

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

**ASMADA (*Vitis vinifera*) TAÇ GALİ HASTALIK ETMENİ *Rhizobium vitis*'İN
LNA PROBE KULLANILARAK REAL-TIME PCR İLE TANISI VE TESPİTİ**

Ali TURGUT

**DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

2014

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

**ASMADA (*Vitis vinifera*) TAÇ GALİ HASTALIK ETMENİ *Rhizobium vitis*'İN
LNA PROBE KULLANILARAK REAL-TIME PCR İLE TANISI VE TESPİTİ**

Ali TURGUT

**DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**(Bu tez 2014.03.0121.007 no'lu proje olarak Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırmalar Proje Birimi tarafından desteklenmiştir.)**

2014

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

**ASMADA (*Vitis vinifera*) TAÇ GALİ HASTALIK ETMENİ *Rhizobium vitis*'İN
LNA PROBE KULLANILARAK REAL-TIME PCR İLE TANISI VE TESPİTİ**

Ali TURGUT

**DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu tez 08/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU

Doç. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Yrd. Doç. Dr. Fatih DAĞLI

Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

ÖZET

ASMADA (*Vitis vinifera*) TAÇ GALİ HASTALIK ETMENİ *Rhizobium vitis*'İN LNA PROBE KULLANILARAK REAL-TIME PCR İLE TANISI VE TESPİTİ

Ali TURGUT

Doktora Tezi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Aralık 2014, 178 sayfa

Bu çalışmada, asmada (*Vitis vinifera*) önemli kayıplara neden olan Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis*'in LNA (Locked Nucleic Acid) prob kullanılarak hem direkt bakteri hücresinden hem de hastalıklı bitki dokularından Real-Time PCR yöntemi ile hassas ve seçici olarak tanısı ve tespiti gerçekleştirilebilmiştir.

Oktopin katabolize eden ve *Rhizobium vitis* strainlerine ait *ocs* (oktopin sentaz) geninin 475 bp'lık kısmı, nopalin katabolize eden *nos* (nopalin sentaz) geninin 394 bp'lık kısmı klasik PCR ile çoğaltılmış, PCR ürünlerinin dizi analizi gerçekleştirilerek Real-Time PCR için primer ve prob setleri geliştirilmiştir. Vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerine spesifik primer ve prob setleri ise, *vis* (vitopin sentaz), vitopin *iaaM* (indol asetik sentaz) ve vitopin *virD2* genlerine ait gen bankasındaki diziler kullanılarak geliştirilmiştir. Geliştirilen primer setleri ve problemlerin spesifikliği, farklı *Rhizobium vitis* strainleri, farklı bitki patojeni bakteriler, asma genomik DNA'sı, baz materyal ve tümör dokularından hazırlanan süspansiyonlar kullanılarak test edilmiştir. Oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinde sırasıyla, 62 ve 78 baz çifti uzunluğunda DNA fragmentleri çoğaltılabilmesine rağmen, farklı bitki patojeni bakterilerde ve asma genomik DNA'sında hiçbir amplifikasyon meydana gelmemiştir. Oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tanıları ve tespitleri, bu çalışmada geliştirilen primer ve prob setleri kullanılarak Real-Time PCR yöntemi ile 20-25 dakikada gerçekleştirilebilmiştir. Oktopin ve nopalin straini için geliştirilen Real-Time PCR yönteminin bakteriyel hücre hassasiyet sınırı 1 bakteri hücresi olarak belirlenmiştir. Oktopin ve nopalin strainleri için DNA düzeyindeki hassasiyet sınırı ise 10 pg olarak tespit edilmiştir. *Rhizobium vitis*'in enfekteli asma baz materyalinden elde edilen bitki öz suyundan ve tümör dokularından hazırlanan süspansiyonlardan tanı ve tespiti gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, Taç Gali hastalık etmeni, *Rhizobium vitis*'in oktopin, nopalin ve vitopin katabolize eden strainlerinin her birine özel geliştirilen primer ve prob setleri ve Real-Time PCR yöntemi kullanılarak hem direkt bakteriyel hücreden, hem asma bitki öz suyundan, hem de asma ve domates tümör dokularından hızlı ve hassas bir düzeyde tanı ve tespitlerinin yapılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

ANAHTAR KELİMELE: Asma, Real-Time PCR, *Rhizobium vitis*, Taç Gali Hastalığı, Tanı, Tespit, *Vitis vinifera*

JÜRİ: Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman)
Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU
Doç. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN
Yrd. Doç. Dr. Fatih DAĞLI
Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND DETECTION OF *Rhizobium vitis* CASUAL AGENT OF CROWN GALL DISEASE OF GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.) BY REAL-TIME PCR USING LNA PROBE

Ali TURGUT

PhD Thesis in Plant Protection
Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin BASIM
December 2014, 178 pages

In this study, a Real-Time PCR method using LNA (Locked Nucleic Acid) probe which was sensitive and selective were developed for identification and detection of *Rhizobium vitis*, a causal agent of Crown Gall Disease of grapevine from both bacterial cells and diseased plant material.

The 475 bp of *ocs* (octopine synthase) gene belong to *Rhizobium vitis* strains catabolising octopine, and 394 bp of *nos* (nopaline synthase) gene belong to *Rhizobium vitis* strains catabolising nopaline were amplified by conventional PCR. The amplified PCR product were sequenced in order to develop primer and probe sets for Real-Time PCR. Specific primer and probe sets for *Rhizobium vitis* strains catabolising vitopine were developed from the gene sequences of *vis* (vitopine synthase), vitopine *iaaM* (indole acetic acid synthase) and vitopine *virD2* genes from the GenBank. Different *Rhizobium vitis* strains, other plant pathogenic bacteria from different genus and species, vine total genomic DNA and basal material and tumor tissue were tested in order to determine the sensitivity of primer sets and probes. Although the DNA fragment amplified from the *Rhizobium vitis* strains catabolising octopine and nopaline were 62 and 78 base pairs respectively, no amplified product was detected from the other bacterial pathogens and vine genomic DNA. The primer and probe sets developed in this Real-Time PCR method for the detection and identification of *Rhizobium vitis* strains catabolising octopine and nopaline were identified within 20-25 minutes. The sensitivity of detection limit by the developed Real-Time PCR methods for octopine and nopaline strains was 1 bacterial cell. The sensitivity limit of DNA level was 10 pg. The pathogenic bacterium obtained from bleeding sap of basal material and tumor tissues were identified and detected.

In conclusion, Real-Time PCR method using primer and probe sets specific for each of *Rhizobium vitis* strains catabolising octopine and nopaline were sensitive and quick for identification and detection of *Rhizobium vitis* from bacterial cell, bleeding sap of grapevine, tumor tissues from grapevine and tomato

KEYWORDS: Crown Gall Disease, Detection, Diagnosis, Grapevine, Real-Time PCR, *Rhizobium vitis*, *Vitis vinifera*

COMMITTEE: Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Supervisor)
Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU
Assoc. Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN
Asst. Prof. Dr. Fatih DAĞLI
Asst. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

ÖNSÖZ

Bu çalışma kapsamında asmada (*Vitis vinifera*) önemli kayıplara neden olan Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis*'in LNA prob kullanılarak hassas ve seçici bir metot olan Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti yapılmıştır.

Ziraat mühendisliğinin lisansüstü eğitiminin kademelerden biri olan doktora eğitimimin sonuna gelmiş bulunuyorum. Doktora süreci boyunca bilgisinden istifade ettiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, insani ve ahlaki değerleri ile de bana hayatımın ileri dönemlerinde yol göstermeye devam edecek Prof. Dr. Hüseyin BASIM'a tecrübelerinden yararlanırken bana karşı göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ekip arkadaşlarıma, çalışmayı mali olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan eşim Duygu TURGUT'a ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	14
3. MATERYAL ve METOT	90
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler	90
3.2. Primerler ve Probların Tasarlanması	91
3.3. Real-Time PCR Optimizasyonu	95
3.4. Primerler ve Probların <i>Rhizobium vitis</i> Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi	95
3.5. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyetinin Belirlenmesi	95
3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primerler ve Probların Hassasiyetinin Belirlenmesi	96
3.7. Primerler ve Probların Seçiciliğinin Belirlenmesi	96
3.8. <i>Rhizobium vitis</i> 'in Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti	97
3.9. Real-Time Bio-PCR	101
4. BULGULAR	102
4.1. <i>Rhizobium vitis</i> 'in Klasik PCR ile Tanısı	102
4.2. <i>Rhizobium vitis</i> 'in Real-Time PCR ile Tanısı	102
4.3. <i>Rhizobium vitis</i> 'in Tüm Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı	105
4.4. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyeti	109
4.5. Direkt Bakteriden Primerler ve Probların Hassasiyeti	111
4.6. Primerler ve Probların Seçiciliği	116
4.7. Real-Time Bio-PCR	120
4.8. <i>Rhizobium vitis</i> 'in Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti	122
5. TARTIŞMA	128
6. SONUÇ	139
7. KAYNAKLAR	143
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
da	Dekar
g	Gram
ha	Hektar
IU	Uluslararası Ünite
kcal	Kilokalori
kDa	Kilodalton
MDa	Megadalton
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
pH	Hidrojen Potansiyeli
pg	Pikogram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
%	Yüzde
~	Yaklaşık
>	Küçüktür

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
<i>Acc</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizimi
<i>Alw</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
<i>Ava</i>	<i>Anabaena variabilis</i>
bç	Baz Çifti
<i>Bfu</i>	<i>Bacillus firmus</i>
<i>Bsp</i>	<i>Bacillus species</i>
biovar	Biyovaryete
<i>C.</i>	<i>Clavibacter</i>
C	Sitozin
<i>Cfo</i>	<i>Clostridium formicaceticum</i>
cfu	Koloni Oluşturan Birim
Chv	Kromozomal virülens gen
COST	European Cooperation in Science and Technology
Ct	Eşik Döngüsü
cv.	Kültivar

D	Dekstrorotatori
Dde	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
ddH₂O	İki Kere Distile Edilmiş Saf Su
DOC-PAGE	Deoksikolat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit Trifosfat
Dra	<i>Deinococcus radiophilus</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECL	Eşdeğer Zincir Uzunluğu
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
FAM	Fluorescein Amidit
FAME	Yağ Asidi Metil Ester
G	Guanin
GC	Guanin/Sitozin
genomosp.	Genomik Tür
genomovar	Genomik Varyete
Hae	<i>Haemophilus aegyptius</i>
Hin	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hpa	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
Hsp	Sıcaklık Şoku Proteini
IAA	Indolasetik Asit
IAM	Indolasetamid
IBA	İndol Bütirik Asit
ICMP	International Collection of Microorganisms from Plants
IGS	İntergenik Ara Bölge
IS	İnversiyon Dizisi
IU	Uluslararası Ünite
kb	Kilobaz
L	Levorotatori
L.	Linnaeus
LNA	Kilitli Nükleik Asit
m	Meta
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
Mb	Megabaz
MS	Kütle Spektrometresi
Mva	<i>Micrococcus varians</i>
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCPBP	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria
OD	Optik Yoğunluk
p	Para
P.	<i>Pseudomonas</i>
Pac	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
PAGE	Poliakrilamit Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patates Dekstroz Agar
PFGE	Pulsed-Field Jel Elektroforez

<i>Pme</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
pv.	Patovar
RAPD	Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA
Rcg	Resistance to Crown Gall
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
rep-PCR	Tekrarlı Dizi Bazlı PCR
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
Ri	Saçak Kök Oluşumunu İndükleyen
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RS	Roy & Sasser
<i>Rsa</i>	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
S	Svedberg Katsayısı
SCAR	Sekansı Karakterize Edilmiş oğaltılan Bölge
SAT	Lam Aglütinasyon Testi
spp.	Tür
subsp.	Alt Tür
SYBR	Synergy Brands
syn.	Sinonim
T4SS	Tip IV Sekresyon Sistemi
T-DNA	Transfer DNA
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
TAMRA	Karboksitetramethylrodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Ti	Tümör Oluşumunu İndükleyen
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
U	Ünite
UPGMA	Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış İkili Grup Metodu
Vir	Virülens
X.	<i>Xanthomonas</i>
<i>Xba</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>
3'	DNA molekülünün 3' terminal hidroksil ucu of DNA
5'	DNA molekülünün 5' terminal fosfat ucu of DNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’de üzüm ve diğer meyve gruplarının üretim miktarları ile üretim oranları.....	2
Şekil 1.2. Dünya’da 1961-2010 yılları arasında bağ alanlarının ve üzüm üretim miktarlarının değişimi	6
Şekil 1.3. Türkiye’de 1961-2010 yılları arasında bağ alanlarının ve üzüm üretim miktarlarının değişimi	6
Şekil 1.4. <i>Rhizobium vitis</i> ’in hayat döngüsü	9
Şekil 2.1. Ti plazmitin şematik gösterimi	22
Şekil 2.2. Plazmit ve ikincil kromozomun replikasyonunda görev alan repC proteinlerine bağlı olarak yapılan <i>Rhizobiaceae</i> familyası filogenetik analizi	23
Şekil 2.3. T-DNA transfer prosesi	24
Şekil 2.4. <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinde onkogenlerin sayısı ve dizilimine temel T-DNA yapıları	25
Şekil 2.5. <i>Rhizobium vitis</i> ’in asma gövdesinde oluşturduğu tümörler.....	40
Şekil 2.6. <i>Rhizobium vitis</i> ’in asma köklerinde oluşturduğu nekrozlar.....	40
Şekil 2.7. pAgK84 plazmitine ait <i>EcoRI</i> restriksiyon haritası.....	43
Şekil 2.8. Asma fidanlarında anaç olarak kullanılacak tek yıllık sürgünlerin arazide budanması.....	46
Şekil 2.9. Anaç olarak kullanılmak üzere arazide tasnif edilip demetlenmiş tek yıllık sürgünler.....	46
Şekil 2.10. Kalem olarak kullanılmak üzere arazide tasnif edilip demetlenmiş tek yıllık sürgünlerin aşısı için kesimi	47
Şekil 2.11. Anaç ve kalemleri birleştirmekte kullanılan omega aşısı makinesi	47
Şekil 2.12. Omega aşısı makinesi ile birleştirilen anaç ve kalem.....	48
Şekil 2.13. Roy & Sasser selektif besi ortamında karakteristik <i>Rhizobium vitis</i> kolonileri.....	51
Şekil 3.1. Klasik PCR ve Real-Time PCR’da <i>Rhizobium vitis</i> ’in tanısı için kullanılan OCTF ve OCTR primerlerinin ve probun oktopin sentaz geni üzerindeki bağlanma yerleri	93
Şekil 3.2. Klasik PCR ve Real-Time PCR’da <i>Rhizobium vitis</i> ’in tanısı için kullanılan NOPF ve NOPR primerlerinin ve probun nopalin sentaz geni üzerindeki bağlanma yerleri	93
Şekil 3.3. Klasik PCR ve Real-Time PCR’da <i>Rhizobium vitis</i> ’in tanısı için kullanılan S4iaaM5 ve S4iaaM3 primerlerinin ve probun vitopin Ti plazmitinde <i>VirD2</i> geni üzerindeki bağlanma yerleri	94
Şekil 3.4. Klasik PCR ve Real-Time PCR’da <i>Rhizobium vitis</i> ’in tanısı için kullanılan VisF ve VisR primerlerinin ve probun vitopin sentaz geni üzerindeki bağlanma yerleri	94
Şekil 3.5. Klasik PCR ve Real-Time PCR’da <i>Rhizobium vitis</i> ’in tanısı için kullanılan VirD2S4F ₇₁₆ ve VirD2S4R ₁₀₃₆ primerlerinin ve probun vitopin Ti plazmitinde <i>VirD2</i> geni üzerindeki bağlanma yerleri.....	94
Şekil 3.6. Asma gövdesi üzerinde <i>Rhizobium vitis</i> tarafından oluşturulan tümörler	98
Şekil 3.7. <i>Rhizobium vitis</i> asma baz materyallerinden ekstraksiyonu.....	98
Şekil 3.8. Domates gövdesi üzerinde <i>Rhizobium vitis</i> tarafından oluşturulan tümörler.	99

Şekil 3.9. <i>Rhizobium vitis</i> strainlerini enfekteli asma ve domates tümör dokularından tespit prosesi	100
Şekil 4.1. Oktopin katabolize eden yerli <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin klasik PCR ile tanısı (a). Nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> ICMP 10753 straininin klasik PCR ile tanısı (b).....	102
Şekil 4.2. Oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin Real-Time PCR ile tanısı.....	103
Şekil 4.3. Nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin Real-Time PCR ile tanısı.....	103
Şekil 4.4. Oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin termal erime eğrisi	104
Şekil 4.5. Nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin termal erime eğrisi.....	104
Şekil 4.6. Oktopin katabolize eden yerli <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti.....	105
Şekil 4.7. Oktopin katabolize eden yerli <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti.....	106
Şekil 4.8. Oktopin katabolize eden yerli <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti.....	107
Şekil 4.9. Oktopin katabolize eden yerli <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti.....	108
Şekil 4.10. Nopalin katabolize eden yabancı <i>Rhizobium vitis</i> ICMP 10753 straininin Real-Time PCR ile tespiti	109
Şekil 4.11. Oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti.....	110
Şekil 4.12. Nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti.....	111
Şekil 4.13. Roy & Sasser seçici besi ortamında farklı seyreltmede tespit edilen en az bakterinin tespiti.....	112
Şekil 4.14. Oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin bakteri hassasiyeti	114
Şekil 4.15. Nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin bakteri hassasiyeti	115
Şekil 4.16. Oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> strainleri için oluşturulan regresyon eğrisi	116
Şekil 4.17. Nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> strainleri için oluşturulan regresyon eğrisi	116
Şekil 4.18. Oktopin katabolize eden yerli <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin farklı <i>Rhizobium</i> türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi	117
Şekil 4.19. Nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin farklı <i>Rhizobium</i> türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi	118
Şekil 4.20. Oktopin katabolize eden yerli <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin farklı bitki patojeni bakterilere karşı spesifikliğin belirlenmesi	119
Şekil 4.21. Nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin farklı bitki patojeni bakterilere karşı spesifikliğin belirlenmesi	120

Şekil 4.22. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin tespiti	121
Şekil 4.23. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin tespiti	122
Şekil 4.24. Tasarlanan primer ve prob seti ile oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin asma özsuyundan tespiti	123
Şekil 4.25. Tasarlanan primer ve prob seti ile nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin asma özsuyundan tespiti	123
Şekil 4.26. Tasarlanan primer ve prob seti ile oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin enfekteli asma dokusundan tespiti	124
Şekil 4.27. Tasarlanan primer ve prob seti ile nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin enfekteli asma dokusundan tespiti	125
Şekil 4.28. Tasarlanan primer ve prob seti ile oktopin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin enfekteli domates dokusundan tespiti	126
Şekil 4.29. Tasarlanan primer ve prob seti ile nopalin katabolize eden <i>Rhizobium vitis</i> straininin enfekteli domates dokusundan tespiti	127

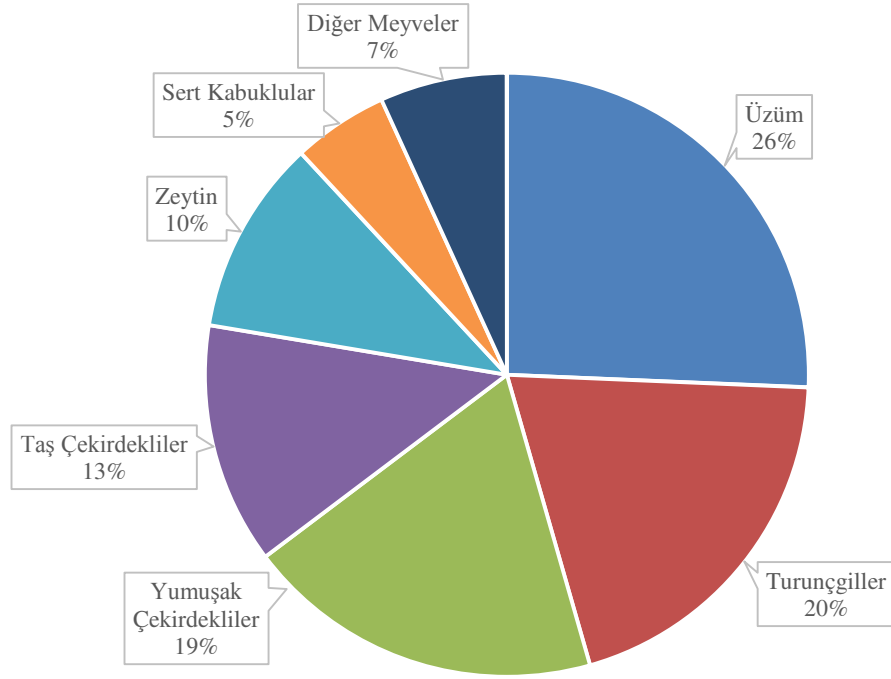
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’de son yıllarda üzüm üretimine ayrılan alan, üzüm üretim miktarı ve üzüm üretiminin değerlendirilme şekillerine göre dağılımı	3
Çizelge 1.2. Türkiye’nin en büyük üzüm üreticisi on şehrinde üretime ayrılan alan ve üretim miktarları.....	4
Çizelge 1.3. Dünya’nın en büyük üzüm üreticisi on ülkesinin üretim miktarları, Dünya üretimindeki payları ve üretim alanları	5
Çizelge 2.1. 100 g Avrupa asması üzümünün kimyasal içeriği	16
Çizelge 2.2. Genom dizisi çıkartılmış <i>Rhizobium</i> türlerinin genomik özellikleri.....	31
Çizelge 2.3. <i>Rhizobium</i> strainlerinin besi ortamında selekte edilmesinde kullanılabilirlik antibiyotikler ve konsantrasyonları	51
Çizelge 2.4. <i>Rhizobium tumefaciens</i> , <i>Rhizobium rhizogenes</i> , <i>Rhizobium vitis</i> , <i>Rhizobium rubi</i> ve <i>Rhizobium larrymoorei</i> türlerine ait başlıca biyokimyasal ve fizyolojik özellikler.....	56
Çizelge 2.5. <i>Rhizobium tumefaciens</i> , <i>Rhizobium rhizogenes</i> , <i>Rhizobium vitis</i> , <i>Rhizobium rubi</i> ve <i>Rhizobium larrymoorei</i> türlerinin ortalama % yağ asidi kompozisyonları	65
Çizelge 3.1. Türkiye’de asmalardan izole edilen ve Real-Time PCR çalışmalarında kullanılan <i>Rhizobium vitis</i> strainleri	90
Çizelge 3.2. Real-Time PCR’da test edilen farklı <i>Rhizobium</i> türleri	90
Çizelge 3.3. Real-Time PCR’da test edilen farklı bitki patojeni bakteriler	91
Çizelge 3.4. <i>Rhizobium vitis</i> strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı.....	91
Çizelge 3.5. Klasik PCR yöntemi ile <i>Rhizobium vitis</i> ’in tanısı için kullanılan, <i>ocs</i> , <i>nos</i> , <i>vis</i> , <i>virD2</i> ve <i>iaaM</i> genlerine ait primerler	92
Çizelge 3.6. Real-Time PCR yöntemi ile <i>Rhizobium vitis</i> ’in tanısı için geliştirilmiş <i>ocs</i> , <i>nos</i> , <i>vis</i> , <i>virD2</i> ve <i>iaaM</i> genlerine ait primerler ve probalar	93
Çizelge 3.7. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda <i>Rhizobium vitis</i> için oluşturulan Real-Time PCR programı	95
Çizelge 4.1. Real-Time PCR ile <i>Rhizobium vitis</i> oktopin ve nopalin strainlerinin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi.....	112

1. GİRİŞ

Bağcılık, insanoğlunun en eski tarımsal aktivitelerinden biri olup, bugün de önemini korumakta ve iklimi uygun ülkelerde en yaygın tarımsal üretim alanlarından birisini oluşturmaktadır. Dünya üzerinde tarımı yapılan en eski bitki türlerinden birisi olan asma, ülkemizde, son derece eski ve köklü bir kültüre sahiptir (Çelik vd 1998). Yeryüzünün kuzey yarımküresinde bağcılık, 10 ile 52 derece kuzey paralelleri arasında yapılmaktadır. Kuzey sınırını oluşturan yörelerde bağcılık, özellikle güney yamaçlarda ve nehir kenarlarında yapılabilirken, ekvatora yaklaştıkça ancak yüksek yaylalarda yapılabilir (Uzun 1996). 50. enlem derecesinden sonra asma, ancak sera ve benzeri ortamlarda üretilebilmektedir (Winkler vd 1974). Yerkürenin en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, 36 ile 42 derece kuzey paralelleri arasında bulunduğundan bağcılık için optimum olanaklara sahiptir (Oraman 1965).

Vavilov'un bitki gen merkezlerinin Dünya üzerindeki dağılımı ile ilgili çalışması sonucunda belirlediği sekiz gen merkezinden ikisi olan Yakın Doğu ve Akdeniz gen merkezleri ülkemiz toprakları üzerinde kesişmektedir (Vavilov 1926). Diğer yandan, Anadolu Yarımadası'nın kuzeydoğu bölümünü de içine alan Karadeniz ve Hazar Denizi arasındaki bölge, asmanın en önemli türü olan *Vitis vinifera*'nın gen merkezi ve kültüre alındığı yöre olarak kabul edilmektedir (McGovern vd 1996, Fatahi vd 2003). Arkeolojik bulgulara ve bölgedeki mevcut asma gen potansiyelinin zenginliğine dayandırılan bu hipotezler, moleküler genetik çalışmalarla da kanıtlanmıştır (Arroyo-Garcia vd 2006). Ülkemiz yaklaşık 6000 yıllık bir bağcılık kültürüne, hem yabani asmaya (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) ve hem de kültür asmasına (*Vitis vinifera* subsp. *sativa*) ait zengin asma gen potansiyeline ev sahipliği yapmaktadır (Ağaoğlu vd 1997, Çelik vd 1998, Çelik vd 2005). Binlerce yıllık bu süreçte Anadolu toprakları üzerinde doğal melezlemelerin eseri olarak çok geniş bir çeşit ve tip zenginliği oluşmuştur (Çelik vd 1998, Argun 2001). Birçok botanikçi, *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* türünün, Avrupa'da ve Batı Asya'da doğal ortamı boyunca yayılmış *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* türünün kültüre alınmasıyla meydana geldiğine inanmaktadır (Üzümeri 1938, Fidan 1985, Vouillamoz vd 2003). Ülkemizin hemen her bölgesinde, özellikle akarsu yatakları ve ormanlarda ağaçlara sarılmış olarak yabani asmalara rastlamak mümkündür. Bu popülasyonlar içinde ve arasında, zaman içinde meydana gelen doğal melezlemeler sonucunda daha da zenginleşen yabani asma gen potansiyelimizi oluşturan çeşit ve tiplerden pek çoğu, doğal olarak ya da biyotik veya abiyotik stres etmenleri nedeniyle elden çıksa da kendi içinde sürekli yenilenme sonucu yeni çeşit ve tipler ortaya çıkmaktadır (Ağaoğlu vd 1998, Söylemezoğlu vd 1998, Çelik vd 2005). Bugün anavatanı Anadolu olarak kabul edilen 1200 kadar üzüm çeşidi bulunmaktadır (Anonim 2012-a). Anadolu 'da bağcılık, daima tarımsal yapı içerisinde önemli bir yere sahip olmuştur. Bununla birlikte, her zaman insanımızın toplumsal ve ekonomik yaşamına önemli katkılarda bulunmuştur (Ergenoğlu ve Tangolar 2000, Anonim 2014-a).



Şekil 1.1. Türkiye’de üzüm ve diğer meyve gruplarının üretim miktarları ile üretim oranları (Anonim 2013)

Bağcılığın ana ürünü olan üzüm oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Üzüm tüm Dünya’da olduğu gibi ülkemizde de sadece sofralık olarak kullanılmamakta, ayrıca şaraplık, kurutmalık ve şıralık olarak da ülkemiz ekonomisine önemli katkılar sağlamaktadır (Ağaoğlu 1986, Argun 2001). Dünya’nın bağcılık için en elverişli iklim kuşağı üzerinde yer alan ülkemizde gerçekleştirilen üretimin ne şekilde değerlendirildiğine bakıldığında, Türkiye’deki toplam meyve üretiminin %25’inden fazlasını oluşturan üzümün büyük orada kurutmalık ve sofralık olarak ayrıldığı, %23’ünün ise pekmez, sucuk, pestil ve sirke gibi ürünlerin üretiminde kullanıldığı görülmektedir (Karabayır ve Tosun 2005, Çelik vd 2010). Bağcılık kültürü kadar eski olan bu ürünler, asırlardır olduğu gibi bugünde halkımız tarafından üretilmekte ve tüketilmektedir (Çelik vd 2000). 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). Ülkemizde üzüm yaprağı, geleneksel olarak önemli bir tüketim potansiyeline sahiptir. Sarmalık yaprak üretimi, özellikle Ege Bölgesi için önemli bir ek gelir kaynağıdır (Çelik vd 2005). Bağcılıkta öne çıkan diğer ülkelerde üretilen üzümün %59 gibi çok önemli bir bölümü, yüksek katma değer yaratan şarap üretiminde kullanılmakta, Dünya bağcılık ihracatından elde edilen gelirin yaklaşık %81’i şarap ihracatından kaynaklanmaktadır (Aktaş ve Tan 2007, Anonim 2010). Ülkemizin ekolojik koşulları, kaliteli şaraplık üzüm yetiştiriciliği için mükemmel seçenekler sunarken bu oran ülkemizde sadece %2,5-3’tür (Çelik vd 2005, Anonim 2013). Şarap üretimi Türkiye’de başta dini gerekçeler olmak üzere çeşitli nedenlerden ötürü yıllardır ihmal edilirken, özellikle Avrupa ülkelerinde ulusal ekonomilere önemli katkılar sağlamaktadır (Karabayır ve Tosun 2005). Dünya’daki en büyük üç şarap üreticisi ülke sırasıyla, Fransa, İtalya ve İspanya’dır. Bu ülkeler Dünya

şarap üretiminin yaklaşık yarısını gerçekleştirmektedirler. Türkiye %0,09 pay ile Dünya üretiminin çok gerisinde kalmıştır (Aktaş ve Tan 2007).

Türkiye bağcılığının geliştirilmesi her şeyden önce elde edilen ürünün taze ya da işlenmiş olarak iç ve dış pazarlarda değerlendirilmesine bağlıdır. Yıllık üretimin yaklaşık olarak %75'i yurt içinde tüketilmektedir. Bu durum, Türkiye bağcılığının içe dönük bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Sektöre konu olan tüm değerlendirme şekillerinin toplamı olarak, kişi başına yıllık tüketim 45 kg, üretim 52 kg dolayındadır (Aktaş ve Tan 2007, Çelik vd 2010). Sofralık ve şaraplık üzüm üretiminin yurt içi talebi ancak karşılıyor olması sebebiyle, üretimin büyük bölümü yurt içinde tüketilmekte, ancak küçük bir bölümü ihracata konu olmaktadır. Kuru üzümde ise tam tersine ağırlık ihracattadır (Anonim 2013). Türkiye'de 2005 yılında toplam ihracatta kuru üzümün payı %72, yaş üzümün payı ise %28'dir. Türkiye kuru üzüm üretiminde ve ihracatında Dünya'da ilk sırayı almaktadır. Fakat yaş üzüm ihracatında kuru üzüm kadar başarılı değildir (Aktaş ve Tan 2007). Ülkemiz, Dünya sofralık üzüm ihracatının %1,1'ini, kuru üzüm ihracatının %14,3'ünü, üzüm suyu ihracatının %0,07'si ve şarap ihracatının %0,03'ünü gerçekleştirmektedir (Anonim 2012-b). Türkiye üzüm üretiminde kendine yeterli, hatta kuru üzümde net ihraç ülkesi olduğundan yapılan ithalat çok az miktardadır (Anonim 2012-c).

Çizelge 1.1. Türkiye'de son yıllarda üzüm üretimine ayrılan alan, üzüm üretim miktarı ve üzüm üretiminin değerlendirilme şekillerine göre dağılımı (Anonim 2013)

Yıl	Üretim Alanı (Hektar)	Üretim Miktarı (Ton)	Sofralık (Ton)	Kurutmalık (Ton)	Şaraplık (Ton)
2004	5.200.000	3.500.000	1.900.000	1.230.000	370.000
2005	5.160.000	3.850.000	2.000.000	1.400.000	450.000
2006	5.138.351	4.000.063	2.060.167	1.495.697	444.199
2007	4.846.097	3.612.781	1.912.539	1.217.950	482.292
2008	4.827.887	3.918.442	1.970.686	1.477.471	470.285
2009	4.790.239	4.264.720	2.256.845	1.531.987	475.888
2010	4.777.856	4.255.000	2.249.530	1.543.962	461.508
2011	4.725.454	4.296.351	2.268.967	1.562.064	465.320
2012	4.622.959	4.234.305	2.219.813	1.613.833	400.659
2013	4.687.922	4.011.409	2.132.602	1.423.578	455.229

Ülkemizde, toplam tarım alanlarının %2,1'i bağlarla kaplıdır (Anonim 2013). Bahçe bitkileri tarımına ayrılan alanların %19,2'si, çok yıllık bahçe bitkilerine ayrılan alanların %27,5'i bağcılığa aittir (Sabır 2002, Anonim 2012-b). Türkiye'de Doğu Anadolu'nun yüksek kesimleri ile yıllık yağışın metrekareye 1.000 mm'nin üzerinde olduğu Doğu Karadeniz sahil şeridi dışında kalan tüm bölgelerinde bağcılık yapılabilmektedir (Çelik vd 1998). Ülkemizde yer alan dokuz tarım bölgesi içinde, hem alan, hem de üretim yönünden Ege Bölgesi birinci sırada gelmektedir. Sadece bu bölgemiz tek başına bağ alanlarının %28,5'ine, üzüm üretiminin %45,6'sına sahiptir (Anonim 2013). Modern bağcılık tekniği sayesinde dekara ortalama verim 1.000 kg'ın üzerine çıkmıştır. Bölgede kurutmalık üzüm yetiştiriciliği yapılmakta olup, %90 oranında yuvarlak çekirdeksiz üzüm çeşidi üretilmektedir (Gider vd 2002). Bağ alanı ve üretim açısından ikinci sırada gelen Akdeniz Bölgesi'nin, sahil kuşağı erkenci, yayla kesimleri

ise orta ya da geç mevsimde olgunlaşan üzüm çeşitlerinin yetiştiriciliği için elverişli koşullara sahiptir. Bölgede örtüaltı bağ yetiştiriciliği son yıllarda artmıştır (Çelik vd 2010).

Çizelge 1.2. Türkiye'nin en büyük üzüm üreticisi on şehirde üretime ayrılan alan ve üretim miktarları (Anonim 2014-a)

Şehir	Üretim Miktarı (Ton)	Üretim Alanı (Dekar)
Manisa	1.163.899	754.009
Denizli	376.253	426.099
Mersin	263.226	223.870
Mardin	171.205	342.810
Gaziantep	127.268	164.851
Diyarbakır	123.213	195.901
İzmir	121.467	134.499
Nevşehir	117.671	181.941
Karaman	56.484	44.395
Uşak	38.330	46.540

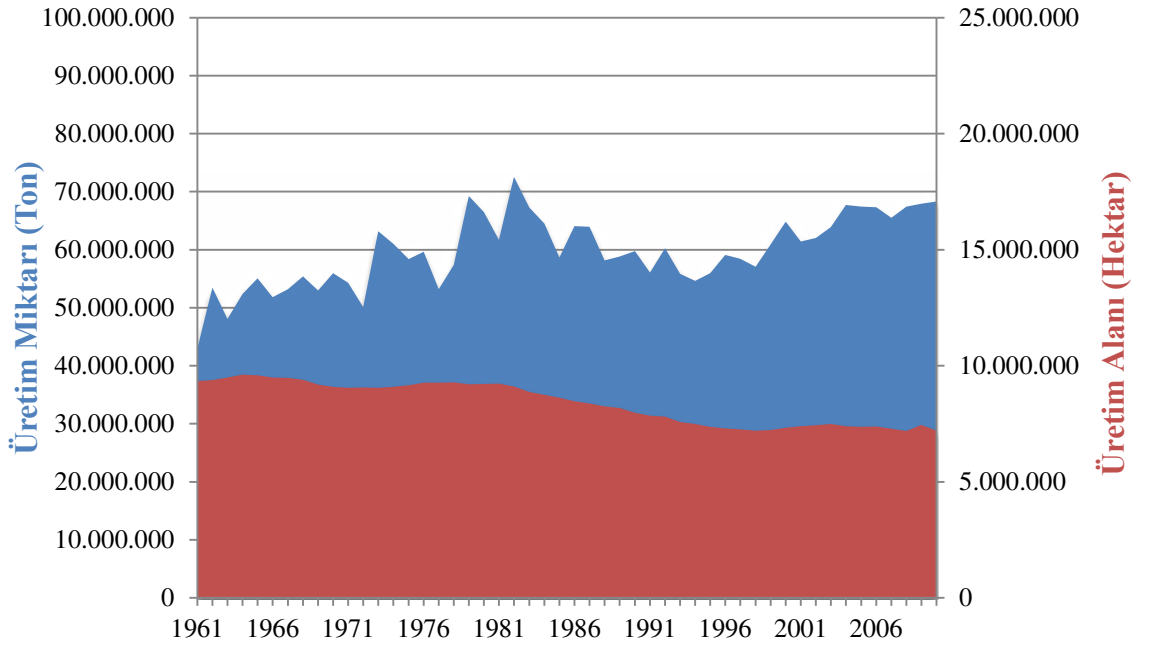
Bağcılık gelir açısından önemli tarım kollarından biridir. Tabii olarak bu sektörü üzüm üreten işletmeler oluşturmaktadır. Bu işletmelerden 2,5 milyon kişi gelir sağlamaktadır. Ülkemizde bağcılık genellikle küçük işletmelerde yapılmaktadır (Gider vd 2002). Asmanın yüksek adaptasyon yeteneğine sahip olması nedeniyle, özellikle diğer tarım ürünlerinin yetiştiriciliğine uygun olmayan iklim ve toprak koşullarına sahip alanların değerlendirilmesine de olanak vermesi, bağcılık faaliyetin önemini arttırmaktadır. Ayrıca yılın hemen hemen her ayında yoğun iş gücü gerektiren bir faaliyet dalı olması ve ülkemiz için önemli bir husus olan istihdama da bir ölçüde katkıda bulunması açısından da ayrı bir öneme sahiptir (Çelik vd 2000, Özdemir 2005). Marmara, Ege ve Akdeniz gibi kuru üzüm ve şarap işletmelerinin daha yoğun olduğu bölgelerde istihdamın diğer bölgelere göre, daha da yoğun olduğu görülmektedir (Çelik vd 2005). İşletmelerin genel yapısı değerlendirildiğinde, Ege, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde pazara yönelik faaliyetin esas olduğu, buna karşılık diğer bölgelerde küçük aile işletmelerinin ağırlıklı olarak bulunduğu görülmektedir (Çetin ve Tipi 1998). Çeşitli kaynaklarda ülkemizde tarım işletmelerinin %15'inin bağcılık alanında faaliyet gösterdiği kabul edilmekle birlikte, veriler çok kesin ve sağlıklı değildir (Çelik vd 2005). Ülkemiz bağlarının büyük bir çoğunluğu mekanizasyona elverişli olmayan, yoğun iş gücünü gerektiren Goble terbiye şekli ile tesis edilmiştir (Anonim 2012-c). Son yıllarda bağ tarımında kol gücüne dayalı üretimden, makineli tarıma dönüşüm, yeni plantasyonların ticari büyüklüklerde kurulmasını özendirmiştir (Gençtan vd 2005).

FAO'nun 2012 yılı verilerine göre Türkiye, 462.269 hektar bağ alanı ile İspanya, Fransa, İtalya ve Çin'in ardından beşinci, 4.275.659 ton üzüm üretimi ile de Çin, Amerika Birleşik Devletleri, İtalya, Fransa ve İspanya'nın ardından altıncı sırayı almaktadır (Anonim 2012-b).

