlarla PGPR izolatları kombine edilerek kullanıldığında başarının arttığını belirtmişlerdir. PGPR izolat kullanımının kimyasal preparatların kullanımını yarı yarıya azaltacağını vurgulamışlardır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada PGPR izolatlarının biberde *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'ya karşı kullanıldığında hastalık şiddetini %65 oranında azalttığı vurgulanmaktadır (Mirik, 2005). Bizim yaptığımız çalışma da PGPR izolatlarının ur büyüklüğünü %80 ve ur ağırlığını ise %98 oranında azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.24). Ur sayısında ise %85 oranında bir azalma tespit edilmiştir.

PGPR izolatları uygulanmış asma çubuklarında sürgün sayısı yönünden istatistiksel olarak LSD'ye göre %5 önem seviyesinde önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Ortalama 1,5 adet sürgün ile en yüksek Os1/3-1 izolatı uygulanmış çubuklarda görülmüştür. En az sayıda sürgün ise Ga1/2-1 izolatı uygulanan çubuklarda elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu yönünden ise en uzun sürgün Ga1/2-1 uygulanmış çubuklardan elde edilirken en kısa sürgünler ise sırasıyla Ga4/3-1, Ga16/2-1 ve Ga3/3-1 uygulanan asma çubuklarında belirlenmiştir.

Sürgün kuru ve yaş ağırlıklarında uygulamalar arasında önemli farklılıklar olmuş ve en fazla sürgün yaş ve kuru ağırlığı OsD3/3-1 uygulanmış asma çubuklarından elde edilmiştir. Kök uzunluğu, kök yaş ve kuru ağırlığına göre de en fazla OsD3/3-1 izolatı uygulanmış asma çubuklarında gözlenmiştir. Bitki gelişimi yönünden genel olarak değerlendirildiğinde en fazla etkili olan OsD3/3-1 izolatı aynı

zamanda ur gelişimini de önemli düzeyde azaltmıştır. Bununla birlikte Ga7/3-6, Ga10/2-5, Os1/3-1 ve HaD6/3-1 izolatları da genel olarak az da olsa bitki gelişimini teşvik etmiştir. Ayrıca bu izolatlar ur oluşumunu da belirli oranda azaltmaktadır. Bundan dolayı asmalarda *A. vitis* ile mücadelede Ga7/3-6, Ga10/2-5, OsD1/3-1, Os1/3-1 ve HaD6/3-1 izolatlarının ümit var olduğu görülmektedir.



Şekil 4.24. Asmada ur oluşumuna PGPR izolatlarının etkisi

4.5.5. Bakteriyel Lipopolisakkaritlerin (LPS) *A. vitis*'e Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi

A. vitis ile mücadelede 10 g/l dozunda LPS uygulanan asma çubuklarında ur oluşumunda LSD analizine göre %5 önem seviyesinde istatistiki olarak önemli farklılıklar olduğu ve LPS uygulamasının ur büyüklüğünü önemli miktarda azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12) (Şekil 4.25). LPS'in diğer dozları ile kontrol arasında önemli bir fark olmadığı ve bundan dolayı da LPS'in etkili olabilmesi için en az 10 g/l dozunda uygulanması gerektiği görülmüştür.