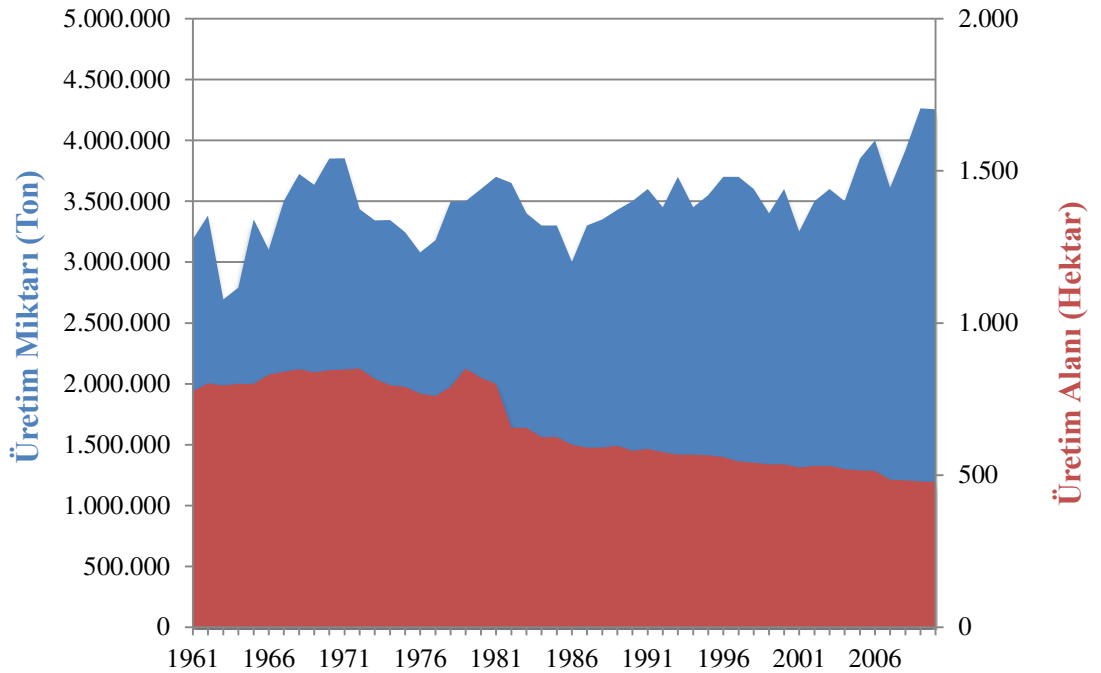
Çizelge 1.3. Dünya'nın en büyük üzüm üreticisi on ülkesinin üretim miktarları, Dünya üretimindeki payları ve üretim alanları (Anonim 2012-b)

Ülke	Üretim Miktarı (Ton)	Dünya Üretimindeki Pay (%)	Üretim Alanı (Hektar)
Çin	9.699.267	14,46	602.800
ABD	6.661.820	9,93	389.349
İtalya	5.819.010	8,67	696.756
Fransa	5.338.512	7,95	760.805
İspanya	5.238.300	7,81	943.000
Türkiye	4.275.659	6,37	462.269
Şili	3.200.000	4,77	204.000
Arjantin	2.800.000	4,17	220.000
İran	2.150.000	3,20	215.000
Hindistan	1.240.000	1,84	112.000
Dünya	67.067.129	100	6.969.373

Türkiye’de bağ alanlarındaki değişim incelendiğinde Dünya’da olduğu gibi bağ alanlarında önemli bir azalış olduğu görülmektedir. Dünya’da 1961-2010 yılları arası bağ alanlarında %33 azalışa karşılık Türkiye’deki azalış %49 oranında olmuştur (Anonim 2012-b). Dünya’da bağ alanları azalmasına rağmen üzüm üretiminde artış devam etmiştir. Dünya’da üzüm üretimi 1961 yılından 2010 yılına %98 artarak, 34,5 milyon tondan 68,3 milyon tona yükselmiştir. Dünya bağ alanlarındaki azalışa rağmen üretimdeki artışı, yeni bağcılık sistemine, biyoteknolojiye ve verimdeki artışa bağlayabiliriz. 1961-2010 döneminde Türkiye’de üzüm üretim artışı yalnızca %33 olarak gerçekleşmiştir. Bu durumun en önemli sebepleri Türkiye’deki verim artışının Dünya’daki verim artış ortalamasının altında olması, zeytinciliğin giderek ön plana çıkması ile hastalık ve zararlıların Türkiye’deki bağ alanlarına verdiği zararlar olarak sıralanabilir (Aktaş ve Tan 2007, Anonim 2012-b).



Şekil 1.2. Dünya’da 1961-2010 yılları arasında bağ alanlarının ve üzüm üretim miktarlarının değişimi (Anonim 2012-b)



Şekil 1.3. Türkiye’de 1961-2010 yılları arasında bağ alanlarının ve üzüm üretim miktarlarının değişimi (Anonim 2012-b)

21. yüzyıla geldiğimiz bu dönemde günümüz bağcılığını tehdit eden pek çok unsur bulunmaktadır. Bu unsurlar, üretici hatalarından, hastalıklara kadar çok çeşitlilik göstermektedir. Dünya’da oldukça geniş bir alanda kültürü yapılan asma, başta virüsler

olmak üzere pek çok patojene karşı hassastır (Alleweldt ve Possingham 1988). Asmada Kısa Boğum, Yaprak Kıvrıkcılığı, Mildiyö, Külleme ve Taç Gali tüm Dünya’da ve ülkemizde bağcılığı tehdit etmektedir. Adı geçen hastalıkların savaşımında erken uyarı, entegre ve biyolojik mücadele sistemleri yaygın ve etkin hale getirilemediği için veya yetersiz mücadeleden dolayı, özellikle iklim koşullarının hastalık gelişmesi için uygun, ancak kontrolü için elverişsiz olduğu yıl ve yörelerde önemli ürün ve gelişme kayıpları meydana gelmektedir (Burr vd 1998, Creasap ve Burr 2006).

Bağlarda meydana gelen hastalıklardan en önemlilerinden biri Taç Gali hastalığıdır (Sawada vd 1990, Burr vd 1998). Taç Gali hastalığı, Dünya çapında üzüm yetiştiriciliği yapılan bölgelerin hemen hemen tamamında karşılaşılan, ekonomik açıdan en yıkıcı hastalıklardan biridir (Panagopoulos ve Psallidas 1973, Loubser 1978, Süle 1978, Dhanvantari 1983, Tarbah ve Goodman 1986, Burr vd 1987-b, Haas vd 1991, Filo vd 2013, Johnson vd 2013). Köppen-Geiger’in iklim sınıflandırmasına göre Taç Gali hastalığının özellikle Dfb kodu ile gösterilen nemli karasal iklim kuşağında yaygın olduğu görülmektedir (Kottek vd 2006, Filo vd 2013). Dfb iklim kuşağı, kışı şiddetli yazı kısa ve sıcak, her mevsimi yağışlı iklim olarak tanımlanabilir. Aylık ortalama sıcaklık 18-22,9°C arasında değişir. En sıcak ayın ortalama sıcaklığı ise 10°C’den fazladır. Yılın en az dört ayı 10°C’nin üzerindedir (Anonim 2014-a).

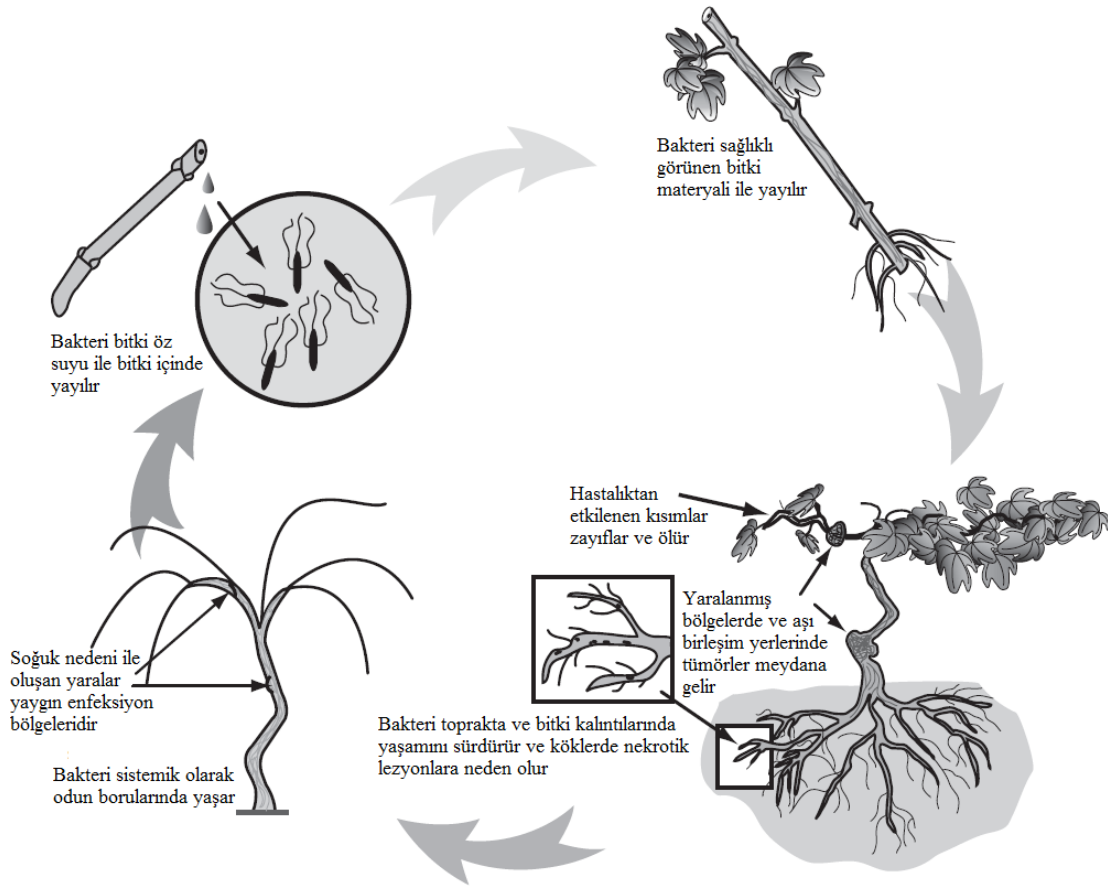
Uygun iklim şartlarında Taç Gali hastalığı asmalarda önemli verim kayıplarına neden olur (Ophel ve Kerr 1990, Rouhrazi ve Rahimian 2012). Hastalık ilerleyen aşamalarda asmanın ölümüne neden olabilir (Süle ve Burr 1998, Odile vd 2006). Bağlarda yaygın olarak ur oluşumuna neden olan Taç Gali hastalığının bakteriyel hastalık etmeni *Rhizobium vitis*’tir (Panagopoulos ve Psallidas 1973, Kerr ve Panagopoulos 1977, Süle 1978, Burr ve Katz 1983, Burr ve Katz 1984, Tarbah ve Goodman 1986, Burr vd 1987-b, Bishop vd 1989, Bien vd 1990, Sawada vd 1990, Haas vd 1991). Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis*’e karşı etkili bir mücadele yöntemi olmamasından dolayı, iklim koşullarının hastalık gelişimi için uygun olduğu bölgelerde, etmen önemli verim ve gelişme kayıplarına neden olmaktadır (Creasap ve Burr 2006, Filo vd 2013). Taç Gali hastalığı halen yürürlükte olan, İç Karantinaya Tabi Bitki Hastalık ve Zararlıları Hakkında Tebliğine göre ülkemizde iç karantinaya tabi hastalıklardan biridir (Anonim 2014-h).

Türkiye bağlarında, *Rhizobium vitis* strainlerinin varlığı, yayılışı ve diğer karakteristikleri üzerine ayrıntılı bir bilgiye sahip olunmadığından, hastalığa karşı etkin bir mücadele yöntemi geliştirilememiş ve dolayısıyla bakterinin bağcılığımıza daha fazla zarar vermesinin önüne geçilememiştir (Argun 2001). Türkiye’de Taç Gali hastalığının ilk kez Ege Bölgesi’nde 1931 yılında görüldüğüne ilişkin kayıtlar bulunmaktadır (Türkmenoğlu vd 1974, Argun 2001). Türkiye’de, özellikle bağcılığın yaygın şekilde icra edildiği İç Anadolu Bölgesi’nde asma hastalıklarını belirlemek için çeşitli çalışmalar yürütülmüş *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin asmada yaygın tümörjenik patojenler oldukları saptanmıştır (İyriboz 1938, Kuntay 1942, Göksel 1953, Karaca 1956, Öktem 1978, Benlioğlu ve Özakman 1998, Argun, 2001).

Rhizobium türleri, bakteriler alemi içinde, Alphaproteobacteria sınıfının baklagillerde simbiyotik olarak azot fikse eden bakterileri de barındıran, Rhizobiaceae familyası içinde yer almaktadır. Patojenik *Rhizobium* türleri, aralarında asma, taş

çekirdekli, ayçiçeği, gül, krizantem, ceviz, fındık, şeker pancarı, ravent, turp, böğürtlen gibi ekonomik önemi olan bitkilerin de bulunduğu 140'tan fazla otsu ve odunsu bitki türünde tümör oluşumuna neden olan toprak kökenli bakterilerdir (Anonim 2012). Bazı onkojenik olmayan *Rhizobium* strainlerinin klinik insan örneklerinden dahi izole edilebildiği bildirilmiştir (Young vd 2005, Kuykendall vd 2005). *Rhizobium* cinsinin *Brucella* cinsi ile yakın akraba olduğu bilinmektedir (Matthysse 2005).

Virulent *Rhizobium* türlerinin bitkilerde neden olduğu tümör veya aşırı saçak kök oluşumu bu türlerin sahip olduğu Ti (Tumour Inducing) ve Ri (Root Inducing) plazmitleri ile ilgilidir (Kerr vd 1977, Ream 1989, De la Riva vd 1998, Oger vd 1998, Young vd 2005, Pulawska 2010). Bu plazmitler hastalık oluşumuna neden olan mekanizmaları kodlamaktadırlar. Söz konusu onkojenik ve rizojenik plazmitlerden yoksun strainler hastalık yapma kabiliyetine sahip değildir (Young vd 2005). Taç Gali hastalık etmeni patojenik *Rhizobium vitis* strainleri de tümör oluşumuna neden olan bir Ti plazmit içermektedirler (Kaufmann vd 1996). Belirtiler bitkinin enfeksiyonu esnasında bu plazmit üzerinde yer alan T-DNA (Transfer DNA) olarak bilinen küçük bir DNA parçasının bitki hücresinin çekirdeğinde yer alan bitki genomuyla rastlantısal olarak birleşmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Transfer edilen DNA parçası, bitkide hücre çoğalmasından sorumlu oksin ve sitokinin hormonlarını ve sadece bu bakteri türlerinin katabolize edebildiği opin türevlerini kodlayan gen bölgelerini içermektedir. Bakteriden bitkiye transfer edilen oksin ve sitokinin genleri, bitkide aşırı ve kontrolsüz hücre bölünmesini teşvik ederek hastalığın tipik belirtisi olan tümörlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Lim vd 2009, Anonim 2012, Campillo vd 2012). *Rhizobium* enfeksiyon prosesi dahilinde gerçekleşen bakteriden bitkiye DNA transferi, doğada alemler arası DNA transferinin gerçekleştiği tek olaydır (Burr 2004).



Şekil 1.4. *Rhizobium vitis*'in hayat döngüsü (Burr vd 1998, Creasap ve Burr 2006)

Rhizobium cinsi bakteriler toprak mikroflorasının ayrılmaz bir parçasıdır (Escobar ve Dendekar 2003). *Rhizobium* türlerinin topraktaki popülasyonunun bahar ve yaz aylarında arttığı, sonbahar ve kış aylarında azaldığı bilinmektedir (Krimi vd 2002). Bir gram toprakta ortalama 10^6 - 10^7 cfu simbiyotik *Rhizobium* straini (Kuykendall vd 2005), 10^3 - 10^7 cfu patojenik *Rhizobium* straini bulunabileceği rapor edilmiştir (Schroth vd 1971, Bouzar ve Moore 1987-a, Bouzar vd 1993-b, Burr vd 1987-b). Her ne kadar *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium larrymoorei*, *Rhizobium skierniewicense*, *Rhizobium nepotum* gibi birçok *Rhizobium* türü bitkilerde ur veya saçak kök oluşumuna neden olsa da topraktan izole edilen *Rhizobium* strainlerinin büyük çoğunluğu bitkilerde ur oluşturma kabiliyetine sahip değildir (Bouzar ve Moore 1987-a, Burr vd 1998, Burr vd 1999, Bouzar ve Jones 2001, Escobar ve Dendekar 2003, Pulawska vd 2012-a, Pulawska vd 2012-b). Bununla beraber *Rhizobium* cinsi bakterilerin topraktaki dağılımı da homojen değildir. Asmada patojenik *Rhizobium* türleri, asma rizosferinde daha yoğun bir şekilde kolonize olmaktadır (Burr vd 1999). Agrosin sentezleyebilen *Rhizobium* strainlerinin topraktaki dağılımı bu toksinden etkilenen patojenik strainlerin topraktaki dağılımı üzerindeki etkilidir. Rekabete dayalı benzer süreçler diğer toprak kökenli bakterilerle de meydana gelmekte, bunlar da patojenin toprakta dağılımını etkilemektedir (Kuykendall vd 2005). Patojenik strainler, toprakta ve bitki artıklarında uzun süre yaşayabilmekte ve işlenen toprakta da virülensliklerini koruyabilmektedirler (Anonim 2008, Bini vd 2008-a). Yapılan

çalışmalar *Rhizobium vitis* strainlerinin topraktaki asma kalıntılarında hasta bitkinin sökülmesinden sonra beş yıla kadar hayatta kalabildiğini, göstermiştir (Burr vd 1998, Vizitiu ve Dejeu 2011). Etmenin, alkali topraklarda, hafif asit karakterde olan topraklara oranla daha iyi kolonize olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalar, asma dikili toprakların *Rhizobium vitis* strainlerinin gelişimini indüklediğini, nadasa bırakılmış veya patojenin konukçu aralığında olmayan bitkilerin yetiştirildiği topraklarda patojenin popülasyonunun azaldığını göstermiştir (Burr vd 1987-a). Bugüne kadar özellikle asma artığı olmayan topraktan bakteriyi izole etmek mümkün olmamıştır (Burr ve Katz 1984, Ferreira ve Van Zyl 1986, Burr vd 1987-b, Burr vd 1995, Stewart vd 2005, Mahmoodzadeh ve Doulati Baneh 2008). Bu durum, temiz çoğaltma materyali kullanılarak daha önceden bağ tesis edilmemiş bir alana yeni bağ tesisinde en azından korunma tedbiri sağlaması bakımından sevindirici bir durumdur (Burr vd 1998, Creasap ve Burr 2006, Vizitiu ve Dejeu 2011). *Rhizobium vitis* strainleri kültürü yapılan asma çeşitlerinin yanı sıra yabancı asma çeşitlerinden de izole edilebilmektedir. Ancak bu strainlerin genellikle patojenik olmayan *Rhizobium vitis* strainleri olduğu saptanmıştır (Burr ve Reid 1994, Burr vd 1999).

Rhizobium vitis, asmalarda tümör oluşturan kök kanseri hastalığı etmeni *Rhizobium tumefaciens*'ten farklı olarak asmada sistemik olarak yayılmaktadır (Lehoczky 1968, Süle 1978, Burr ve Katz 1984, McGuire vd 1991, Burr vd 1999 Stewart vd 2005, Genov vd 2006). Asma köklerinde nekrozlar ve asmanın üst aksamında galler meydana getiren toprak kaynaklı patojenin, asmada odun boruları ile üst aksamlara taşındığı ayrıca hastalık belirtisi göstermeyen omcalardan alınan sürgünlerin iletim demetlerinde de etmenin bulunabildiği kesin olarak ortaya konmuştur (Lehoczky 1968, Lehoczky 1971, Moore vd 1980, Burr ve Katz 1984, Bishop vd 1989, Burr vd 1988, Benlioğlu ve Özakman 1998). Taç Gali hastalık etmeni ile enfekteli bitkiler herhangi fiziksel bir zararlanma veya don zararı görmedikçe belirti vermeyebilirler (Burr ve Katz 1983, Burr ve Katz 1984, Eastwell vd 1995, Kawaguchi vd 2008-b). Bakterinin, bitki özsuyunda bulunması ve özsu vasıtasıyla taşınabilmesi, budama ya da diğer kültürel işlemler sırasında bulaşmaların meydana gelmesine neden olabilmektedir. Bu durum, bağcılığın önemli bir kolu olan fidancılık için büyük bir tehlike arz etmektedir. Çünkü hastalık dolayısıyla erken dönemde fidanlıklarda oluşabilecek urlar fidan ölümüne dahi sebep olabilmektedir (Burr vd 1998, Campillo vd 2012 Burr 2004, Creasap ve Burr 2006). Hastalıktan arı asmalar, daha önce *Rhizobium vitis* ile bulaşık bitki kalıntıları barındıran topraklara dikildiğinde hastalığın bu asmalara da bulaşabildiği rapor edilmiştir (Burr vd 1995, Stewart vd 2005). Hastalıktan zarar görüp ölen bitkilerin sökülmesi ve gerekirse yeniden dikilmesi gerektiğinden hastalığın yol açtığı zarar üreticiler için önemli bir maliyet unsurudur (Creasap ve Burr 2006). Ayrıca hastalık etmeni, bitki materyalinde simptom oluşturmada yıllarca canlı kalabildiğinden, kolaylıkla vejetatif üretim materyali ile yayılmakta, hastalık etmeninin varlığı ancak ur oluşumu gözlenince fark edilebilmektedir (Süle 1978, Burr ve Katz 1983, Burr ve Katz 1984, McGuire vd 1991, Stewart vd 2005, Johnson vd 2013). *Rhizobium vitis* ile enfekteli bir asmada dondan, budamadan, aşı işleminden veya başka bir nedenden dolayı meydana gelen yaralanmadan sonra bitkide ur oluşturabilmektedir (Lehoczky 1968, Lehoczky 1978, Dhanvantari 1983, Bishop vd 1989, Burr 2004, Stewart vd 2005, Creasap ve Burr 2006, Vizitiu ve Dejeu 2011, Tolba ve Zaki 2011, Johnson vd 2013). Aşı işlemlerinden sonra meydana gelen enfeksiyonlardan ötürü aşı kalemi ölebilmektedir. Hastalık, özellikle soğuk iklimli

bölgelerde büyük zararlanmalara yol açmaktadır (Creasap vd 2005, Stewart vd 2005, Creasap ve Burr 2006 Vizitiu ve Dejeu 2011).

Bakteriyel patojenlerin tanı ve tespitinde geçmişten günümüze kadar geliştirilen birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar, hastalıklı bitki materyallerinden besi ortamlarına izolasyon, fidelerde belirti izleme yöntemi, test bitkilerine inokülasyon yöntemi, bakteriyofaj yöntemi, serolojik yöntemler, biyokimyasal yöntemler, protein elektroforezi, mikroorganizmaların yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi, mikroskopi ve genetik farklılıkların esas alındığı modern biyoteknolojik yöntemlerinden olan nükleik asit hibridizasyonu, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), sekanslama, PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), klasik PCR (Polymerase Chain Reaction) ve Real-Time PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) gibi yöntemleridir (Temizkan vd 2008, Buckingham 2011).

Son yıllarda nükleik asit temelli yöntemler diğer yöntemlere nazaran oldukça hızlı ve güvenilir olmasından dolayı tercih edilmektedir. PCR, dizisi bilinen bir DNA dizisinin *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün çok sayıda kopyasını kısa zamanda oluşturmaya olanak sağlayan bir tekniktir (Saiki vd 1985). Bu teknoloji sayesinde patojenlerin tanı ve tespitinde bir devrim yaşanmış, hedef DNA parçasığını çoğaltarak bir patojenin varlığı veya yokluğu çok daha kısa sürelerde tespit edilebilir hale gelmiştir. Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-Time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-Time PCR’da oluşan ürünlerin analizi reaksiyon esnasında eş zamanlı olarak yapılmaktadır. Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek eş zamanlı olarak reaksiyonun gidişine müdahale edebilmek ve PCR döngülerinin sayısını değiştirebilmek mümkün olmuştur. Bu yeni sistemde, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-Time PCR yönteminin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi ve direkt bitki dokularından tespit yapılabilmesi bu yöntemin son yıllarda kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır.

Real-Time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Gelişen teknoloji ile beraber Real-Time PCR için farklı prob sistemleri de geliştirilmiştir. Günümüzde kullanılan en gelişmiş prob sistemlerinden biri LNA (Locked Nucleic Acid) adı verilen sistemdir. Bu sistemde, prob üzerinde yer alan DNA analogu ile monomerlerde bulunan şeker halkaları metilen bir köprü ile bağlanmıştır. Bu sayede monomerlerin her biri spesifik bağlanma için en uygun konformasyon olan N konformasyonunda sabit kalabilmektedirler. Bu durum spesifik olmayan bağlanmalara izin vermemekte, problemlerin spesifik bölgelere olan bağlanma afinitelerini arttırmakta ve gerçekleşen spesifik bağlanmaların daha stabil olmasını sağlamaktadır. Bu tip problemlere ait diziler, Real-Time PCR ile yapılan diğer çalışmalarda kullanılan problemlerin dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Böylece prob dizisinin kendi içinde bağlanması olasılığı ortadan kaldırılmakta ve aynı zamanda amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesi mümkün olmaktadır. LNA probun kimyasal yapısı daha spesifik olarak

çalışılmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını garanti etmektedir (Anonim 2014-b).

Bahçe bitkilerinin diğer kollarında olduğu gibi, bağcılıkta da iki tip çoğaltma yapmak mümkündür. Bunlar tohumlarla yapılan generatif çoğaltma ve bitkilerin dal, kök, gövde gibi organlarıyla yapılan vejetatif çoğaltmadır. Generatif çoğaltma, pratikte pek kullanılmayan bir yöntemdir. Ancak generatif çoğaltma yöntemi ıslah çalışmalarında elde edilen melezlerin çekirdekten üretiminde kullanılmaktadır. Vejetatif çoğaltma ise tamamen odunlaşmış tek yıllık dallar olan çubuklar ile yapılır. Yöntem, daldırma, çelik ve aşı olmak üzere başlıca üç şekilde uygulanır. Daldırma ile çoğaltma kültür çeşitlerinden fidan elde etmek amacıyla başvurulmuş, günümüzde kullanım önemini büyük ölçüde yitirmiş bir yöntemdir. Çelikle çoğaltma, çubukların köklendirilmesini esas alan bir çoğaltma yöntemidir. Çeliklerin hazırlanmasında genellikle 7-10 mm çapındaki farklı uzunluklardaki çubuklar kullanılmaktadır. Bu tip çelikler doğrudan köklendirmede kullanıldığı için dikim çeliği adını alır. Aşı ile çoğaltma, 1860'dan itibaren Avrupa'ya Amerika'dan filoksera denilen bir böceğin bulaşması sonucu bağların çoğunun yok olması sonucunda yaygınlaşmıştır. Filoksera asmanın köklerinde yaşamakta ve kökleri tahrip ederek asmayı kurutmaktadır. Böceğe karşı ekonomik bir kimyasal mücadele yöntemi bulunmadığından, filokseraya karşı dayanıklı asma anaçları kullanılmaya başlanmıştır. Artık günümüzde asmalar bu anaçlar üzerine aşılanarak bağ tesis edilmektedir. Bağcılıkta aşı, fidan üretimi, bağlarda anaçların aşılanması veya verimli bağlarda çeşit değiştirmek amacıyla yapılmaktadır (Jackson 2008, Creasy ve Creasy 2009).

Bağcılık konusunda gelişmiş olan ülkelerde, yeni bağların tesis edilmesi sırasında göz önünde bulundurulmuş en önemli faktör, ulusal ve uluslararası pazarda yıllar içinde oluşan pazar rekabeti sebebiyle kurulacak olan bağlardan uzun yıllar boyunca yeterli ve kaliteli ürün elde edilebilmesinin sağlanmasıdır. Bu amaçla, kurulacak olan bağların ekolojiye ve pazar isteklerine uygun çeşit, anaç ve yetiştirme tekniği seçimini kapsayacak bir şekilde planlanması kaçınılmazdır. Bu planlamanın temelini ise sertifikalı, sağlıklı ve standartlara uygun anaçlara dayalı fidanlarla bağların tesis edilmesi oluşturmaktadır (Karaca 2006). Dünya bağcılık endüstrisi, önemli ölçüde belirli çeşitlerin veya bu çeşitlerin seçilen klonlarının üretimine dayanmaktadır. Bu durum tamamen uzun yılların birikimi olan, tüketici ve endüstrinin tercihi sonucunda ortaya çıkmıştır. Sertifikasyonun gereği, asma ve meyve fidanlarının üretiminde ana damızlık parselleri olarak tanımlanan, hastalıklardan arı baz materyallerden çoğaltılarak tesis edilen, klon bazlı anaç ve kalem damızlıklarının kurulması ve fidan üretimine hizmet etmeleridir (Söylemezoğlu vd 2010). Ülkemizde sertifikalı fidan üretimi için uygulanması gereken hususlar, Resmi Gazete'de yayınlanan meyve ve asma çeşit/anaç damızlığı fidan üretim materyali ve fidanlarının sertifikasyonuna ait genel esaslar tebliği ile belirlenmiştir (Anonim 2014-h). Bu tebliğe göre, sertifikalı fidan üretim sistemi için klon seleksiyonundan elde edilen materyal tercih edilmelidir. Bağcılık konusundaki gelişmeler bakımından daha ileri durumda bulunan ülkelerdeki verim ve kalite artışının sağlanması amacıyla ülkemizde üzüm çeşitlerinin klonlarına ait sertifikalı çoğaltma materyallerinin üretimi sağlanmış ve 2006 yılında yayınlanan bağcılık yönetmeliği ile bağ alanlarında dikim ve çeşit değiştirme için kullanılacak asma çoğaltım materyallerinin sertifikalı olması zorunluluğu getirilmiştir (Karaca 2006, Anonim 2011). Ülkemiz bağcılığında standartlara uygun modern anlamda asma fidanı üretimine ilk olarak 1930'lu yıllarda kamu kuruluşlarında başlanmasına

rağmen asma baz materyaliyle anaç ve kalem damızlık parsellerinin kurulması ve ilişkilendirilmesi yönündeki altyapı ve üretim zinciri kurulamamıştır (Gençtan vd 2005, Söylemezoğlu vd 2010). Ülkemizde, asma fidanı üreten kuruluşların baz materyal kökenli anaç ve kalem damızlıklarına sahip olmadıkları ya da bu damızlıkların yeterli düzeyde olmadıkları bir gerçektir (Söylemezoğlu vd 2010). *Rhizobium vitis* strainlerinin asmalarda da sistemik olarak zarar yapması ve hastalıkla bulaşık vejetatif çoğaltma materyali kullanımı ile hızlı olarak yayılabilmesi, asma gibi ticari olarak tümüyle aşı yoluyla çoğalan bitkilerde bu patojenin yol açtığı verim ve kalite kayıplarının boyutunu aynı hızla artırmaktadır.

Taç Gali, asmalarda görülen en tehlikeli hastalıklardan biridir ve üretimi büyük ölçüde sınırlamaktadır. Bu çalışmada bakterinin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanısının gerçekleştirilmesi amacıyla primer ve prob geliştirilmesi ve Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis*'in farklı opin strainlerinin baz materyal olarak kullanılacak bitkisel materyallerden kesin ve güvenilir tespitinin sağlanması amaçlanmıştır. Taç Gali hastalığı ile bulaşık çoğaltma materyali ile tesis edilecek bir bağ ileri dönemlerde çoğunlukla yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır. Fidan ölümlerinden ya da tesis edilmiş bir bağın bu nedenle elden çıkmasından dolayı oluşacak kayıp düşünüldüğünde, temiz fidan kullanımının ne kadar büyük bir önem taşıdığı ortaya çıkmaktadır. Taç Gali hastalığından korunmada sadece temiz çelik ya da anaç kullanımının yeterli olmadığı da bir gerçektir. Çünkü hastalık etmeni, toprakta, hastalıklı asma artıklarında ve hatta diğer bitki artıklarında uzun yıllar canlılığını sürdürebilmektedir. Bu çalışmada *Rhizobium vitis*'in tanı ve teşhisi için geliştirilen primer setleri ve prob lar sayesinde Taç Gali hastalığının etkin şekilde tanısının gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Geliştirilen LNA prob bazlı Real-Time PCR yöntemi ile hastalık etmeni simptom göstermeyen üretim materyalinde hızlı ve kesin bir şekilde tespit edilebilir hale gelmiştir. Bu durum Taç Gali hastalığının oluşturacağı zararın en aza indirgenmesine katkı sağlanacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Vitis vinifera L. veya *Vitis vinifera* subsp. *vinifera* olarak da adlandırılan asma, Plantae aleminin Magnoliophyta bölümünün, Magnoliopsida sınıfındadır. Asma bu sınıf içinde Vitales takımının, Vitaceae familyası dahilindedir (Anonim 2014-c). *Vitaceae* familyasına ait bitkiler bilinen anlamda asmaları tanımlamaktadır. Bu familyanın 14 cinsi ve yaklaşık 950 türü bulunmaktadır. Kültür asmalarının tümü *Vitis* cinsine aittir *Vitis* genusu içinde yer alan kültür asması günümüzde taksonomik olarak *Vitis vinifera* olarak adlandırılmaktadır (Anonim 2014-d).

Yakın Doğu ve Avrupa’da doğal olarak yetişen asma türü Avrupa Üzümlü olarak da adlandırılan *Vitis vinifera*’dır. *Vitis vinifera*’nın iki yabani alt türe sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar, *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* ve *Vitis vinifera* subsp. *caucasica*’dır. *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*, Orta ve Güney Avrupa, Türkiye’nin batı yöreleri, Filistin ve Kuzeybatı Afrika’da, *Vitis vinifera* subsp. *caucasica* ise Güney Rusya, Kafkasya, Ermenistan, Anadolu ve İran’da yayılış göstermektedir. Bu türün kültür formu *Vitis vinifera* subsp. *sativa*’dır. *Vitis vinifera* türünde yaklaşık 6000 çeşidin olduğu, bunların da 400’den daha azının ticari öneme sahip olduğu ifade edilmektedir (Wagner 1976).

Vitis vinifera türünün ait olduğu *Vitaceae* familyasının genel özelliklerine bakıldığında, sülüklerle tırmanan odunlu parçalı veya bileşik, alması durumunda gövde yapısı, genellikle 3-5 dilimden meydana gelmiş asimetrik stipüllü yapraklar ve küçük, yeşil renkli salkım şeklinde çiçekler dikkat çeker. Asmanın, odunlaşmış sürgünlerine çubuk adı verilir. Gövde belirli bir yükseklikten sonra ana dallara ayrılır. Bunlara kol adı verilir ve çubuklar bu kollar üzerinde yer alır. *Vitis vinifera* yaban hayatında kışın yaprağını döken, çok yıllık tırmanıcı bir bitkidir. Esnek gövde ve dalları üzerinde yetiştiği ağaçlar tarafından desteklenir. Asmanın tırmanıcı özelliği basınca hassas sülüklerinin varlığıyla gerçekleşir (Keller 2010, Rees vd 2012). Yabani asmalar, orman ağaçları üzerinde 20-30 metre yüksekliğe kadar tırmanabilir. Asma gelişmesine devam ettikçe, gövde üzerindeki kabuk gittikçe, kalınlaşır ve zamanla şerit halinde soyulabilir (Creasy ve Creasy 2009).

Asmanın, yıl boyunca dinlenme ve aktif hayat olmak üzere iki ana hayatsal safhası vardır. Bağlarda uyku dönemi, sonbaharda yaprak dökümü ile başlayıp ilkbaharda asmaya su yürümesi ve gözlerin uyanmaya başlaması ile sona ermektedir. Aktif hayat dönemi ise gözlerin uyanmaya başlamasından yaprakların dökümüne kadar uzanan periyottur. Asmanın uyku döneminde genellikle beslenme ile ilgili gelişmeler yaşanmayıp bazı içsel değişimler söz konusu olmaktadır. Beslenme ile ilgili faaliyetler esasen aktif hayat döneminde cereyan etmektedir. İlkbaharda toprak sıcaklığı 10 °C’yi bulduğu andan itibaren gözler uyanmaya başlamakta ve bu tarihten itibaren sıcaklık yanında topraktaki rutubet ve besin maddesi içeriğine göre sürgünler hızlı bir şekilde büyümeye devam ederken çiçeklenme döneminde gelişme kısmen yavaşlamaktadır. Bu sürecin ardından çiçeklenme, çiçeklenme dönemindekinden daha az olmak üzere devam etmekte, ben düşme döneminde ise tekrar yavaşlayarak durmaktadır (Kerridge ve Antcliff 2000, Jackson 2008).

Asmada çiçek durumu bileşik salkım şeklindedir. Asma çiçeği, beş çanak yaprağın birleşmesinden oluşan kaliks, beş taç yaprağın birleşmesinden oluşan korolla, beş adet erkek organ, iki karpelli birleşmiş bir dişi organ ve nektar bezlerinden oluşmaktadır (Scoggan 1978). Erkek organlarda anterler, ikişer adet polen kesesi ve iki tekadan oluşur. Polen keselerinde erkek eşey hücrelerini oluşturacak olan polen ana hücreleri bulunmaktadır. Asmanın polenleri küçük, genellikle oval yapıda ve sarı renktedir. Bazı asma çiçekleri altı, bazıları nadir olarak dört veya yedi adet erkek organa sahiptir. *Vitis vinifera* türünde iki çiçek tipi bulunmaktadır. Bunlardan birisi hermafrodit diğeri ise fonksiyonel dişi çiçektir. Hermafrodit çiçeklerde erkek ve dişi organ aynı çiçekte bulunmaktadır. Fonksiyonel dişi çiçeklerde erkek organlar muhtelif derecelerde aşağı doğru kıvrık olup kısır. Fonksiyonel dişi çiçekli olarak tanımlanan çeşitlerde, mikrospor gelişimi hermafrodit olanlardan farklı bir gelişme gösterir. Bu çeşitler, sayıca daha küçük bir grubu oluşturur ve genel olarak kısır çiçek tozlarına sahip olarak nitelendirilirler (Keller 2010). Genel bir kural olarak meyve tutumu, hermafrodit çiçekli asmalarda kendine, fonksiyonel dişi çiçekli asmalarda ise yabancı tozlaşma ve döllenme şeklinde olmaktadır (Einset ve Pratt 1975). Asmalar, diğer çok yıllık bitkilere göre daha kısa gençlik kısırlığı dönemine sahip olmalarına rağmen, ürün alabilmek için 2-5 yıllık bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Asmanın ekonomik ömrü bakım şartlarına göre değişmekle birlikte 30-40 yıl civarındadır Fakat bundan çok daha yaşlı olduğu halde üzüm verebilen asmalar da mevcuttur (Powers 2002). Dikkatli yönetilen asma çok uzun süre verimli kalır, kesin olmamakla birlikte yaşayan en yaşlı asmanın 1769'da dikildiği düşünülmektedir (Anonim 2014-f).

Asmanın meyvesine üzüm adı verilir. Meyveler, salkım halinde bulunur ve her salkım üzüm çeşidine bağlı olarak değişik sayıda üzüm tanesi içerir. Salkım şekli, çeşitlere göre ve hatta aynı çeşit içerisinde bile değişiklik gösterebilir. Taneler, yuvarlak, oval gibi farklı şekillerde olabilirler. Tane rengi açısından siyah ve beyaz renkli üzümler diye iki ana gruptan bahsedilebilir. Siyah renkli üzümler, pembe veya kırmızı gibi daha alt gruplara ayrılabilir. Ayrıca beyaz diye tanımlanmasına rağmen bu gruptaki üzümlerin kabuk rengi sarı ila açık yeşil arasında değişir. Tanelerin üzeri çeşitlere göre farklı kalınlıkta olan mumsu bir tabaka ile kaplıdır (Rees vd 2012). Taneler çekirdek durumuna göre, çekirdekli ve çekirdeksiz şeklinde ikiye ayrılır. Çekirdeksiz çeşitler ise tamamen çekirdeksiz veya iz halinde çekirdek içeren çekirdeksiz çeşitler şeklinde ayrılır. Çekirdekli çeşitlerde meyve normalde dört çekirdek taşır. Fakat bu sayıdan daha az veya fazla çekirdeğe sahip çeşitler de mevcuttur (Jackson 2008). Çekirdek sayısı ile tane iriliği arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır (Keller 2010). Üzümlerin tam olarak olgunlaşabilmesi için yıllık belli bir sıcaklık toplamına erişilmesine ihtiyaç vardır. Erkenci çeşitlerde 1600-2000 °C geççi çeşitlerde ise 3000 °C veya daha fazla sıcaklık toplamı ve ortalama 1300 saatlik güneşlenme olgunlaşma için yeterlidir (Creasy ve Creasy 2009).

Üzümlerin bileşimindeki en önemli karbonhidratlar, glikoz ve fruktozdur. Bu iki karbonhidrat, sıradaki şekerlerin %99'unu, olgun tane ağırlığının ise %12-27'sini oluşturur. Bu şekerler yapraklarda çoğunlukla sakkaroz şeklinde sentezlenir. Daha sonra üzüm tanelerine taşınan sakkaroz invertaz enzimi yardımıyla kendisini oluşturan glikoz ve fruktoza ayrışır. Üzümlerdeki en önemli asitler, tartarik asit ve malik asittir. Bu asitler üzümün toplam asit içeriğinin %70-%90'ını oluşturur. Her iki asitte yapraklarda sentezlenip meyveye taşınır. Bu asitler haricinde, sitrik, süksinik, fumarik, formik, asetik,

glikolik, laktik, akonitik, kuinik, şikimik ve mandelik asitler üzüm içeriğinde yer alır (Ruffner 1982). Taneler olgunlaşmamış halde iken yeşil rengini klorofilden alırlar. Beyaz üzümlerin rengini flavon ve flavon grubu sarı renk maddeleri oluşturur. Kırmızı ve siyah renkli üzümlerin rengini ise antosiyanidin grubu renk maddeleri oluşturur. Tane eti genellikle beyazdır (Creasy ve Creasy 2009). Avrupa asması üzümünün kimyasal içeriği Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. 100 g Avrupa asması üzümünün kimyasal içeriği (Anonim 2014-f)

Genel Kompozisyonu		Mineral İçeriği		Vitamin İçeriği		Aminoasit İçeriği	
Su	80,54 g	Kalsiyum	10 mg	C vitamini	3,2 mg	Triptofan	0,011 g
Enerji	69 kcal	Demir	0,36 mg	Tiyamin	0,069 mg	Treonin	0,022 g
Protein	0,72 g	Magnezyum	7 mg	Riboflavin	0,070 mg	İzolösin	0,011 g
Toplam yağ	0,16 g	Fosfor	20 mg	Niyasin	0,188 mg	Lösin	0,022 g
Doymuş yağ	0,0054 g	Potasyum	191 mg	Pantotenik asit	0,50 mg	Lizin	0,027 g
Doymamış yağ	0,055 g	Sodyum	2 mg	B-6 vitamini	0,086 mg	Metiyonin	0,009 g
Fitosterol	4 mg	Çinko	0,07 mg	Folat	2 µg	Sistin	0,010 g
Kül	0,48 g	Bakır	0,127 mg	Kolin	5,6 mg	Fenilalanin	0,019 g
Karbonhidrat	18,10 g	Mangan	0,71mg	Betain	0,1 mg	Tirozin	0,010 g
Diyet lif	0,9 g	Selenyum	0,1 µg	β karoten	39 µg	Valin	0,022 g
Glikoz	7,20 g	Flor	7,8 µg	α karoten	1 µg	Arjinin	0,130 g
Fruktoz	8,13 g			A vitamini	66 IU	Histidin	0,022 g
				E vitamini	0,19 mg	Alanin	0,022 g
				K vitamini	14,6 µg	Aspartik asit	0,038 g
						Glutamik asit	0,081 g
						Glisin	0,016 g
						Prolin	0,080 g
						Serin	0,022 g

Asma, organik madde ve besin maddeleri açısından zengin, su tutma kapasitesi ve havalanması elverişli pH’sı 6-8 civarında olan topraklarda iyi gelişme göstermektedir (Creasy ve Creasy 2009). Asmalar, oldukça gelişmiş kök yapısına sahiptir. Asma köklerinin büyük çoğunluğu, toprağın ilk 20-60 santimetrelik katmanında bulunur. Kök gövdesinin alt kısmında bulunan ve toprağın derinliklerine doğru giden dip kökler ise toprak içinde 12 metre kadar derine inebilir. Fakat köklerin yarısı toprağın ilk 24-45 santimetrelik kısımda yer alır. Ortalama bir asmada on bine yakın kılcal kök bulunur (Jackson 2008). Gelişmiş kök yapısı sayesinde yağışı az olan bölgelerde ve tarla, meyve ve sebze tarımı yapılamayan sırtlarda da asma yetişebilmekte, erozyona uygun alanları erozyondan korumaktadır (Keller 2010).

Vitis vinifera’nın kökleri toprak içinde yaşayan filoksera (*Phylloxera vastatrix*) isimli bir böceğe karşı hassastır. Dolayısıyla asmanın toprak içinde kalan ve anaç adı verilen kısmı, bu böceğe dayanıklı başka asma türleriyle oluşturulur ve bunların üzerine ticari olarak yetiştirilecek *Vitis vinifera* türü kalemmler aşılanır (Winkler vd 1974). Avrupa ülkelerinde bağcılık 19. yüzyıl ortalarına kadar eski bağcılık diye tanımlanan ve kültür çeşitlerinin doğrudan köklendirilmesi ile elde edilen asmalarla yapılmaktaydı. Fakat 1861 yılında orijini Amerika olan ve filokseranın Avrupa’ya bulaşması ile bağların önemli bir bölümü zarar görerek kurumuştur. Filoksera, Avrupa bağlarında ilk olarak 1868 yılında rapor edilmiştir (Planchon 1868). Filokseranın, Avrupa’ya 1854-1860 yılları arasında Amerika’dan getirilen fidanlardan bulaştığı tahmin edilmektedir. Böceğe karşı alınan hiçbir önlem fayda sağlamamıştır. 1872 yılında *Vitis aestivalis* türü asmalara filoksera

tarafından zarar verilmediğini gözlemlenmiş ve bunun sonucunda *Vitis vinifera* türünün Kuzey Amerika orijinli *Vitis berlandieri*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* gibi *Vitis* türleri üzerine aşılmasını önermiştir (Laliman 1872, Shaffer vd 2004). Başlangıçta bu yabancı asmaların kendileri anaç olarak kullanılmış, bu anaçlar daha sonraki dönemlerde yerlerini birbirleriyle veya *Vitis vinifera* türü ile melezlenmesi sonucu oluşturulan melez Amerikan asma anaçlarına bırakmıştır. Günümüzde bile bağcılıkta filoksera zararına karşı anaç kullanımı dışında pratik çözüm bulunmamaktadır (Winkler vd 1974). Filokseraya karşı asma türlerinin dayanıklılık göstermesinin nedeni, böceğin asma kökünü emdiği kısımda, asmanın gösterdiği reaksiyon ile bir mantar tabakası meydana getirmesi ve bu tabakanın kökün iç kısımlarını çürümekten koruması esasına dayanır. Yerli asmalarda bu reaksiyon yavaş meydana gelmekte, mantar tabakası ya çok ince oluşmakta veya hiç oluşmamaktadır. Amerikan asmalarında bu tabaka hızlı oluşmakta ve kalın bir şekilde meydana gelmektedir (Anonim 2012-a). Aşısız asmaların toprakla olan adaptasyonları daha iyi olmasına karşın, filoksera ve nematodlar asmaların köklerinde büyük zararlar meydana getirmektedir. Bu nedenle maliyeti artırmasına rağmen, bu zararlılarla bulaşık ve riskli bölgelerde Amerikan asma anaçlarının kullanılması tavsiye edilmektedir (Powers 2002) Dünya bağcılığındaki bu değişim dikkate alınarak ülkemizde de Amerikan asma anacı kullanımına geçilmiştir. Filoksera zararının henüz etkili olarak ortaya çıkmadığı bazı bölgelerimizde hala kültür asmasının kendi kökleri üzerinde yetiştirildiği de görülmektedir. Ancak günümüzde ülkemiz topraklarının büyük bir kısmının filoksera zararlısı ile bulaşık olduğu dikkate alınarak yeni bağlar tesis edilirken mutlaka olumsuz iklim ve toprak özellikleri yanında filoksera hatta bazı yörelerimizde nematodlara dayanıklı anaçlar üzerine aşılı fidanların kullanılması gerekmektedir (Pearson ve Goheen 1988)

Ülkemizde ticari olarak yetiştirilen ve standart kabul edilebilecek niteliklere sahip üzüm çeşidi sayısı 70-80 dolayındadır (Çelik vd 2010). Bugüne kadar yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre, Türkiye bağlarında özellikleri belirlenmiş çok sayıda anaç da bulunmaktadır (Çelik vd 1998, Özdemir 2005). Ülkemizin değişik bölgelerinde yaygın olarak kullanılan asma anaçları, 41B, 5BB, 1103P, 99R, Rup. du Lot olarak sıralanabilir (Çelik vd 2010). Bağcılığın geliştiği ülkelerde anaçların sayıları sınırlandırılmıştır (Çelik 1998). Türkiye’de çeşit ve anaç standardizasyonu dinamik bir yapı göstermektedir (Çelik vd 2010).

Dünya üzerinde çok farklı iklim koşullarına adapte olabilmiş olan asmanın, yüksek oranda ve sürekli olarak yabancı döllenmesi sonucunda ortaya çıkan heterozigotik kalıtsal yapı, tohumdan elde edilen fertler arasında büyük genetik farklılık ortaya çıkmasına neden olmuştur (Alleweldt ve Possingham, 1988). Yüksek oranda heterozigotik kalıtsal yapıya sahip olan asma türlerin çoğaltılmasında genellikle vejetatif yöntemler kullanılmaktadır. Kökeni çok eski tarihlere dayanan çeşitlerin günümüze kadar korunmaları bu şekilde sağlanmıştır (Powers 2002). Türlerin çoğaltılmasında vejetatif yöntemlerin benimsenmesi ile kökeni çok eski tarihlere dayanan çeşitlerin günümüze kadar korunması bu şekilde sağlanmıştır. Dünya’da, 30.000 civarında isimlendirilmiş üzüm çeşidi bulunduğu bilinmektedir. Bunlardan 15.000’inin genotipik olarak farklı olabileceği düşünülmektedir (Alleweldt ve Possingham, 1988). Vejetatif çoğaltmanın kolaylığı, birçok üzüm çeşidinin Dünya’nın farklı bölgelerine yayılmasını sağlamıştır. Bunun sonucu olarak, bazı çeşitler günümüz itibarıyla yüzün üzerinde sinonim ve çok sayıda homonime sahiptir (Anonim 2014-i).

Çeşit standardizasyonun olmaması, ıslah edilmemiş mahalli çeşitlerin kullanılması, yanlış budama, yanlış gübreleme, aşırı veya yetersiz sulama gibi teknik ve kültürel uygulamaların uygun bir şekilde gerçekleştirilememesi yanında, filoksera, nematodlar, salkım güvesi, tripsler, bağ uyuzu, kırmızı örümcekler, bağ maymuncukları, haziran böcekleri, arılar, kuşlar gibi zararlılar, Külleme, Mildiyö, Ölü Kol, Antraknoz, Kurşuni Küf, Kav, Pas, Kök Çürüklüğü, Sap Çürüklüğü, Acı Çürüklük, Beyaz Çürüklük, Siyah Çürüklük, gibi fungal hastalıklar, Kısa Boğum, Arabis Mozaği, Sarı Mozaik, Sarı Benek, Damar Bantlaşması, Yaprak Kıvrıcıklığı, Gövde Çukurlaşması gibi virüs ve virüs benzeri etmenlerin oluşturduğu hastalıklar, Bağ Kanseri, Asmada Bakteriyel Yanıklık, Asma Vebası ve Taç Gali hastalığı bağlarda meydana gelen hastalıklar düşük verimliliğinin temel nedenleri arasında sayılabilir.

Asmada hastalığa neden olan bakteriyel hastalık etmenleri: *Rhizobium vitis*, *Rhizobium tumefaciens*, *Xylella fastidiosa* ve *Xylophilus ampelinus* birçok ülkede ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Loubser 1978, Anderson ve Moore 1979, Kennedy ve Alcorn 1980, Burr ve Katz 1984, Staphorst vd 1985, Ma vd 1987, Bishop vd 1988, Stefani ve Rudolph 1989, Brisset vd 1991, Canfield ve Moore 1991, Haas vd 1991, Sawada ve Ieki 1992-a, Eastwell vd 1995, Benlioğlu ve Özakman, 1998, Burr vd 1998, Bazzi vd 1999, Alexandrova vd 2000, Cubero ve Lopez 2001, Khlaif 2003, Kawaguchi vd 2005-a, Grall vd 2005, Lim vd 2009, Pulawska 2010, Tolba ve Zaki 2011, Vizitiu ve Dejeu 2011, Campillo vd 2012, Rouhrazi ve Rahimian 2012). Son yüz yıllık periyotta özellikle Avrupa'da bakteriyel hastalıkların üzüm üretimindeki düşüşlerde önemli role sahip olduğu rapor edilmektedir (Vizitiu ve Dejeu 2011). Dünya'da üzüm üretiminin %90'ı *Vitis vinifera* kültivarları ile gerçekleştirilmektedir. Ancak *Vitis vinifera* kültivarlarının %95'inin *Rhizobium vitis*'e karşı hassas olduğu rapor edilmektedir (Bishop vd 1989, Ophel ve Kerr 1990, Mahmoodzadeh ve Doulati Baneh 2008). Taç Gali hastalığı, özellikle Akdeniz'e kıyısı olan ılıman ülkelerde yaygındır (Rhouma vd 2006, Chebil vd 2013).

Rhizobium strainleri 0,5-1×1,2-3 µm ebatlarında çubuk şeklinde, 1-6 adet peritrik kamçı bulunduran, Gram-negatif, spor oluşturmayan, aerobik bakterilerdir (Kuykendall vd 2005, Vizitiu vd 2012). *Rhizobium* cinsi bakterilerin genom büyüklükleri 3-3,6×10⁹ baz çifti, DNA'sının %GC içeriği %57-66 arasında değişmektedir. Pek çok *Rhizobium* türü bitki dokuları arasında oldukça düşük oksijen konsantrasyonunda gelişebilmekte, hatta bazı *Rhizobium* strainlerinin nitrat varlığında anaerobik solunum yapabildiği de bilinmektedir (Kuykendall vd 2005, Young vd 2005). Bu cinsteki bakterilerin gelişebildikleri sıcaklıklar, bakterinin türüne hatta strainine göre büyük değişiklik göstermektedir. *Rhizobium* cinsi bakterilerin, 4-40 °C gibi mezofil bakterileri için uç sayılabilecek sıcaklıklarda gelişebilen strainleri vardır. Optimum gelişme pH'ları, 6-7 arasında değişmekle birlikte, 4-10 pH aralığında gelişebilmektedirler. Bu cinsteki bakterilerin jenerasyon süreleri 1,5-5 saat arasında değişmektedir (Kuykendall vd 2005). *Rhizobium* strainleri, daire şeklinde, düzgün kenarlı, konveks, herhangi spesifik bir renk pigmenti içermeyen koloniler meydana getirirler. Kolonilerin rengi genellikle açık bejdir (Young vd 2005). Farklı *Rhizobium* türlerinin 61 kadar karbonhidrat türünü oksidatif veya fermentatif glikoz mekanizmasında karbon kaynağı olarak kullanabildiği bilinmektedir (White 1972). Karbonhidrat içeren besi ortamlarında geliştirildiğinde asit reaksiyon verip ekstraselüler polisakkaritlerden oluşan kaygan bir yapı meydana getirmektedirler. Asit üretimi en fazla, L-arabinoz, sellobiyoz, D-fruktoz, D-glikoz, laktoz, maltoz, gibi

karbonhidratların varlığında ortaya çıkmaktadır. *Rhizobium* türleri genellikle, katalaz pozitif, oksidaz pozitif ve üreaz pozitifler. Pek çok farklı karbonhidrat, organik asit tuzları ve aminoasidi karbon kaynağı olarak kullanabilmelerine rağmen, selüloz, nişasta, agar ve kitini sindiremezler. Bazı *Rhizobium* strainleri için amonyum tuzları ve nitratlar azot kaynağı olarak yeterli iken, bazı strainler için bazı aminoasitler ve ek gelişme faktörleri elzem olabilmektedir (Young vd 2005). Pek çok *Rhizobium* straini, 3-ketoglikozitleri sentezleme kabiliyetindedir. Hücre duvarı yapıları diğer Gram-negatif bakterilere benzemekle birlikte peptidoglikan tabakasındaki lösin, fenilalanin, serin ve aspartik asit miktarı pek çok patojenik Gram-negatif bakteriye oranla fazladır (Kuykendall vd 2005). Lipopolisakkaritlerin hücre duvarlarındaki kompozisyonu, strainden straine değişmekle birlikte glikoz, mannoz, ramnoz, glikozamin, fukoz, galaktoz, 2-keto 3-deoksioktanoik asit ve üronik asit, oranı görece olarak sabittir (Carlson 1982). Elektron mikroskobu görüntüleri ve biyokimyasal analizler, patojenik *Rhizobium* strainlerinin hücre duvarlarında selüloz içeren fibrillerin bulunduğunu göstermektedir. Bu fibrillerin enfeksiyon esnasında bakterinin bitki hücresine tutunmasını sağladığı bilinmektedir (Matthysse vd 1981, Escobar ve Dendekar 2003). Dış membranda yer alan lipopolisakkaritlerin de bakterinin yaralanmış bitki hücresine bağlanmasında rol oynadığı belirlenmiştir (Whatley vd 1976, Matthysse vd 1978, Alexandrova vd 2000, De Castro vd 2008). *Rhizobium* türlerinin bitkiye tutunmasında bakteriye aracılık eden farklı bakteriyel adezinlerin olduğu da bilinmektedir (Smit vd 1989).

Rhizobium türlerinde bulunan plazmitlerin sayısı, büyüklükleri ve yapıları değişkenlik göstermektedir (White ve Nester 1980, Willmitzer vd 1983, Buchholz ve Thomashow 1984, Dong vd 1992, Sawada vd 1995, Pulawska 2010). *Rhizobium* türlerinin bitkilerde neden olduğu tümör veya aşırı saçak kök oluşumu patojenik *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium larrymoorei*, *Rhizobium skierniewicense*, *Rhizobium nepotum* strainlerinin sahip olduğu Ti ve *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin sahip olduğu Ri plazmitleri ile ilişkilidir (Ream 1989, De la Riva vd 1998, Oger vd 1998, Bouzar ve Jones 2001, Kuykendall vd 2005, Young vd 2005, Pulawska vd 2012-b). Bu plazmitler, strainler arasında transfer edilebilir niteliktedir (Van Larebeke vd 1975, Oger vd 1998). Her iki plazmit de hastalık oluşumuna neden olan benzer mekanizmalardan sorumludur. Ti ve Ri plazmitleri üzerinde yapılan sekans analizleri her iki plazmitin de farklı diziler içerdiğini göstermektedirler (White ve Nester 1980). Patojenik olmayan *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainlerinde Ti veya Ri plazmitleri gibi büyük ancak patojenisite ile ilgili olmayan plazmitlere de rastlanabilmektedir (Merlo ve Nester 1977, Sheikholeslam vd 1979). Benzer plazmitlere, patojenik *Rhizobium* türlerindeki Ti ve Ri plazmitlerinin yanında da rastlanabilmektedir. Patojenik *Rhizobium* türlerinde bulunan plazmitler, yapı ve sayı açısından büyük heterojenlik göstermektedir. Patojenik *Rhizobium* strainlerinde bulunan Ti ve Ri plazmitlerin büyüklüklerinin 200 ila 800 kb, arasında değiştiği rapor edilmiştir (De Vos vd 1981, Pomponi vd 1983, Hood vd 1984, Jouanin 1984, Knauf vd 1984, Unger vd 1985, Komari vd 1986, Paulus vd 1989, Paulus vd 1991, Gerard vd 1992, Fortin vd 1993, Vaudequin-Dransart vd 1995, Otten vd 1996, Suzuki vd 2000, Goodner vd 2001, Wood vd 2001, Gelvin 2003). Yapılan araştırmalar, patojenik *Rhizobium* strainlerinde plazmit sayısının 1 ila 5 arasında değiştiğini, büyüklüklerinin 5 ila 1000 MDa (~7,5-1500 kb) arasında değiştiğini göstermiştir (Albiach ve Lopez 1992, Pulawska 2010). Bazı *Rhizobium* strainlerinin, tüm bu genetik materyallere ek olarak yaklaşık $2,1 \times 10^6$ baz çifti

uzunluğunda lineer ikinci bir kromozoma sahip olduğu da bilinmektedir (Allardet-Servent vd 1993).

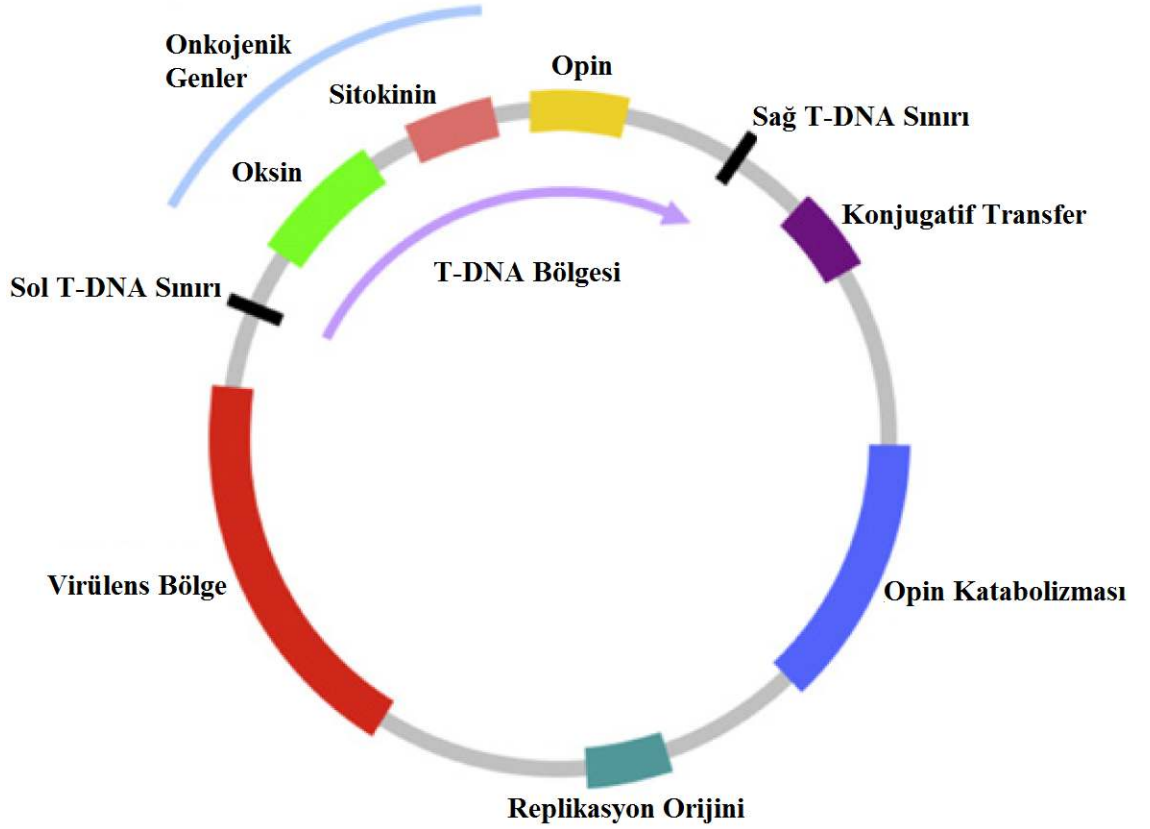
Opinler, patojenik *Rhizobium* türlerinin bitkinin metabolik aktivitelerini modifiye etmesi sonucunda oluşan aşırı saçak kök veya tümörlerde üretilen müstesna aminoasit ve iminoasit türevleridir (Burr ve Otten 1999, Kuykendall vd 2005). Bu bileşikler, aminoasit ve iminoasitlerin şekerler ile kondanase olması ile meydana gelen maddelerdir (De la Riva vd 1998). Opinler, ilk kez 1956'da Lioret tarafından tümör dokularından düşük moleküler ağırlıklı bileşenler olarak tanımlanmışlardır (Lioret 1956, Escobar ve Dendekar 2003). Bu bileşen bitkiler tarafından sentezlense de bitkiler ve birçok mikroorganizma tarafından metabolize edilemez (De la Riva vd 1998, Burr ve Otten 1999, Kuykendall vd 2005, Pulawska 2010). Opinler, sadece spesifik opin katabolizmasından sorumlu genleri taşıyan patojenik *Rhizobium* strainleri tarafından karbon ve azot kaynağı olarak kullanılabilirler (Guyon vd 1993, Kuykendall vd 2005, Vizitiu ve Dejeu 2011). Tümör oluşumuna neden olan *Rhizobium* straini, bitki içindeki gelişimi esnasında substrat olarak belirli bir opin tipini kullandığından, tümör oluşumuna neden olan *Rhizobium* straini ile tümörde saptanan opin fenotipi arasında yüksek bir korelasyon vardır (Dessaux vd 1998, Rouhrazı ve Rahimian 2012). Bitkiye aktarılan T-DNA üzerinde yer alan bazı spesifik genler, bitkinin sentezlediği fotosentetik ürünleri sadece patojenik *Rhizobium* türleri tarafından kullanılabilir forma sokan mekanizmaların oluşturulmasına rehberlik etmektedir (Kuykendall vd 2005). Opin katabolizma genleri, Ti veya Ri plazmit üzerinde fakat T-DNA dışında yer almaktadır (Bomhoff vd 1976, Montoya vd 1977, Pulawska 2010). Bu durum *Rhizobium* türlerine, diğer bakteri türlerine karşı rekabet avantajı sağlamaktadır (Burr ve Otten 1999, Kuykendall vd 2005). Bir *Rhizobium* straininin bitkiye sentezlettiği opin tipinin, başka bir *Rhizobium* straininin gelişimini inhibe edebildiği de saptanmıştır (Kim vd 2001, Pulawska 2010). Bazı patojenik *Rhizobium* strainlerinin, birden fazla opin tipini katabolize edebildiği de bilinmektedir (Moore vd 1997). Bazı *Pseudomonas* ve *Corynebacterium* türlerinin bazı opinleri metabolize edebildiği rapor edilmiştir (Beaulieu vd 1983, Tremblay vd 1987-a, Tremblay vd 1987-b, Moore vd 1997). Bugüne değin *Rhizobium* türlerinin oluşturduğu hiperplastik dokulardan, agrosinopin, agropin, agropinik asit, asparajinopin (süksinamopin), epilösinopin, glutaminopin, histopin, krizopin, kukumopin, lizopin, lösinopin, mannopin, mannopinik asit, metiopin, mikimopin, nopalin, nopalinik asit (ornalin), oktopin, oktopinik asit, rideopin, santopin, strombin, tauropin, valinopin, vitopin (heliopin), farklı canlılardan, asetopin, alanopin, izolösinopin, fenilalaninopin, insandan, sakkaropin gibi daha pek çok opin ve opin türevleri izole edilmiş, tanımlanmıştır (Petit vd 1983, Szegedi vd 1988, Chang vd 1989, Chilton vd 1995, Moore vd 1997, Dessaux vd 1998, Pionnat vd 1999, Moriguchi vd 2001, Filo vd 2013, Anonim 2014-a). Tümörjenik *Rhizobium* strainlerinin enfeksiyonlarında en fazla rastlanan opin türleri, nopalin, oktopin, agropin, asparajinopin ve krizopindir (Dessaux vd 1998). Asmalardan izole edilen tümörlerde en fazla rastlanan opin türevleri ise oktopin, nopalin ve vitopin olarak sıralanabilir (Szegedi vd 1988, Paulus vd 1989, Canaday vd 1992, Gerard vd 1992, Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999, Ride vd 2000, Szegedi 2003, Szegedi vd 2005, Genov vd 2006, Bini vd 2008-b, Palacio-Bielsa vd 2009). *Rhizobium vitis* strainlerinin katabolize edebildiği opin türlerinin en yaygını, %60-75 ile oktopindir. Oktopini, %20-30 ile nopalin, %5-10 ile vitopin takip etmektedir (Burr vd 1998, Ride vd 2000, Szegedi 2003). Oktopin, arjinin ve prüvatın bir araya gelmesiyle meydana gelen bir ürünken, nopalin, arjinin ve α -ketoglutaratın bir araya gelmesi ile meydana gelmektedir (Dessaux vd 1993). Vitopin ise prüvat ve glutaminin birleşmesi ile

oluşmaktadır (Chilton vd 2001, Szegedi 2003). Bazı opinlerin, patojenik olmayan strainlere Ti plazmitin konjugal transferini indüklediği ve enfeksiyondan sorumlu plazmitin yayılmasına katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Gelvin 1992, Guyon vd 1993). Plazmitlerin dağılışına dair yapılan analizler, *Rhizobium* cinsi bakterilerin ekolojilerinin çok kompleks olduğunu göstermiştir (Moore vd 1997). Bir tümörde bulunan opinlerin kuru ağırlığının, toplam tümör kuru ağırlığının %7'sine kadar çıkabildiği belirlenmiştir (Dessaux vd 1993, Escobar ve Dendekar 2003).

Tümörijenik *Rhizobium* strainlerinin konukçu aralığının çok geniş olduğu bilinmektedir (Kuykendall vd 2005). Bitkiler aleminde 93 familyada yer alan, 331 cins dahilindeki 640'tan fazla dikotiledon bitki türünün patojenik Ti plazmitine sahip *Rhizobium* strainleri (De Cleene ve De Ley 1976, Vizitiu ve Dejeu 2011), 15 familyada yer alan, 30 cins dahilindeki 37 dikotiledon bitki türünün de Ri plazmitine sahip *Rhizobium* strainleri tarafından transforme edilebildiği saptanmıştır (De Cleene ve De Ley 1981, Vizitiu ve Dejeu 2011). Patojenik *Rhizobium* türlerinin, bazı maya (Bundock vd 1995, Bundock ve Hooykaas 1996, Piers vd 1996) ve fungus (De Groot vd 1998, Abuodeh vd 2000, Michielse vd 2005) türlerini hatta laboratuvar şartlarında insan hücrelerini (Kunik vd 2001) transforme edebildiği de rapor edilmiştir. Patojenik *Rhizobium* cinsi bakteriler hastalık fenotipine bağlı olarak yedi farklı türe ayrılmaktadır. Bu türler: *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium larrymoorei*, *Rhizobium skierniewicense* ve *Rhizobium nepotum* türleri olarak sıralanabilir. Bu türler haricinde patojenik türler ile yakın akraba olmasına rağmen, patojenik olmayan ve bitkide nodül oluşturmeyen *Rhizobium radiobacter* türü de bulunmaktadır (Bouzar ve Jones 2001, Matthysse 2005, Lim vd 2009, Slater vd 2009, Vizitiu vd 2012, Pulawska vd 2012-b).

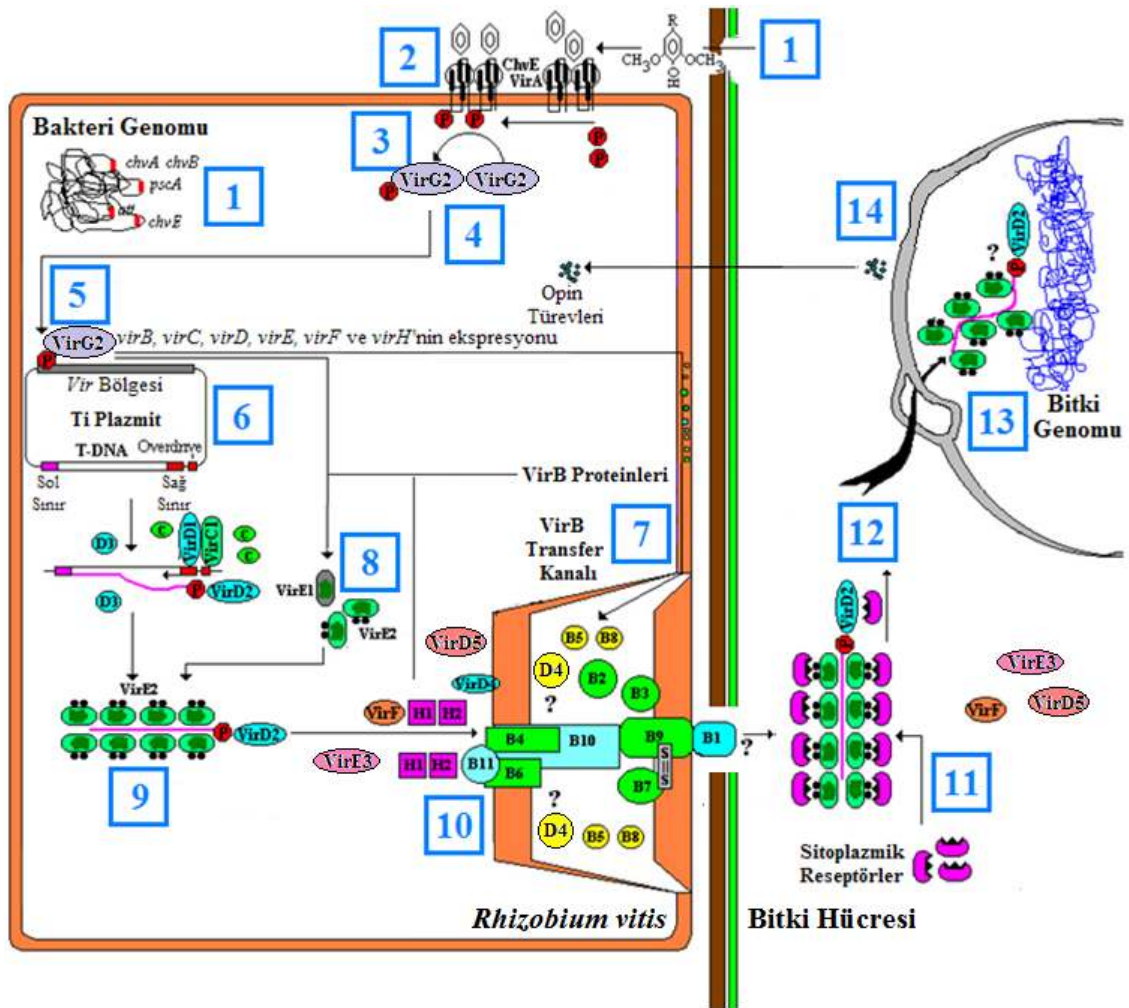
Rhizobium türlerinde *Pseudomonas* veya *Xanthomonas* cinsi bakterilerin patovarlarında olduğu gibi konukçu aralığı spesifikliği görülmez (Kuykendall vd 2005). *Rhizobium tumefaciens* pek çok dikotiledon bitkide ve bazı monokotiledon bitkilerde kök uru hastalığına, *Rhizobium rhizogenes* pek çok dikotiledon bitkide saçak köklülüğe neden olur (Slater vd 2009). *Rhizobium tumefaciens*, türü kendi içinde dokuz genomik varyete barındırmakta ve taksonomik açıdan diğer *Rhizobium* türlerinden daha heterojen bir yapı sergilemektedir (De Ley 1974, Portier vd 2006, Costechareyre vd 2010). Gerçekleştirilen taksonomik çalışmalar neticesinde, *Rhizobium tumefaciens* türünün genomik varyetelerinden olan *Rhizobium tumefaciens* genomovar G2 ve *Rhizobium tumefaciens* genomovar G8 varyetelerinin, *Rhizobium pusense* (Panday vd 2011) ve *Rhizobium fabrum* (Lassalle vd 2011) adında farklı bir *Rhizobium* türü olarak kabul edilmeleri önerilmiştir. *Rhizobium rubi* strainlerinin, özellikle *Rubus* cinsinde tümör oluşumuna neden olsa da aslında geniş bir konukçu aralığına sahip olduğu saptanmıştır (Sawada vd 1992-a). *Rhizobium rubi* strainlerinin konukçu aralığı *Rubus* türlerinin yanında, kiraz, şeftali, armut, krizantem, ayçiçeği gibi bitkileri de kapsamaktadır (Pulawska 2010). *Rhizobium skierniewicense* strainlerinin krizantem ve kiraz eriğinde (Pulawska vd 2012-b), *Rhizobium nepotum* strainlerinin ise kiraz eriği, kiraz, *Prunus avium*×*Prunus pseudocerasus* hibrit kiraz anacı, ahududu ve asmada (Pulawska vd 2012-a) hastalık yaptığı belirlenmiştir. Bir istisna olarak *Rhizobium larrymoorei* türü sadece ağlayan incirden izole edilmiştir (Bouzar vd 1995, Bouzar ve Jones 2001). *Rhizobium vitis*, *Vitis* cinsinde baskın tümörijenik bakteri türü olsa da (Thies vd 1991, Young vd 2005, Tanaka vd 2006) *Actinidia* türleri, krizantem, domates, kivi gibi başka konukçulardan da izole

edilebildiği bilinmektedir (Sawada ve Ieki 1992-a, Pulawska 2010). Özellikle *Rhizobium vitis* strainlerinin asma dokularında nekroz oluşturmalarını sağlayan poligalakturonaz aktivitesinin ve tartarat degradasyon yeteneğinin patojenin konukçu aralığını belirlemede önemli rol oynadığı saptanmıştır (Crouzet ve Otten 1995, Szegedi 1985, McGuire vd 1991, Rodriguez-Palenzuela vd 1991, Otten vd 1996). Poligalakturonaz sentezinden ve tartarat degradasyonundan sorumlu *tar* genlerinin mutasyona uğratılmasının patojenin konukçu aralığını daraltması da ve üzümdeki virülensliğini azalttığı da bilinmektedir (Burr vd 1998). Bunun yanında *Vitis* türlerinde kallus oluşturma yeteneği ile *Rhizobium vitis* strainlerinin oluşturduğu Taç Gali hastalığına karşı dayanıklılık arasında negatif bir korelasyon olduğu da rapor edilmiştir (Burr 2004).



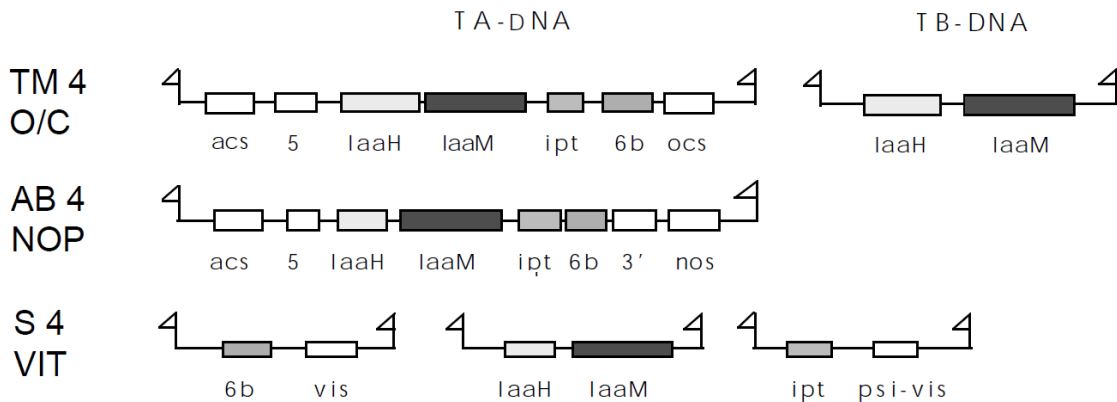
Şekil 2.1. Ti plazmitin şematik gösterimi (Pacurar vd 2011)

Barker vd 1983, Byrne vd 1983, De la Riva vd 1998, Suzuki vd 2000, Gelvin 2003, Kuykendall vd 2005). Enfeksiyon esnasında T-DNA fragmentinin bir veya birden fazla kopyası (Chilton vd 1980, Lemmers vd 1980, Willmitzer vd 1980, Zambryski vd 1980), bitki genomuna rastlantısal olarak entegre olur (Chilton vd 1977, Chyi vd 1986). T-DNA, bitkide ifade edilecek oksin ve sitokinin genleri yanında tümör oluşumu için tüm gerekli genleri taşır (Kuykendall vd 2005). Bitki hücresi, *Rhizobium* straini tarafından transforme edildikten sonra tümör gelişimi otonom olarak devam etmektedir. Bu aşamadan sonra *Rhizobium* straininin varlığı tümör gelişimi için elzem değildir (Campillo vd 2012). Patojenik *Rhizobium vitis* strainleri, 195 proteini kodlayan, 196 gen içeren, yaklaşık 200 kilobaz büyüklüğünde, tümör oluşumuna neden olan bir Ti plazmit içermektedirler. *Rhizobium vitis* strainlerinde bulunan oktopin, nopalin, vitopin tipi Ti plazmitler ile 16S-23S rRNA intergenik bölgesi üzerinde gerçekleştirilen karşılaştırmalı sekans analizleri iki yapı arasında bir korelasyona işaret etmektedir (Otten vd 1996).