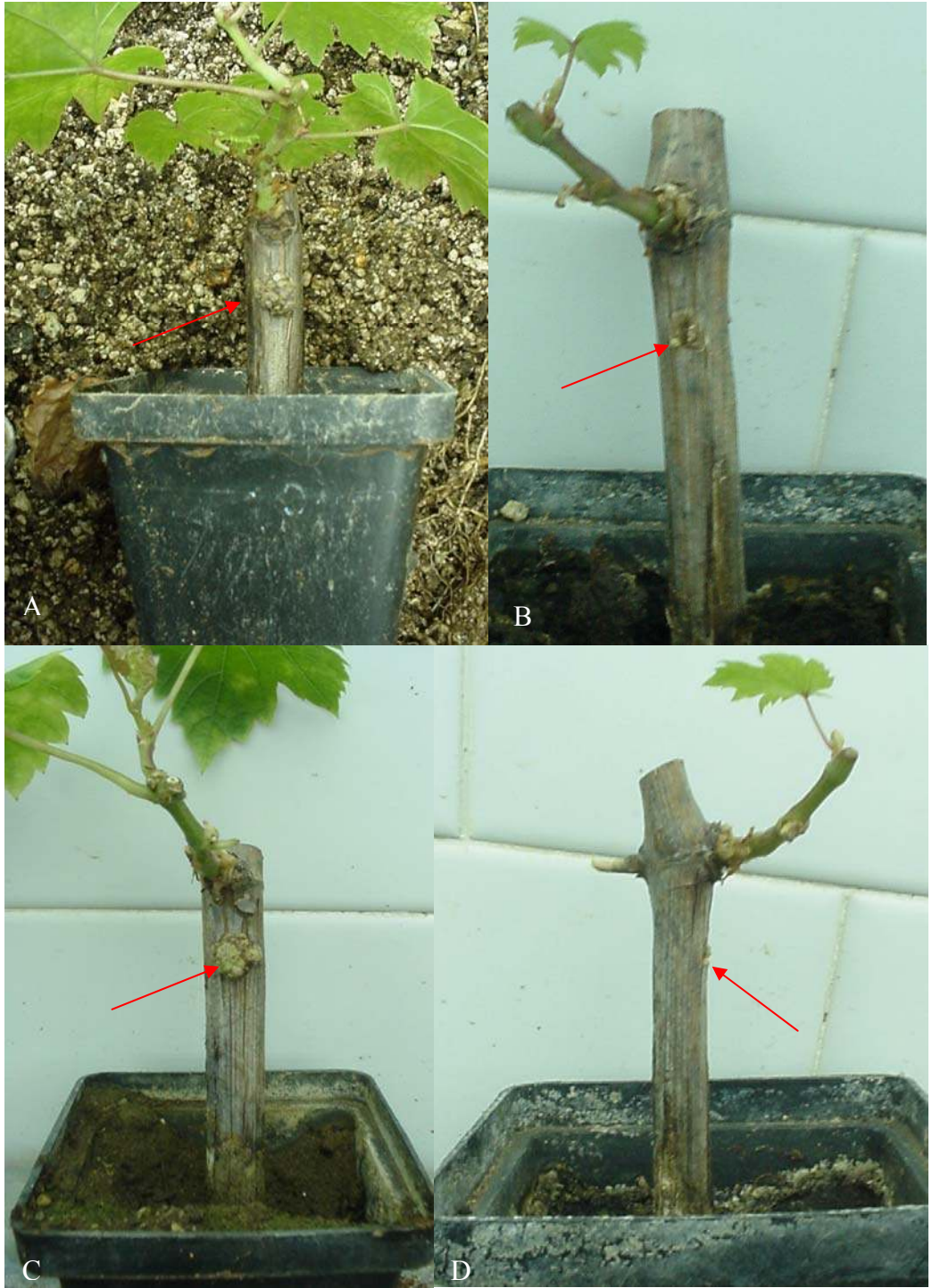
Çizelge 4.11. PGPR izolatları uygulanmış asmalarda 3,5 ay sonra oluşan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğu, yaş ve kuru ağırlığı

Uygulamalar	Sürgün sayısı	Sürgün uzunluğu (cm)	Sürgün yaş ağırlığı (g)	Sürgün kuru ağırlığı (g)	Kök uzunluğu (cm)	Kök yaş ağırlığı (g)	Kök kuru ağırlığı (g)
- Kontrol	1,17 bc	28,67 b	5,49ab	1,22 b	18,17 c	1,54 b	0,76 b
+ Kontrol	1,00 bc	46,50 ab	8,45a	2,61 a	27,83ab	2,88 ab	1,64 ab
Ga1/2-1	0,83 c	54,33 a	6,95ab	1,85 ab	18,00 c	2,42 b	1,25 ab
Ga3/3-1	1,33ab	29,17 b	5,82ab	1,42 ab	12,33 c	1,78 b	1,08 ab
Ga4/3-1	1,25abc	24,25 b	2,09 b	0,90 b	12,75 c	3,10 ab	1,85 ab
Ga7/3-6	1,25abc	32,63 ab	7,71a	1,58 ab	17,25 c	2,81 ab	0,86 ab
Ga10/2-5	1,33ab	33,33 ab	5,85ab	1,66 ab	13,17 bc	2,69 b	1,55 ab
Ga16/2-1	1,33ab	28,08 b	8,45a	2,60 a	19,33 c	2,64 b	1,54 ab
Os1/3-1	1,50a	31,50 ab	4,62ab	1,46 ab	15,75 c	1,36 b	0,96 ab
OsD1/3-1	1,00 bc	33,50 ab	9,33a	2,69 a	33,67a	5,05 a	2,04 a
OsD3/3-1	1,00 bc	45,20 ab	6,76ab	1,55 ab	15,80 c	2,73 ab	1,38 ab
HaD6/3-1	1,25abc	47,88 ab	8,68a	1,89ab	14,50 c	2,01 b	1,14 ab

Çizelge 4.12. Farklı dozlarda uygulanan LPS'in asma çubuklarında ur oluşumuna etkisi

Uygulamalar	Ur büyüklüğü (mm)			Ortalama ur büyüklüğü (mm)
	En (mm)	Boy (mm)	Yükseklik (mm)	
Kontrol	5,26	8,21	3,91	5,79 a
0,1 g/l G5	6,06	8,52	3,74	6,10 a
0,1 g/l S4	2,78	2,87	1,45	3,16 ab
1,0 g/l G5	1,66	4,68	2,21	3,80 ab
1,0 g/l S4	3,36	3,89	3,74	2,82 ab
10 g/l S4	0,41	0,40	0,31	0,49 b

Alexandrova ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada uygulanan tüm LPS konsantrasyonlarında *A. vitis*'in düşük yoğunlukta (5×10^2 hücre/ml) ur oluşumunu engellerken yüksek yoğunlukta (5×10^5 hücre/ml) ise ur oluşumunu engellemediğini gözlemişlerdir. Araştırmacıların uyguladığı en yüksek LPS konsantrasyonu 1,0 g/l olmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada 10^8 hücre/ml konsantrasyonda bakterilerin inokule edildiği asma çubuklarında LPS'in 1,0 g/l konsantrasyonda kullanıldığında ur büyüklüğünü bir miktar azaltmış ancak uygulamalar arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Asma çubuklarına LPS konsantrasyonu 10 g/l olarak uygulandığında asma çubuklarında ur büyüklüğü istatistiki olarak önemli derecede azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.25. Farklı dozlarda LPS uygulanmış asmalarda oluşan urlar: Kontrol (A, C), 10 g/l dozunda LPS uygulanmış (B, D)

Bu çalışma sonucunda LPS'nin patojen gelişimini durdurup ur oluşumunu engellemede teşvik edilmiş dayanıklılığa mı yoksa diğer dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirdiğini söylemek oldukça zordur. LPS'ler bitkilerde doğrudan savunma ile ilgili dayanıklılık mekanizmalarını aktive edebilirler (Dow ve ark., 2000). Coventry ve Dubery (2001) tütüne 50 µg/ml konsantrasyonda *Burkholderia cepacia* LPS'ini inokule ettiğinde 4 gün sonra yapraklarda patogeneze ile ilgili (PR) proteinlerin biriktiğini gözlemişlerdir. Ayrıca LPS bitkilerde teşvik edilmiş sistemik dayanıklılığda harekete geçirebilir (Dow ve ark., 2000; Leeman ve ark., 1995; Van Loon ve ark., 1998). Reitz ve ark., (2000) *Rhizobium etli* G12 izolatının LPS'si patatestte kist nematoduna karşı teşvik edilmiş dayanıklılıkta rol oynadığını göstermişlerdir.