Şekil 2.3. T-DNA transfer prosesi (De la Riva vd 1998, Pacurar vd 2011). Yaralanmış bitkiden bakteriyi uyarıcı sinyal moleküller salınır. Bakteri kemotaksik olarak bitkiye yönelir ve yaralanmış hücreye tutunur (1). Sinyal molekülleri, Ti plazmit tarafından kodlanan dimerik transmembran reseptörü VirA ve ChvE kompleksi tarafından algılanır (2). VirA proteini, otofosforilasyon ile aktive olur (3), Aktive olmuş VirA proteini, sitoplazmik VirG proteinini fosforile

eder (4). Aktive olmuş VirG2 proteinini, transkripsiyonel aktivatör olarak *vir* operonundaki regülatör bölgeye bağlanır ve *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virH* (*pinF*), genleri ifade edilir (5). VirD1 ve VirD2 proteinleri, T-DNA'nın sağ ve sol sınır bölgelerindeki 25 bp'lik bölgelere bağlanırken, VirC1 proteinini, sağ sınır bölgesinde VirD2 proteinini vasıtasıyla oluşturulan endonükleolitik açıklığa bağlanarak, T-DNA sentezini stimule eder. VirC1 proteinini, aynı zamanda DNA zincirinin etkin bir şekilde sentezlenmesini düzenlediği düşünülen overdrive bölgesine bağlanarak zincirin oluşumunu stimule eder (Toro vd 1989). VirD2 proteinini T-DNA kompleksinin 5' ucuna kovalent bağlar ile bağlanır ve T-DNA bitki genomuna entegre olana değin proses sırasında nükleik aside kılavuzluk eder (6) (De la Riva vd 1998, Valentine 2003, Pacurar vd 2011). 11 VirB proteinini ve VirD4 proteinini ile Tip IV sekresyon sistemi (T4SS) oluşturulur (Christie 2004, Fronzes vd 2009). Öncülü olan VirE1 proteininden VirE2 proteinleri sentezlenir (8). Tek DNA zincirine bağlanma kabiliyetine sahip VirE2 proteinleri, T-DNA zincirine bağlanır (9) (De la Riva vd 1998, Pacurar vd 2011). VirE2 proteinleri ile sarılmış T-DNA kompleksi, Tip IV sekresyon aparatı vasıtasıyla bitkinin hücre duvarı ve hücre zarını aşarak bitki hücresine geçer (10) (De la Riva vd 1998, Villemont vd 1997). VirE3, VirF, VirD5 gibi transformasyon prosesine eşlik ettiği düşünülen diğer bakteriyel virülens proteinler de Tip IV sekresyon aparatı vasıtasıyla bitki hücresine geçer (Lacroix vd 2006). Bitki hücresine geçen T-DNA kompleksi, bitki hücresindeki sitoplazmik reseptörler tarafından tanınır (11). VirD2 ve VirE2 proteinleri eşliğindeki T-DNA, bitki hücresinin çekirdeğine giriş yapar (12). T-DNA, bitki genomuna rastlantısal olarak entegre olur (13). Bitki genomuna entegre olan T-DNA, ifade edilerek bitki hücrelerinin kontrolsüz bölünmesine neden olan hormonların ve opin sentezinin bitki tarafından gerçekleştirilmesine neden olur (14) (De la Riva vd 1998, Burr vd 1998, Burr 2004, Pacurar vd 2011). Overdrive bölgesinin T-DNA zincirinin bitkiye etkin bir şekilde iletimini düzenlediği düşünülmekle beraber overdrive sisteminin moleküler mekanizması belirsizliğini korumaktadır



Şekil 2.4. *Rhizobium vitis* strainlerinde onkogenlerin sayısı ve dizilimine temel T-DNA yapıları. Oktopin ve kukumopin katabolize eden TM4 straini, nopalın katabolize eden AB4 straini ve vitopin katabolize eden S4 strainine ait T-DNA yapıları. Flama sembolleri sınır dizilerini sembolize etmektedir (Burr vd 1998)

Rhizobium vitis strainlerinde, onkogenlerin sayısı ve dizilimine bağlı üç temel T-DNA yapısı ile karşılaşmaktadır. Bu DNA yapılarının en yaygını, Ti plazmit üzerinde birbirinden bağımsız iki farklı T-DNA'nın (TA-DNA ve TB-DNA) bulunduğu yapıdır. Bu yapı *Rhizobium vitis* strainlerinin yaklaşık %60'ında bulunmaktadır. TA-DNA bölgesi oktopin ve kukumopin katabolize eden strainlerde, 5, TA-*iaaM*, TA-*iaaH*, *ipt*, *6b* onkogenleri ve opin genleri olan *acs* ve *ocs* genlerini barındırır. *acs* agrosinopin, *ocs* ise oktopin sentezinden sorumlu genlerdir (Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999). Kontrolsüz hücre bölünmesinden sorumlu onkolojik faktörler, *iaaM* (*tms1*) ve *iaaH* (*tms2*) genleri vasıtasıyla iki basamakta sentezlenen oksin ile *ipt* (izopentenil transferaz) (*tmr*) geni vasıtasıyla adenozin monofosfattan katalizlenen bir izopentenil adenozin türevi olan sitokinin ve diğer bazı gen ürünleridir (Akiyoshi vd 1984, Barry vd 1984, Haas vd 1995, Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999). *iaaM* geni, triptofandan indolasetamid (IAM) sentezini kodlarken, *iaaH* geni ise indolasetamitten indolasetik asidi (IAA) kodlamaktadır (Inze vd 1984, Schröder vd 1984, Otten vd 1993, Van Nuenen vd 1993, Fournier vd 1994). *iaaM*, *iaaH* ve *ipt* genleri, birincil dereceden tümör oluşumundan sorumlu genlerdir. Sekonder onkogenler olan *6b* ve 5 genlerinin ise fitohormonların aktivite düzeyleri üzerinde etkili oldukları düşünülmektedir. *6b* proteininin biyokimyasal ve fonksiyonel doğası tam olarak aydınlatılamamıştır. 5 proteininin ise bitkide sentezlenen indolasetik asit bağlanma proteinleri ile interaksyona giren, oksin benzeri bir protein olduğu düşünülmektedir (Escobar ve Dendekar 2003). Yapılan çalışmalar, TA-DNA taşıyan plâzmitlerin büyüklüğünün 248 ila 258 kb arasında değiştiğini göstermektedir (Otten vd 1993, Van Nuenen vd 1993, Fournier vd 1994).

TB-DNA bölgesi oktopin ve kukumopin katabolize eden strainlerde TB-*iaaM* ile TB-*iaaH* onkogenlerini taşımaktadır. Bazı strainlere ait TB-DNA bölgesinde kukumopin sentezinden sorumlu *acs* ve *cus* gibi genleri de bulunabilmektedir (Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999). Yapılan çalışmalar, TB-DNA taşıyan plâzmitlerin büyüklüğünün 224 ila 234 kb arasında değiştiğini göstermektedir (Van Nuenen vd 1993). *Rhizobium vitis* strainlerinde rastlanan TA/TB T-DNA yapısı, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinde bulunan T-DNA yapılarına oldukça benzerdir. Yapılan detaylı klonlama ve sekans çalışmaları, TA/TB T-DNA yapısının pek çok farklı varyantı olduğunu göstermiştir. Bu varyantlar, genellikle insersiyon dizisi (IS, Insertion Sequence) adı verilen, DNA dizileri arasına rastlantısal olarak girip mutasyonlara neden olabilen yapılar veya delesyonlar ile meydana gelmektedir. Bu mutasyonların, genellikle patojenin tümör oluşturma kabiliyetini etkilemediği görülmektedir. Çünkü patojen strainler, birden fazla onkogen barındırmaktadırlar. Bu onkogenlerden biri veya birkaçı mutasyona uğrasa dahi, diğer onkogenler tümör oluşumuna neden olmaya devam ederler. Doğal yollardan da oluşan bu varyantların, *Rhizobium vitis* strainlerine farklı evrimsel avantajlar sağladığı düşünülmektedir (Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999). *6b*, 5 ve 3' genlerinin tümör indüklenme yetenekleri ve konukçu aralığının belirlenmesindeki muhtemel rolleri henüz aydınlatılamamıştır (Burr ve Otten 1999).

Rhizobium vitis strainlerinde ikinci temel T-DNA yapısı nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinde bulunur. Bu tip T-DNA yapısına *Rhizobium vitis* strainlerinin yaklaşık %30'unda rastlanır. Söz konusu yapıda 5, *iaaM*, *iaaH*, *6b*, 3' onkogenlerini ve *acs* ve *nos* opin genlerini içeren tek parça halinde bulunan bir T-DNA zinciri vardır. Yapıdaki *nos* geni nopalin sentezinden sorumlu genidir. Bu grup bakterilerin T-DNA yapısında farklı varyantlara rastlanmamaktadır (Burr vd 1998).

Yapılan alışmalar nopalin tipi T-DNA büyüklüğünün yaklaşık 157 kb olduğunu göstermektedir (Ottten ve De Ruffray 1994).

Rhizobium vitis strainlerinde üçüncü temel T-DNA yapısı vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinde bulunur. Bu tip T-DNA yapısına *Rhizobium vitis* strainlerinin yaklaşık %10'unda rastlanır. Bu gruptaki strainlerde T-DNA  parça halinde bulunur. Bu üç parçanın biri olan T1, onkojenik *6b* geni ve *vis* opin genini barındır. Yapıdaki *vis* geni vitopin sentezinden sorumlu gendir. T2, onkojenik *iaaH* ve *iaaM* genlerini, T3 ise onkojenik *ipt* geni ve mutasyona uğramış inaktif *vis* geni kopyasını içermektedir (Burr vd 1998). Yapılan alışmalar vitopin tipi T-DNA taşıyan plāzmitlerin büyüklüğünün yaklaşık 262 kb olduğunu göstermektedir (Szegeci vd 1996).

Rhizobium vitis strainlerinin virülens sisteminden sorumlu olan genler, kromozom üzerinde ve Ti plazmit üzerinde 30 kb'lık bir alanda lokalize olmuş bir grup genden oluşmaktadır (Kado 1994, Sheng ve Citovsky 1996, De la Riva vd 1998, Tanaka vd 2006). Kromozom üzerinde yer alan virülens genlere *chv* (Chromosomal Virulence) genleri olarak adlandırılırken, Ti plazmit üzerinde yer alan virülens genler *vir* (Virulence) genleri olarak adlandırılmaktadır (Tanaka vd 2006). Ti plazmit üzerinde *vir* bölgesi olarak adlandırılan 30 kb'lık kısım, ortalama 8 operon altında toplanan, en az 35 virülens genden meydana gelmektedir (Pacurar vd 2011). *virA*, *virF* ve *virG* operonları tek genden meydana gelirken, *virC*, *virE* ve *virH* operonları iki genden, *virD* operonu dört genden, *virB* operonu on bir genden meydana gelmektedir. *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* operonlarının varlığı enfeksiyonun gerçekleşmesi için elzemken, *virH* ve *virF* operonlarının elzem olmadığı belirlenmiştir (De la Riva vd 1998). *Rhizobium* türlerinde bulunan plazmitlerin, yapıları değişkenlik göstermesine rağmen, *vir* bölgesi oldukça konservatif bir bölgedir (Engler vd 1981, Risuleo vd 1982, Hooykaas vd 1984, Yanofsky vd 1985). *vir* bölgesinde yer alan genler genellikle T-DNA'nın Ti plazmitten ayrılması ve bitki hücresine taşınması ile ilgili proteinleri kodlamaktadır. *virA* geni, yaralanmış bitki hücresinden salınan aminoasitler, organik asitler, monosakkaritler ve asetosiringon gibi fenolik bileşiklerin ortamdaki varlığını belirleyen bir dimerik transmembran sensör proteini kodlamaktadır (Cangelosi vd 1990, Pan vd 1993, De la Riva vd 1998, Escobar ve Dendekar 2003). VirA proteininin kemoatraktanlar tarafından uyarılmasının ardından, bakteri selüloz fibrillerle yaralanmış bölgeye bağlanır. Ancak bağlanmanın ilk aşamasının selüloz fibrillerle değil, asetile olmuş polisakkaritlerle gerçekleştirildiği bilinmektedir (Gelvin 2000). Bitkinin yaralanan bölgesinde yer alan asidik ekstraselüler koşullar, VirA proteininin otofosforilasyonunu indüklemektedir (Winans 1992). Yapılan araştırmalar *virA* gen dizisinin patojenin konukçu aralığını belirleyen unsurlardan biri olduğunu göstermiştir (Yanofsky vd 1985, Turk vd 1993). VirA proteini ile kombine alışan VirG2 proteini, diğer *vir* genleri için transkripsiyonel bir regülatör görevindedir (Jin vd 1990, Escobar ve Dendekar 2003, Pacurar vd 2011). *virC* genlerinin, T-DNA sentezini indüklediği ve T-DNA transferinin etkinliğini arttırdığı düşünülmektedir. Hastalığa karşı direnç gösteren bitkilerde hipersensitif reaksiyon mekanizması henüz aydınlatılamamıştır, ancak *Rhizobium tumefaciens* zerinde yapılan araştırmalarda VirC proteinlerinin dayanıklı çeşitlerde hipersensitif reaksiyonu tetiklediği belirlenmiştir (Yanofsky vd 1985, De la Riva vd 1998). VirC1 proteini, sağ sınır bölgesinde VirD2 proteini vasıtasıyla oluşturulan endonkleolidik açıklığa bağlanarak, T-DNA sentezini stimule eder. VirC1 proteini aynı zamanda DNA zincirinin etkin bir şekilde sentezlenmesini düzenlediği düşünülen overdrive bölgesine bağlanarak zincirin

oluşumunu stimule etmektedir (Toro vd 1989). VirC2 proteininin, T-DNA'nın sağ ve sol sınır bölgelerinden düzgün bir şekilde kesilmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (Soltani vd 2008). *virC* operonunun mutasyona uğratılmasının, bakterinin virülensliğini önemli ölçüde azalttığı kaydedilmiştir (Jen ve Chilton 1986, Van Haaren vd 1987, Rogowsky vd 1990, Hansen vd 1992, De la Riva vd 1998, Gelvin 2003). *virD1* ve *virD2* genlerinin kodladığı proteinlerin kooperatif çalışması ile bitkiye entegre olacak tek zincirli T-DNA fragmenti oluşturulur (Winans 1992). *virD1* ve *virD2* genlerinin kodladığı endonükleazlar, 25 bp'lik sol ve sağ sınır bölgeleri ile interaksiyona girme kabiliyetindedir (Gelvin 2003). *virD2* geni, T-DNA'yı sınır bölgelerinden kesip serbest bırakan ve T-DNA'ya kovalent bağla bağlanarak fragmente enfeksiyon sürecinde rehberlik eden bir endonükleazı kodlamaktadır (Burr ve Otten 1999, Escobar ve Dendekar 2003). Bitki genomuna rastlantısal entegrasyonun gerçekleşmesi için VirD2 proteininin varlığının elzem olduğu gösterilmiştir (De la Riva vd 1998). VirE2 DNA bağlanma proteinleri ve VirD2 proteininin serbest kalan T-DNA iplikçğine bağlanarak iplikçği nükleaz aktivitesinden koruduğu ifade edilmektedir (Dürrenberger vd 1989, Yusibov vd 1994, Rossi vd 1996, Burr ve Otten 1999). *virE2* geni, tek zincirli DNA'ya bağlanma kabiliyetine sahip 69 kDa'lık bir proteini kodlamaktadır. 20 kb'lik bir T-DNA iplikçğinin sarmalanması için yaklaşık 600 VirE2 proteini gerektiği düşünülmektedir. VirE2 proteinleri ile sarmalanmış T-DNA iplikçğinin çapı 2 nm'ye düşmekte bu sayede iplikçğin transfer kanallarından geçişi kolaylaşmaktadır (De la Riva vd 1998). VirD2 ve VirE2 proteinlerinin NLS dizileri (Nuclear Localization Sequence) içerdiği, endojen bazı bitki proteinleri ile interaksiyona girerek T-DNA kompleksinin çekirdeğe yönlenmesini sağladığı düşünülmektedir (Bravo-Angel vd 1998, De la Riva vd 1998, Gelvin 2000, Tzfira ve Citovsky 2002, Gelvin 2003, Valentine 2003). *virE2* geni mutasyona uğratılmış patojenik *Rhizobium* strainlerinin enfeksiyon kabiliyetinin on kat azaldığı (Bundock vd 1995), ancak VirE2 proteinlerinin transformasyon için elzem olmadığı tespit edilmiştir (Binns vd 1995). VirE1 proteinlerinin, VirE2 proteinleri ile sarmalanmış T-DNA'nın bitki hücresine geçiş sürecinde rol aldığı düşünülmekle beraber fonksiyonları tam olarak karakterize edilebilmiş değildir. *virE1* geni mutasyona uğratılmış strainlerin, VirE2 proteinlerini bitki hücresine aktaramadığı ve VirE2 proteinlerinin sitoplazma içinde biriktiği ortaya konulmuştur (Binns vd 1995). VirF ve VirH proteinlerinin T-DNA'nın korunmasında görevli olduğu düşünülmekle beraber, tam fonksiyonu bilinmemektedir (Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999). Bakteri hücresinden bitki hücresine salgılanan VirD5 ve VirE3 proteinlerinin bitkide meydana gelen transformasyon prosesine hizmet ettiği sanılmaktadır (Pacurar vd 2011). *virB* operonu, 11 açık okuma bölgesi içeren, 9,5 kb'lik bir operondur. Bu operon tarafından kodlanan proteinler ve VirD4 transmembran proteini, periplazmik membrana lokalize olan Tip IV sekresyon sistemi transfer kanalını oluşturmaktadır (De la Riva vd 1998, Pacurar vd 2011). Tip IV sekresyon sistemi transfer kanalını oluşturan proteinlerden biri veya birkaçını kodlayan genlerin mutasyona uğratılması transfer kanalının etkinliğini azaltmakta, fakat transfer aparatüsü işlevliğini sürdürmektedir. Ancak transfer kanalının temel komponentleri olan VirB2 ve VirB11 proteinlerini kodlayan genlerin mutasyona uğratılmasının, transfer aparatüsünün çalışmasını engellediği görülmüştür (Berger ve Christie 1993, 1994). Bazı insan patojenlerinde de Tip IV sekresyon sistemine rastlanabilmektedir (Valentine 2003). VirB proteinlerine benzer proteinlerin bakteriyel konjugasyon esnasında da oluşması, transfer kanalının konjugasyon sisteminden evrildiğini düşündürmektedir (Pansegrau ve Lanka 1996, De la Riva vd 1998, Oger vd 1998, Vergunst vd 2000, Christie 2001, Valentine 2003).

Ti plazmit üzerinde bulunan genler haricinde enfeksiyon oluşum sürecinde görev alan farklı genler de bulunmaktadır. Bu genlerin pek çoğu kromozomlar üzerinde yer aldığından kromozomal virülens gen (*chv*) olarak adlandırılırlar. Bu genler, T-DNA'nın bitkiye transferi için elzemdir. Fakat bu genler kromozomal kökenli olduğundan patojenik olmayan strainlerde de bulunabilmektedir. *chv* genlerinin patojenik olmayan strainlerdeki görevi henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (Slater vd 2008). Kromozomal *chvA* ve *chvB* genleri, bakterinin yaralanmış bitki dokusuna tutunmasını sağlayan bir polisakkarit olan β -1, 2-glukanın sentezi ve taşınmasından sorumludur (Cangelosi vd 1987, Zorreguieta vd 1988, Slater vd 2008). Kromozomal *att* (Attachment) genlerine ait ürünlerinin ise *Rhizobium* ve konukçusu arasında ilk spesifik bağlanmanın gerçekleşmesini sağlayan anahtar bileşen olduğu düşünülmektedir (Binns ve Thomashow 1988). *attR* ve *attD* genlerinin, sadece spesifik bağlanmada değil aynı zamanda T-DNA'nın bitkiye aktarım sürecinde de elzem olduğu gösterilmiştir (Nair vd 2003). *chvE* geninin sentezinden sorumlu olduğu proteinler, yaralanmış bitkiden yayılan karbonhidrat moleküllerinin algılanmasından ve bakteriyel kemotaksinin başlamasından sorumludur (Ankenbauer ve Nester 1990, Cangelosi vd 1990, 1991, De la Riva vd 1998). *chvE*, *chvG*, *chvH*, *chvI*, *acvB* ve *ros* genlerinin Ti plazmit üzerindeki *vir* genlerinin regülasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Slater vd 2008). *exoC* (*pgm*, *pscA*) geninin ise tutunmada görev alan β -1, 2-glukan ve süksinoglukan polisakkaritlerinin bakteri tarafından gerçekleştirilebilmesi için elzem olan bir gen olduğu rapor edilmiştir (Piers vd 1996, Slater vd 2008). *cel* (Cellulose) genleri ise enfeksiyon esnasında bakterinin bitki yüzeyine tutunmasını sağlayan selülozik fibrillerin sentezinden sorumludur. *cel* genlerinin mutasyona uğraması durumunda enfeksiyon şansının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Matthysse 1983). Bu genler haricinde, sıcaklık stresi altında bakterinin hayatta kalmasına ve etkin bir şekilde enfeksiyon gerçekleştirmesine yardımcı olan kromozomal *hspC* ve *hspL* (Heat Shock Protein) genleri sıcaklık şoku proteinlerini kodlamaktadır (Slater vd 2008).

Taç Gali hastalığının tipik belirtilerinden olan asma köklerindeki nekrozların oluşmasında etkili ekstraselüler bir enzim olan poligalakturonaz sentezinden sorumlu kromozomal bir gen olan *PehA* (Pectic Enzyme Hydrolase) genidir. Poligalakturonaz, bitki hücre duvarlarındaki pektik polimerleri parçalayan bir enzimdir (Burr vd 1998). Bu enzim, bitkinin hücre duvarındaki pektik polimerleri hidrolize edebilme kabiliyetindedir (McGuire vd 1991, Herlache vd 1997). Enzim, *Rhizobium vitis* ile zarar görmüş asma köklerinden kolaylıkla izole edilebilir. *PehA*, kromozomal olarak kodlanan bir gen olduğundan hem patojenik hem de patojenik olmayan *Rhizobium vitis* strainlerinde bulunabilir (McGuire vd 1991, Burr vd 1998, Crouzet ve Otten 1995). *PehA* geni mutasyona uğratıldığında patojenin meydana getirdiği tümörlerin de küçüldüğü görülmüştür. Bu durum *PehA* geninin *Rhizobium vitis* patojenisitesinde farklı fonksiyonlarının olduğunu düşündürmektedir (Brisset vd 1991, Herlache vd 1997).

Farklı *Rhizobium* türlerinin tümörjenik ve tümörjenik olmayan strainlerinin, tümör ve kök çürüklüğü oluşturmada yaralanmış bitki hücrelerine bağlanma durumları üzerine yapılan araştırmalar patojenlerin bitkiye bağlanmasını etkileyen farklı faktörlerin olabileceğini göstermiştir. *Rhizobium vitis* strainlerinin, *Rhizobium tumefaciens* strainlerine oranla daha spesifik bir bağlanma kapasitesine sahip olmasının, diğer *Rhizobium* türlerinde rastlanmayan poligalakturonaz üretimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Asmadaki yara bölgesinden salgılanan bazı kimyasalların varlığının

enfeksiyon esnasında poligalakturonaz üretimini indüklediği de belirlenmiştir (Brisset vd 1991, McGuire vd 1991).

Poligalakturonaz enzim aktivitesinin hastalık oluşumunda ana belirleyicilerden biri konumunda olduğu ve ur oluşturma yeteneği ile de yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Poligalakturonaz sentezleme kabiliyetinden yoksun *Rhizobium vitis* mutantları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda bu mutant strainlerin, yabanıl tip *Rhizobium vitis* kadar virülens olmadığı tespit edilmiş, poligalakturonaz enziminin bu etmen için önemli bir virülens faktör olduğu saptanmıştır (Rodriguez-Palenzuela vd 1991). *PehA* geninin bakterinin asmaya özelleşmesinde, patojenin adaptasyonunda ve asmada hastalık oluşturma kabiliyetinde anahtar faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir (Burr vd 1987-a, Rodriguez-Palenzuela vd 1991).

Tartarat, asmalarda yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir organik asittir (Ruffner 1982, Crouzet ve Otten 1995). Enfeksiyon prosesinde etkin diğer genler ise tartarat degradasyonunu ve bakterinin degrade edilmiş tartarattan yararlanmasını sağlayan *ttu* (Tartrate Dehydrogenase) genleridir (Szegedi vd 1992, Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999). Bu genler pek çok *Rhizobium vitis* straininde bulunan konjugatif plazmitler üzerindeki TAR bölgesinde yer alır (Otten vd 1995, Crouzet ve Otten 1995, Otten vd 1996). *Rhizobium tumefaciens* strainleri genellikle tartarattan faydalanamazlar (Crouzet ve Otten 1995). Ancak asmalardan izole edilen *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin pek çoğunun, patojene tartarattan yararlanma kabiliyeti veren genler taşıdığı saptanmıştır (Ride vd 2000, Palacio-Bielsa vd 2009). *Rhizobium rubi* strainlerinin de tartarata metabolize edebildiği ancak glikoz içeren ortamlarda daha iyi gelişim gösterdiği bilinmektedir (Crouzet ve Otten 1995). *Rhizobium vitis* strainlerinde, farklı konjugatif plazmitlerde yer alan üç farklı TAR bölgesi bulunabildiği gösterilmiştir (Otten vd 1995, Salomone vd 1996, Burr vd 1998). Bazı strainlerde TAR bölgesinin konjugatif plazmitten kromozoma entegre olabildiği de bilinmektedir. Bu durumun nedeni bilinmemekle beraber plazmit stabilizasyonu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Otten vd 1995). Yapılan çalışmalar farklı plazmitlerde bulunan TAR bölgelerinin benzer sekanslara sahip olduğunu göstermektedir (Salomone vd 1996). *ttu* genlerine sahip *Rhizobium vitis* strainleri ile *ttu* genlerine sahip olmayan mutant *Rhizobium vitis* strainleri ile yapılan araştırmalar bu genlerin özellikle patojenin asmada gerçekleştirdiği enfeksiyonlarda patojen kolonizasyonunda selektif avantaj ve rekabet avantajı sağladığını ortaya koymaktadır (Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999). Patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin çok azı tartarattan yararlanamazlar, bu durum bu strainlerin farklı kolonizasyon faktörlerine sahip olduğunu düşündürmektedir (Kerr ve Panagopoulos 1977, Süle 1978, Otten vd 1996, Burr vd 1999).

Patojenik *Rhizobium* türleri pek çok açıdan diğer *Rhizobium* türleri ile benzeşse de bazı farklılıkları bulunmaktadır. Bu bakteriler, 0,6-1×1,5-3 µm ebatlarında çubuk şeklinde, 1-4 adet peritrik kamçı bulunduran, Gram-negatif, spor oluşturmayan, aerobik bakterilerdir (Smith ve Townsend 1907, Ophel ve Kerr 1990, Young vd 2005). Tümörjenik *Rhizobium* strainlerinin genom büyüklükleri 3-3,6×10⁹ baz çifti, DNA'sının %GC içeriği %57-63 arasındadır. *Rhizobium vitis*, *Rhizobium tumefaciens* türünün aksine 3-ketolaktoz sentez mekanizmalarından yoksundur. Asit oluşum reaksiyonları adonitol ve mannitol varlığında gerçekleşirken, diğer karbonhidratların varlığında gözlenmez. *Rhizobium* türleri pek çok farklı karbonhidratı metabolize edebilirken, *Rhizobium vitis*

sadece asetat, N-asetilglukozamin, adonitol, arbutin, L-aspartat, bütirat, sitrat, glutarat, DL- gliserat, DL- laktat, prüvat, salisilin ve L-tartarat gibi bazı bileşenleri karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Etmenin, optimum gelişme sıcaklığı 25-28°C, (Young vd 2005) minimum gelişme sıcaklığı 15°C, maksimum gelişme sıcaklığı ise 37°C'dir (Sudarshana vd 2006). *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* türlerinin patojenik strainlerinin konukçu aralığı oldukça genişken, patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin konukçu aralığı *Vitis* ve *Actinidia* türleri ve birkaç dikotiledon bitki ile sınırlıdır (Sawada ve Ieki 1992-b, Young vd 2005). *Rhizobium vitis*, *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium radiobacter* türlerine ait genomik özellikler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Genom dizisi çıkartılmış *Rhizobium* türlerinin genomik özellikleri (Goodner vd 2001, Suzuki vd 2000, Wood vd 2001, Urbanczyk vd 2003, Slater vd 2009, Anonim 2014-j)

Karakteristik	<i>Rhizobium vitis</i> (S4)	<i>Rhizobium tumefaciens</i> (C58)	<i>Rhizobium radiobacter</i> (K84)
Genom büyüklüğü	6.320.946 bç	5.674.260 bç	7.273.300 bç
Kromozom sayısı	2	2	2
Kromozom 1	3.726.375 bç	2.841.580 bç	4.005.130
Kromozom 2	1.283.187 bç	2.075.577 bç (lineer)	2.650.913
%GC içeriği	57,5	59,0	59,9
Plazmit sayısı	5	2	3
pTiS4	258.824 bç		
pAtS4a	78.730 bç		
pAtS4b	130.435 bç		
pAtS4c	211.620 bç		
pAtS4e	631.775 bç		
pTi		214.233 bç	
pAt		542.868 bç	
pAtK84b			184.668 bç
pAtK84c			388.169 bç
pAgK84			44.420 bç
Protein kodladığı düşünülen gen	5.559	5.459	6.820
Protein	5.389	5.355	6.684
Korunmuş bölge (varsayımsal)	1.282	1.287	1.201
Pseudogen	90	28	68
rRNA operonları	4	4	3
tRNA genleri	54	56	51
Diğer RNA genleri	30	26	23
Genomik ada	30	38	59
Ortalama genomik ada büyüklüğü	33 kb	23,3 kb	28,2 kb

Alphaproteobacteria sınıfındaki bakteri türlerinde, birden fazla kromozom bulundurma, lineer replikonlar, farklı sayı ve büyüklüklerde plazmitler gibi farklı genom mimarilerinin bulunduğu görülmektedir. Patojenisite, mutualizm ve diğer simbiyotik ilişkiler ile ilgili genler genellikle büyük konjugatif plazmitler üzerinde yer almaktadır. Alphaproteobacteria sınıfındaki bakterilerin bu karmaşık doğası, Rhizobiaceae familyasındaki simbiyotik fenotiplerin, patojenisiteden azot bağlama mutualizmine kadar farklı özelliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. *Rhizobium* türleri genellikle iki kromozom bulundurmakla birlikte, bu kromozomların biri halkasal yapıya sahipken bir

diğeri lineer yapıya sahip olabilmektedir (Slater vd 2009). *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium radiobacter* iki adet halkasal kromozom bulundururken, *Rhizobium tumefaciens* bir adet halkasal bir adet lineer kromozom bulundurmaktadır (Goodner vd 2001, Wood vd 2001, Suzuki vd 2000, Anonim 2014-j). Daha büyük yapıdaki birinci halkasal kromozomun replikasyon orijininin yapısı, Alphaproteobacteria sınıfı üyelerinin replikasyon orijinine benzerken, daha küçük yapıdaki ikinci kromozomun replikasyon orijininin yapısı, Rhizobiaceae familyası üyelerinin sahip olduğu büyük plazmitlerin replikasyon orijinlerine benzemektedir (Slater vd 2009).

Keşfinden günümüze *Rhizobium* türlerinin sınıflandırılmasında ve tanılanmasında; **a)** indikatör bitki kullanımı (Riker 1923, Brown 1927, Hildebrand 1942, McKeen 1954, Ark ve Schroth 1958, Öktem 1972, Burr ve Katz 1984, Tarbah ve Goodman 1986, Burr vd 1987-b, Holmes 1988, Szegedi vd 1988, Bishop vd 1989, Ophel ve Kerr 1990, Sawada vd 1990, Bush ve Pueppke 1991, Haas vd 1991, Tolba ve Zaki 2011), **b)** fenotipik karakterlerin nümerik analizi (White 1972, Kersters vd 1973, Holmes ve Roberts 1981), biyokimyasal ve fizyolojik testler (Baldwin ve Fred 1927, Hofer 1941, Lange 1961, Graham 1964, Keane vd 1970, White 1972, Kersters vd 1973, Kerr ve Panagopoulos 1977, Süle 1978, Holmes ve Roberts 1981, Tarbah ve Goodman 1986, Bouzar ve Moore 1987-a, Ophel ve Kerr 1990, Bush ve Pueppke 1991, Haas vd 1991, Sawada ve Ieki 1992-b, Nagai-Miyata vd 1993, Sawada 1994, Bouzar vd 1995, Mohammadi ve Fatehi-Paykani 1999, Ride vd 2000, Argun vd 2002, Matthyse 2005, Genov vd 2006, Tolba ve Zaki 2011), **c)** serolojik testler (Coleman ve Reid 1945, Mushin vd 1958, Hochster ve Cole 1967, Graham 1971, Bouzar vd 1986, Alarcon vd 1987, Bouzar ve Moore 1987-b, Sawada vd 1992-b, 1992-c, Sawada 1994, Benlioğlu ve Özakman 1998, Kawaguchi vd 2008-b), **d)** yağ asidi profilleri (Sawada vd 1992-d, Bouzar vd 1993-a, Sawada 1994, Bouzar vd 1995, Jarvis vd 1996), **e)** DNA'nın enzimle kesilerek oluşan profillerin karşılaştırılması (Bouzar ve Moore 1987-b), **f)** DNA hibritlerinin termal stabiliteilerinin ölçümü (De Ley vd 1973), **g)** DNA-DNA ilişkileri (De Ley 1972, 1974), **h)** çözülebilir proteinlerin elektroforetogramlarının karşılaştırılması (Kersters ve De Ley 1975) gibi pek çok farklı teknik kullanılmıştır.

Asmada ur oluşumu, bağ alanlarında uzun yıllardır bilinmekle birlikte, yazılı olarak 1853'te ilk kez Fabre ve Dunal tarafından Fransa'da rapor edilmiştir. Uurların bakteriyel orijinli olabileceği ilk kez 1885'te ifade edilmiş, ancak urlara neden olan organizmanın kültüre alınması mümkün olmamıştır (Levine 1931). Cavara, 1897'de Asma Tüberkülozu veya Rogna olarak isimlendirdiği asmalardaki bu ur hastalığına neden olan etmeni ilk kez izole etmiş, izole ettiği organizmanın sağlıklı asmaları da hastalandırdığını bildirmiştir. Cavara, izole ettiği etmenin 1,5-2×0,5µm ebadında çubuk şeklinde kamçılı bir bakteri olduğunu ifade etmiş ve bakteriyi *Bacillus ampelopsorae* olarak adlandırılmıştır. 1894'te Smith söz konusu hastalık için ilk kez Taç Gali terimini kullanmıştır (Toumey 1900). Scalia, gül (*Rosa* spp.) sürgünlerinde asmadakine benzer urların varlığını tespit etmiş, hastalık etmenini izole edip metil viyole ile gözlemlemiştir (Levine 1931). 1900'de Toumey badem ağaçlarında (*Prunus dulcis*) görülen urlar üzerinde araştırmalar yapmış, urların baharda gelişmeye başladıklarını, sonbaharda olgunlaştıklarını, büyüme sezonunun sonunda urların kurduğunu, ertesi bahar yeniden oluştuğunu ifade etmiştir. Toumey, her geçen sezonda urların daha da büyüüp yayıldığını, urun oluşturduğu yaranın daha derine ilerlediğini belirtmiştir. 1907'de Smith ve Townsend, Taç Gali hastalık etmeni bakteriyi ilk kez çayır papatyasından (*Bellis perennis*) izole etmiş ve pek çok farklı bitkiye inoküle ederek bakterinin tümörjenik

doğasını göstermişlerdir (Burr vd 1998). 1910'da Hedgcock (Hedgcock 1910-b) bakteriyel etmeni ilk kez hastalıklı asmadan izole etmiş ve tümörjenisitesini şeftali (*Prunus persica*) ve kayısıda (*Prunus armeniaca*) denemiştir (Burr vd 1998). 1916'da Smith, 1919, 1921, 1923 ve 1924'te Levine, 1920'de Levin ve Levine, tümör oluşturan patojenlerin konukçu aralığında bulunan bitkilere inokülasyonlar yapıp izolasyonlar gerçekleştirmişler, tümör oluşum sürecini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, tümörlerin etmenle bulaşmanın ardından sürgünlerde spontan olarak geliştiği öne sürmüşlerdir. Araştırmalar, tümör oluşumu ile memelilerdeki kanser oluşumu arasındaki benzerliğe dikkat çekmişler, bu yüzden bitkide meydana gelen tümörleri memelilerde rastlanan bir tümör türü olan teratom olarak isimlendirmişlerdir (Binns 2008).

Bakteriyel taksonomideki gelişmelere bağlı olarak etmen, tümör oluşturan anlamı taşıyan tumefaciens epitetini alıp *Bacterium tumefaciens* olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Sonraki yıllarda etmenin adı birkaç kere değişmiştir. Etmen, 1909'da Duggar tarafından *Pseudomonas tumefaciens*, Bergey ve arkadaşları tarafından *Phytomonas tumefaciens*, 1928'de Lieske tarafından *Polymonas tumefaciens* olarak adlandırılmıştır (Pulawska 2010). Daha sonra tür, yeni bir genus olan *Agrobacterium* genusuna taşınmış ve patolojik davranışlarına göre ayrılmaksızın tüm tümörjenik bakteriler *Agrobacterium tumefaciens* olarak adlandırılmıştır. Fakat bazı araştırmacılar *Bacterium tumefaciens* adını kullanmayı sürdürmüşlerdir (Levine 1931, Anonim 2014-a). 1902'te Beijerinck ve Van Delden, patojenik olmayan *Agrobacterium* türlerini *Agrobacterium radiobacter*, 1907'de Smith ve Townsend, pek çok farklı konukçuda tümör oluşumuna neden olan bakterileri *Agrobacterium tumefaciens*, 1930'da Riker ve arkadaşları, aşırı saçak kök oluşumuna neden olan bakterileri *Agrobacterium rhizogenes*, 1940'ta Hildebrand, *Rubus* türlerinde tümör oluşumuna neden olan bakterileri *Agrobacterium rubi* olarak adlandırmış, bitkilerde ura ve neden olan bakterilerin Rhizobiaceae familyasında bir genus olan *Agrobacterium* genusunda yer alması gerektiği geçerlilik kazanmıştır.

1910'da Hedgcock yaptığı çalışmada hastalığın elma (*Malus domestica*) ve asmada belirtilerini, bitki gövdesinde tümörlere ek olarak, bitki gelişiminde gerileme, küçük ve genelde etiyle veya klorotik yapraklar şeklinde belirlemiştir. Hedgcock, urların yıllık olarak çürüdüğünü ve bu noktadan yukarıdaki dokulara zarar verdiğini ifade etmiştir. Hedgcock, epidermin zarar görmesine bağlı olarak bitkinin hastalık süresince aşırı su kaybettiğini (Hedgcock 1910-a), başka bir çalışmasında taze tümörlerin aşırı gelişmiş kallus yapıları olduğunu daha sonra odun hücrelerinin meydana gelmesi ile odunlaştığını ileri sürmüştür (Hedgcock 1910-b).

1911'de Smith, Brown ve Townsend, 1912'de Smith, Brown ve McCulloch etmenin konukçu aralığını büyük ölçüde belirlemiş, etmen ile insanda görülen kötü huylu kanser arasında bağlantı kurmaya çalışmışlardır. Lakin hayvan ve insanlarda görülen neoplastik hastalıkların bakteriyel orijinini göstermekte başarısız olmuşlar, etmenin bir bitki patojeni olduğunda karar kılmışlardır. Ancak 1919'da Blumenthal ve Hirschfeld turnagagası (*Geranium spp.*) ve havuçta (*Daucus carota*) gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda bitkilerdeki Taç Gali hastalığının insandaki kanserle benzeşmediğini bildirmişlerdir. İzleyen yıllarda insan tümörlerinden farklı bakteriler izole edilip bunlar bitkilerdeki tümörjenik bakteriler ile karşılaştırılmış (Blumenthal vd 1924, Reichert 1925, Kauffmann 1926) ancak genel kabul görmemiştir (Levine 1931).

1923'te Riker, bitkide yaralanmanın gerçekleşmesinden beş gün sonra dahi tümörjenik hastalık etmeninin bitkiye giriş yapabildiğini ve tümör oluşturabildiğini göstermiştir. Yaralanmanın gerçekleşmesinden 5-7 gün sonra yaraların etmene karşı daha az duyarlı veya duyarsız olduğu saptanmıştır.

1926'da Riker, tümörlere farklı sıcaklık rejimleri uygulamış, 32 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda bakteriyel etmenin tümör oluşturma kabiliyetini kaybettiğini ve bakteriyel gelişimin büyük ölçüde sekteye uğradığını göstermiştir.

1927'de Riker, ilk kez bitkilerde meydana gelen urların sitolojisi üzerine çalışmış, urları kallus dokusu ile karşılaştırmıştır. Tümör hücrelerinde kallus hücrelerinden farklı olarak bazı hücre inklüzyonları saptamış ve bunların hastalıkla bağlantılı olduğunu ifade etmiştir.

1941'de White ve Braun, 1943'te Braun ve White ile White ve Braun tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, ayçiçeğinde *Agrobacterium tumefaciens* tarafından meydana getirilmiş tümörleri bakteriden arındırmış, buna rağmen tümörlerin gelişmelerini sürdürdüğünü gözlemlemiştir. Araştırmacıların, ayçiçeğinde (*Helianthus annuus*) gerçekleştirdikleri çalışmalarda etmenin primer inokülasyon bölgesinden farklı yara bölgelerinde de tümör oluşturabildiği belirlenmiştir (Binns 2008).

1942'de Conn, *Agrobacterium* cinsine ait tip strainleri kez tanımlamıştır. *Agrobacterium tumefaciens* ismi uzun yıllar pek çok konukçuda tümörjenik reaksiyonlara neden olan bakterileri tanımlamak için kullanılmıştır (Young vd 2005).

1943'te Braun, Taç Gali hastalık etmeni ile Cezayir menekşelerini (*Vinca rosea*) inokülasyondan sonra beş gün boyunca farklı sürelerle 46 °C'de inkübe etmiş, daha sonra bitkilerin gelişmelerini 25 °C'de gözlemlemiştir. Yüksek sıcaklık bitkinin yaşamı için olumsuz bir etki yaratmazken bakteri için letal etki göstermiş, bu duruma rağmen tümör gelişiminin devam ettiği saptanmıştır. Bu sayede tümör formasyonu için bakterinin varlığına gerek olmadığı gösterilmiştir.

1947'de Braun, tümörlerin bakteriyel etmen tarafından transforme edilen hücrelerden meydana geldiğini öne sürmüştür. Braun'a göre tümör oluşum prensipleri, Taç Gali hastalık etmeninin metabolik ürünleri, bakteri tarafından tümör oluşumunda substrata dönüştürülen konukçuya ait bileşen, transformasyon bileşenlerinin sentezini başlatma kabiliyetine sahip, konukçu hücrede belirli değişikliklere neden olarak kontrolsüz bir şekilde bölünmesine neden olan bakteriyel hücrenin bir fraksiyonu (DNA) ve Taç Gali hastalık etmeni ile ilişkili bir virüs veya başka bir ajan olarak sıralanabilir. Braun bitkilerde meydana gelen tümörler ile memelilerde meydana gelen tümörler arasında benzerlikler olduğunu ifade etmiştir (Binns 2008). Bu benzerlikler bir veya bir grup hücrenin hücre döngüsünün kontrolünü kaybetmesine neden olan genetik veya epigenetik değişim, bu değişime bağlı kontrolsüz hücre bölünmesi ile oluşan makroskobik tümör oluşumu ile bu oluşumu besleyen iletim yapılarının oluşumu şeklinde sıralanabilir (Britton vd 2008). Tümör oluşum mekanizmasının doğru şekilde anlaşılması ancak 1970'lerin sonunda kullanımı mümkün olabilecek teknolojiler sayesinde gerçekleşmiştir (Binns 2008).