LPS ön uygulamaları bitkide herhangi bir aktif tepki oluşturmuyorsa, uygulanan bileşiğin etrafındaki bitki hücre duvarının fiziko kimyasal değişimleri akla getirebilir. Bitki dokularına infiltre edilen protein-LPS ve EPS gibi makromoleküler kompleksler hücreler arası boşluklarda birikir ve hücre duvarına eklenirler (Medeghini Bonatti ve ark., 1985; Stefani ve Rudolph, 1989). Alternatif olarak LPS'lerin bir rolü de bitki hücre reseptörleri için öncül sinyaller olarak rol oynamış olabilir.

Van Peer ve Shippers (1992) ve Leeman ve ark. (1995) *Fusarium* solgunluğuna karşı turp ve karanfilde *P. fluorescens* LPS'inin O-spesifik zincirinin teşvik edilmiş sistemik dayanıklılığın önemli bir belirleyici olduğunu kanıtlamışlardır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Asmanın en önemli bakteriyel hastalıklardan biri olan *Agrobacterium vitis*'in tanılanması ve bitki gelişimini teşvik edici rhizobakteriler ile biyolojik mücadelesi ve *A. vitis* izolatından elde edilen LPS'in teşvik edilmiş dayanıklılık ile mücadele olanaklarının araştırılmasını hedefleyen bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1. Asmada ura neden olan *A. vitis* izolatlarını toplamak amacıyla Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman (Gölbaşı) ve Kahramanmaraş bağ alanları incelenmiş ve Mersin, Hatay, Gaziantep, Adıyaman (Gölbaşı) ve Kahramanmaraş bağ alanlarında urlu bitkilerden 47 *Agrobacterium vitis* izolatı elde edilmiştir. İzolatların tanısı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre yapılmıştır. Ayrıca PCR ve yağ asit metil ester analizleri ile klasik tanı desteklenmiştir.

2. Yağ asit metil ester analizi ile izolatların fenotipik olarak %19,1 ile %89,8 oranları arasında *Agrobacterium* ile benzer olduğu ve referans *A. tumefaciens* izolatları ile ayrı bir küme oluşturdukları belirlenmiştir. Sum in Feature 2 (14:0 3OH veya 16:1 ISO 1), 16:0 ve 18:1 ω7c yağ asitleri tüm izolatlardan izole edilmiş ve *Agrobacterium* izolatlarının tanılanmasında önemli yağ asitleri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 18:1 ω7c en fazla oranda bulunan yağ asidi olmuştur.

3. Asmadan izole ettiğimiz 47 izolatın 40'ı domateste (*Lycopersicon esculentum* cv Heinz 2274) ur oluştururken, 39 izolat kalonşede (*Bryophyllum daigremontianum*) ur oluşturmuştur. Domateste ur oluşturmayan izolatlar kalonşede, kalonşede ur oluşturmayan izolatlar da domateste ur oluşturmuştur. Bundan dolayı izole edilen *Agrobacterium* izolatlarının patojenite çalışmalarında hem domates hem de kalonşe bitkilerinin kullanılması gerekmektedir. Patojenite çalışmasında asma kullanıldığında 2 ay gibi uzun bir zamana ihtiyaç duyulurken domates veya kalonşe gibi otsu bitkiler kullanıldığında 9-15 gün gibi kısa bir sürede ur oluşturabildiğinden kendi konukçusu yerine bu tip otsu bitkilerin kullanılması tercih edilmelidir.

4. *Agrobacterium vitis* ile mücadelede kullanılmak için topraktan izole edilen bakterilerden 63 izolatın katı NBRIB besi yerinde zon oluşturduğu belirlenmiş ve bunlardan fosfor çözme indeksi en yüksek olan 29 izolat seçilerek sıvı NBRIP besi

yerinde çözebildiği fosfor miktarı ölçülerek en yüksek fosfor çözen 10 izolat belirlenerek saksı çalışmasında kullanılmıştır.

5. Seçilen 10 PGPR izolatı kök uygulaması şeklinde bitkiye verildiğinde ur sayısı, büyüklüğü ve ağırlığı yönünden istatistiki olarak önemli düzeyde azaltıcı etkinin olduğu belirlenmiştir. Ga7/3-6, Ga10/2-5, OsD1/3-1, Os1/3-1 ve HaD6/3-1 izolatları diğer izolatlara göre daha fazla hastalık gelişimini engellemişler aynı zamanda bitki gelişimini de olumlu yönde etkilemişlerdir. Seçilen bu beş PGPR izolatından faydalanılarak bu izolatların asma uru hastalığını engelleme özelliği, bitki gelişimine, özellikle de verime olan etkileri göz ardı edilmemelidir.

6. Bu çalışmada *A. vitis* ile mücadele için uygulanan bir diğer yöntem ise LPS'ler kullanılarak bitkilerde dayanıklılığın teşvik edilmiş olmasıdır. Bu amaçla yapılan çalışmada *Agrobacterium vitis*'ten izole edilmiş 10 g/l dozunda LPS uygulamasının asma çubuklarında ur büyüklüğünü önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Burada ortaya çıkan dayanıklılığın sistemik teşvik edilmiş dayanıklılık mı yoksa lokal teşvik edilmiş dayanıklılık mı olduğu, dayanıklılığı LPS'in belli bir bölgesinin mi yoksa bütün olarak mı etkileyip etkilemediği gelecekte yapılacak çalışmalar ile belirlenmelidir. Bunlarla birlikte LPS'nin pratikte uygulama olanaklarının da geliştirilmesi gerekmektedir.

7. Farklı bölgelerden elde edilen izolatların hangi tip hormonları sentezlediği gelecekte yapılması gereken diğer bir husustur.

KAYNAKLAR

- ABD-ALLA, M.H., 1994. Phosphates and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. Letters in Applied Microbiology, 18, 294-296.
- AĞAOĞLU, Y. S., 1986. Bağcılık. Türkiye İş Bankası Genel Müdürlük, Halkla İlişkiler Müdürlüğü Yayınları, Ankara, s 1-23.
- ALEXANDROVA, M., BAZZI, C., HOLST, O., 2000. Protective effect of bacterial lipopolisaccharides in the grapevine-*Agrobacterium vitis* interaction. Vitis, 39, 67-70.
- ANDERSON, A. R., MOORE, L. W., 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. Phytopathology, 69, 320-323.
- ANONİMOUS, 2006a. FAO Statistic. (www.fao.org).
- ANONİMOUS, 2006b. TÜİK verileri. (www.tuik.gov.tr).
- 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.
- AYSAN, Y., ŞAHİN, F., 2003. An outbreak of crown gall disease on rose caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. Plant Pathology, 52, 780.
- AYSAN, Y., ŞAHİN, F., MİRİK, M., DONMEZ, M. F., TEKMAN, H., 2003. First report of crown gall of apricot (*Prunus armeniaca*) caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Turkey. Plant Pathology, 52, 793.
- BARTON, C. J., 1948. Photometric analysis on phosphate rock. Analytical Chemistry, 20, 1068-1073.
- BASIM, E., BASIM, H., ÖZCAN, M., 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of Food Engineering, 77, 992-996.

- 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 its utilization for indexing grapevine propagation material. *Phytopathology*, 79, 995-998.
- BORA, T., ÖZAKTAN, H., 1998. Bitki hastalıkları ile biyolojik savaş. Prizma Matbaası, İzmir. 205s.
- BOUZAR, H., JONES, J. B., HODGE, N. C., 1993. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology*, 83, 733-739.
- BOUZAR, H., MOORE, L.W., 1987. Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass prairie. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 717-721.
- BOUZAR, H., MOORE, L.W., SCHAUP, H.W., 1988. Lipopolysaccharide from *Agrobacterium tumefaciens* B6 induces the production of strain-specific antibodies. *Phytopathology*, 78, 1237-1241.
- BRISBANE, P. G., KERR, A., 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 425-431.
- 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* 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 non-tumorigenic *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 opine-utilizing 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 colvivate. *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.
- CREASAP, J. E., REID, C. L., GOFFINET, M. C., ALOI, R., ULLRICH, C., BURR, T. J., 2005. Effect of wound position, auxin, and *Agrobacterium vitis* strain F2/5 on wound healing and crown gall in grapevine. Phytopathology, 95, 362-367.
- CUBERO, J., LOPEZ, M. M., 2001. An efficient microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. European Journal of Plant Pathology, 107, 757-760.
- 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.
- 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.
- DOW, M., NEWMAN, M., VON ROEPENACK, E., 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. Annual Review of Phytopathology, 38, 241-261.