1968’de Lehoczky, *Agrobacterium vitis* strainlerinin asma içinde sistemik olarak taşındığını ve tümör oluşumunun yaralanmalarla indüklendiğini belirlemiştir. Bu bilgi, patojenin sistemik doğasının ve üretim materyali ile nasıl yayıldığının açıklanmasını sağlamış, bu sayede hastalıkla mücadelede önemli başarı kazanılmıştır (Burr vd 1998). Daha sonraki yıllarda Lehoczky ve diğer araştırmacılar gerçekleştirdikleri çalışmalarda patojenin bitki öz suyundan izole edilebildiğini göstermişlerdir (Lehoczky 1971, Lehoczky 1978, Burr vd 1998). Lehoczky, bakteriyel etmenin bitkinin kök sisteminde kışladığını öne sürmüştür. Etmen bahar geldiğinde uygun koşullar altında kök basıncı ile ksilemden yukarı doğru çıkmakta ve yaralanmış dokulara tutunarak ur oluşturmaktadır (Burr vd 1998).

1970’te Keane ve arkadaşları, gerçekleştirdikleri biyokimyasal ve serolojik testlere, protein elektroforezinden elde ettikleri protein paternlerine ve patojenisite testlerine dayanarak, fitopatolojik davranışları göz önünde bulundurularak farklı türlere dağıtılmış olan *Agrobacterium* türlerini *Agrobacterium radiobacter* türü altında birleştirilmişlerdir. Araştırmacılar, farklı semptomlar oluşturan veya semptom oluşturmeyen strainleri ise *Agrobacterium radiobacter*’in farklı biyotipleri olarak adlandırmayı önermişlerdir. Keane’nin sınıflandırmasında Taç Gali hastalık etmeni bakteriler, *Agrobacterium radiobacter* biyotip 3 olarak adlandırılmıştır.

1971’de Kerr, patojenik *Agrobacterium tumefaciens* strainlerinden, patojenik olmayan *Agrobacterium tumefaciens* strainlerine hastalık yapabilme kabiliyetinin transfer olabildiğini göstermiştir. Kerr, patojenik *Agrobacterium tumefaciens* strainleri ile hastalandırılmış, domates bitkilerinde meydana gelen tümörlere patojenik olmayan *Agrobacterium tumefaciens* strainlerini inoküle etmiş, patojenik olmayan strainlerin patojenik özellik kazandığını saptamıştır. Kerr, sıvı besiyerinde patojenik ve patojenik olmayan *Agrobacterium tumefaciens* strainleri karıştırıldığında hastalık yapabilme kabiliyetinin patojenik olmayan strainlere aktarılmadığını belirlemiştir. Araştırmacı, hastalık yapabilme kabiliyetinin, patojenik olmayan strain ile tümörün temas süresine ve tümörün gelişim aşamasında bağlı olduğunu ifade etmiştir.

1973’te Panagopoulos ve Psallidas, biyokimyasal ve fizyolojik testleri kullanarak asmada meydana gelen urlardan izole ettikleri *Agrobacterium* cinsi bakterileri, diğer bazı bitkilerde meydana gelen urlardan izole ettikleri *Agrobacterium* cinsi bakteriler ile karşılaştırmıştır. Çalışma sonucunda farklı konukçulardan izole edilmiş bu etmenlerin üç farklı gruba ayrılması gerektiği önerilmiştir. Araştırmacılar, asmadan izole ettikleri *Agrobacterium* türlerinin sadece asmaya spesifik olduğunu belirlemişler ve diğer patojenlerden ayrı bir grup altına toplamışlardır.

1974’te Zaenen ve arkadaşları, patojenik *Agrobacterium tumefaciens* strainlerinde bulunan ancak patojenik olmayan *Agrobacterium tumefaciens* strainlerinde bulunmayan bir plazmitin varlığını keşfetmişler ve plazmiti patojenik *Agrobacterium tumefaciens* strainlerinin hastalık yapma kabiliyetleri ile ilişkilendirmişlerdir. Genetiğin gelişmesiyle birlikte bu bakterilere ait tümörjenik ve rizojenik özelliklerin plazmit üzerinde yer aldığı ve *Agrobacterium* cinsi içindeki bakteriler arasında bu plazmitlerin geçişinin mümkün olduğu görülmüştür (Young vd 2005). Hem doğada hem de laboratuvar ortamında nodül oluşturan *Rhizobium* türleri ile patojenik *Agrobacterium* türlerinin kendi türleri içinde nodül ve ur oluşumundan sorumlu plazmitlerini aktarabildiği, hem nodül oluşturan

türlerden patojenik türlere (Martinez vd 1987, Brom vd 1988, Abe vd 1998), hem de patojenik türlerden nodül oluşturan türlere (Hooykaas vd 1977) plazmitlerin transfer edilebildiği gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler *Rhizobium* ve *Agrobacterium* türlerini birbirine yaklaştırmıştır (Young vd 2005).

1975'te Miller, daha önce Jones tarafından rapor edilen krizantemde (*Chrysanthemum morifolium*) rastlanan urların, *Agrobacterium tumefaciens* tarafından oluşturulduğunu saptamıştır. Farklı sıcaklık ve bağıl nem rejimlerinin farklı tümör büyüklüklerine neden olduğunu belirlenmiş, tümör büyüklüğünün bağıl nem ile doğrusal bir ilişkisi olduğunu ifade edilmiştir.

1976'da Bomhoff ve arkadaşları, oktopin ve nopalin katabolize eden *Agrobacterium tumefaciens* strainleri üzerinde yaptıkları plazmit transfer deneylerinde, opin üretimi ve opin kullanımının patojenisite ile bağlantılı olduğunu keşfetmişlerdir. Araştırmacılar, nopalin katabolize eden *Agrobacterium tumefaciens* straininden, *Agrobacterium radiobacter* strainine plazmit aktarımı gerçekleştirmiş ve *Agrobacterium radiobacter* straininin patojenik özellik kazanıp nopalin degrade edebilir nitelik kazandığını belirlemişlerdir. Benzer bir şekilde plazmiti ortadan kaldırılmış oktopin katabolize edebilme kabiliyetindeki *Agrobacterium tumefaciens* strainlerine, nopalin plazmiti transfer edilmiş ve strainin nopalin degrade edebilir nitelik kazandığı saptanmıştır.

1977'de Chilton ve arkadaşları, *Agrobacterium tumefaciens* ile enfekte edilmiş tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisindeki tümör hücre DNA'sının, bakterinin sahip olduğu plazmitin bir kısmını içerdiğini tespit etmiştir. Araştırmacılar, *Agrobacterium tumefaciens* ile enfekte edilmiş ve sağlıklı tütün bitkilerinden izole ettikleri DNA'ları endonükleaz enzimler vasıtasıyla kesime uğratmışlardır. *Agrobacterium tumefaciens* ile enfekte edilmiş tütün bitkisinden elde edilen DNA fragmentlerinin çalışmada kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* strainlerinin plazmitleri ile başarıyla hibridize olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, konukçudaki tümör hücrelerinin, bakterinin sahip olduğu plazmitin bir kısmını içerdiğinin kanıtıdır.

Daha sonraki yıllarda farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda T-DNA'nın bitkinin ana kromozomuna yarı-raslantısal olarak entegre olduğu belirlenmiştir (Lemmers vd 1980, Thomashow vd 1980, Yadav vd 1980, Zambryski vd 1980, Yadav vd 1982, Barker vd 1983, Wang vd 1984). Bu gözlemler *Agrobacterium* türlerinin insersiyonal mutagenез kabiliyetinin modern bitki moleküler genetiğinde güçlü bir araç olabileceğini göstermiştir (Binns 2008).

1977'de Kerr ve Panagopoulos, 1978'de Süle, gerçekleştirdikleri biyokimyasal ve fizyolojik testler doğrultusunda daha önce *Agrobacterium radiobacter* veya *Agrobacterium tumefaciens* türü içinde biyotip olarak adlandırılan bakterileri yeniden sınıflandırmış asmadan izole edilen Taç Gali hastalık etmeni bakterileri *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 olarak sınıflandırmışlardır.

1966'da De Ley ve arkadaşları, 1981'de Holmes ve Roberts, 1984'te Kersters ve De Ley, 1988'de Holmes bu taksonomik gruplar için farklı adlandırmalar önermişler, ancak bilim çevrelerinde geniş kabul görememişlerdir (Young vd 2005).

1990'da Ophel ve Kerr, *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 olarak tanıladıkları *Agrobacterium* izolatlarını, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes* ve *Agrobacterium rubi* türlerinin tip strainleri ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 olarak belirlenen izolatları, diğer *Agrobacterium* türlerinden, bazı biyokimyasal testlere ve *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3'ten geliştirilmiş monoklonal antikörlere karşı gösterdikleri reaksiyonlara dayanarak ayırmışlardır. Araştırmacılar gerçekleştirdikleri optik ölçümlerle tip strainler ile *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3'ün DNA bağlanma seviyelerini karşılaştırmışlar, DNA bağlanma seviyelerinin *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 izolatları arasında %78-92 olarak gerçekleştiği belirlenirken, diğer tip strainlerde bu seviyenin %7-47 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada, *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3'ün daha önceden belirlenen *Agrobacterium* türlerinin tip strainlerinden tür düzeyinde farklı olduğu ifade edilmiş ve bu yeni tür *Agrobacterium vitis* olarak isimlendirilmiştir.

Rhizobium vitis, Ophel ve Kerr tarafından ayrı bir tür olarak tanımlanmasından önceki süreçte farklı araştırmacılar tarafından *Rhizobium tumefaciens* ile beraber *Achromobacter radiobacter*, *Agrobacterium radiobacter* biovar *tumefaciens* biotype 3, *Agrobacterium genomsp.* 4, *Agrobacterium genomovar* 4, *Alcaligenes radiobacter*, *Bacillus radiobacter*, *Bacterium radiobacter*, *Bacterium tumefaciens*, *Pseudomonas radiobacter*, gibi pek çok farklı isimle anılmıştır (Vizitiu ve Dejeu 2011, Anonim 2014-j).

1990'da Ophel ve Kerr'in gerçekleştirdiği çalışmalara benzer çalışmalar farklı biovarlar üzerinde de yürütülmüş ve biovar olarak adlandırılan taksonomik birimlerde yer alan bakterilerin her birinin farklı birer tür olduğu, DNA-DNA homolojisine dayanan pek çok farklı araştırma ile gösterilmiştir (Moore vd 1980). Daha önce biovar 1 olarak adlandırılan taksonomik birimde yer alan bakteriler *Agrobacterium tumefaciens* (Bouzar 1994), biovar 2'de yer alan bakteriler *Agrobacterium rhizogenes* (Sawada vd 1993) olarak adlandırılmış, daha önce *Agrobacterium rubi* olarak adlandırılan bakteri türü taksonomik yerini korumuştur (Moore vd 1980).

Patojenik *Rhizobium* türlerinin taksonomik konumunun stabil olmaması, bu etmenlerin fitopatojenik karakterlerinin kromozomal değil, plazmit kaynaklı karakterler olmasından ve bu karakterlerin kaybının, kazanımının veya farklı türler arasında aktarımının mümkün olmasından kaynaklanmaktadır (Hussam ve Katsunori 2012).

2001'de Young ve arkadaşları gerçekleştirdikleri 16S rDNA (*rrs*) analizleri doğrultusunda *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium* genuslarının *Rhizobium* genusu altında birleştirilmesi gerektiğini önermişlerdir. Araştırmacılar, *Rhizobium* türleri içinde *Agrobacterium tumefaciens* (syn. *Agrobacterium radiobacter*), *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium vitis* ve *Allorhizobium undicola*'nın monofiletik bir grup oluşturduğunu ve bu genusların tek bir *Rhizobium* cinsi içerisinde toplanması gerektiğini bildirmişlerdir. Young 2004'te gerçekleştirdiği 16S rDNA analizleri doğrultusunda *Agrobacterium* türü içinde yer alan *Agrobacterium larrymoorei* türünün de *Rhizobium* cinsi içinde yer alması gerektiğini göstermiştir. Bu kapsamda *Agrobacterium tumefaciens* (syn. *Agrobacterium radiobacter*), *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium larrymoorei* ve *Agrobacterium vitis*

türleri sırası ile *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Agrobacterium larrymoorei* ve *Rhizobium vitis* olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Günümüzde *Rhizobium vitis* asmada ur oluşturan en baskın tür olarak bilinmekle birlikte *Rhizobium tumefaciens* de nadir olarak asmalarda izole edilmektedir (Knauf vd 1983, Salomone vd 1996, Ride vd 2000).

Rhizobium vitis, bulaşık topraklardan hassas konukçu bitkiye hayatının herhangi bir evresinde kök veya gövdenin toprağa yakın kısımlarından, kültürel işlemler, aşılama, böcek ve nematod beslenmesi gibi nedenlerle açılan taze yaralardan giriş yapmakta ve sistemik olarak tüm bitkiye hızlı bir şekilde yayılmaktadır (Burr vd 1987-a, Burr 2004, Stewart vd 2005, Creasap ve Burr 2006, Anonim 2012-a). Yapılan araştırmalar *Rhizobium vitis* strainlerinin taze bir sürgünde 24 saat içinde 30 cm kadar ilerleyebildiğini ortaya koymuştur (Tarbah ve Goodman 1987, Burr vd 1998). Her ne kadar etmenin ksilem ile taşındığı bilinse de, etmenin bitki içindeki spesifik yaşam alanı ve popülasyonlarının dağılımı ile ilgili mefhumlar açık değildir (Burr vd 1998). Enfeksiyondan sonra inkübasyon periyodu asmanın yaşına ve çevresel şartlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. 20-25°C sıcaklıkta inkübasyon süreci 13-14 gün sürerken, 10-15°C sıcaklıkta 27-28 gün sürmektedir. %80-90 bağıl nem enfeksiyon için en uygun nem aralığıdır (Vizitiu ve Dejeu 2011). Hastalık, omcanın gövdesinde ve kollarda tümörlerle kendini gösterir (Burr vd 1987-a, Burr ve Otten 1999). Tümörler, genellikle omcanın alt kısımlarında aşı birleşim yerlerinin yakınlarında gözlemlenir (Burr vd 1987-a, Burr ve Otten 1999, Creasap ve Burr 2006). Etmen, köklerde genellikle ur oluşturmaz, fakat *Rhizobium vitis* türünün hem patojenik hem de patojenik olmayan strainleri köklerde bölgesel nekrozlara ve çürümelere neden olabilmektedir (Burr vd 1987-a, Burr ve Otten 1999, Burr 2004, Matthyse 2005, Stewart vd 2005, Creasap ve Burr 2006, Anonim 2012-a). Asma köklerinde meydana gelen bu nekrozlar bitkiye elektrolit kaybettirmekte ve bitki gelişimini olumsuz etkilemektedir (Stover vd 1997, Burr vd 1998, Tolba ve Zaki 2011, Chebil vd 2013). *Rhizobium vitis*, diğer patojenik *Rhizobium* türleri arasında köklerde nekroz oluşumuna neden olan tek türdür (Burr vd 1987-a, Vizitiu ve Dejeu 2011, Johnson vd 2013). Uurların oluşumu genellikle kambiyum dokusundan başlar. Uurlar, yaz ayı başlarında beyaz renkli ve yumuşak görünümlüdürler, yaz sonunda uurların dış yüzeyindeki hücrelerin çürümesiyle kahverengine dönüşmektedirler. Tümörler, sonbaharda ise kuru ve odunsu bir yapıya bürünürler (Anonim 2008, Creasap ve Burr 2006, Hartman 2007, Vizitiu ve Dejeu 2011). Bazı uurlar kolaylıkla parçalanabilir ve bitki dokusundan kolaylıkla ayrılabilirler. Bazı uurlar ise daha odunsu ve sert yapıda olabilirler. Uurların bazıları tümüyle çürüyerek aktivitesini yitirirken, bazıları takip eden sezonda üst yüzeyinden tekrar taze gelişimler gösterebilir (Anonim 2008). Bazı ikincil fungal enfeksiyonlar çürüyen uurların dağılmasında etkili olabilirler (Levine 1931). Bir sezonda tüm omcayı saracak kadar büyük uurlar oluşabilmektedir (Anonim 2012-a). Bitkide asıl zarar uurların kambiyum dokusunda oluşmaya başlamasına müteakip, iletim demetlerinin organizasyonunun bozulması ve su ve besin geçişini sekteye uğratması ile başlar (Levine 1931, Stewart vd 2005, Creasap ve Burr 2006, Vizitiu ve Dejeu 2011, Campillo vd 2012). Bu yüzden urlu bitkiler genellikle zayıf sürgün gelişimi gösterir ve sürgünün, ur üstünde kalan kısımları kuruyabilir (Stewart vd 2005, Anonim 2012-a). Uurlar asma gövdesinin yarısını çevrelediğinde bitki gelişiminde ve veriminde önemli azalmalara neden olmaktadır (Schroth vd 1988). Gövdeyi saran büyük tümörler asmanın ölümüne neden olabilir (Stewart vd 2005).

Tümörlerde ve bitki materyalinde tümörijenik ve tümörijenik olmayan *Rhizobium vitis* strainlerinin beraber rastlanabilmektedir (Burr ve Katz 1983, Burr ve Katz 1984).

Hasta bitkiler, olumsuz çevre koşullarına, özellikle kış zararlanmalarına çok daha duyarlıdır. Özellikle don olaylarının görüldüğü yerlerde, asma üzerindeki don çatlakları boyunca çok sayıda urlanma olmaktadır. Don çatlakları boyunca oluşan bu belirtiler halk arasında sıraca ya da uyuz olarak adlandırılmaktadır (Anonim 2008). Asmada meydana gelen don yaraları kış boyunca meydana gelmesine rağmen tümör oluşumu bahar aylarına kadar görülmemektedir. Tümör oluşum zamanı, baharın gelmesiyle bitkide dormansi kallozunun degrade olması ve buna bağlı oksin üretiminin artışı ile başlar (Creasap vd 2005). Kalloz kış boyunca floemleri tıkayarak bitkinin don zararından korunmasını sağlayan β -1,3-glukan yapısındaki bir bileşiktir (Esau 1948). Kallozun sürgünlerden oksinin bazal taşınmasında ve don yaralarının iyileşmesinde rol aldığı bilinmektedir (Aloni 1995). Asmadaki oksin düzeyinin de *Rhizobium vitis* ile enfekteli asmalarda tümör oluşumuyla karşılıklı ilişkili olduğu saptanmıştır (Stover vd 1996, Rezmer vd 1999, Chateau vd 2000).

Taç Gali hastalığının görüldüğü bağlarda hastalık, yıldan yıla sahasını genişletmektedir. Etmen, asma bitkisinde, toprağa karışmış urlarda ve kök parçalarında uzun yıllar canlılığını sürdürebilmektedir (Anonim 2012-a). Hastalık, bitkilerde ur oluşumu dışında, bodurlaşma, küçük ve klorotik yaprak çıkarma gibi belirtilere de neden olur (Anonim 2008). Taç Gali hastalığı, nadiren bitkinin ölümüne neden olmakta, genellikle bitkide gelişme geriliğine sebebiyet vererek büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (De Cleene 1979). Oluşan galler farklı fitopatojenler için giriş sahası olabilmektedirler. Galli dokular abiyotik stres faktörlerine karşı da daha hassastırlar (Schroth vd 1988, Escobar ve Dendekar 2003).



Şekil 2.5. *Rhizobium vitis*'in asma gövdesinde oluşturduğu tümörler (Brown Jr 2008)



Şekil 2.6. *Rhizobium vitis*'in asma köklerinde oluşturduğu nekrozlar (Creasap ve Burr 2006, Burr vd 2006)

Taç Gali ile mücadelede etkin ve ekonomik bir kimyasal mücadele imkanının olmaması, hastalıkla mücadelede kültürel önlemlerin önemini daha da arttırmaktadır (Creasap ve Burr 2006, Anonim 2012-a). Yüzeysel antibiyotik ve bakterisidal kimyasal uygulamaları bitki yüzeyindeki bakterileri etkisiz hale getirse de, sistematik olarak bitki içinde yaşamını sürdüren bakterilerin kontrolünde etkisizdir. Bu yüzden Taç Gali ile mücadele yaralanmaların önlenmesine ve sağlıklı asmaların devamlılığına odaklanmaktadır (Creasap ve Burr 2006, Vizitiu vd 2012).

Hastalıkla mücadelede hastalığa göreli olarak dayanıklı anaç ve kültivarların kullanımı önerilebilir ancak, yabancı birkaç tür haricinde Taç Gali hastalığına mutlak dayanıklı bir tür bulunmamaktadır. *Vitis vinifera* türlerinin hemen hemen tamamı Taç

Gali hastalığına karşı hassastır. *Vitis riparia* klonları Taç Gali hastalığına genellikle dayanıklıdır. *Vitis labrusca* ve *Vitis amurensis* hibritlerinin hastalığa karşı *Vitis vinifera* türlerinden daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda, Chardonnay, Semillon, Riesling, Carignan, Blanca ovoide, Regina gibi kültivarlar, Paulsen 775, 1103 Paulsen, Freedom, Couderc 3309, 101-14 Mgt, Kober 5BB, C 3309, SO 4, Riparia Gloire, NAZ 1, NAZ 2, NAZ 4, NAZ 5, NAZ 6 gibi anaçların Taç Gali hastalığına dayanıklı olduğu bildirilmiştir. Fakat bu çeşitlerin de sadece *Rhizobium vitis* türünün belirli strainlerine karşı dayanıklılık gösterdiği, bazı farklı strainlere karşı test edildiğinde Taç Gali hastalığının ortaya çıkabildiği görülmüştür (Ferreira ve Van Zyl 1986, Goodman vd 1993, Stover 1993, Stover vd 1997, Burr vd 1998, Süle ve Burr 1998, Burr ve Otten 1999, Mahmoodzadeh vd 2004, Kuczmog 2012, Vizitiu vd 2012). Araştırmalar, Taç Gali hastalığına karşı mukavemet gösteren asma çeşitlerinde bulunan ve hastalığa dayanıklılıktan sorumlu olduğu düşünülen bir gen bölgesinin varlığına işaret etmektedir. Lakin *Rcg1* (Resistance Crown Gall) adı verilen bu lokusu barındıran her çeşidin hastalığa karşı aynı derecede mukavim olmadığı, lokusun farklı alellerinin olduğu bilinmektedir (Kuczmog vd 2012).

Taç Gali hastalığından korunmak için, ağır ve su tutma kapasitesi yüksek olan topraklarda ve kış ve ilkbahar donlarının yoğun görüldüğü yerlerde fidanlık ve bağ tesisinden kaçınılmalı, tesis kurulurken hastalık belirtilerini taşımayan sertifikalı fidan, çelik ve kalemler kullanılmalıdır (Tarbah ve Goodman 1986, Bazzi vd 1987, Burr vd 1988, Stewart vd 2005, Creasap ve Burr 2006, Hartman 2007, Vizitiu ve Dejeu 2011, Anonim 2012-a). Fidan üretiminde kullanılacak olan uyku dönemindeki anaç ve kalem çeliklerinin, 50-52°C sıcaklığa ayarlı su banyosunda 30-60 dakika süreyle sıcak su uygulamasına tabi tutulmasıyla, ksilem borularında bulunan bakteri büyük oranda yok edilebilmektedir (Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999, Burr 2004, Anonim 2012-a). Bu uygulama Ocak veya Şubat ayı gibi bitkinin dormant olduğu bir dönemde gerçekleştirilirse, tomurcuk gözlerinde hemen hemen hiç zarar meydana gelmemektedir. Daha sonraki dönemlerde gerçekleştirilen sıcaklık uygulamaları, gözlerde ölümlere veya geç tomurcuklanmaya neden olabilmektedir. 60 dakikayı geçen uygulamaların uygulama başarısını fazla değiştirmediği belirlenmiştir (Burr 2004). Sıcak su uygulamaları genellikle bitki içindeki tüm etmenleri eradike edemese de Dünya'nın pek çok farklı bölgelerindeki, pek çok fidanlıkta uygulanmaktadır (Burr vd 1998).

Budama, aşılama gibi yetiştirme tekniklerinin uygulanması sırasında kullanılan aletler her seferinde %10'luk sodyum hipoklorür veya %2-5'lik formalin ile dezenfekte edilmeli, aşılama sırasında anaç kalem uyumuna dikkat edilmelidir. Bakım işlemleri sırasında bitkileri yaralamaktan kaçınılmalı, yara yerlerinden bakteri girişini engellemek için aşı yerleri steril parafin ile kapatılmalıdır. Taç Gali hastalığının görülmesi durumunda, bağdaki bulaşık asmalar sökülüp imha edilmeli, söküm yerinde 40 cm derinlik ve 20 cm genişliğinde tecrit çukuru açılarak içerisi sönmemiş kireçle doldurulmalı ve toprak altı zararlıları ile mücadele edilmelidir. Hastalığın görüldüğü bağlar söküldükten sonra en az beş yıl süreyle yeni bağ tesis edilmemeli, mısır, buğdaygiller, soğanlı bitkiler, yonca ve kuşkonmaz gibi bitkilerle beş yıllık ekim nöbeti uygulanmalıdır (Anonim 2012-a, Vizitiu vd 2012).

Toprak fümigasyonu, torak kökenli Taç Gali hastalık etmenini yok etmede etkisizdir (Hartman 2007). Yapılan çalışmalar *Rhizobium vitis* strainlerinin, topraktaki

asma kalıntılarında hasta bitkinin sökülmesinden sonra saprofitik faza geçerek, beş yıla kadar hayatta kalabildiğini göstermiştir (Burr vd 1998, Creasap ve Burr 2006, Vizitiu ve Dejeu 2011). Patojenin, bulaştığı bağ alanından ne kadar zamanda eradike olacağı, bulaşık asma kalıntısı miktarına ve bu kalıntıların dekompozisyon hızına bağlı olarak değişir (Burr vd 1998). Ancak daha önce bağ tesis edilmemiş topraklarda Taç Gali hastalık etmenine rastlanmadığından, böyle arazilerin dikimde kullanılması hastalığa dair etkin kontrol sağlamaktadır (Burr vd 1998, Creasap ve Burr 2006, Vizitiu ve Dejeu 2011).

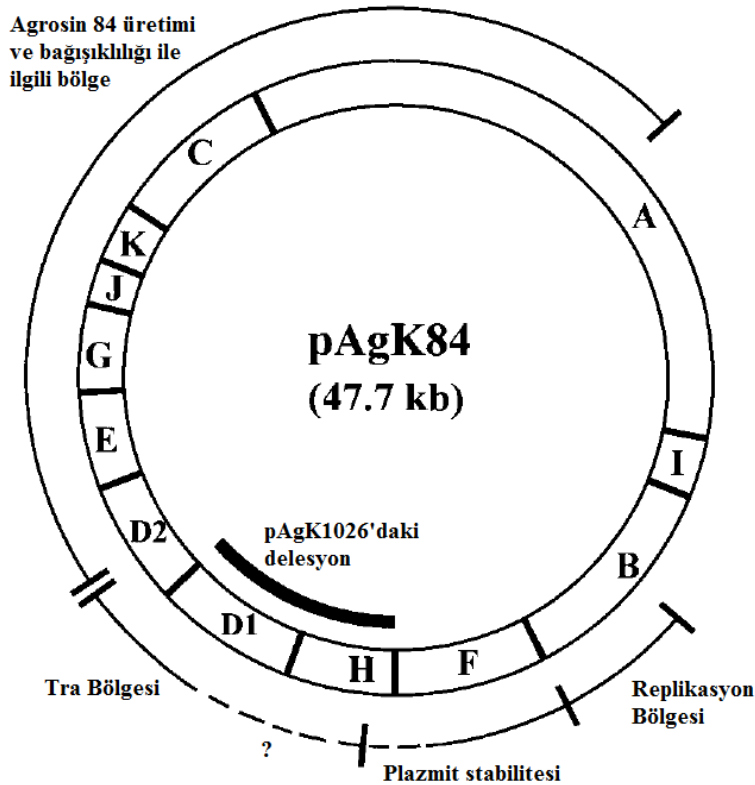
Yapılan bazı çalışmalar filokseraya dayanıklı bazı anaçların Taç Gali hastalığına karşı dayanıklı olabileceğine işaret etmektedir (Goodman vd 1993, Stover 1993, Süle vd 1994, Stover vd 1997, Mahmoodzadeh vd 2004). Soğuk iklim şartlarına dayanıklı çeşitlerin seçimi Taç Gali ile mücadelede önemlidir (Burr 2004, Stewart vd 2005, Creasap ve Burr 2006, Vizitiu ve Dejeu 2011). Azotlu gübreleme yerine potaslı gübreleme planı ve dengeli budama asmaların dona karşı olan dayanımını arttırmaktadır (Burr vd 1998, Stewart vd 2005, Vizitiu vd 2012). Hasadın geciktirilmesi ise asmanın dona karşı direncini azaltacağından geç hasattan kaçınılmalıdır (Stewart vd 2005). Aşırı azotlu gübrelemeden kaynaklanacak azot fazlasının Taç Gali hastalık etmenlerine azot kaynağı olarak hizmet edebileceği düşünülmektedir (Vizitiu vd 2012).

Hastalıklı bir bitkideki genç sürgün uçlarında patojen bulunmadığından (Burr vd 1988, Szegedi ve Nemeth 1996) sürgün ucu kültürü, patojenden arı bitki eldesinde, patojenin elimine edilmesinde ve hastalıktan arı anaç parsellerinin kurulmasında uygulanan en etkin yöntemlerden biri olarak öne çıkmaktadır (Burr ve Otten 1999, Creasap ve Burr 2006).

Asma dikimi gerçekleştirilen arazide nematod aktivitesinin olup olmadığının kontrolü büyük önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalar nematod aktivitesi olan topraklarda Taç Gali vakalarının daha sık ortaya çıktığını göstermektedir (Süle vd 1995, Stewart vd 2005, Vizitiu vd 2012).

Dünya'nın pek çok üzüm üretimi yapılan bölgesinde Taç Gali hastalığı ile biyolojik mücadelede *Rhizobium radiobacter* K84 straini uzun yıllar kullanılmıştır (Kerr ve Htay 1974, Moore ve Warren 1979, Cooksey ve Moore 1980, Lopez vd 1987, 1989, Shim vd 1987, Jones ve Kerr 1989, Farrand 1990, Tawfik 1990, Donner vd 1993, Vicedo vd 1993, Moore ve Canfield 1996, Burr vd 1998, Penyalver vd 2000, Herlache ve Triplett 2002). Patojenik olmayan K84 straini, 1972 yılında New ve Kerr tarafından badem fidanlarından izole edilmiştir. Araştırmacılar, yaralandırılmış bitki köklerini bire bir oranlarda patojenik *Rhizobium* ve patojenik olmayan K84 strainleri ile muamele ettiklerinde, zamanla patojenik bakteriyel popülasyonun azalarak patojenik olmayan K84 strainin baskın hale geldiğini ve ur oluşumunun meydana gelmediğini gözlemlemişlerdir (Kerr 1972, New ve Kerr 1972, Penyalver vd 2000). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda K84 straininin patojenik olmayan bir *Rhizobium radiobacter* straini olduğu belirlenmiştir (Kerr ve Panagopoulos 1977). Bu biyokontrol ajanı, konukçu rizosferinde ve kök sisteminde kolonize olmakta (Ellis vd 1979, Shim vd 1987, Macrae vd 1988, Stockwell vd 1993, Vicedo vd 1993) ve yüksek derecede spesifik antiagrobakteriyel bir antibiyotik olan agrosin 84'ü (agrosinopin A) sentezlemektedir (Kerr ve Htay 1974). Bu antibiyotik, sadece agrosine hassas *Rhizobium* türlerinde etkili bir adenin nükleozit analogudur (Kerr ve Htay 1974, Murphy ve Roberts 1979, Tate vd 1979, Hayman ve

Farrand 1988). Fakat gerçekleştirilen bazı çalışmalar arazi şartlarında K84 straininin agrosin 84'e dayanıklı patojenleri de kontrol altına alabildiği de rapor edilmiştir (Cooksey ve Moore 1980, Lopez vd 1987, 1989, Bouzar vd 1991, Vicedo vd 1993, Penyalver ve Lopez 1999). K84 straininin, agrosin 84'e dayanıklı patojenleri nasıl kontrol altına aldığı tam manasıyla anlaşılamamıştır. Bu durum söz konusu biyolojik kontrol fenomeninin sadece agrosin üretiminden ibaret olmadığını, mekanizmanın daha komplike bir yapı barındırdığını düşündürmektedir (Farrand ve Wang 1992, Vicedo vd 1993, Penyalver vd 2000). K84 straini, agrosin 434 isimli antimikrobiyal bileşeni kodlayan pAgK434 plazmiti (> 300 kb) (Donner vd 1993), nopalin katabolizmasını kodlayan pNoc plazmiti (173 kb) (Sciaky vd 1978, Ellis vd 1982) ve agrosin 84 isimli antimikrobiyal bileşeni kodlayan pAgK84 plazmitini (47,7 kb) (Ellis vd 1979, Ryder vd 1987) taşımaktadır. pNoc plazmiti, *Rhizobium tumefaciens*'in Ti plazmiti ile büyük ölçüde homoloji göstermektedir. Bu durum pNoc plazmitinin, Ti plazmitinin delesyon mutasyonu ile onkojenik aktivitesini yitirmiş hali olduğunu düşündürmektedir (Clare vd 1990). K84 straininin kodladığı ikinci antimikrobiyal bileşen olan agrosin 434 ise sadece hassas *Rhizobium rhizogenes* strainleri üzerinde etki gösteren, agrosin 84'e göre daha etkisiz bir bileşendir (McClure vd 1998, Donner vd 1993). Agrosin 434'ün sitidin nükleoziti analogu olduğu düşünülmektedir (Kerr ve Tate 1984, Fajardo vd 1995, Herlache ve Triplett 2002). K84 straini, bu iki antimikrobiyal bileşenin haricinde ALS84 adı verilen üçüncü bir antibiyotik benzeri madde daha sentezlemektedir ancak bu bileşenin kimyasal yapısı ve Taç Gali hastalık etmenlerinin kontrolündeki rolü henüz açıklığa kavuşmamıştır (Penyalver vd 2000).



Şekil 2.7. pAgK84 plazmitine ait *EcoRI* restriksiyon haritası. Tra⁻ pAgK1026 plazmiti *virD1* ve *virH* bölgelerini içeren *EcoRI* restriksiyon fragmentini içermemektedir (Penyalver vd 2000)

K84 straininin, uygulamasında, yüksek miktarlarda agrosin 84'e dayanıklı patojen strainlerin bulunması, latent enfeksiyonlar, yetersiz miktarda K84 straini içeren formülasyonlar, uygunsuz inokülasyon uygulamaları, K84 straininin toprakta bulunan rekabetçi mikroorganizmalar, antagonistler veya diğer faktörler sebebiyle biyolojik mücadele ajanının yeterince kolonize olamaması gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir. K84 uygulamalarının bir başka başarısızlık nedeni de biyolojik ajandan patojenlere plazmit aktarımının meydana gelmesi ve patojenik formların agrosin 84'e dayanıklı hale gelmesidir (Panagopoulos vd 1979, Penyalver vd 2000). Biyolojik ajanın başarısı, agrosin sentezinden sorumlu pAg84 plazmitinin konjugasyon yoluyla, patojenik *Rhizobium* strainlerine geçmesiyle zaman içinde azalmıştır. Agrosin 84'ün sentezinden sorumlu pAg84 plazmiti üzerinde yer alan Tra (Transfer) bölgesi, plazmitin bir bakteriden başka bir bakteriye geçişini sağlamaktadır (Jones vd 1988, Burr vd 1998). Rekombinant DNA teknikleri kullanılarak pAg84 plazmiti üzerindeki Tra bölgesinin 5,9 kb'lık kısmı silinmiş, plazmitini transfer etme kabiliyetinden yoksun (Tra⁻), ancak sentezlediği agrosin ile agrosine hassas *Rhizobium* türlerini etkisiz hale getirebilen *Rhizobium radiobacter* K1026 adı verilen yeni bir biyolojik ajan oluşturulmuştur (Jones vd 1988, Jones ve Kerr 1989). Yapılan çalışmalar K1026 straininin, K84 straini kadar agrosin84, agrosin 434 ve ALS84 üretebildiğini, agrosin 84'e hassas patojenler üzerinde K84 straini kadar etkili olduğunu göstermiştir (Penyalver vd 2000). *Rhizobium radiobacter* K1026, Dünya'nın pek çok ülkesinde ticari biyopestisit olarak halen kullanılmaktadır (Penyalver vd 2000, Anonim 2014-k). Agrosin üreten bu strainler, pek çok patojenik *Rhizobium* straininin kontrolünde etkili olsa da *Rhizobium vitis* türünün tümörjenik aktivitesinin agrosin 84 ile kontrol altına alınamadığını işaret eden veya bu strainlerin asmadan farklı konukçularda meydana gelen *Rhizobium vitis* enfeksiyonlarını engellemekte daha etkin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Kerr ve Htay 1974, Farrand 1990, Burr vd 1998, Burr ve Otten 1999, Zauner vd 2006).

Rhizobium vitis F2/5 straini, hastalığın kontrolünde ümit veren bir başka biyolojik kontrol ajanıdır (Staphorst vd 1985, Burr ve Reid 1994, Burr vd 1998, Genov vd 2006, Rouhrazı ve Rahimian 2012). Bu strain patojenik olmayan bir *Rhizobium vitis* strainidir. *Rhizobium vitis* F2/5'in, asma yüzeyinde ve yaralarda kolonize olması sağlanarak, ürettiği antimikrobiyal bileşenler sayesinde patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin enfeksiyon şansı bulmasının önüne geçilebilmektedir. *Rhizobium vitis* F2/5 uygulamalarının arazideki başarısına dair veriler değişkenlik göstermektedir (Burr ve Reid 1994, Bazzi vd 1999, Burr vd 1997, 1999, Szegedi vd 1999, Burr 2004, Creasap vd 2005, Hao vd 2005, Creasap ve Burr 2006, Vizitiu ve Dejeu 2011).

Patojenik olmayan *Rhizobium tumefaciens* J73 (Thomson 1986, Webster vd 1986, Macrae vd 1988), D286 (Ryder vd 1987) strainleri, patojenik olmayan *Rhizobium radiobacter* MI 15 (Xie vd 1993), HLB-2 (Xiaoying ve Wangnian 1986, Pu ve Goodman 1993-a, 1993-b, Bazzi vd 1999), UHFBA-8, UHFBA-11, UHFBA-12 (Gupta vd 2010) strainleri, patojenik olmayan *Rhizobium vitis* F2 (Staphorst vd 1985), E26 (Yajie vd 1990, Liang vd 2001, Li vd 2005, Wang vd 2008, Wei vd 2009), CG1077 (Burr vd 1997), CG573 (Bazzi vd 1999), CG49 (Otten vd 1996), VAR03-1 (Kawaguchi vd 2005-a, 2007, 2008-a) strainleri, farklı endofitler (Bell vd 1995), farklı kaynaklardan izole edilmiş *Rhizobium* strainlerine karşı antagonistik etki gösterdiği belirlenen *Pseudomonas fluorescens* (Khmel vd 1998, Eastwell vd 2006), *Pseudomonas corrugata* (Bell vd 1995), *Pseudomonas aureofaciens* (Khmel vd 1998), *Pseudomonas* spp. (Biondi vd 2009),

Bacillus subtilis (Biondi vd 2009), *Bacillus* spp. (Eastwell vd 2006), *Rahnella aquatilis* (Bell vd 1995, Chen vd 2007, 2009), *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas viridilivd*, *Pseudomonas asplenii*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Curtobacterium* spp. (Tolba ve Soliman 2013) strainleri, modern biyoteknolojik yöntemlerle trifolitoksin (TFX) geni aktarılmış farklı *Rhizobium* strainleri (Herlache ve Triplett 2002), *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. gibi farklı fungus cinsleri (Cooksey ve Moore 1980) gibi *Rhizobium vitis*'e karşı farklı seviyelerde kontrol sağlayan pek çok farklı mikroorganizma Taç Gali hastalığı ile mücadelede kullanılmıştır.

Ülkemizde asma üretim materyallerinin elde edilmesinde, çekirdekten çoğaltım, daldırma ile çoğaltım ve çelik ile çoğaltım gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde gerek ülkemizde gerek Dünya'da asma fidanı üretiminde en yaygın kullanılan yöntem, anaç ve kalem kısımlarının ayrı ayrı yetiştirilip birbirine aşılması esasına dayanan yöntemdir. Asma üretim materyalinin eldesinin ilk aşamasında, asma fidanlarında anaç ve kalem olarak kullanılacak tek yıllık sağlıklı sürgünler budanarak arazide tasnif edilmekte ve demetlenmektedir. Demetlenen materyaller karanlık ve serin bir ortamda birkaç gün depolanmaktadır. Kalemler aşı işlemine geçilmeden önce bir gün boyunca suda bekletilmektedir. Depolanan anaçların en üst ve en alt kısmında yer alan gözler hariç diğer gözleri köreltilmekte, bir gün boyunca suda bekletilen kalemler ise tek gözlü parçalar halinde kesilmektedir. Kesilen gözler ve anaçlar çeşit karışıklığına sebep olamayacak bir nizam içerisinde aşı makinesi yardımı ile birleştirilmekte, ardından aşı yüzeyi oluşabilecek enfeksiyonların engellenmesi amacıyla parafin ile kaplanmaktadır. Aşı bölgesi kaplanan materyaller, anaç ve kalemin kaynaşması amacıyla, 26 C°'de, %80-85 nispi nemde, 21 gün inkübe edilmektedir. Dikime hazır hale gelen çelikler, dikimden önce köklenmeyi teşvik etmesi için IBA (İndol Bütirik Asit) çözeltisine batırılmalarının ardından, tüplerin içine hazırlanmış fidan harcına dikilmektedir (Anonim 2014-m).



Şekil 2.8. Asma fidanlarında anaç olarak kullanılacak tek yıllık sürgünlerin arazide budanması (Bu çalışmadan. Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonu)



Şekil 2.9. Anaç olarak kullanılmak üzere arazide tasnif edilip demetlenmiş tek yıllık sürgünler (Bu çalışmadan. Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonu)



Şekil 2.10. Kalem olarak kullanılmak üzere arazide tasnif edilip demetlenmiş tek yıllık sürgünlerin aşı için kesimi (Bu çalışmadan. Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonu)



Şekil 2.11. Anaç ve kalemleri birleştirmekte kullanılan omega aşı makinesi (Bu çalışmadan. Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonu)



Şekil 2.12. Omega aşı makinesi ile birleştirilen anaç ve kalem (Bu çalışmadan. Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonu)

Çeliklerin hazırlanma sürecinde gerek anaç gerek kalemler pek çok kez yaralandırılmakta ve Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis* ile enfekte olma riski ile karşı karşıya kalmaktadır. Budama ve tasnif işlemlerinin arazide gerçekleştirilmesi budanan parçaların toprak ile temas etmesine neden olmakta, anaç ve kalemlerin uygun şekilde kesimi ve birleştirilmesi esnasında meydana gelen yaralanmalar da *Rhizobium vitis* strainlerinin üretim materyaline girişi için büyük risk oluşturmaktadır. Birleştirilen anaç ve kalemlerin kaynaşması amacıyla *Rhizobium vitis* gelişimi için oldukça uygun olan 26 C°'de 21 gün inkübe edilmesi hastalık etmeninin bitki içine girmesi durumunda hastalık etmeninin bitkide hızlı bir şekilde gelişim göstermesine neden olabilmektedir. Bulaşma için risk taşıyan bu süreçlerin sonrasında üretim materyalinin hastalığa dair hızlı ve hassas tespit yöntemleri ile kontrol edilmesi hastalıktan arı üretim materyali eldesinde büyük önem arz etmektedir.

Patojenik *Rhizobium* türlerinin konukçu bitki veya toprak gibi karmaşık bir mikrofloranın içinde yaşamını sürdürmesi patojenin tanı ve teşhisini güçleştirmektedir. Tanı ve teşhiste kullanılan yöntemlerin pek çoğunda tanılanmak istenen bakterinin tek başına elde edilebilmesi önemli bir gereksinimdir. Patojenik *Rhizobium* türlerinin urlardan ve topraktan izolasyonu oldukça güç olduğundan farklı düzeylerde gerçekleştirilen tanı ve teşhis çalışmalarında özel selektif ortamlar uzun yıllar kullanılmıştır (Öktem 1972).

1926'da Patel, agar, glikoz, kristal viyole ve sodyum taurokolat içeren bir besi ortamı kullanarak *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainlerini geliştirmeyi başarmıştır. Ancak Patel'in geliştirdiği ortam toprak mikroflorasındaki diğer bakterileri elimine etmede yetersiz kalmaktadır (Moore vd 1980).

1965'te Schroth ve arkadaşları, *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium radiobacter* grubu bakterilerin topraktan izolasyonu için geliştirdikleri agar, mannitol, sodyum nitrat, magnezyum klorür, kalsiyum propiyonat, magnezyum monohidrojen fosfat, magnezyum sülfat, sodyum bikarbonat ve magnezyum karbonat gibi kimyasallar, berberin, sodyum selenit, penisilin, streptomisin, sikloheksimit, tirotrisin ve basitrasin gibi antibiyotikler ve toksin bileşenler içeren seçici besi ortamı sayesinde, seçici olmayan besi ortamında gelişen bakterilerin %99'undan fazlasını elemine etmiş *Rhizobium* kolonilerini, diğer bakterilerden kolaylıkla ayırt etmeyi başarmışlardır. Patojenisite testleri için ayçiçeği domates (*Solanum lycopersicum*) fideleri kullanarak ur teşkilini incelemişlerdir. Besi ortamının antibiyotik içeriği azaltıldığında ortam *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin gelişmesine de olanak vermekte bu durum ortamın seçiciliğini belirgin ölçüde azalmaktadır (Moore vd 1980).

1966'da Moustafa Darweish, agar, laktoz, mangan sülfat, magnezyum sülfat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, amonyum fosfat içeren, 1969'da Clark, agar, laktoz, mangan sülfat, magnezyum sülfat, potasyum nitrat, sodyum fosfat, demir EDTA, içeren benzer besi ortamları geliştirmişler toprak mikroflorasında *Rhizobium* türleri haricinde hemen hemen tüm bakteri türlerinin gelişimini engelleyen bir besi ortamı geliştirmişlerdir. 3-ketolaktoz üretimi ile bitki inokülasyonlarını kapsayan testler ile ortamın seçiciliğini sınamışlardır. Bu besi ortamları *Rhizobium tumefaciens* strainleri için iyi bir gelişme ortamı sunsa da *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* bu ortamlarda oldukça zayıf gelişmektedir (Moore vd 1980).

1970'te Kado ve Heskett, *Rhizobium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* cinsleri içindeki bitki patojeni bakteriler için lityum klorür, sodyum dodesil sülfat, polimiksin ve glisin gibi bakteri membranının geçirgenliğini etkilediği bilinen aktif bileşenleri, tek başına veya kombine olarak kullanarak bir cinsin gelişmesine izin veren, diğer cinslerin gelişmesini engelleyen D serisi adını verdikleri beş seçici besi ortamı geliştirmişlerdir. *Rhizobium* türleri için hazırlanan D1 adındaki besi ortamında, agar, mannitol, magnezyum sülfat, sodyum nitrat, kalsiyum nitrat, lityum klorür, dipotasyum hidrojen fosfat ve bromtimol mavisi kullanılmaktadır. Bu besi ortamında geliştirilen *Rhizobium* kolonileri önce besi ortamı içeriğindeki bromtimol mavisinden ötürü açık mavi olarak gözlemlenmekte, kolonideki pH'nın zamanla düşmesine bağlı olarak zamanla yeşil renk almaktadır.

1971'de New ve Kerr, *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin izolasyonunda başarılı bir besi ortamı geliştirmişlerdir. Besi ortamı, agar, eritritol, monopotasyum fosfat, sodyum nitrat, sodyum klorür, kalsiyum klorür, demir EDTA, magnezyum sülfat, biyotin, sikloheksimit, basitrasin, tirotrisin ve sodyum selenit gibi maddeler ihtiva eden selektif bir besi ortamıdır. Bu ortam sayesinde New ve Kerr, *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin patojenik formlarını hem toprak hem de hastalıklı bitki dokusundan izole etmeyi başarmışlardır.

1976'da Matthyse ve Stump, *Rhizobium tumefaciens* strainlerini izole etmek amacıyla H4 minimal besi ortamı adını verdikleri bir ortam geliştirmişlerdir. Bu besi ortamı, *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium vitis* türleri spesifik olarak gelişebilmektedir. *Rhizobium rhizogenes* türleri ise daha yavaş bir şekilde de olsa bu besiyerinde gelişebilmektedir.

1980’de Moore ve arkadaşları DIM agar adını verdikleri, agar, sellobiyoz, amonyum klorür, sodyum dihidrojen fosfat, dipotasyum hidrojen fosfat, magnezyum sülfat, malaşit yeşili kullanarak hazırladıkları besi ortamı sayesinde *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* türlerini selekte edebilmişlerdir.

1983’te Brisbane ve Kerr, farklı *Rhizobium* türlerinin gelişmek için farklı karbon ve azot kaynaklarını kullanması ve eritritolün *Rhizobium tumefaciens* tarafından karbon kaynağı olarak kullanılamaması esasına dayanarak 1A, 2E ve 3DG adını verdikleri sodyum selenit ve tellürit içeren üç besi ortamı tasarlamış, bu sayede *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve kısmen de *Rhizobium vitis* türlerini ayırmayı başarmıştır. Bakterilere farklı gelişme faktörleri olarak farklı konsantrasyonlarda eritritol, arabitol, tartarat ve D-glutamat bileşenleri verilerek seçicilik sağlanmıştır. Sodyum selenitin söz konusu patojenler tarafından indirgenme kabiliyeti bakterinin toksik bir bileşen olan tellürite karşı direnç seviyesini belirlemektedir. *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin izolasyonunda kullanılan 1A besi ortamı, agar, arabitol, amonyum nitrat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, magnezyum sülfat, sodyum taurokolat, kristal viyole, sikloheksimit, tellürit ve sodyum selenit içermektedir. *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin izolasyonunda kullanılan 2E besi ortamı ise agar, eritritol, amonyum nitrat, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, magnezyum sülfat, sodyum taurokolat, maya ekstraktı, malaşit yeşili, sikloheksimit, tellürit ve sodyum selenit içermektedir. *Rhizobium vitis* strainlerinin izolasyonunda kullanılan 3DG besi ortamı, agar, D-glutamat, sodyum tartarat, monosodyum fosfat, sodyum klorür, disodyum fosfat, magnezyum sülfat, mangan sülfat, sodyum taurokolat, maya ekstraktı, Kongo kırmızısı ve sodyum selenit içermektedir. 3DG besi ortamının hazırlanmasında D-glutamat yerine amonyum nitrat da kullanılabilir. 1A ve 2E ortamları yüksek seviyede seçici ve etkili ortamlardır (Moore vd 1980), fakat tartarat kullanabilen *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin de *Rhizobium vitis* için geliştirilen tartarat ve glutamat içeren DG3 ortamında çoğalabilmesi nedeni ile bu ortamda etkili bir ayırım sağlanamayabilmektedir.

1983’te Roy ve Sasser, başta *Rhizobium vitis* olmak üzere diğer *Rhizobium* türlerinin de başarılı bir şekilde izole edilebilmesini sağlayan oldukça seçici bir besi ortamı dizayn etmişlerdir. Agar, maya ekstraktı, adonitol, borik asit, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, magnezyum sülfat gibi kimyasallar ve klorotalonil, trimetoprim, trifeniltetrazolyum klorür, D-sikloserin gibi antibiyotikler içermektedir. Ortamda *Rhizobium* kolonileri şeffaf hale ile çevrilmiş bordo koloniler şeklinde kendini göstermektedir (Şekil 2.13). Besi ortamına tellürit eklenerek ortamın seçiciliği arttırılabilmektedir (Shams vd 2012). *Rhizobium* strainlerinin besi ortamında selekte edilmesinde kullanılabilecek antibiyotikler ve konsantrasyonları Çizelge 2.3’te verilmiştir.



Şekil 2.13. Roy & Sasser selektif besi ortamında karakteristik *Rhizobium vitis* kolonileri
(Bu çalışmadan)

Çizelge 2.3. *Rhizobium* strainlerinin besi ortamında selekte edilmesinde kullanılabilecek antibiyotikler ve konsantrasyonları (Wise vd 2006)

Antibiyotik	Stok Konsantrasyon (mg/ml)	Antibiyotik Solventi	Katı Besiyeri (µg/ml)	Sıvı Besiyeri (µg/ml)
Karbenisilin	100	Su	100	30-50
Kloramfenikol	3	Etanol	3	3
Eritromisin	100	Etanol	150	100
Gentamisin	100	Su	100	100
Kanamisin	50	Su	50	10-20
Rifampisin	10	Metanol	10	10
Spektinomisin	100	Su	100	25-50
Tetrasiklin	3	%50 Etanol	3	1,5

Rhizobium vitis, ksilem vasıtasıyla bitki içinde sistemik olarak yayıldığından, hastalıklı bitki dokusu, toprak, su gibi ortamlardan izolasyonu kadar vasküler özsudan izolasyonu da önem arz etmektedir. Özellikle bahar aylarında asmalardan alınan eksudatların izolasyon için uygun olduğu bilinmektedir. Buna alternatif olarak asma çubuklarından vakum pompası yardımı ile bitki özsuğunun çekilmesi tüm yıl içinde uygulanabilecek bir yöntemdir. Bu yöntem sadece asmada değil diğer odunsu bitkilerde de kullanılabilmektedir (Moore vd 1980, Bazzi vd 1987).

Hastalık etmeninin *in vitro* tanısı ile ilgili ilk çalışmalar, indikatör bitkiler yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Özellikle hastalığın keşfini izleyen otuz yılda pek çok

farklı bitki üzerinde pek çok farklı izolat test edilmiştir (Binns 2008). *Rhizobium vitis* strainlerinin patojenisiteleri, asıl konukçusu olan asmanın yanı sıra domates, ayçiçeği gibi patojenin konukçu aralığında bulunan indikatör bitkilerle birlikte havuç diskleri ile de belirlenebilmektedir. Havuç diskleri pratik kullanım avantajlarına karşın, bazen düşük patojenisite gösteren strainler şüpheli sonuçlar verebilmektedir (Burr ve Katz 1983). Konukçu aralığı dar olan *Rhizobium* strainlerinin belirli bir indikatör bitki ile saptanabilmesi ise oldukça güç olmaktadır (Pulawska ve Sobiczewski 2005). Bunun yanında domates, ayçiçeği ve asma gibi konukçularda *Rhizobium* türlerinin tümör formasyonu 4-8 hafta (Sawada vd 1990), tütünde, 3-6 hafta (Kaufmann vd 1996) gibi uzun süreler almaktadır.

İndikatör bitki ile ilgili çalışmalar 1916'da Smith'in ayçiçeğini, papatyayı ve şeker pancarını ve bazı kültür bitkilerini kullanması ile başlayıp, 1919, 1921, 1923 ve 1924'te Levine, 1920'de Levin ve Levine, 1923'te Riker ve 1927'de Brown'un çalışmaları ile devam eder. Bu çalışmalarda farklı dilüsyonlarda hazırlanan inokulumlar ile bitkiler inoküle edilmiş ve tümör gelişimi izlenmiştir. Araştırmacılar, tümör gelişimi haricinde bitkide meydana gelen belirtileri, yaprak saplarında epinasti, adventif kök oluşumu, tomurcuklanmada azalma, yaşlanan yaprakların dökülmesinde gecikme şeklinde sıralamışlardır.

1938'de Locke ve arkadaşları, Taç Gali etmeni ile enfekte edilmiş domateslerde belirtileri ve tümör gelişimini izlemiş, bitki gelişiminden sorumlu hormonların *Rhizobium tumefaciens* kaynaklı tümör oluşumlarındaki rollerini incelemiştir. Araştırmacılar bitkinin hastalığa gösterdiği tepkileri yakından incelemiş, tipik hastalık belirtilerine ek olarak bitkide hormonal düzenin bozulmasından kaynaklanan, yaprak saplarında epinasti, adventif kök oluşumu, kambiyal aktivitenin stimülasyonu, tomurcuk oluşumunun inhibisyonu, yaşlı yapraklarının dökümünün gecikmesi belirtilerini gözlemlemişlerdir.

1942'de Hildebrand, indikatör bitki olarak domatesi kullandığı çalışmasında mikromanipülatör yardımı ile tek bir bakteri hücresinin hastalık gelişimi için yeterli olduğunu göstermiştir.

1954'te McKeen, bakla (*Vicia faba*) ile şeker pancarının (*Beta vulgaris*) ur teşkili için uygun bitkiler olduğuna işaret etmiş 1958'de Ark ve Schroth ise havuç ile turp (*Raphanus sativus*) dilimlerine patojen bakteri süspansiyonu ile inoküle edilmesiyle urların meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Türkiye'de ise etmenin topraktan izolasyonu ve indikatör bitkiler yardımıyla teşhisi ile ilgili çalışmalar Ankara Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Meyve ve Bağ Hastalıkları Laboratuvarı'nda yapılmıştır (Öktem 1972).

1975'te Miller, krizantemden izole ettiği *Rhizobium tumefaciens* strainlerini tanılamak amacıyla domates, ayçiçeği, gül, yıldız çiçeği (*Dahlia* spp.), söğüt (*Salix* spp.), hikori (*Carya* spp.), Çöven (*Gypsophyla* spp.) ve *Rubus* spp. üzerinde test etmiş ve *Rubus* türü haricinde diğer türlerde de etmenin hastalığa neden olduğunu gözlemlemiştir.

1976'da De Cleene ve De Ley, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin konukçu aralığını belirlemek amacıyla 138 farklı familyadan, 558 cins dahilindeki 1193 bitki türünün etmene karşı hassasiyetini test etmiştir. Gerçekleştirilen patojenisite testleri neticesinde, 93 familyadan, 331 cinse ait, 643 konukçu bitkinin *Rhizobium tumefaciens* strainlerine karşı hassas olduğu kaydedilmiştir. Test edilen bitkilerin %55'inin patojenin konukçu aralığında olduğu ifade edilmiştir. Açık tohumlu bitkiler ve çift çenekli kapalı tohumlu bitkilerin, toplam konukçu aralığının %60'ını temsil ettiği görülmüştür. *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin konukçu olarak yüksek bitkileri tercih ettiği saptanmıştır. Konukçular içinde tek çenekli bitkilerin oranı %3 olarak belirlenmiştir. Tek çenekli konukçuların Liliales ve Arales familyaları dahilinde olduğu belirlenmiş, ancak bitkilerin taksonomik pozisyonu ile patojene olan hassasiyetleri arasında belirli bir ilişki tespit edilememiştir.

1979'da Anderson ve Moore, *Rhizobium* strainlerinin konukçu spesifikliğini belirlemek amacıyla 26 farklı konukçudan izole edilmiş, 176 *Rhizobium* straini bilinen 11 *Rhizobium* konukçusuna inoküle etmişlerdir. Çalışmada test bitkisi olarak, domates, datura (*Datura stramonium*), ayçiçeği (*Helianthus annuus*), kalanşo (*Kalanchoe daigremontiana*), bezelye (*Lathyrus hirsutus*), turp, erik (*Prunus cerasifera*), fasulye (*Phaseolus vulgaris*), papatya (*Argyranthemum frutescens*), şeker pancarı ve elma kullanılmıştır. Test edilen strainlerden hiçbirisi test edilen konukçu bitkilerin tamamında patojenik bulunmamıştır. 27 strainin patojenik olmadığı belirlenmiştir. İzole edilen strainlerin sadece %3'ünün sadece izole edildikleri konukçularda patojen olduğu belirlenmiştir. Bu durum orijin konukçunun, strainin konukçu aralığı üzerinde minimal etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. Domates ve daturanın test edilen diğer konukçulardan daha fazla strain tarafından enfekte edildiği gözlemlenmiştir.

1984'te Burr ve Katz, Taç Gali ile enfekteli asmaların öz suyundan, tümör dokularından ve rizosferlerinden izole ettikleri 30 *Rhizobium vitis* strainini test etmek amacıyla indikatör bitki olarak ayçiçeğini kullanmıştır. Tümör dokularından izole edilen izolatların %97'sinin ayçiçeğinde patojen olduğunu, topraktan elde edilen izolatların ise ancak %5'inin ayçiçeğinde patojen olduğunu bildirmişlerdir.

1986'da Tarbah ve Goodman, asmalardan izole ettikleri 36 *Rhizobium* straininin patojenisite testleri için domates, Hint yağı bitkisi (*Ricinus communis*) ve farklı asma kültivarlarını kullanmışlardır. *Rhizobium* izolatlarının 31'i ile asmalar yeniden hastalandırılabilmiştir. 29 izolatın domatesi, 27 izolatın da Hint yağı bitkisini hastalandırabildiği belirlenmiştir.

Rhizobium vitis strainlerinin pek çoğu, diğer *Rhizobium* türlerinden farklı olarak ur oluşumunun yanı sıra asmalarda kök çürüklüğüne de sebep olmaktadır. Asmadan farklı indikatör bitkilerde ise kök çürüklüğü meydana gelmemektedir. Bu durum, çeşitli şekillerde incelenmekte ve *Rhizobium vitis* türünün tanımlanmasında bir kıstas olarak kullanılabilir (Burr vd 1987-a). 1987'de Burr ve arkadaşları bu amaçla, *Rhizobium vitis* strainlerinin kök çürüklüğü oluşturma yeteneklerini farklı çeşitler üzerinde iki ayrı yöntemle test etmişlerdir. İlk yöntemde, sürgünlerin köklerini 1×10^8 cfu/ml konsantrasyona sahip süspansiyona daldırarak dikim yaptıktan iki hafta sonra yaşayan sürgünlerin taze ağırlıklarını hesaplamışlar, ikinci yöntemde ise tohumlar petri kabı içinde nemli hücrelerde çimlendirildikten sonra, içinde steril perlit bulunan petrilere

transfer edilmiş ve bunların kök boğazlarına yine 1×10^8 cfu/ml'lik bakteri süspansiyonundan iğne yardımıyla inoküle edilmiştir. Sonuç olarak sadece asma köklerinde kök çürüklüğü oluştuğunu ve asma çeşitleri arasında kök çürüklüğü bakımından farklılıklar bulunduğunu, buna karşın indikatör bitki olarak kullanılan ayçiçeği ve fasulye bitkilerinde kök çürüklüğü oluşmadığını ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, tümörjenik olmayan strainlerinde de kök çürüklüğüne sebep olabildiğini, kök çürüklüğü oluşturma durumunun tümör oluşturma kabiliyetinden bağımsız olduğunu ifade etmişlerdir.

1988'de Szegedi ve arkadaşları, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin ur oluşturma bakımından *Rhizobium vitis* strainlerinden farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında, *Rhizobium vitis* strainleri diğer türlerin aksine kalanşonun gövdesinde çok zayıf patojenisite göstermiş, sürgün uçlarında çok büyük urlara neden olmuş ve bu urlar morfolojik olarak farklılıklar göstermiştir. Araştırmacılar, bu durumun biyotiplerin farklı ur oluşturma yapılarından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanında, *Rhizobium vitis* strainleri tarafından oluşturulan urların *Rhizobium tumefaciens* strainleri tarafından oluşturulan urlara göre çok daha fazla oktopin içerdiğini tespit etmişler, urların nopalin içeriğinde ise bir farklılık gözlemlememişlerdir. Opinlerin sadece hastalıklı dokularda değil, sağlıklı bitki aksamalarında da bulunduğu, opinlerin sadece bir bölgede lokalize olmadığı, bitki içerisinde taşındığı belirlenmiştir. Bu durum, patojenin bitki içinde sistemik olarak bulunması ile açıklanmaktadır.

1989'da Szegedi ve arkadaşları, asmada *Rhizobium vitis*'e karşı asmada üç tip durum oluştuğunu belirlemişlerdir. Bunlardan ilki, gerek nopalin gerekse oktopin sentezinin yara dokularında bulunmasına karşın ur oluşmaması, diğeri bazı izolatların yara kalluslarında yeterli miktarda opin sentezi yapamamaları, üçüncü ve sonuncu ise vitopin tipi strainlerin ur değil daha çok nekroz oluşturduğu şeklindedir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, opin sentezini takiben mutlaka ur oluşumunun şart olmadığını, ancak mekanizmasının da tam olarak ne olduğunun bilinmediğini ifade etmişlerdir. Vurgulanan bir başka konu ise izolatların tek tek ya da birlikte enfeksiyonları durumunda kimi zaman ur oluşumu gözlenmesi, kimi zaman da hastalıkta bir azalma ve engellenme görülmesidir. Kombine inokülasyonlar sonunda bazı çeşitlerde eşit miktarda opin tespit edilirken, bazılarında opin miktarlarında azalma gözlenmiştir.

1990'da Ophel ve Kerr, *Rhizobium vitis* strainlerini tanılamak ve diğer patojenik *Rhizobium* türleri ve *Rhizobium radiobacter* strainlerinden ayırmak için pek çok farklı testi içeren bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, gerçekleştirdikleri biyokimyasal ve fizyolojik testler, monoklonal antikör testleri ve nükleik asit tabanlı testleri kapsayan çalışmalarını desteklemek amacıyla, indikatör bitki olarak ayçiçeği, böğürtlén (*Rubus ursinus* × *Rubus idaeus*) ve asma kullanmışlardır. *Rhizobium tumefaciens*'in asma ve ayçiçeğinde patojenik olduğu gözlemlenmiş, ancak böğürtlénde herhangi bir tümör oluşumuna neden olmadığı gözlemlenmiştir. *Rhizobium radiobacter* strainlerinin ise çalışmadaki konukçuların hiçbirinde patojenik olmadığı belirlenmiştir. *Rhizobium rubi* strainlerinin de sadece böğürtlénde hastalığa neden olduğu ifade edilmektedir. Çalışmada kullanılan 10 *Rhizobium vitis* straininden 9'unun ayçiçeğinde ve asmada hastalığa neden olduğu gözlemlenmiştir. Hastalığa neden olan 9 strainin, 8'inin oktopin, 1 strainin nopalin katabolize eden strain olduğu belirlenmiştir. Patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin tamamının asma köklerinde nekrozlara neden olduğu

belirtilmiş, ancak nekroz oluşumunun patojenik *Rhizobium tumefaciens* ile enfekte edilmiş bitkilerde ortaya çıkmadığı saptanmıştır.

1990'da Sawada ve arkadaşları asmalardaki tümörlerden izole ettikleri *Rhizobium* türlerinin, asmada, ayçiçeğinde ve domateste ur oluşturma kabiliyetlerini incelemişlerdir. Aynı zamanda uyguladıkları kültürel, biyokimyasal ve fizyolojik testlerle asmalardan izole ettikleri 25 *Rhizobium* strainin 22'sinin *Rhizobium vitis* olarak tespit edildiğini ifade etmişlerdir.

1990'da Michel ve arkadaşları, fidanlık toprağı, asma, kiraz (*Prunus avium*) ve kavak (*Populus* spp.) ağaçlarından izole ettikleri *Rhizobium* strainlerini serolojik, biyokimyasal yöntemler, bakteriyel zarftan elde edilen protein paternlerinin belirlenmesi ve DNA hibridizasyon teknikleri kullanarak tanılamaya çalışmışlardır. İzole edilen altı *Rhizobium* straininden hazırlanan antiserumlar ile *Rhizobium tumefaciens* C58 straininden elde edilen antiserumların etkisi endirekt immünofloresan yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde bu *Rhizobium* strainlerinin *Rhizobium tumefaciens* oldukları tespit edilmiştir.

1991'de Haas ve arkadaşları, asmalarda meydana gelmiş tümörlerden izole ettikleri 8 *Rhizobium* strainini biyokimyasal ve fizyolojik testler, agrosin 84'e hassasiyet ve indikatör bitkilere verdikleri tepkilere göre tanılamışlardır. İndikatör bitki olarak asma, domates, tütün ve kalanşo kullanılmıştır. İzole edilen strainlerin 2'sinin *Rhizobium vitis* straini olduğu, bu strainlerin asma ve tütünde tümör oluşumuna neden olurken domates ve kalanşoda tümör oluşturmadağı tespit edilmiştir.

1991'de Bush ve Pueppke, krizantemde meydana gelmiş tümörlerden izole ettikleri *Rhizobium* strainini biyokimyasal ve fizyolojik testler, agrosin 84'e hassasiyet ve indikatör bitkilere verdikleri tepkilere göre tanılamışlardır. İndikatör bitki olarak domates, tütün ve kalanşo kullanılmıştır. izole edilen strainlerin domates, tütün, şeker pancarı, karnabahar (*Brassica oleracea*), kalanşo, kadife çiçeğı (*Tagetes patula*), bezelye, soya fasulyesi, ayçiçeğı ile test edilmiş ve strainin tüm çeşitlerde tümör oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir.

1997'de Moore ve arkadaşları, farklı bitkilerdeki tümörlerden izole ettikleri 43 farklı *Rhizobium* straininin opin katabolizmalarını araştırmak amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada kullanılan strainlerin patojenisite testlerini gerçekleştirmek amacıyla domates ve ayçiçeğı bitkilerini kullanmıştır. Araştırmacılar strainlerin sentezlettiğı opin tipinin domates veya ayçiçeğı gibi konukçularda belirli bir konukçu ayırma neden olmadığını belirlemişlerdir.

2000'de Ride ve arkadaşları, 111 patojenik *Rhizobium* strainini karakterize etmek için nükleik asit tabanlı testler, biyokimyasal ve fizyolojik testler ve patojenisite testleri uygulamıştır. Farklı konukçulardan izole edilmiş *Rhizobium* türlerinin yaklaşık %60'ının datura ve domateste, %70'inin kalanşoda tümör oluşturduğu gözlemlenmiştir. Asmalardan izole edilmiş 10 *Rhizobium* straininden 7 tanesinin domateste patojenik olmadığı, ancak bu 7 strainin 3 tanesinin daturada tümör oluşumuna neden olduğu gözlemlenmiştir. *Prunoideae*, *Pomoideae*, *Populus* spp. ve *Chrysanthemum* spp. gibi farklı konukçulardan izole edilmiş *Rhizobium* strainlerinin hemen hemen tüm test

bitkilerinde patojen olduğu belirtilmiştir. *Rhizobium vitis* strainlerinin tamamının domates ve kalanşoda tümöre neden olduğu belirlenirken bazı *Rhizobium vitis* strainlerinin daturada tümöre neden olmadığı belirlenmiştir.

2011’de Tolba ve Zaki, bağlarda meydana gelen tümörlerden izole ettikleri bakterileri *Rhizobium vitis* olarak tanılamış, bu strainlerin asma, domates, kalanşo, ayçiçeği, datura, tütün ve sirkende (*Chenopodium album*) ur oluşturma kabiliyetlerini incelemiş, etmenlerin konukçu aralığı belirlenmeye çalışılmıştır. Tümör oluşturan tüm patojenik strainlerin poligalakturonaz ve endoglukanaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. *Rhizobium vitis* olarak tanılanan 12 strainin tamamı asmada ur oluşumuna neden olurken, sadece 5 strainin domateste ur oluşturduğu kaydedilmiştir.

Rhizobium türlerinin tanılanmasında biyokimyasal ve fizyolojik testler uzun yıllar boyunca pek çok farklı araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Baldwin ve Fred 1927, Hofer 1941, Lange 1961, Graham 1964, Keane vd 1970, White 1972, Kersters vd 1973, Kerr ve Panagopoulos 1977, Süle 1978, Holmes ve Roberts 1981, Tarbah ve Goodman 1986, Bouzar ve Moore 1987-a, Holmes 1988, Ophel ve Kerr 1990, Bush ve Pueppke 1991, Haas vd 1991, Sawada ve Ieki 1992-b, Nagai-Miyata vd 1993, Sawada 1994, Bouzar vd 1995, Mohammadi ve Fatehi-Paykani 1999, Ride vd 2000, Argun vd 2002, Matthyse 2005, Genov vd 2006, Tolba ve Zaki 2011), *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi* ve *Rhizobium larrymoorei* türlerine ait başlıca biyokimyasal ve fizyolojik özellikler Çizelge 2.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi* ve *Rhizobium larrymoorei* türlerine ait başlıca biyokimyasal ve fizyolojik özellikler (Moore vd 1980, Kerr 1986, Ophel ve Kerr 1990, Bush ve Pueppke 1991, Bouzar vd 1995, Ride vd 2000, Bouzar ve Jones 2001, Argun vd 2002, Kuykendall vd 2005, Matthyse 2005)

Özellik	<i>Rhizobium tumefaciens</i>	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	<i>Rhizobium vitis</i>	<i>Rhizobium rubi</i>	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
Peritrik flagella	1-4	1-4	1-4	1-4	+
3-Ketolaktoz üretimi	+	-	-	-	-
Biyotin ihtiyacı	-	+	+	+	-
Pantotenat ihtiyacı	-	-	+	-	-
Tiyamin ihtiyacı	-	-	-	-	-
Litmus sütü testi	Alkali	Asidik	Alkali	Alkali	Alkali
Ferrik amonyum sitrat testi	+	-	-	-	-
pH aralığı	5-9	5-9	5-9	5-9	-
28 °C’de gelişim	+	+	+	+	-
35 °C’de gelişim	+	-	-	-	-
37 °C’de gelişim	+	-	-	+	-
40 °C’de gelişim	-	-	-	-	-
%1’lik NaCl’de gelişim	+	-	-	+	+
%2’lik NaCl’de gelişim	+	-	-	+	+
%4’lük NaCl’de gelişim	-	-	-	-	-
Onkojenik kabiliyet	+	+	+	+	+
Simbiyotik kabiliyet	-	-	-	-	-
Adonitol kullanımı	+	+	+	+	+

(Devamı arkada)

Çizelge 2.4.'ün devamı

Akonitat kullanımı	+	-	-		
cis-Akotinik Asit kullanımı	+	+	+	+	-
L-α-Alanin kullanımı	+	+	+	+	+
β-Alanin kullanımı	-	Değişken	-		
D-Alanin kullanımı	Değişken	-	-	+	-
Amigdalın kullanımı	-	+	Değişken		
DL-3 Aminobütirat kullanımı	-	-	-		
DL-4 Aminobütirat kullanımı	Değişken	-	+		
DL-5 Aminovalerat kullanımı	-	Değişken	-		
γ-Aminobütirik Asit kullanımı	-	-	-	+	-
L-Arabinoz kullanımı	+	+	Değişken	Değişken	+
D-Arabitol kullanımı	+	+	-	-	-
Arbutin kullanımı	-	+	+		
L-Arjinin kullanımı	-	+	-	Değişken	
Asetat kullanımı	+	-	+		
Asetik Asit kullanımı	+	-	-	+	-
N-Asetil-D-Galaktozamin kullanımı	Değişken	-	Değişken	+	-
N-Asetil-D-Glikozamin kullanımı	+	-	+	+	+
L-Aspartat kullanımı	+	+	+	+	+
Bütirat kullanımı	-	-	+		
Dulsitol kullanımı	+	Değişken	-	-	
Eritritol kullanımı	-	+	-	+	-
Etanolamin kullanımı	-	+	-		
L-Fenilalanin kullanımı	-	-	-	-	
Formik Asit kullanımı	Değişken	+	Değişken	-	-
Fükoz kullanımı	+	+	+		+
D-Galaktonik Asit kullanımı	+	Değişken	-	+	-
Glikojen kullanımı	+	Değişken	+	-	+
Glikoz 1-Fosfat kullanımı	+	-	-	-	+
Glikoz 6-Fosfat kullanımı	+	-	-	-	+
Metil-D-Glikozit kullanımı	-	+	-		
Glisil-L-Aspartik Asit kullanımı	+	-	-	+	-
Glukonat kullanımı	+	+	-		-
D-Glukozaminik Asit kullanımı	-	+	-	+	-
D-Glukuronik Asit kullanımı	+	-	-	-	-
L-Glutamat kullanımı	Değişken	Değişken	Değişken	Değişken	+
Hidroksi-L-Prolin kullanımı	+	-	-	+	-
m-Hidroksibenzoat kullanımı	-	-	-		
p-Hidroksibenzoat kullanımı	Değişken	+	+		
DL-3-Hidroksibütirat kullanımı	+	Değişken	+		
α-Hidroksibütirik Asit kullanımı	Değişken	-	-	+	Değişken
β-Hidroksibütirik Asit kullanımı	Değişken	Değişken	+	+	-
İnozin kullanımı	-	-	-	+	-
İzobütirat kullanımı	-	-	-		
L-İzolösin kullanımı	-	Değişken	-	-	
DL-Karnitin kullanımı	-	Değişken	-	+	-
α-Ketobütirik Asit kullanımı	Değişken	-	-	+	Değişken
2-Ketoglukonat kullanımı	+	+	Değişken		
5-Ketoglukonat kullanımı	+	+	-		

Çizelge 2.4.'ün devamı

2-Ketoglutarat kullanımı	-	Değişken	-		
α-Ketoglutarik Asit kullanımı	-	Değişken	-	+	-
Ksilitol kullanımı	+	+	-	-	
Ksiloz kullanımı	Değişken	+	Değişken		+
Metil-D-Ksilozit kullanımı	+	+	-		
DL-Laktat kullanımı	+	+	+	+	+
α-Laktoz kullanımı	+	+	+	-	-
α-D-Laktoz Laktuloz kullanımı	Değişken	+	+	-	+
Liksoz kullanımı	+	+	+		
L-Lisin kullanımı	-	+	-		
L-Lösin kullanımı	Değişken	Değişken	-	Değişken	-
Malonik Asit kullanımı	-	+	+	-	-
D-Mandelat kullanımı	-	-	-		
L-Mandelat kullanımı	-	-	-		
Mannitol kullanımı	+	+	+	+	+
D-Melezitoz kullanımı	+	-	-	-	
D-Melibiyoz kullanımı	+	+	+	-	+
β-Metilglukozit kullanımı	+	+	Değişken	-	-
L-Ornitin kullanımı	-	+	-		
L-Pirolglutamik Asit kullanımı	+	+	+	-	-
Propiyonat kullanımı	-	+	-		
Propiyonik asit kullanımı	+	-	-	+	Değişken
Prüvat kullanımı	+	+	+	+	+
D-Rafinoz kullanımı	+	+	+	-	-
D-Sakkarik Asit kullanımı	-	+	Değişken	-	+
Salisin kullanımı	-	+	+		
Sarkozin kullanımı	-	+	-		
L-Serin kullanımı	-	+	Değişken	Değişken	
L-Sistein kullanımı	-	Değişken	-		
Sitrat kullanımı	-	+	+		-
L-Sitrülin kullanımı	-	+	-		
L-Sorboz kullanımı	Değişken	+	-		
Süksinamik Asit kullanımı	-	+	+	-	-
D-Tagatoz kullanımı	+	+	-		
D-Tartarat kullanımı	+	-	-		-
L-Tartarat kullanımı	-	-	+	-	
mezo-Tartarat kullanımı	+	-	-		
L-Tirozin kullanımı	-	-	-	-	
L-Treonin kullanımı	+	-	Değişken	+	+
Trigonellin kullanımı	-	Değişken	+		
Tween 20/Tween 80 oksidasyonu	+	Değişken	+	+	-
Ürokanik asit kullanımı	-	-	-	+	-
L-Valin kullanımı	-	Değişken	-		

1964'te Graham, baklagillerde nodül oluşturan *Rhizobium* türleri ve *Rhizobium tumefaciens* üzerinde gerçekleştirdiği biyokimyasal ve fizyolojik testlerin verilerini bilgisayar kullanarak nümerik analize tabi tutmuştur. Graham, metilen mavisinin redüksiyonu, nitrat redüksiyonu, nitrit redüksiyonu, levan oluşumu, litmuslu sütte asit oluşumu, litmuslu sütte serum zonu oluşumu, litmuslu sütte koagülasyon, metil kırmızısı testi, indol üretimi, katalaz üretimi, oksidaz üretimi, hidrojen siyanit üretimi, jelatin

hidrolizi, üre hidrolizi, anaerobik şartlarda bakteriyel gelişim, farklı sıcaklıklarda ve farklı pH'larda bakteriyel gelişim, koloni şekli ve koloni çapı, pigmentasyon, sodyum sitrat agar besiyerinde bakteriyel gelişim, azot içermeyen besiyerinde bakteriyel gelişim, biyotinin bakteriyel gelişim için gerekliliği, tiyaminin bakteriyel gelişim için gerekliliği, kalsiyum pantotenatın bakteriyel gelişim için gerekliliği, farklı sodyum klorür konsantrasyonlarında bakteriyel gelişim, dekstrin, maltoz, laktoz, ramnoz glikoz, sükröz, mannitol, nişasta, galaktoz, sorbitol, dulcitol, inülin, rafinoz, arabinoz ve ksilozdan faydalanabilme kabiliyeti, farklı bitkilerde nodül oluşturma kabiliyeti, nodül çapı, fermentasyon halinde gaz üretimi, farklı konsantrasyonlarda streptomisin, aureomisin, teramisin, ledermisin, neomisin, kloramfenikol, penisilin, basitrasin ve eritromisine hassasiyet, 50 °C'ye dayanma süresi gibi kıstaslara göre değerlendirmiş, o dönemde *Agrobacterium* cinsi içinde yer alan *tumefaciens* ve *radiobacter* türlerini günümüzde olduğu gibi *Rhizobium* türü içinde yer alması gerektiğine kanaat getirmiştir.

1968'de Moffett ve Colwell, yavaş gelişen *Rhizobium* strainleri, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium phaseoli* ve bazı *Chromobacterium*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, türlerini morfolojik karakterler, hareketlilik, flagella yapısı, koloni karakteristikleri, kapsül varlığı, sıvı besiyerinde gelişim karakteristikleri, karbonhidrat metabolizması, Voges-Proskauer testi, farklı sıcaklıklarda bakteriyel gelişim, sodyum klorür toleransı, farklı pH'larda bakteriyel gelişim, floresan pigment, pigment, oksidaz, sitokrom oksidaz, katalaz, fosfataz, üreaz, indol, lesitinaz, 3-ketolaktoz üretimi, antibakteriyel ve antibiyotiklere hassasiyet, nitrit ve nitrat redüksiyonu, jelatin hidrolizi, litmuslu sütte asit oluşumu, litmuslu sütte serum zonu oluşumu, litmuslu sütte koagülasyon, kazein hidrolizi, peptondan amonyak üretimi, kurşun asetat agar besiyerinde hidrojen sülfür üretimi, lipolitik aktivite, sitrattan faydalanabilme, kalsiyum laktat oksidasyonu, sodyum malonat, sodyum asetat, sodyum formatın karbon kaynağı olarak kullanılması, amonyum dihidrojen fosfatın azot kaynağı olarak kullanılması, aminoasitlerin karbon ve azot kaynağı olarak kullanılması, Paton (Paton 1959) besiyerinde ketoglukanat üretimi, metilen mavisinin redüksiyonu, pektat hidrolizi, penisilinaz üretim kabiliyeti, melanin üretim mekanizması gibi 191 farklı karakteri kıstas olarak nümerik analize tabi tutmuştur. Moffett ve Colwell test uyguladığı 59 farklı bakteriyi farklı istatistiksel değerlendirme kıstasları ve bilgisayar programları kullanarak dört farklı şekilde gruplamıştır.