- 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.
- ELAD, Y., CHET, I., 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of pythium damping-off by bacteria. *Phytopathology*, 77, 190-195.
- GALANOS, C., LÜDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *European Journal Biochemistry*, 9, 245-249.
- GLICK, B. R., BASHAN, Y., 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*, 15, 353-378.
- GRAHAM, T.L., SEQUEIRA, T., HUANG, T. S. R., 1977. Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 424-432.
- 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.
- HALDER, A. K., MISHRA, A. K., BHATTACHARYYA, P., CHAKRABARTTY, P. K., 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 36, 81-92.
- HITCHCOCK, P. J., BROWN, T. M., 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology*, 154, 269-277.
- 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.
- JEON, J., LEE, S., KIM, H., AHN, T., SONG, H., 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *The Journal of Microbiology*, 41, 271-276.

- 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.
- 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.
- 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 fluorescin. *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. (Z. KLEMENT, K. RUDOLPH, D. C. SANDS editor), *Methods in Phytopathology*, Akademiai Kiado, Budapest, 95-124.
- KLOEPPER, 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.
- 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.
- LEEMAN, M., VAN PELT, J. A., DEN OUDEN, F. M., HEINSBROEK, M., BAKKER, P. A. H. M., SCHIPPERS, B., 1995. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 85, 1021-1027.
- 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.
- LLOP, P., LASTRA, B., MARSAL, H., MURILLO, J., LOPEZ, M. M., 2003. Tracking *Agrobacterium* strains by a RAPD system to identify single colonies from plant tumors. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 381-389.

- LEYVAL, C., BARTHELIN, J., 1989. Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: influence on P, K, Mg and Fe mobilization from mineral and plant growth. *Plant and Soil*, 17, 103-110.
- MEDEGHINI BONATTI, P., STEFANI, E., MAZZUCCHI, U., 1985. Ultrastructural evidence for cellular response in tobacco leaves following infiltration with protein-lipopolysaccharide complexes of *Pseudomonas syringae* pv. *tobaci*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 112, 117-126.
- MILLER, K. J., GORE, R. S., JOHNSON, R., BENESI, A. J., REINHOLD, V. N., 1990. Cell-associated oligosaccharides of *Bradyrhizobium* spp. *Journal of Bacteriology*, 172, 136-142.
- MIRIK, M., 2005. Biberde bakteriyel leke etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*'nın tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rhizobakteriler ile biyolojik mücadele olanakları. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 162s.
- 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.
- NAUTIYAL, C. S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265-270.
- NAUTIYAL, C. S., BHADARIA, S., KUMAR, P., LAL, H., MONDAL, R., VERMA, D., 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182, 291-296.

- NEWMAN, M., VON ROEPENACK, E., DANIELS, M., DOW, M., 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*, 1, 25-31.
- NEWMAN, M., VON ROEPENACK-LAHAYE, E., PARR, A., DANIELS, M., DOW, J. M., 2002. Prior exposure lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal*, 29, 487-495.
- 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.
- PANAGOPOULOS, E.F., PSALLIDAS, P.G., 1973. Characteristics of Greek 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.
- PULAWSKA, J., WILLEMS, A., SOBICZEWSKI, P., 2006. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 470-479.
- REITZ, M., RUDOLPH, K., SCHRÖDER, I., HOFFMANN-HERGARTEN, S., HALLMANN, J., SIKORA, R.A., 2000. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3515-3518.
- 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.
- RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., BURR, T. J., COLLMER, A., 1991. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Journal of Bacteriology*, 173, 6547-6552.

- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 9, 401-408.
- 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.
- 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 tumefaciens*- *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.
- SILVA, H. S. A., REMEIRO, R. S., CARREN, R., PEREIRA, J. L. A., MIZUBUTI, E. S. G., MOUNTEER, A., 2004. Induction of systemic resistance by

- Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. Journal of Phytopathology, 152, 371-375.
- SMITH, E. F., TOWNSEND, C. O., 1907. A plant tumor of bacterial origin. Science, 25, 671-673.
- STEFANI, E., RUDOLPH, K., 1989. Induced resistance in bean leaves pretreated with extracellular polysaccharides from phytopathogenic bacteria. Journal of Phytopathology, 124, 189-199.
- SUMNER, M. E., 1990. Crop responses to Azospirillum inoculation. Advanced Soil Science, 12, 53-123.
- 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., 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.
- TAIWO, L. B., OSO, B. A., 1997. The influence of some pesticides on soil microbial flora in relation to changes in nutrient level, rock phosphate solubilization and P release under laboratory conditions. Agriculture, Ecosystems and Environment, 65, 59-68.
- 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.
- TOMASHOW, L. S., WELLER, D. M., 1988. Role of phenazine antibiotic in suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Journal of Bacteriology, 170, 3499-3508.
- VAN PEER, R., SHIPPERS, B., 1992. Lipopolysaccharides of plant growth-promoting *Pseudomonas* spp. Strain WCS 17r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. Netherlands Journal of Plant Pathology, 98, 129-139.
- VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M., PIETERSE, C. M. J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36, 453-483.
- VAZQUEZ, P., HOLGUIN, G., PUENTE, M. E., LOPEZ-CORTES, A., BASHAN, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biology and Fertility of Soils, 30, 460-468.
- 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.
- WEBSTER, J., THOMSON, J. A., 1986. Agrocine-producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevine isolates. Applied and Environmental Microbiology, 52, 217-219.
- WELLER, D. M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26, 379-407.
- WHATLEY, M. H., BODWIN, J. S., LIPPINCOTT, B. B., LIPPINCOTT, J. A., 1976. Role of *Agrobacterium* cell envelope lipopolysaccharide in infection site attachment. Infection and Immunity, 13, 1080-1083.

- 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 *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 89-103.

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Ayvalık (Yumurtalık/Adana)'ta doğdum. Orta ve lise eğitimimi Yumurtalık Lisesi'nde (Yumurtalık/Adana) tamamladım. 1986 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandım ve 1991 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldum. 1991-1994 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde Fitopatoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans'ımı tamamladım. 1996-2002 yılları arasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalında Öğretim Görevlisi olarak çalıştım. 2002 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalında Doktora yapmak üzere YÖK tarafından görevlendirildim. Evliyim ve bir kızım var.

EKLER

EK 1

***Agrobacterium vitis* İzolasyonu ve Karakterizasyonu Çalışmalarında Kullanılan**

Besi Yerleri

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

Protease Peptone	20,0 g
Gliserin	10,0 ml
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	1,5 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Patates Dekstroz Agar+CaCO₃ (PDA+ CaCO₃) (Moore ve ark., 2001)

Patates dekstroz agar	39,0 g
CaCO ₃	5,0 g
Saf su	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat (YDC) Agar (Lelliott ve Stead, 1987)

Yeast Ekstrakt	10,0 g
Dekstroz	20,0 g
Kalsiyum Karbonat	20,0 g
Agar	15,0 g
Saf Su	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Benedict's Ayıracı (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. Aynı 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.