1972'de White, *Rhizobium tumefaciens* ile diğer *Rhizobium* türlerini karbon kaynağı olarak kullandıkları bileşikler, oksidatif veya fermentatif glikoz mekanizmaları, nişasta, kazein ve jelatin gibi bileşikler hidrolize edip edemedikleri, anaerobik arjinin mekanizmaları, 3-ketolaktoz üretimi gibi biyokimyasal ve fizyolojik karakterlerini belirlemiş ve nümerik analiz ile *Rhizobium* türlerini gruplamaya çalışmıştır. White, *Rhizobium tumefaciens* ile diğer bazı hızlı gelişen *Rhizobium* türlerini tek bir grup altında toplamıştır. *Sinorhizobium meliloti* tek başına ikinci bir grup oluştururken, *Rhizobium tumefaciens* ve taş çekirdekli bitkilerde hastalık yapan bazı *Rhizobium* strainleri bir başka grubu oluşturmuştur. *Rhizobium leguminosarum* ise araştırmacı tarafından tamamen ayrı bir grup olarak saptanmıştır.

1975'te Kersters ve De Ley, 42 patojenik *Rhizobium*, 1 patojenik olmayan *Rhizobium*, 2 *Achromobacter*, 1 *Chromobacterium*, 1 *Erwinia*, 1 *Mycoplana*, 1 *Pseudomonas* ve 1 *Zymomonas* straininden elde ettikleri çözülebilir proteinlerin PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) çalışmalarından sağladıkları verileri nümerik analize tabi tutmuşlardır. Araştırmacılar, elektroforetik protein paternlerinin elde edilme sürecini katı standartlara bağlayıp, protein fragmentlerinin daha keskin olmasını sağlamışlar ve analizin tekrar edilebilirliğini arttırmışlardır. Elde ettikleri tutarlı verilerin nümerik analizini bilgisayar ile gerçekleştirmişlerdir. Analiz neticesinde Patojenik *Rhizobium* strainleri iç farklı gruba ayrılmıştır. Patojenik *Rhizobium* strainlerinin oluşturduğu gruplar diğer bakteri türlerinden de kesin bir şekilde ayrılmıştır.

1981'de Holmes ve Roberts, 50 farklı *Rhizobium* cinsi bakteri üzerinde nümerik analizler gerçekleştirmiş ve strainleri dört farklı gruba ayırmışlardır. Örnek grubunun büyük kısmını oluşturan ilk iki grupta *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin yer aldığı belirlenirken, üçüncü grupta *Rhizobium rubi* strainlerinin yer aldığı saptanmıştır. Sarı pigment oluşturan, türü belirlenememiş *Rhizobium* cinsi bakteriler ise dördüncü grupta yer almıştır. Holmes ve Roberts, *Rhizobium radiobacter* ile *Rhizobium tumefaciens* aynı grupta yer aldığından *Rhizobium radiobacter* isimlendirmesini reddetmiş, bu strainlerin *Rhizobium tumefaciens*'in patojenik olmayan formları olduğunu ifade etmişlerdir.

2000'de Ride ve arkadaşları, Amygdaloideae, Pomoideae alt familyalarına mensup bitkilerde, asmada, gülde, kavaklarda meydana gelmiş tümörlerden ve topraktan izole ettikleri 111 farklı *Rhizobium* straini ile nümerik analizler gerçekleştirmiştir. 167 farklı karakter kullanan Ride ve arkadaşları, 111 *Rhizobium* straininden 108'ini tür bazında karakterize etmeyi başarmıştır. Söz konusu strainlerin 28'inin *Rhizobium tumefaciens*, 33'ünün *Rhizobium rhizogenes*, 47'sinin *Rhizobium vitis* türlerine ait olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium vitis* strainlerinin de kendi içinde iki farklı gruba ayırdıklarını belirlemişlerdir.

Bakteriyel strainlerin biyokimyasal ve fizyolojik testler ile ayrımı oldukça zahmetli, tecrübe gerektiren, hataya açık ve zaman alıcıdır bu yüzden, biyokimyasal ve fizyolojik testler günümüzde yerini daha hızlı ve hassas yöntemlere bırakmıştır (Burr vd 1987-b, Miller ve Vrugink 1981, Dhanvantari 1983, Bishop vd 1989, Schaad ve Frederick 2002, Pulawska vd 2006, Lim vd 2009). Serolojik testler biyokimyasal ve fizyolojik testlere göre daha hızlı sonuç vermektedir. Ancak hedeflenmeyen strainlerdeki bazı yaygın epitopların varlığı yanlış sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Galzolari vd 1982, Crowley ve De Boer 1982, Bishop vd 1989).

1945'te Coleman ve Reid, o dönemde *Alcaligenes radiobacter* ve *Phytomonas tumefaciens* olarak adlandırılan *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium radiobacter* türlerini birbirinden ayırmak için serolojik aglütinasyon ve aglütinin absorpsiyon tekniklerinin kullanıldığı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Araştırma M (Mitoz) ve S (Sentez) fazındaki bakteriler üzerinde yapılmış, türlerin ayrımı sadece M fazında bulunan bakterilerde sağlanabilmiştir.

1958'de Mushin ve arkadaşları, *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* cinslerine ait 55 farklı bitki patojeni bakteriyi lam aglütinasyon testi, tüp aglütinasyon testi ve aglütinin absorpsiyon testi yöntemleri ile patojenleri tanılamaya çalışmışlardır. Çalışmada tüm bakteri türlerinin kesin ve pratik ayrımı sağlanamasa da kısmen başarı sağlanmış, yöntemin bitki patojeni bakterilerin tanılanmasında, epidemiyolojik çalışmalarda antiserum kullanımının kullanışlı olabileceği belirtilmiştir.

1971'de Graham, 6 *Rhizobium tumefaciens* ve 3 *Rhizobium radiobacter* strainini kullanarak antiserumlar hazırlamış o dönemde *Agrobacterium tumefaciens* ve *Agrobacterium radiobacter* olarak adlandırılan bakteri türlerini *Rhizobium* türlerinden ayırt etmeye çalışmıştır. Graham, belirlediği üç antijenin test ettiği tüm strainlere bulunduğunu, beş tanesinin strainlere has olduğunu tespit etmiş, ancak bu antijenlerin türlere dağılımı ile ilgili bir çıkarımda bulunamamıştır.

1986'da Bouzar ve arkadaşları, gerçekleştirdikleri çalışmada o dönemde *Agrobacterium* olarak adlandırılan türlerle, *Rhizobium* olarak adlandırılan türleri 50S ribozomal alt üniteleri esas alan beş farklı antiserum kullanarak birbirinden ayırmaya çalışmışlardır. İmmünodifüzyon jel yönteminin kullanıldığı çalışmada *Agrobacterium* ve *Rhizobium* türlerinin serolojik olarak özdeş olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, çalışmada kullandıkları antiserumları *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Clavibacter* gibi farklı bitki patojeni bakteri cinslerine karşı test etmiş ve antiserumların *Agrobacterium* ve *Rhizobium* türlerine has olduğunu belirlemişler, bu antiserumların bu grup bakterilerin tanılanmasında kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

1987'de Alarcon ve arkadaşları, immünodifüzyon, indirekt immünofloresan ve indirekt ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemlerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, on farklı antiserum kullanarak *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium radiobacter* türlerini etkin bir şekilde ayırmayı başarmışlardır. Lakin *Rhizobium vitis* strainlerinde heterojen sonuçlar elde etmişler, etkin bir ayırım gerçekleştirilememişlerdir.

1987'de Bouzar ve Moore çalışmalarında (Bouzar ve Moore 1987-b) immünodifüzyon ve immünofloresan yöntemleri ile ham ribozom preparatlarına karşı hazırladıkları poliklonal antiserumları kullanmışlardır. Pek çok *Rhizobium* türünde türe spesifik presipitin antikorü gözlemlenirken, bu antikoru tüm *Rhizobium* türlerinde bulunmadığı ve bakterinin plazmit taşıyıp taşımadığının bu durumu etkilemediği belirlenmiştir.

1989'de Bishop ve arkadaşları, ELISA yöntemini kullanarak *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium radiobacter*, diğer bitki patojenleri, simbiyontlar ve saprofitler ile reaksiyon vermeyen, sadece *Rhizobium vitis* ile reaksiyon veren AbF21-1D3G7C8 adını verdikleri bir antikor belirlemeyi başarmışlardır. Araştırmacılar, tespit ettikleri bu antikoru *Rhizobium vitis* strainlerinin laboratuvar şartlarında tespitinde, kantitatif testlerde, sağlıklı üretim materyallerinin kataloglanması ve sertifikasyonunda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

1990'da Ophel ve Kerr, farklı patojenik *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi* ve *Rhizobium radiobacter* strainlerini *Rhizobium vitis* strainlerinden ayırmak için gerçekleştirdiği çalışmada biyokimyasal ve fizyolojik testler ve nükleik asit tabanlı testlerin yanında 1988'de Bishop ve arkadaşlarının (Bishop vd 1989) tespit edip AbF21-1D3G7C8 adını verdikleri antikoru kullanarak serolojik testler gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, çalışmada kullanılan 10 *Rhizobium vitis* straininin tamamını tanımlayabilmişlerdir. Diğer *Rhizobium* türlerine ait strainlerin bu antikorla negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. AbF21-1D3G7C8 antikoru kullanılarak Bishop ve arkadaşlarının ve Ophel ve Kerr'in çalışmalarında toplam 42 farklı *Rhizobium vitis* straini tanımlanmıştır.

1992'de Sawada ve arkadaşları gerçekleştirdikleri iki ayrı çalışmada (Sawada vd 1992-b, 1992-c) *Rhizobium vitis* ve diğer *Rhizobium* türlerini somatik antijenler kullanarak SAT (Slide Agglutination Test) ve ELISA yöntemleri ile tanılamaya çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmalar neticesinde *Rhizobium* türlerinin serolojik bir heretojenisiteye sahip olduğunu ifade edilmiş, *Rhizobium* türlerinin serolojik olarak dört farklı gruba ayrılması gerektiği önerilmiştir.

1998'de Benlioğlu ve Özakman, *Rhizobium vitis* strainlerine karşı elde ettikleri poliklonal antiserum ile immünofloresan testler gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen antiserumun Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis* izolatlarıyla pozitif reaksiyon verdiği, buna karşın *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, diğer bitki patojenleri ve simbiyotik bakterilerle reaksiyon oluşturmadığını saptanmıştır. Çalışmada, Orta Anadolu Bölgesi'nde sağlıklı görünen 150 asmadan elde edilmiş numunelerin 7 tanesinin sürgünlerinden, enfekteli 8 asmadan elde edilmiş numunelerin 6 tanesinden *Rhizobium vitis* tespit edilmiştir. Elde edilen antiserumun, düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında *Rhizobium tumefaciens* strainleri ile de pozitif sonuç verebildiği görülmüştür.

2008'de Kawaguchi ve arkadaşları (Kawaguchi vd 2008-b), somatik antijenlere karşı hazırladıkları antiserumlar ile testler gerçekleştirmiş yaptıkları aglütinasyon testleri sonucunda *Rhizobium vitis* strainlerini dört farklı serogruba ayırmışlardır. Araştırmacıların serolojik çalışmalara paralel olarak gerçekleştirdikleri tekrarlı sekans temelli PCR çalışmaları da yapılan serolojik ayrımların büyük ölçüde desteklediği görülmüştür. Yapılan moleküler çalışmalarda söz konusu dört serogrup haricinde beşinci bir patojenik olmayan *Rhizobium vitis* grubunun varlığı belirlenmiştir.

2011'de Tolba ve Zaki, bağlarda meydana gelen tümörlerden izole ettikleri bakterileri, Bishop ve arkadaşlarının 1989'daki çalışmalarında kullandıkları monoklonal antikorları kullanarak *Rhizobium vitis* olarak tanılamışlardır. Serolojik testlerinin sonuçlarını, patojenlerin asmada ur oluşturma kabiliyetleri, biyokimyasal testler, fizyolojik testler ve poligalakturonaz genine spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR testleri ile desteklemiştir.

Özellikle Gram-negatif bakterilerin tanımlanmasında kullanılan bir başka yöntem, 9-20 karbon uzunluğunda yağ asitlerinin silika kapiler kolonlar ile gaz kromatografisi veya gaz-sıvı kromatografisi vasıtasıyla karakterize edilmesi esasına dayanan otomatize edilmiş mikrobiyal tanımlama sistemleridir (Sasser 1990). Mikrobiyal tanımlama

sistemlerine ait kütüphanelerde tanılanmış yağ asitleri, kısa süre içinde pek çok farklı bakteriyi tanılama imkanı verdiği için pek çok laboratuvar da bakteriyel analizler için kullanılmaktadır (Tighe vd 2000).

1992'de Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1992-d), 65 farklı patojenik *Rhizobium* strainini gaz-sıvı kromatografisi ile tanılamıştır. Araştırmacılar, 12 farklı yağ asidi metil ester (FAME) kullanarak strainleri üç farklı gruba ayırmışlar ve biovar düzeyinde tanılamayı başarmışlardır. Birinci grup, üçüncü gruptan 16:1 ve 18:1 yağ asitlerinin kantitatif farkları ve 17:0 siklo yağ asitlerinin varlığı ile ayrılmıştır. Diğer taraftan ikinci grup, 19:0 siklo yağ asitlerinin kantitatif farkları ve 15:0 iso 3-OH varlığı ve 18:1 3-OH yokluğu ile birinci ve üçüncü gruplardan ayrılmıştır. Biovarlar, yağ asidi profili açısından kendi içlerinde homojen bir yapı sergilediklerinden yağ asidi ile tanılama yönteminin biovar düzeyinde hızlı ve doğru bir tanılama yöntemi olduğunu ifade edilmiştir.

1993'te Bouzar ve arkadaşları (Bouzar vd 1993-a), *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium rubi* strainlerine ait yağ asidi profilleri üzerinde gaz-sıvı kromatografisi kullanarak incelemelerde bulunmuşlardır. Araştırmacılar, 95 farklı karbon kaynağının bu tespitlerde kullanılabilirliğini test etmişler, *Rhizobium* türlerinin tanılanmasında hangi yağ asitlerinin önem arz ettiğini belirlemeye çalışmışlardır. Vaksenik asidin (18:1 ω cis), tüm *Rhizobium* strainlerinde baskın yağ asidi olduğunu belirlenmiştir. 3-hidroksipalmitik asit miktarının (16:0 3-OH), *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* strainlerinde farklılık gösterdiğini bu yağ asidinin kantitatif ölçümü ile bu strainlerin tanısının yapılabileceği ifade edilmiştir. Ancak 3-hidroksipalmitik asit, *Rhizobium rubi* strainlerinde tespit edilememiştir. Diagnostik değeri olduğu belirtilen bir başka yağ asidinin de sadece *Rhizobium rhizogenes* strainlerinde rastlanan 15:0 iso 3-OH olduğu belirlenmiştir.

1993'te Weibgen ve arkadaşları, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium rubi* strainlerine ait şeker ve yağ asidi profilleri üzerinde incelemelerde bulunmuşlardır. 9 strain üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda 6-deoksiheksozlar, heksozlar ve galaktronik asit, 3-deoksi-likso-heptulosarik asit, 3-deoksi-D-manno-2-ulosonik asit gibi asidik şekerler içeren kompleks kompozisyonlara sahip olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen DOC-PAGE (Deoxycholate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) çalışmaları *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium rubi* strainlerinin R tipi lipopolisakkaritler içerirken, *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin içermediğini göstermiştir. R tipi lipopolisakkaritler O halkası içeren kısa lipopolisakkarit zincirleridir. Buna karşılık *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin ise O halkası içeren yağ asidi zincirlerinin yaklaşık 20 ünite bulunduran uzun zincirler olduğu ifade edilmektedir. Weibgen ve arkadaşları, tür ayrımının gerçekleştirilmesinde kullanılabilecek türe spesifik kemotaksonomik bir markör bileşen tespit edememişlerdir.

1995'te ve arkadaşları, ağlayan incirden (*Ficus benjamina*) izole ettikleri ve yeni bir *Rhizobium* straini olduğunu ifade ettikleri günümüzde *Rhizobium larrymoorei* olarak adlandırılan *Rhizobium* straini ile 23 *Rhizobium tumefaciens*, 16 *Rhizobium rhizogenes*, 14 *Rhizobium vitis* ve 1 *Rhizobium rubi* strainini yağ asidi profilleri bakımından karşılaştırmışlardır. Bu çalışma kapsamında patojenik *Rhizobium* strainlerinin de

karşılaştırmalı olarak yağ asidi kompozisyonu ve farklı karbon kaynaklarındaki oksidasyon kabiliyetleri incelenmiş, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin yağ asidi kompozisyonu açısından iki farklı grup altında toplandığı saptanmıştır. Birinci grupta 9 ikinci grupta 14 strain yer almıştır. *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium rubi* strainlerine ait oksidasyon kabiliyetleri Çizelge 2.4'te verilmiştir.

1996'da Jarvis ve arkadaşları, 34 *Rhizobium tumefaciens*, 16 *Rhizobium rhizogenes*, 10 *Rhizobium vitis*, 2 *Rhizobium rubi*, 21 *Rhizobium etli*, 20 *Rhizobium galegae*, 17 *Rhizobium huakuii*, 20 *Rhizobium leguminosarum*, 16 *Mesorhizobium loti*, 18 *Rhizobium tropici*, 19 *Sinorhizobium fredii* ve 20 *Sinorhizobium meliloti* strainine ait yağ asidi profillerini gaz kromatografisi tabanlı mikrobiyal tanılama sistemi ile belirlemişlerdir. Araştırmacılar, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium rhizogenes*, *Sinorhizobium fredii* ve *Sinorhizobium meliloti* strainlerini bir grup altına toplarken, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium galegae* strainlerinin başka bir grup oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Oluşan bu büyük grup içinde, patojenik *Rhizobium* türleri olan *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium vitis* kesin bir şekilde hem birbirlerinden hem de diğer *Rhizobium* türlerinden ayrılmıştır. *Mesorhizobium loti* ve *Rhizobium huakuii* strainleri ise daha küçük üçüncü bir grup oluşturmuşlardır. Araştırmacılar, hücrel yağ asidi profilleri ve filogenetik verilerin biovar sınıflandırmasını desteklediğini ifade etmişlerdir. *Rhizobium vitis* strainlerinde hakim yağ asidi grubu %68,09 ile 18:1 ω 7cis/ ω 9trans, 18:1 ω 12trans/ ω 9trans/ ω 7cis, 18:1 ω 9cis/ ω 12trans ω 7cis şeklinde belirlenmiştir. Bu yağ asidi grubunu %7,96 ile 12:0, Tanımlanamamış (ECL 10,928), 16:0 iso/14:0 32-OH, 14:0 3-OH/16:1 iso yağ asidi grubu, 6,02 ile 16:0 yağ asidi takip etmektedir.

Strain düzeyinde tanılama, filogenetik ve epidemiyolojik çalışmalar ile yakından ilgilidir. Filogenetik çalışmaların gerçekleştirilmesi için strainlerin kesin bir şekilde tanımlanabilmesi elzemdir. Her ne kadar farklı çevresel koşullarda aynı bakteri strainine rastlamak çok ender görülen bir durum olsa da bir veya bir grup strainin farklı lokasyonlarda meydana gelen hastalık vakalarından sorumlu olabildiği bilinmektedir. Bu durum tanılama çalışmalarının epidemiyolojik çalışmalar ile ilişkili olması gerektiğini göstermektedir (Shams 2012).

2000'de Tighe ve arkadaşları, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* ve *Sinorhizobium* türlerine ait 600'den fazla strainin yağ asidi profilini gaz kromatografisi tabanlı mikrobiyal tanılama sistemi ile belirlemişlerdir. Çalışmada, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* türlerinin diğer bakteri türlerinden farklı bir yağ asidi profiline sahip olduğu görülmüştür. *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Mesorhizobium tianshanense* *Mesorhizobium plurifarum*, *Mesorhizobium huakuii* ve *Mesorhizobium loti* farklı bir grup altında toplanırken, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium saheli*, *Sinorhizobium teranga*, *Sinorhizobium kostense*, *Sinorhizobium arboris* ve *Sinorhizobium meliloti* bir başka grup oluşturmuştur. *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium leguminosarum* ve *Rhizobium etli* türlerinin birbirlerine benzer yağ asidi kompozisyonuna sahip olduğu gözlemlenmiştir. *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium hainanense*. *Rhizobium tropici* ve *Rhizobium hainanense* strainlerine ait yağ asidi profillerinin, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium galegae* ve *Rhizobium tumefaciens* strainlerine ait yağ

asidi profillerinin benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *Rhizobium giardinii* ve *Bradyrhizobium* türleri kendilerine has yağ asidi profilleri ile diğer türlerden açık bir şekilde ayrılmıştır. Araştırmacılar, *Rhizobium* strainlerini tanılamada kullanılabilecek, ancak mikrobiyal tanılama sistemin kütüphanesinde yer almayan bazı yağ asitleri belirlemişlerdir. *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* strainlerine ait tespit edilen yağ asidi kompozisyonları Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi* ve *Rhizobium larrymoorei* türlerinin ortalama % yağ asidi kompozisyonları. Parantez içindeki değerler standart sapmayı ifade etmektedir. Mikrobiyal tanılama sistemin kütüphanesinde yer almayan yağ asitlerinin eşdeğer zincir uzunlukları (ECL) ile gösterilmiştir. Gaz kromatografisinde aynı alıkonma zamanına sahip yağ asitleri Sherlock MIS yazılımı tarafından tabloda gruplanmıştır. Yağ asidi grubu 1: 15:1 iso H/I, 13:0 3-OH, Yağ asidi grubu 2: 12:0, ECL 10.928, 16:1 iso I/14:0 3-OH, Yağ asidi grubu 3: 15:0 iso 2-OH, 16:1 ω 7cis, Yağ asidi grubu 4: 17:1 iso/anteiso B, Yağ asidi grubu 5: 18:1 ω 7cis/ ω 9trans/ ω 12trans, 18:1 ω 7cis/ ω 9cis/ ω 12trans şeklindedir (Tighe vd 2000, Pulawska vd 2012-b)

Yağ Asidi	<i>Rhizobium tumefaciens</i>	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	<i>Rhizobium vitis</i>	<i>Rhizobium rubi</i>	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
10:0	-	0,01 (0,05)	-		
10:0 3-OH	-	0,24 (0,22)	-	1,44 (1,07)	-
11:0 2-OH	-	-	-		
Tanımlanamamış (ECL 11,541)	-	0,10 (0,11)	-		
Tanımlanamamış (ECL 14,952)	-	0,26 (0,16)	0,13 (0,22)		
12:0 3-OH	-	-	-		
13:0 3-OH	-	-	-		
13:1 at 12-13	0,49 (0,21)	0,37 (0,10)	-	0,23 (0,10)	0,6
13:0 iso 3-OH	-	-	-		
14:0	0,11 (0,12)	-	-	0,10 (0,03)	-
Tanımlanamamış (ECL 14,780)	0,06 (0,11)	-	0,22 (0,30)		
15:0	0,29 (0,19)	-	-		
15:0 anteiso	-	-	-		
15:0 iso	-	-	-		
15:0 2-OH	-	-	-		
15:0 3-OH	0,03 (0,08)	-	-		
15:0 iso 3-OH	-	4,02 (0,54)	-		
15:1 ω 8cis	-	-	-	-	-
Tanımlanamamış (ECL 15,953)	0,27 (0,15)	0,28 (0,14)	-		
16:0	9,03 (1,29)	7,14 (1,98)	5,98 (0,91)	5,03 (0,16)	8,4
16:0 3-OH	4,76 (1,23)	5,19 (0,88)	2,28 (0,78)	4,80 (2,71)	4,2
16:0 iso	-	-	-		
16:1 ω 5cis	-	-	-		
17:0	0,13 (0,14)	0,06 (0,11)	-		
17:0 iso	-	0,60 (0,16)	-		

Çizelge 2.5.'in devamı

17:0 iso 3-OH	-	0,21 (0,18)	-		
17:0 siklo	1,60 (0,54)	0,74 (0,36)	-	-	-
17:0 3-OH	0,18 (0,18)	-	-		
17:1 ω 6cis	-	-	-		
17:1 ω 7cis	-	-	-		
17:1 ω 8cis	0,22 (0,15)	-	-		
Tanımlanamamış (ECL 17,875)	-	-	-		
18:0	0,17 (0,17)	2,14 (0,57)	1,21 (0,48)	-	-
18:0 3-OH	-	-	1,3	0,06 (0,01)	-
11 metil 18:1 ω 7cis	0,23 (0,24)	0,14 (0,17)	0,39 (0,36)	0,43 (0,16)	-
18:1 2-OH	-	2,22 (0,87)	1,29 (0,43)	-	-
18:1 ω 5cis	-	-	-		
18:1 ω 9cis	-	-	-		
Tanımlanamamış (ECL 18,794)	0,01 (0,03)	-	-		
19:0	-	-	-		
19:0 siklo ω 8cis	18,78 (5,14)	34,62 (8,96)	4,11 (2,07)	0,1 (0,03)	1,1
10 metil 19:0	1,09 (0,30)	0,11 (0,18)	2,03 (0,67)	1,76 (0,05)	-
20:0	-	-	-		
20:1 ω 9trans	-	0,04 (0,09)	-		
20:2 ω 6,9cis	0,01 (0,04)	0,13 (0,16)	-		
20:3 ω 6,9,12cis	0,33 (0,16)	2,46 (0,50)	1,67 (0,38)		
Yağ Asidi Grubu 1	0,03 (0,08)	-	-		
Yağ Asidi Grubu 2	8,15 (1,90)	3,38 (0,44)	7,91 (2,57)	17,86 (11,18)	9,6
Yağ Asidi Grubu 3	1,62 (0,40)	0,47 (0,19)	5,16 (1,16)	8,83 (2,56)	5,5
Yağ Asidi Grubu 4	-	-	-		
Yağ Asidi Grubu 5	52,41 (6,86)	35,04 (10,78)	67,62 (4,85)	59,30 (13,73)	70,90

2012'de Pulawska ve arkadaşları (Pulawska vd 2012-b), krizantem ve kiraz eriği tümörlerinden izole ettikleri Gram-negatif, çubuk şekilli, spor oluşturmeyen bakterilerin yeni bir *Rhizobium* straini olduğunu ifade etmişlerdir. Günümüzde *Rhizobium skierniewicense* olarak adlandırılan *Rhizobium* straini, 16S rDNA dizileri ve yağ asidi profilleri bakımından *Rhizobium rubi*, *Rhizobium larrymoorei*, *Rhizobium radiobacter* ve *Rhizobium vitis* strainleri ile karşılaştırmışlardır. *Rhizobium skierniewicense* strainlerde en fazla rastlanan yağ asidi %62,1 ile 18:1 ω 7cis olarak belirlenmiştir. Bu yağ asidinin ardından, yağ asidi grubu 2 (12:0 aldehit/16:1 iso/14:0 3-OH) %10,8 ile, yağ asidi grubu 3 (16:1 ω 7cis/15:0 iso 2-OH) %7,7 ile gelmektedir. Strainlerin genel yağ asidi kompozisyonunun *Rhizobium rubi* strainlerine benzer olduğu tespit edilmiştir.

2012'de Pulawska ve arkadaşları (Pulawska vd 2012-a), kiraz eriği, kiraz, *Prunus avium*×*Prunus pseudocerasus* hibrit kiraz anacı, ahududu ve asma tümörlerinden izole ettikleri Gram-negatif, çubuk şekilli, spor oluşturmeyen bakterilerin yeni bir *Rhizobium* straini olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, günümüzde *Rhizobium nepotum* olarak adlandırılan *Rhizobium* straini, 16S rDNA dizileri ve yağ asidi profilleri bakımından *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium larrymoorei*, *Rhizobium skierniewicense*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi* ve *Rhizobium pusense* strainleri ile karşılaştırmışlardır. *Rhizobium nepotum* strainlerde en fazla rastlanan yağ asidi %50-70 ile 18:1 ω 7cis olarak belirlenmiştir. Bu yağ asidinin ardından, 16:0, 16:0 3-OH, yağ asidi grubu 2 (12:0

aldehit/16:1 iso I/14:0-3OH) ve yağ asidi grubu 3 (16:1 ω 7cis/15 iso-2OH) gelmektedir. Strainlerin genel yağ asidi kompozisyonunun *Rhizobium radiobacter* strainlerine benzer olduğu tespit edilmiştir.

Bakteriyel DNA'nın saptanmasına dair metotlar, spesifik, hassas, hızlı ve rutin uygulanabilir nitelikte tanı ve tespit yapılabilmesine olanak vermektedir (Pulawska ve Sobiczewski 2005). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki spesifik bir DNA dizisinin enzimatik üssel amplifikasyonu için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Metot, basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. Bir çeşit *in vitro* klonlama olarak da tanımlanabilen PCR, 94°C-98°C aralığında gerçekleştirilen çift zincirli DNA'nın denatürasyonu, 50°C-65°C aralığında denatüre olmuş DNA zincirine oligonükleotit primerlerin bağlanması ve 72°C'de gerçekleştirilen DNA polimeraz vasıtasıyla yeni DNA zincirinin sentezlenmesi aşamalarından oluşur ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır (Mullis vd 1986, Saiki vd 1988, Henson ve French 1993, Anonim 2014-a). PCR işleminde, termal denatürasyon sıcaklıklarında yapısını koruyabilen *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerazın kullanıma sunulması ile her döngüde sisteme enzim ekleme gerekliliği ortadan kalkmış, bu sayede PCR otomatize edilebilmiştir. Termal döngü cihazlarının geliştirilmesi ile bitki patolojisi ve diğer pek çok disiplinde PCR kullanımı hızla artmıştır (Henson ve French 1993). PCR ile enfekteli bitkiden patojenin tespiti ilk kez 1991 yılında Rasmussen ve Wulff tarafından gerçekleştirilmiştir.

PCR, geleneksel tanı ve teşhis yöntemleri ile karşılaştırıldığında pek çok avantaj sunmaktadır. Teoride, radyoaktif prob kullanmadan tek bir hedef molekülü dahi tespit olanağı sağlayan bu sistem, keşfedildiği tarihe değin geliştirilen hiçbir sistemde bulunmayan hassasiyetle tanılamaya olanak vermiştir. Teoride tek bir hedef molekül tespit edilebilmesine rağmen PCR tekniğinin hassasiyeti ve etkinliği, reaksiyon karışımının kompozisyonu, uygulanan termal döngü rejimi, kullanılan primerlerin tasarımı gibi etmenlere bağlıdır (Henson ve French 1993). Sistemin gelişmesiyle mikroorganizmaların tanı ve teşhisten önce kültüre alınma zorunluluğu büyük ölçüde ortadan kalkmış, kendinden önceki tekniklerde bulunmayan bir kesinlikle tanı ve teşhis yapma imkanı doğmuştur. PCR, pek çok bitki patojenine karşı temiz bitki materyali seçiminde kullanılmaktadır (Henson ve French 1993, Louws vd 1999, Bini vd 2008-b).

Taç Gali hastalığına karşı kimyasal mücadele olanağının bulunmaması, patojenin erken tanısının da içinde bulunduğu önleyici tedbirlerin önemini arttırmaktadır (Genov vd 2006). Taç Gali hastalık etmeninin uzun süre gözle görülebilir symptom vermeden bitkinin vasküler dokularında ve korteksinde varlığını sürdürebilmesini sağlayan sistemik doğası, hastalığın etmeni olan *Rhizobium vitis* türünün kolay ve hızlı bir şekilde yayılmasına olanak vermektedir. *Rhizobium vitis* strainlerinin, hayat döngüsünün saprofitik fazında asma kalıntıları ve toprakta varlığını uzun süre sürdürebildiği de bilinmektedir. Bu yüzden Taç Gali hastalığının belirti gösteren ve göstermeyen bitki dokularına ve toprakta saptanmasında kullanılabilecek hızlı ve güvenilir bir yöntemin bulunması, hastalığın yayılmasının kontrolünde büyük önem arz etmektedir. Virulent *Rhizobium* strainlerinin tanı ve teşhisinde pek çok farklı PCR protokolü kullanılmış kromozomal veya Ti/Ri plazmiti üzerindeki farklı genlere karşı pek çok farklı primer dizayn edilmiştir (Bini vd 2008-a).

Patojenik *Rhizobium* strainlerinin PCR yöntemi ile tanısı, ilk kez 1990'da Nesme ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Nesme ve arkadaşları, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin tespiti için *virB* ve *virG* operonlarının arasındaki intersistronik bölgeye spesifik FGP_{virB}₁₁₊₂₁/FGP_{virG}15' ve *tmr* genine spesifik FGP_{tmr}530/FGP_{tmr}701' primer setlerini dizayn etmişlerdir. Ancak *virB* ve *virG* operonlarının arasındaki diziye has tasarlanan primerlerin bağlandığı diziler sadece nopalin katabolize eden strainlerde bulunduğundan, bu primer çifti oktopin katabolize eden strainleri tespit etmekte etkisiz kalmıştır. *tmr* genine spesifik tasarlanmış primer çifti hem oktopin hem de nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainlerini saptayabilmiştir. Ancak bu primer setinin de agropin katabolize eden strainlerin tanılanmasında başarısız olmuştur.

1992'de Picard ve arkadaşları, toprakta yaşamını sürdüren bakterileri tanılamak amacıyla hızlı ve spesifik bir yöntem geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Araştırmacılar, topraktaki bakterilerin lizise uğratılması, toprak ortamından açığa çıkan bakterilere ait DNA'ların saflaştırılması ve ortamdan izole edilen DNA'lardan tanı ve teşhisin gerçekleştirilmesi olarak sıralanabilecek üç basamaklı bir sistem dizayn etmişlerdir. Sistemin ilk basamağında, küçük porsiyonlara ayrılan toprak örneklerine sonikasyon, mikrodalga ile ısıtma, termal şok uygulama gibi farklı litik yöntemler tatbik edilmiş, toprakta bulunan bakterilerin ölmesi ve hücre muhteviyatlarının hücre dışına çıkması sağlanmıştır. İkinci basamakta toprak çeşitli çözücüler ile muamele edilmiş, ekstrakte edilen hücre çökeltileri DNA'yı bünyesinde tutma kabiliyetine sahip sentetik kolonlardan geçirilmiştir. Üçüncü basamak ise kolonlar tarafından tutulan fenolik ve hüyük bileşenlerden ari DNA'lardan tanı ve teşhisin gerçekleştirilmesi PCR ile gerçekleştirilmesi basamağı olarak düzenlenmiştir. Sistemin işlerliğinin test edilmesi için nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* C58 straini ve *Frankia* spp. strainleri kullanılmıştır. Araştırmacıların nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainini tanılamak için *vir* bölgesine göre tasarladıkları primer seti olumlu sonuç vermiş, PCR sonucunda *Rhizobium tumefaciens* örneğinde 246 bp'lık bir fragment gözlenirken *Frankia* strainlerinde herhangi bir amplifikasyona rastlanmamıştır.

1992'de Dong ve arkadaşları, patojenik ve patojenik olmayan *Rhizobium* strainlerinin ayrımını gerçekleştirmek için PCR yöntemini kullanmışlardır. Simptom gösteren ve göstermeyen çeşitli konukçulardan izole edilmiş *Rhizobium* strainlerini biyokimyasal testlerle *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* türlerinden hangisine ait olduğu belirlenmiş, daha sonra oksin sentaz gen bölgesine uygun tasarlanan iki primer seti yardımı ile strainlerin patojenik olup olmadığı test edilmiştir. Tasarlanan primer setlerinden biri geniş konukçu aralığı olan strainlere spesifik iken, diğeri konukçu aralığı dar olan strainler için tasarlanmıştır. Dar konukçu aralığı olan strainler için tasarlanan primer seti, 29 patojenik strainden 27'sini tespit etmeyi başarmıştır. Bu primer seti ile denenen 8 patojenik olmayan strainde herhangi bir amplifikasyon gözlemlenmemiştir. Geniş konukçu aralığı olan strainler için tasarlanan primer seti ise 20 patojenik strainden 18'inin tespitinde başarılı olmuştur, ancak 3 patojenik olmayan strainin 1'inde yanlış pozitif sonuç vermiştir.

Rhizobium vitis strainlerinin PCR yöntemi ile tanısı ise ilk kez 1993'te Schulz ve arkadaşları, tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, amplifikasyon için 19-26 bp uzunluğunda üç farklı primer seti kullanarak, oktopin, nopalin ve vitopin katabolize eden

Rhizobium vitis strainlerinin ayrı ayrı tespit edebilmişlerdir. Manuel olarak gerçekleştirilen reaksiyonda her bir örnek için bir *Rhizobium vitis* kolonisi mikrofüj tüpüne alınmış, 1ml fosfat tampon ile süspanse edilmiş, ardından bakteriler santrifüj edilerek, 0,5 ml steril distile su ile resüspanse edilmiştir. Bakteriye süspansiyonun yoğunluğu OD₆₀₀=0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan bakteriye süspansiyon 0,5 ml'lik bir reaksiyon tüpüne aktarılarak üzerine 50 µl PCR tamponu eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri, 10 dakika boyunca 95 °C'ye tabi tutularak bakterilerin parçalanması sağlanmıştır. Ardından reaksiyon tüpleri oda sıcaklığına soğutulmuş, her bir tüpe, her bir dNTP'den 200 µm, her bir primerden 200 nM, 2,5 U *Taq* polimeraz eklenmiş tüplerin üstleri parafin ile kapatılmıştır. 94 °C'de 2 dakika ön denatürasyonun ardından, 94 °C'de 30 saniye, 50 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 30 saniye şeklindeki sıcaklık döngüleri 30 döngü boyunca sürdürülmüştür.

Gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda, oktopin ve kukumopin katabolize eden strainlerde T-DNA üzerinde yer alan *ipt* genine 215 bp'lik bir fragmentin amplifiye olduğu tespit edilmiştir. Geniş konukçu aralığı olan bazı oktopin/kukumopin strainlerinde ise *iaaH* genleri arasında yer alan IS866 insersiyon dizisinin 361 bp'lik bir kısmı amplifiye olduğu görülmüştür. Bazı oktopin/kukumopin strainlerinde ise 215 ve 361 bp'lik fragmentlerin bir arada bulunduğu gözlemlenmiştir. IS866 insersiyon dizisini taşımayan, konukçu aralığı dar *Rhizobium vitis* strainlerinin *ipt* geninin sağında ve solunda IS868 ve IS869 insersiyon dizilerini taşıdığı bildirilmiştir. Bu nitelikteki strainlerle gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda IS868 insersiyon dizisinden 271 bp'lik, IS869 insersiyon dizisinden 278 bp'lik ampikonların meydana geldiği ifade edilmektedir. *Rhizobium vitis* vitopin strainlerinin tanısı, *6b* ve *vis* genlerinin arasındaki 571 bp'lik bir bölgenin amplifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Nopalin strainleri ise IS869 insersiyon dizisinin varlığı, incelenen diğer moleküler markörlerin yokluğu ve 278 bp'lik bir fragment ile varlığı ile kendini göstermiştir.

1994'te Ponsonnet ve Nesme, farklı konukçulardan izole edilmiş 41 *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium rubi* straininin PCR ile çoğaltılmış DNA'larını RFLP analizine tabi tutarak karakterize etmişlerdir. Çalışmada *Rhizobium* strainlerinin *tmr*, *nos*, *virA*, *virB2* genlerine, 16S (*rrs*) ve 23S (*rrl*) rDNA bölgesinin farklı kısımlarına uygun dizayn edilmiş primer setleri kullanılmıştır. RFLP analizleri için *MspI*, *HaeIII* ve *CfoI* endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. Araştırmacılar, 16S ile 23S rDNA arasındaki intergenik ara bölgenin (IS) yüksek miktarda polimorfizm gösterdiğini bu yüzden bu ara bölgenin strain ayrımı için uygun dizililere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Tasarlanan primerler sayesinde 41 *Rhizobium* straininin 37'si karakterize edilebilmiştir.

1995'te Sawada ve arkadaşları, hem Ti hem de Ri plazmitlerinde bulunan *virC* operonuna uygun VCF/VCR adını verdikleri universal bir primer seti tasarlamışlardır. Bu primer seti, *virC* operonunda 730 bp'lik bir bölgeyi amplifiye etmektedir. Çalışmada, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium rubi* strainleri ve bu türlere ait patojenik olmayan strainlerin yanında *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium galegae*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azorhizobium caulinodans* ve sınıflandırılmayan bazı *Rhizobium* türleri kullanılmış, farklı türlerindeki 77 farklı

patojenik strainin 75'ini tespit edilebilmiştir. Aynı çalışmada *virG* bölgesine göre tasarlanan primer setleri *Rhizobium* strainlerini tanılamakta başarısız olmuştur.