Nutrient Glikoz Agar (NGA) Besi Yeri

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

121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Demir Amonyum Sitrat Besi Yeri (Moore ve ark., 2001)

Demir amonyum sitrat	10,0 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
CaCl ₂	0,2 g
Saf su	1000 ml

pH'ı 7,0'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Asit Üretimi İçin Temel Besi Yeri (Moore ve ark., 2001)

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

Agar ilave edilmeden önce 1 N NaOH ile pH'ı 7,1'e ayarlanmıştır. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Sitrat Besi Yeri (Moore ve ark., 2001)

Sodyum sidrat	2,0 g
Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
NaCl	5,0 g
Bromthymol blue [%50 etanol içerisinde %1 (w/v)]	15,0 ml
Agar	1,5 g
Saf su	1000 ml

Agar ilave edilmeden önce pH'ı 6,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Litmus Milk Besi Yeri (Moore ve ark., 2001)

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

1,0 N NaOH ile pH'ı 7,0'e ayarlanmıştır. Birbirini takip eden 3 gün 100°C'de 30 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Malonik Asit Besi Yeri (Moore ve ark., 2001)

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

pH'ı 7,0'e ayarlanmıştır. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

Mucic ve L-tartarik Asit Besi Yeri (Moore ve ark., 2001)

NaNH ₄ PO ₄	0,5 g
NaH ₂ PO ₄	0,17 g
KCl	0,2 g
Bromthymol blue [%50 etanol içerisinde %1 (w/v)]	2,5 ml
Saf su	1000 ml

pH'ı 7,0'e ayarlandıktan sonra her bir tüpe 4,5 ml ilave edilmiş ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Her Tüpe daha sonra 0,5 ml filtre ile steril edilmiş %1'lik mucic asit veya L- tartarik asit ilave edilmiştir.

EK 2

Yağ Asit Analizi Çalışmasında Kullanılan Besi Yerleri ve Çözeltiler

Tryticase Soy Broth Agar (TSBA)

Tryticase Soy Broth (BBL # 11768)	30,0 g
Agar	15,0 g
Saf Su	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Çözelti 1

Metil alkol (HPLC grade)	150 ml
Saf su	150 ml
Sodyum hidroksit	45 g

Sırası ile saf su ve metil alkol 1 litrelik renkli çözelti şişesine ilave edildikten sonra sodyum hidroksit ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır.

Çözelti 2

Hidroklorik asit (6,0 N)	325 ml
Metil alkol (HPLC grade)	275 ml

Renkli çözelti şişesi içerisinde hazırlanır.

Çözelti 3

Heksan (HPLC grade)	200 ml
Metil-tert-butil eter (MTBE, HPLC grade)	200 ml

Renkli çözelti şişesi içerisinde Metil-tert-butil eter üzerine heksan ilave edilerek hazırlanır.

Çözelti 4

Sodyum hidroksit (ACS grade)	10,8 g
Saf su	900 ml

Renkli çözelti şişesi içerisinde hazırlanır.

EK 3

PCR Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

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 Buffer

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

TBE Buffer

Tris	107,89 g
Borik asit	55,0 g
Na ₂ EDTA	7,44 g
Saf su	1000 ml
pH: 8,3	

EK 4

PGPR'ların İzolasyonunda Kullanılan Besi Yerleri

NBRIP-BPB Besi Yeri (Nautiyal, 1999)

Glikoz	10,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0 g
(NH ₄)SO ₄	0,1 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
MgCl ₂ -6H ₂ O	5,0 g
Bromphenolblue	0,025 g
Saf su	1000 ml

pH 7,0'ye ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

NBRIP Besi Yeri (Nautiyal, 1999)

Glikoz	10,0 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0 g
(NH ₄)SO ₄	0,1 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
MgCl ₂ -6H ₂ O	5,0 g
Saf su	1000 ml

pH 7,0'ye ayarlanır ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir.

EK 5

Lipopolisakkarit İzolasyonu Çalışmasında Kullanılan Besi Yeri

YM Besi Yeri (Miller ve ark., 1990)

Yeast ekstrakt	0,4 g
Mannitol	10,0 g
NaCl	0,1 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Saf su	1000 ml
pH: 7	