1995'te Haas ve arkadaşları, patojenik *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* strainlerinin *virD2* ve *ipt* genlerine spesifik farklı primerler geliştirmişlerdir. Çalışmada, toprak, asma, vişne, böğürtlendi, elma, armut, krizantem, huş (*Betula* spp.) badem, kestane (*Castanea* spp.) yıldız çiçeği, gül, yıldızpatı (*Aster* spp.), taflan (*Euonymus* spp.) gibi farklı konukçulardan izole edilmiş 73 farklı *Rhizobium* straini kullanılmıştır. Primerlerin geliştirilmesinde tip strainler olan, *Rhizobium rhizogenes* A4 straini, nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* C58 straini ve oktopin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* A6 strainine ait *virD2* gen dizileri kullanılmıştır. *VirD2* genine spesifik primerler ileri yönlü *VirD2A* ve geri yönlü *VirD2C'* ve *VirD2E'* primerleri olarak sıralanabilir. Gerçekleştirilen PCR'lerde, tasarlanan *VirD2A/VirD2C'* primerleri kullanıldığında *Rhizobium tumefaciens* strainleri ile 224 bp'lik, *VirD2A/VirD2E'* primerleri kullanıldığında *Rhizobium tumefaciens* strainleri ile 338 bp'lik amplikonların meydana geldiği gözlemlenmiştir. Patojenik olmayan bir *Rhizobium radiobacter* straini de *virD2* genine spesifik bu primer setleri ile pozitif sonuç vermiştir. *virD2* primer setlerinin, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin yanında test edilen 3 *Rhizobium rhizogenes* ve 3 *Rhizobium vitis* straininde de amplifikasyon meydana getirdiği saptanmıştır. *VirD2* geni kadar konservatif olmayan *ipt* genine spesifik dizayn edilen primerler ise CYT ve CYT' primerleridir. CYT ve CYT' primerleri beraber kullanıldıklarında 427 bp'lik amplikonların meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu primer seti kullanılarak patojenik olmayan *Rhizobium radiobacter* strainleri ile PCR gerçekleştirildiğinde ise amplifikasyon gözlemlenmemiştir. *ipt* primer setinin çalışmada kullanılan 38 *Rhizobium tumefaciens* straini ile fragment vermesinin yanında, 3 *Rhizobium vitis* straininden 2'si ile de fragment verdiği görülmüştür. Ancak *ipt* primer seti hiçbir *Rhizobium rhizogenes* straini ile amplifikasyon sağlayamamıştır.

1995'te Vaudequin-Dransart ve arkadaşları, krizantemden izole ettikleri 5, ağlayan incirden izole ettikleri 7 *Rhizobium* strainini tanılamak için PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada, patojenisite testleri, strainler tarafından katabolize edilebilen opin türlerinin tespiti, RFLP analizleri, hibridizasyon testleri gibi patojenlerin karakterizasyonuna dair pek çok farklı analiz yapılmıştır. Bu analizleri destekleyici bir unsur olarak, *vir* bölgesi, *iaa*, *cyt* ve *nos* genlerine uygun tasarlanan primerler kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. *vir* bölgesine göre dizayn edilen primer seti, krizantem strainlerinde, *cyt* ve *iaa* genlerine göre dizayn edilen primer setleri ise ağlayan incir strainlerinde pozitif sonuç vermiştir. 2 ağlayan incir straininde ise bir amplifikasyon meydana gelmediği gözlemlenmiştir.

1995'te Eastwell ve arkadaşları, enfekteli asma kalemelerindeki *Rhizobium* cinsi bakterileri tespit etmek için tasarladıkları *virA*, *pehA* ve *6a* genlerine uygun primer setlerinin *Rhizobium vitis* türünün tespiti için kullanılabilirliğini test etmişlerdir. Araştırmada 3'ü *Rhizobium tumefaciens*, 2'si *Rhizobium rhizogenes*, 8'i *Rhizobium vitis* türünde olan 13 farklı *Rhizobium* straini kullanılmıştır. *Rhizobium vitis* strainleri oktopin, nopalin veya vitopin gibi farklı opin tiplerini katabolize eden strainlerden seçilmiştir. Araştırmacılar, *pehA* genine özgün tasarlanan 199 bp'lik ürün veren primer seti ile çalışmalarındaki tüm *Rhizobium vitis* strainlerini tespit etmeyi başarmışlardır. *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainlerinde ise amplifikasyon

gözlemlenmemiştir. *virA* genine özgün tasarlanan 480 bp'lik ürün veren primer seti ile 8 *Rhizobium vitis* straininden 7'si tespit edilebilmiştir. *virA* genine özgün tasarlanan primer seti, vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straini ile amplifikasyon meydana getirmemiştir. *6a* genine özgün tasarlanan 260 bp'lik ürün veren primer seti ile 3 *Rhizobium tumefaciens* straininden 2'si tespit edilebilmiştir. Araştırmacılar, kalemelerden alınan bitki öz sularındaki bazı kontaminantların varlığının, öz su içindeki hedef DNA'nın amplifikasyonuna engel olduğunu ifade etmişlerdir. Etkin bir PCR için asma kalemelerinden direkt örnekleme yapılabilmesine imkan verebilecek dört farklı DNA saflaştırma protokolü test edilmiş, test edilen yöntemlerden en başarılı olanının iyon değişim kromatografisi yöntemi olduğu belirlenmiştir.

1996'da Otten ve arkadaşları, 76 *Rhizobium vitis* strainini pek çok farklı moleküler yöntemle analiz etmişlerdir. Ribozomal DNA (rDNA) 16-23S intergenik ara bölgesinin (IGS) PCR analizi, bu bölgenin ve bakterilere ait total DNA'nın restriksiyon paternleri ve farklı Ti plazmit problemleri ile hibridizasyon gibi yöntemler ile strainler tanılanıp genetik gruplara ayrılmıştır. rDNA 16-23S intergenik ara bölgesi PCR ile amplifiye edilmiş, amplifikasyon ürünleri *AvaI*, *CfoI*, *HaeIII*, *RsaI* ve *TaqI* endonükleazları ile kesilmiştir. Kesimler sonrasında 76 *Rhizobium vitis* straininin 13 farklı restriksiyon paterni ortaya koyduğu kaydedilmiştir. Restriksiyon paternleri ile *Rhizobium vitis* strainlerinin katabolize ettiği opin tipi arasında paralellik olduğu ortaya çıkarılmıştır. 16S rDNA ile 23S rDNA arasında kalan intergenik ara bölgenin, sahip olduğu değişkenlik düzeyi, genomun diğer kısımlarına göre evrilme hızının yavaş olması, gen ürünlerinin bakteriyel hücre için hayati öneme sahip olması ile yakın akraba strainlerin ayrımının yapılmasında etkin şekilde kullanılabilecek nitelikte olduğu rapor edilmiştir (Navarro vd 1992, Pulawska vd 2000, Raio vd 2004).

1996'da Kaufmann ve arkadaşları, asmalarda patojenisitelerini test ettikleri, oktopin katabolize eden bir *Rhizobium vitis* straininin *6b* genine spesifik bir primer seti geliştirmişlerdir. 4095/4906 adı verilen primer seti oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri ile polimerizasyon reaksiyonuna girdiğinde 693 bp'lik ürün ortaya çıkarmıştır. Araştırmacılar, aynı primer seti ile Tm4-plazmit DNA'sı, enfekteli asma ekstraktı, immuno-capture kültür metodu ile enfekteli asma ekstraktından izole edilmiş bakteri örneği ile PCR analizleri gerçekleştirmiş ve pozitif sonuç almışlardır.

1996'da Irelan ve Meredith, farklı konukçulardan izole ettikleri *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* türleri arasındaki genetik heterojenliği araştırmak amacıyla RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntem polimorfik DNA fragmentlerinden spesifik bir parmak izi oluşturarak strainlerin tespit edilmesine ve karşılaştırılabilmesine olanak vermektedir. Test edilen 20 *Rhizobium* straininde, hem türler arası, hem de tür içi yüksek seviyede farklılık tespit edilmiştir. Çalışmada monomorfik bant tespit edilmemiştir. *Rhizobium rhizogenes* strainlerinde %41, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinde %38 özdeş bant gözlemlenirken, *Rhizobium vitis* strainlerinde oranın %12'ye düştüğü görülmüştür. Belirlenen bu markörlerden sadece birinin intraspesifik monomorfik olduğu ifade edilmiştir. Buna karşın, *Rhizobium tumefaciens* strainlerine ait özdeş markörlerin çoğunluğunun intraspesifik monomorfik olduğu görülmüştür. En büyük genetik farklılığın ise *Rhizobium vitis* strainleri arasında

olduğu tespit edilmiştir. Her ne kadar strainler arasındaki genetik varyasyon yüksek bulunmuş olsa da elde edilen veriler tür düzeyinde tanılama gerçekleştirilebilmiştir.

1997’de Herlache ve arkadaşları, patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinde poligalakturonaz sentezinden sorumlu *pehA* genine spesifik bir primer seti dizayn ederek, bu gene sahip *Rhizobium vitis* strainlerini PCR ile tespit etmeyi başarmıştır. Tasarlanan primerler kullanılarak *Rhizobium vitis* strainlerinde 466 bp’lik ampikonlar elde edilmiştir. Araştırmacılar, amplifiye ettikleri DNA dizisinin sekans analizini gerçekleştirerek elde ettikleri bu diziyi *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Ralstonia solanacearum* strainlerinde bulunan homolog poligalakturonaz enzim dizilerini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda *Rhizobium vitis* strainlerinde bulunan poligalakturonaz dizisinin, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Ralstonia solanacearum* strainlerinde bulunan diziler ile büyük benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Ancak patates yumruları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda enzim aktivitesi açısından *Rhizobium vitis* strainlerinde bulunan poligalakturonaz enziminin, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Ralstonia solanacearum* strainleri tarafından sentezlenen enzimlerden etkisiz olduğu, patates yumrularındaki hücrelerden daha az elektrolit sızıntısına neden olduğu belirlenmiştir.

1998’de Momol ve arkadaşları, tümörjenik *Rhizobium vitis* strainlerini RAPD-PCR yöntemi ile 23S rDNA geninin bir kısmına dayanarak karakterize etmiş ve genetik farklılıklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, 16S ve 23S rDNA genlerinin moleküler belirleyici tasarlamak için yeterince değişken olmadığını ifade etmiş, bu sebeple 23S rDNA’nın 5’ ucunda yer alan, diğer kısımlara göre daha fazla değişkenlik gösteren bu bölgeye göre R13 ve A9 adını verdikleri iki belirleyici tasarlamışlardır. RAPD belirleyicileri ile oktopin, nopalin ve vitopin katabolize eden 66 *Rhizobium vitis* straininden elde edilen ampikonlar *TaqI*, *RsaI*, *AvaI*, *CfoI* ve *AluI* endonükleaz enzimleri ile kesilmiştir. Hem DNA parmak izi analizleri hem de enzimle kesim işlemlerinden elde edilen sonuçların korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

1998’de Oger ve arkadaşları, PCR-RFLP analizinde 16S rDNA gen bölgesinin kullanımının, toprak kökenli ve bitki patojeni bakterilerin tespitinde doğruluk ve hassasiyetinin belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmada, biyokimyasal ve fizyolojik yöntemlerle karakterize edilmiş *Rhizobium*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* ve *Pseudomonas* cinslerindeki bakteriler kullanılmıştır. *Rhizobium* strainlerinin 16S rDNA gen bölgesinin çoğaltılmasında, Nesme ve arkadaşları (Nesme vd 1995) tarafından tasarlanan prokaryot spesifik FGPS6 ve FGPS1509’ primerleri kullanılmıştır. Primerler, 16S rDNA gen bölgesinin %99,5’ini amplifiye edebilme kabiliyetindedir. Araştırmacılar, aynı tür içinde yer alan bakterilerin 16S rDNA geni ile gerçekleştirilen PCR-RFLP analizlerinde oluşan paternlerin oldukça benzer olduğunu belirtmişler, tanılama limitinin analiz edilen taksona göre değiştiğini ifade etmişlerdir. *Rhizobium* türlerinin RFLP profillerinin çıkarılmasında farklı enzimler test edilmiş en etkin ayrımın *HpaII* (*MspI*), *AluI* ve *HaeIII* enzimleri kullanılarak gerçekleştirildiğini belirtmişlerdir. Elde edilen sonuçların bakterilerin tanılanması kadar, bakteriyel biyofarklılığın belirlenmesinde de kullanılabileceği ifade edilmiştir. Araştırmacılar, farklı türlerdeki bakterilerin ayrımının gerçekleştirilebilmesi için 16S rDNA geni üzerinde en az beş enzim kesim bölgesinde dizi farklılığı bulunması gerektiğini saptamışlardır.

1999'da Pionnat ve arkadaşları, PCR ve RFLP yöntemlerini kullanarak güllerden izole ettikleri 30 *Rhizobium tumefaciens* strainini tanılamışlardır. Bu strainlerin yanında 17 *Rhizobium tumefaciens*, 4 *Rhizobium vitis* ve 2 *Rhizobium rhizogenes* straini karşılaştırma için kullanılmıştır. Çalışmada, *Rhizobium* strainlerine ait *vir* bölgelerinin farklı kısımları, 16S rDNA'sının farklı kısımları ve *tms* bölgesine uygun dizayn edilmiş dört farklı primer seti kullanılmıştır. 16S rDNA dizilerinin RFLP analizleri için *MspI*, *HaeIII*, *vir* bölgesinin RFLP analizleri için *MspI*, *MseI*, *CfoI*, *tms* bölgesinin RFLP analizleri için *CfoI* ve *DdeI* endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. Araştırmacılar, güllerden izole edilen 30 strainin 16'sının süksinamopin, 14'ünün nopalin katabolize eden strainler olduğunu belirlemiş bu ayrımın RFLP analizleri ile örtüştüğünü belirtmişlerdir. Çalışmada kullanılan 2 *Rhizobium vitis* straininin nopalin katabolize eden özellikte strainler olmasına rağmen, güllerden izole edilmiş nopalin katabolize eden *Rhizobium* strainlerden farklı bir profil çizdiği ifade edilmiştir.

1999'da Cubero ve arkadaşları, bitki tümörlerindeki *Rhizobium tumefaciens* strainlerini tanılamak amacıyla PCR protokolü geliştirmişlerdir. Toprak, asma, şeftali, kiraz, domates, badem, *Prunus persica* × *Prunus dulcis* hibritleri, *Rubus* spp. gül, kavak, ayva (*Cydonia oblonga*), söğüt gibi bitkilerden izole edilmiş, oktopin, nopalin ve mannopin katabolize eden 16 *Rhizobium tumefaciens*, 15 *Rhizobium rhizogenes*, 5 *Rhizobium vitis* straini ile asma, domates, tütün, krizantem, gül, badem, *Prunus persica* × *Prunus dulcis* hibritleri, kayısı, bitkilerine inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Meydana gelen tümörlerden PCR ile tanılama yapılmıştır. PCR ile tanılamada, Nesme ve arkadaşları (Nesme vd 1990) tarafından tasarlanan için *virB* ve *virG* operonlarının arasındaki intersistronik bölgeye özgün FGP $virB_{11+21}$ /FGP $virG15'$, *tmr* genine özgün FGP $tmr530$ /FGP $tmr701$ primerleri ile Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1995) tarafından tasarlanan hem Ti hem de Ri plazmitlerinde bulunan *virC* operonuna uygun VCF/VCR adı verilen universal bir primer seti kullanılmıştır. Primer setleri hemen hemen tüm strainlerle pozitif sonuç verse de, tümörlerden izole edilen bir *Rhizobium tumefaciens* straini üç primer seti ile de pozitif sonuç vermemiştir. Bu strain haricindeki tüm strainler ile *tmr* genine spesifik primerler kullanılarak amplifikasyon elde edilebilmiştir. VCF/VCR primer seti ve *virB* ve *virG* operonlarının arasındaki intersistronik bölgeye spesifik primer seti ile tüm *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainleri saptanabilmiştir. Ancak 5 *Rhizobium vitis* straininden biri, her iki primer ile de tanılanamamıştır.

2000'de Pulawska ve arkadaşları, 5 *Rhizobium tumefaciens*, 3 *Rhizobium radiobacter*, 1 *Rhizobium rhizogenes*, 2 *Rhizobium vitis*, 1 *Rhizobium rubi*, 2 *Sinorhizobium* ve 4 nodül oluşturma kabiliyetindeki *Rhizobium* straini 23S rDNA dizisine uygun primerler vasıtasıyla PCR yöntemi ile tanılamışlardır. Strainler, asma, domates, elma, vişne, kavak, ahududu, şeftali, armut, yonca, bezelye, fasulye, keçisedefi gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir. İlk aşamada *tmr*, *virD*, *virG*, *virD*, *virC*, *6a* ve *virA* genlerine özgün tasarlanan primerler ile çalışmada kullanılan strainlerdeki Ti plazmit varlığı PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Pulawska, 23S rDNA bölgesinin farklı kısımlarına bağlanabilen, 4 ileri yönlü, 6 geri yönlü primer tasarlamıştır. Dizayn edilen primerler, amplifikasyon yönlerine göre farklı ikili kombinasyonlarla gruplanarak primer setleri oluşturmuş ve bu setlerle amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerle benzerlik matrisleri oluşturulmuş, strainler filogenetik analize tabi tutmuşlardır.

2002’de Argun ve arkadaşları, Türkiye’deki farklı bağ alanlarında sörveyler gerçekleştirmişler, saptadıkları enfekteli asmalardaki urlardan izolasyonlar yapmışlardır. İzolasyonlar, Ereğli Çavuşu, Dimrit, Emir, Hasandede, Kalecik, Karası ve Narince çeşitlerinden gerçekleştirilmiştir. İzole edilen ur oluşturan etmenler biyokimyasal ve fizyolojik testler, Ti plazmit ve kromozomal genlere ait dizilerin PCR ile amplifikasyonu ve türe spesifik monoklonal antikorlar ile tanılanmıştır. İzole edilen tüm strainlerin oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri olduğu belirlenmiştir. Serolojik tanılamada Bishop ve arkadaşlarının 1989’da geliştirdiği sadece *Rhizobium vitis* strainleri ile reaksiyon veren AbF2-1D3G7C8 antikor kullanılmıştır. PCR analizlerinde üç farklı primer seti kullanılmıştır. Primerlerden ilki, *pehA* genine özgün dizayn edilmiş 199 bp’lik ürün veren primer setidir. Bu set, patojenik ve patojenik olmayan *Rhizobium vitis* strainleri ile pozitif sonuç verirken, *Rhizobium tumefaciens* strainleri ile negatif sonuç vermektedir. *virA* geninden türetilen primer seti, hem patojenik *Rhizobium vitis* hem de patojenik *Rhizobium tumefaciens* strainleri ile 480 bp’lik fragment vermektedir. Kullanılan *virA* ve *pehA* genlerine spesifik primerler, Eastwell ve arkadaşları (Eastwell vd 1995) tarafından tasarlanan primer setleridir. *VirE2* genine uygun tasarlanan primer seti ise sadece vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri ile yaklaşık 1 kb’lik amplikon oluşturmaktadır. 16S rRNA, 23S rRNA genleri ve 16S IS bölgesi restriksiyon enzimleri ile kesilerek DNA parmak izi analizi gerçekleştirilmiştir. Amplikonların kesimlerinde *RsaI*, *TaqI*, *CfoI*, *HaeIII* ve *AvaI* endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. İzole edilen *Rhizobium vitis* strainlerinin tamamının oktopin katabolize eden tipte olduğu belirlenmesine rağmen, gerçekleştirilen DNA parmak izi analizleri sonucunda söz konusu strainleri iki farklı gruba ayrıldığı görülmüştür. Restriksiyon fragmentlerinin varlığı veya yokluğuna bağlı olarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) metoduyla benzerlik katsayıları ve strainlerin akrabalık ilişkileri belirlenmiştir.

2002’de Szegedi ve Bottka, 15 *Rhizobium vitis* ve 1 *Rhizobium tumefaciens* straini dört farklı primer seti kullanarak PCR ile tanılamışlardır. Kullanılan *Rhizobium vitis* strainlerinin 14’ü patojeniktir. Patojenik *Rhizobium vitis* strainleri, oktopin, nopalin ve vitopin katabolize eden farklı *Rhizobium vitis* tiplerinden seçilmiştir. *Rhizobium tumefaciens* strainini tanılamakta daha önce Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1995) tarafından tasarlanan hem Ti hem de Ri plazmitlerinde bulunan *virC* operonuna uygun VCF/VCR adını verilen universal bir primer seti kullanılmıştır. *virC* operonuna spesifik bu primer seti *Rhizobium tumefaciens* straininde 730 bp’lik bir amplikon verirken, bu primer setinin *Rhizobium vitis* strainlerinde pozitif sonuç vermediği görülmüştür. *Rhizobium tumefaciens* strainini tanılamakta Ti plazmitinde yer alan *virE2* genine uygun virE2PF/virE2PR adını verdikleri primer seti kullanılmıştır. *virE2* genine spesifik bu primer seti *Rhizobium tumefaciens* straininde 753 bp’lik bir amplikon verirken, bu primer setinin vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinde pozitif sonuç vermediği görülmüştür. virE2PF/virE2PR primer seti oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri ile pozitif sonuç vermiştir. *Rhizobium vitis* strainlerinin tanılanmasında ise *pehA* ve *vis* genlerine spesifik primerler kullanılmıştır. 466 bp’lik amplikon veren PGF/PGR ve 561 bp’lik amplikon veren VisF/VisR primerleri ile *Rhizobium vitis* strainlerinden ürün alınabilmektedir. *vis* genine spesifik primer seti sadece vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerini tanılayabilirken, *pehA* genine spesifik primer seti ile patojenik olan ve patojenik olmayan tüm *Rhizobium vitis* strainleri tanılanabilmektedir.

2003'te Bian ve arkadaşları, oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainlerini tanılayan iki primer seti tasarlamışlardır. Gerçekleştirilen çalışmada *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium vitis*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii* ve türü belirlenmemiş bazı *Rhizobium* strainleri dahil toplam 45 strain kullanılmıştır. Strainler, asma ve gül başta olmak üzere pek çok farklı konukçudan izole edilmiştir. Tasarlanan RBF/RBR primer seti nopalin katabolize eden strainlerde sağ sınır bölgesini kapsayan bir kısmı amplifiye ederken, ocsF/ocsR primer seti ocs geninin bir kısmını amplifiye etmektedir. Bian ve arkadaşları geliştirdikleri primerlerin yanında daha önce farklı araştırmacılar tarafından tasarlanan *Rhizobium tumefaciens* strainlerinde *iaaH* genini amplifiye eden tms2A/tms2B (Sachadyn ve Kur 1997), Ti ve Ri plazmitlerinde *virD2* genini amplifiye eden VirD2A/VirD2C' ve VirD2A/VirD2E' (Haas vd 1995) primer setlerini de çalışmalarına dahil etmişlerdir. *Rhizobium tumefaciens* türündeki strainlerde amplifiye edilen kısımlar *DraI* ve *XbaI* enzimleri ile kesilerek RFLP analizi gerçekleştirilmiş, neticede oluşan profillerin, aynı analize tabi tutulan tip strain profilleri ile uyduğu görülmüştür. RBF/RBR primer seti ile nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin tamamı tespit edilebilmiştir. Bu strainlerde 206 bp'lik amplifikasyon meydana geldiği görülmüştür. ocsF/ocsR primer seti ile de oktopin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainleri tanımlanabilmiştir. Bunun yanında 298 bp'lik ürün veren ocsF/ocsR primer setinin çalışmada yer alan 4 *Rhizobium vitis* straininden 1'i ile pozitif sonuç verdiği görülmüştür. ocs genini amplifiye eden bu primer seti ile pozitif sonuç veren *Rhizobium vitis* straininin hangi opin tipini katabolize ettiği tespit edilmemiştir. tms2A/tms2B primer seti ile nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin tamamında 220 bp'lik ampikon oluştuğu gözlemlenirken, bazı oktopin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin de bu primer seti ile fragment verebildiği belirlenmiştir. Bunun yanında tms2A/tms2B primer seti ile reaksiyona sokulan *Rhizobium vitis* strainlerinde spesifik olmayan bağlanmalar meydana geldiği belirlenmiştir.

2003'te Szegedi, 90 doğal enfekteli tümörden izole ettiği, 85 farklı DNA örneğini opin tipine göre karakterize etmiştir. İzole edilen DNA örneklerinin tür düzeyinde tanımlanmasına Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan poligalakturonaz genine spesifik PGF/PGR primerleri kullanılmıştır. Tümörlerin 50'sinin oktopin, 28'inin nopalin 8'inin vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri tarafından enfekte edilmiş tümörler olduğu kaydedilmiştir. Tümörlerin hemen hemen tamamında sadece bir opin tipine rastlanırken, bir tümörde hem vitopin hem nopalin bileşiklerine rastlanmıştır. 5 tümör örneğinde herhangi bir opin türevi tespit edilememiştir. Bu tümörlerin doğal veya mekanik yaralanma sonucu meydana gelmiş kallus dokusu veya nadir rastlanan bir opin tipini katabolize eden bir *Rhizobium* straini tarafından gerçekleştirilmiş enfeksiyon neticesinde meydana gelmiş olabileceği düşünülmüştür.

2003'te Llop ve arkadaşları, 39 *Rhizobium* strainini tanılamak amacıyla RAPD-PCR yöntemini kullanmışlardır. *Rhizobium* strainleri toprak, asma, krizantem şeftali, domates, gül, badem, vişne, kavak, ayva, söğüt (*Salix viminalis*), hıyar (*Cucumis sativus*) gibi farklı konukçulardan izole edilmiştir. Strainlerin tümörjenik plazmit taşıyıp taşımadığının moleküler olarak belirlenmesinde Nesme ve arkadaşları (Nesme vd 1990) tarafından tasarlanan için *virB* ve *virG* operonlarının arasındaki intersistronik bölgeye

özgün FGP_{virB}₁₁₊₂₁/FGP_{virG}15', *tmr* genine özgün FGP_{tmr}530/FGP_{tmr}701 primerleri kullanılmıştır. Tasarlanan, OPE-2, OPE-7, OPE-14 ve OPE-20 adı verilen RAPD primerleri ile farklı tipte plazmit taşıdığı bilinen strainler aynı DNA fragment profilini vermişlerdir. 10 konukçu bitki, 8 farklı *Rhizobium* straini ile enfekte edilmiş meydana gelen tümörlerden yeniden izolasyon yapılmıştır. Tümörlerden izole edilen strainlerin, inokülasyon öncesindeki RAPD-PCR'da ortaya koydukları DNA fragment profili ile aynı DNA fragment profilini ortaya koyduğu kaydedilmiştir.

2004'te Raio ve arkadaşları, ağlayan incirden izole edilen 48 *Rhizobium* strainini toprak, vişne (*Prunus cerasus*), şeftali, asma, ağlayan incir, Kaliforniya böğürtleni (*Rubus ursinus*) gibi farklı kaynaklardan izole edilen *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi* ve *Rhizobium larrymoorei* strainleri ile PCR ve RFLP yöntemlerini kullanarak karşılaştırmışlardır. 16S rDNA ile 23S rDNA arasında yer alan 16S rDNA intergenik ara bölge, *tms*, *tmr*, *nos* genleri ve *vir* bölgesi primer tasarımı için seçilmiştir. Test edilen tüm strainlerde, 16S rDNA'ya uygun tasarlanan FGPS6/FGPS1509 primer seti pozitif sonuç vermiştir. Bu primer setinin ürünü olan 1500 bp'lik fragment, *AccI*, *AluI*, *BfaI*, *HaeIII* ve *HpaII* enzimleri ile kesilmiştir. 16S rDNA, 16S rDNA intergenik ara bölgesi ve 23S rDNA'nın bir 132 bp'lik bir kısmını amplifiye eden FGPS6/FGPL132 primer setinin de test edilen tüm strainlerde ise 2500 ila 2700 bp'lik bir amplifikasyon meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Bu primer setinin ürünü de aynı endonükleazlar ile kesilmiş RFLP analizi gerçekleştirilmiştir. Ağlayan incirden izole edilmiş 48 *Rhizobium* straininden 17'sinin *Rhizobium larrymoorei* profili ile eşleştiği, teste alınan hiçbir strainin *Rhizobium vitis* straininin profili ile eşleşmediği tespit edilmiştir. Plazmit üzerinde bulunan genler için tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizleri sonucunda elde edilen ampiklonlar *DdeI*, *MseI*, *HpaII* ve *CfoI* enzimleri ile kesilmiş, ancak ortaya çıkan profiller ile *Rhizobium* türleri arasında kesin bir ilişki kurulamamıştır. *tms*, *tmr*, *nos* genleri ve *vir* bölgesi için tasarlanan primerlerden hiçbirisi *Rhizobium vitis* strainlerine karşı denenmemiştir.

2004'te Suzaki ve arkadaşları, elma fidanlarından izole ettikleri 48 *Rhizobium* strainini tanılamak amacıyla tasarladıkları, *virC* operonuna spesifik dört yeni primer seti tasarlamışlar ve bu primerler setlerini daha önce Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1995) tarafından tasarlanan VCF/VCR primerleri ile karşılaştırmışlardır. Primer setlerinin tanılamadaki etkinliğinin belirlenmesinde, elma fidanlarından izole edilen *Rhizobium* strainlerinin yanında *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium radiobacter* türlerine ait 11 kontrol straini ile test edilmiştir. Suzaki ve arkadaşları tarafından tasarlanan VCF2/VCR2 ve VCF4/VCR4 primer setleri, VCF/VCR primer setinin tasarımı baz alınarak dizayn edilmiş dejenere primer setleridir. VCF3/VCR3 ve VCF5/VCR5 primer setleri ise VCF/VCR primer setinin amplifiye ettiği *virC* operonundaki 730 bp'lik bölgenin dizisi esas alınarak tasarlanmıştır. VCF3/VCR3 ve VCF5/VCR5 primer setlerinin ampiklonları VCF/VCR primer setinin ampiklonundan daha kısadır. VCF2/VCR2 primer seti 736 bp, VCF3/VCR3, primer seti 414 bp, VCF4/VCR4 736 bp primer seti, VCF5/VCR5 primer seti 93 bp'lik ürün vermektedir. VCF2/VCR2, VCF3/VCR3, VCF4/VCR4 ve VCF5/VCR5 adı verilen primer setlerinden VCF3/VCR3 ve VCF5/VCR5 adı verilen setler elma fidanlarında izole edilmiş, hem Ti hem de Ri plazmit taşıyan patojenik *Rhizobium* strainlerin tanılanmasında, VCF/VCR primer setinden daha başarılı bulunmuştur. VCF/VCR primer seti 10'u patojenik 11 kontrol straininden 4'ünü tespit edebilirken, VCF3/VCR3 ve VCF5/VCR5 primer setleri

tüm patojenik strainleri tespit edebilmiştir. VCF3/VCR3 primer seti ile elma fidanlarından izole edilen strainleri ise patojenik olduğu belirlenen 41 strainin tamamı, VCF5/VCR5 primer seti ile 40 adedi tespit edilmiştir. VCF/VCR primer seti ile 41 patojenik strainin 36'sının tespiti gerçekleştirilebilmiştir.

2005'te Kawaguchi ve arkadaşları (Kawaguchi vd 2005-b), Multipleks PCR yöntemi ile patojenik ve patojenik olmayan *Rhizobium* strainlerini tanımlamasına olanak veren, 16S rDNA bölgesine ve *virC* genlerine uygun primer setleri geliştirmişlerdir. Çalışmada, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium* spp. türlerine ait 61 farklı strain kullanılmıştır. Ab3-F3/Ab3-R4 adı verilen primer seti *Rhizobium vitis* strainlerinin de dahil olduğu bazı *Rhizobium* strainlerindeki 16S rDNA bölgesinin 570 bp'lik bir kısmını amplifiye etmektedir. Araştırmacılar, patojenik ve patojenik olmayan *Rhizobium vitis* strainlerinin seçilimi için Ab3-F3/Ab3-R4 primer seti ile *virC1* ve *virC2* genlerinin bir kısmını amplifiye eden VCF3/VCR3 (Suzaki vd 2004) primer setinin birlikte kullanımını önermişlerdir. VCF3/VCR3 primer setinin ürünü 414 bp'dir. Sadece *Rhizobium vitis* strainlerinde Ab3-F3/Ab3-R4 ve VCF3/VCR3 primerleri ile amplifiye edilen 570 ve 414 bp'lik fragmentler gözlemlenmiştir.

2005'te Szegedi ve arkadaşları, asmalardan izole ettikleri 18 *Rhizobium* strainini, 4 *Rhizobium tumefaciens* ve 4 *Rhizobium vitis* straini ile karşılaştırmışlardır. Karşılaştırmada, biyokimyasal ve fizyolojik testler, agrosin 84'e hassasiyet, indikatör bitki testleri, tümörlerden ekstrakte edilen opinin tiplerinin belirlenmesi ve PCR analizi gibi pek çok farklı yöntem kullanılmıştır. PCR ile tanımlamanın gerçekleştirilmesinde, Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1995) tarafından tasarlanan VCF/VCR primerleri ve Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan VisF/VisR primerlerinin yanında, araştırmacılar tarafından tasarlanan oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerindeki *6b* genine spesifik TF/TR, nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerindeki *6b* genine spesifik NF/NR, *Rhizobium vitis* strainlerindeki tartarat dehidrogenaz genine spesifik ttuCfw/ttuCrev primerleri kullanılmıştır. İzole edilen *Rhizobium* strainlerinin tamamı VCF/VCR primer seti ile pozitif sonuç vermiş ve bu strainlerin *Rhizobium tumefaciens* straini olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal ve fizyolojik testler de izole edilen strainlerin *Rhizobium tumefaciens* straini olduğuna işaret etmiştir. Ancak bu strainlerin 7'sinin *Rhizobium vitis* strainlerindeki tartarat dehidrogenaz genine spesifik ttuCfw/ttuCrev primerleri ile pozitif sonuç verdiği kaydedilmiştir. Bu durum, *Rhizobium tumefaciens* strainleri için tipik olmayan bir durumdur. ttuCfw/ttuCrev primer seti *Rhizobium vitis* strainleri ile 479 bp'lik ürün vermektedir. NF/NR primer setinin nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium vitis* strainleri ile 570 bp'lik ampikon verdiği saptanmıştır. Araştırmacılar tarafından tasarlanan TF/TR primer seti, oktopin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium vitis* strainleri ile test edilmiş, oktopin katabolize eden bir *Rhizobium tumefaciens* straini hariç tüm oktopin katabolize eden strainler ile 520 bp'lik ürün verdiği tespit edilmiştir.

2005'te Pulawska ve Sobiczewski, toprak kökenli tümörjenik *Rhizobium* strainlerini tanımlamasını amaçlayan *tms2* genine özgün primerler tasarlamış ve Semi-Nested PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium*

rhizogenes, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Arthrobacter ramosus*, *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter pascens*, *Erwinia amylovora*, *Dickeya chrysanthemi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, türlerine ait 113 farklı strain kullanılmıştır. Bakteriyel etmenler, toprak, asma, elma, erik, ahududu, kavak, domates, kiraz, vişne, krizantem, şeftali, armut (*Pyrus communis*), kivi (*Actinidia deliciosa*), soya fasulyesi (*Glycine max*), bezelye, yonca (*Medicago sativa*), Kaliforniya böğürtlendi, krizantem gibi pek çok farklı konukçudan izole edilmişlerdir. Tasarlanan tms2A/tms2B ve tms2F1/tms2R2 primer setlerine ait primerler farklı kombinasyonlarla PCR reaksiyonuna sokulmuştur. Pozitif sonuç veren örneklerde, tms2A ve tms2B primerleri beraber kullanıldıklarında 220 bp, tms2F1 ve tms2R2 primerleri beraber kullanıldıklarında 617 bp, tms2F1 ve tms2B primerleri beraber kullanıldıklarında 458 bp, tms2R2 ve tms2A primerleri beraber kullanıldıklarında 277 bp büyüklüğünde amplikonlar meydana geldiği görülmüştür. tms2A ve tms2B primer seti *Rhizobium* türlerinin yanında *Pseudomonas fluorescens* türleri ile de pozitif sonuç verdiğinden yeterince spesifik bulunmamıştır. tms2F1/tms2R2, tms2F1/tms2B, tms2F1/tms2B ve tms2R2/tms2A primer kombinasyonları *Rhizobium* cinsindeki bakterilerin pek çoğu ile pozitif sonuç vermiş, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Arthrobacter ramosus*, *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter pascens*, *Erwinia amylovora*, *Dickeya chrysanthemi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* türlerinde ise amplifikasyon meydana gelmemiştir. Ancak bu primer kombinasyonları, çalışmadaki 63 *Rhizobium rhizogenes* straininden 3'ünü, 8 *Rhizobium vitis* straininden 1'ini tespit etmekte başarısız olmuştur.

2006'da Pulawska ve arkadaşları, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* cinslerine ait 119 strain ile Multipleks PCR yöntemi ile tanılama çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bakteriyel etmenler, asma, elma, erik, ahududu, kavak, domates, kiraz, vişne, krizantem, şeftali, armut, ağlayan incir, soya fasulyesi, bezelye, yonca, fasulye, Kaliforniya böğürtlendi, krizantem, keçisedefi (*Galega officinalis*) gibi pek çok farklı konukçudan izole edilmişlerdir. PCR için, 23S rDNA dizisine özgün dört farklı primer tasarlanmıştır. UF adı verilen ileri yönlü primer, tüm *Rhizobium* strainlerinin 23S rDNA dizisine spesifik universal bir primerdir. Tasarlanan diğer dört geri yönlü primer, farklı bir *Rhizobium* türüne özgün dizayn edilmiştir. B1R primeri *Rhizobium tumefaciens* strainlerine, B2R primeri *Rhizobium rhizogenes* strainlerine, AvR primeri *Rhizobium vitis* strainlerine, ArR primeri *Rhizobium rubi* strainine spesifik tasarlanmıştır. UF ileri yönlü universal primeri ile B1R primeri beraber kullanıldığında 184 bp, B2R primeri beraber kullanıldığında 1066 bp, AvR primeri beraber kullanıldığında 478 bp, ArR primeri beraber kullanıldığında 1006 bp ürün vermektedir. UF ileri yönlü primeri ile kullanılan B1R primeri ile çalışmada kullanılan tüm *Rhizobium tumefaciens* strainleri, AvR primeri ile tüm *Rhizobium vitis* strainleri, ArR primeri ile tüm *Rhizobium rubi* strainleri tespit edilebilmiştir. UF ileri yönlü universal primeri ile B2R primeri kullanıldığında ise *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin yanında bazı *Allorhizobium undicola*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, *Rhizobium tropici* ve tüm *Sinorhizobium* strainleri pozitif sonuç vermiştir. Tasarlanan primer setlerinin hiçbirisi test edilen, *Rhizobium larrymoorei*, *Phyllobacterium*, *Arthrobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* ve *Xanthomonas* strainleri ile reaksiyon vermemiştir.

2006'da Genov ve arkadaşları, yabancı bir asma çeşidi olan *Vitis vinifera* spp. *silvestris*'ten 20 *Rhizobium* straini izole etmiştir. İzolasyon için seçilen asmalar Taç Gali veya Kök Kanseri hastalıklarına dair bir simptom içermeyen bireylerden seçilmiştir. İzole edilen strainler, biyokimyasal ve fizyolojik testler, patojenisite testleri, bazı kromozomal ve plazmit kaynaklı genlere özgün tasarlanmış primerler ile gerçekleştirilen PCR analizleri ile karakterize edilmiştir. PCR ile karakterizasyonların gerçekleştirilmesinde Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan PGF/PGR, Haas (Haas vd 1995) tarafından tasarlanan VirD2A/VirD2C', Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan VirE2PF/VirE2PR ile VisF/VisR primerleri kullanılmıştır. PGF/PGR primer seti ile *Rhizobium vitis* strainlerinin tamamı tanımlanabilmiştir. PGF/PGR primer setinin *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainleri ile reaksiyon vermediği saptanmıştır. VirD2A/VirD2C' primer seti ile sadece patojenik *Rhizobium vitis* strainleri başarıyla tespit edilebilmiştir. VirE2PF/VirE2PR primer seti ile oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri tanımlanabilmiş, ancak vitopin katabolize eden strainler ile pozitif sonuç alınamamıştır. VirE2PF/VirE2PR primer setinin *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* strainleri ile reaksiyon vermediği belirlenmiştir. Vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tanısı ise VisF/VisR primerleri ile gerçekleştirilmiştir. VisF/VisR primer seti sadece vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri ile reaksiyon vermektedir. İzole edilen strainlerin 19'unun patojenik *Rhizobium vitis*, 2'sinin patojenik olmayan *Rhizobium tumefaciens* straini olduğu belirlenmiştir. Kontrol straini olarak kullanılan oktopin, nopalin ve vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri ile patojenik olmayan *Rhizobium rhizogenes* ve patojenik *Rhizobium tumefaciens* straininin de tanısı başarı ile gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal ve fizyolojik testler, patojenisite testleri ile PCR analizlerinden elde edilen sonuçlar arasında yüksek korelasyon olduğu sonuçların birbirini desteklediği kaydedilmiştir.

2006'da Tanaka ve arkadaşları, farklı konukçulardan izole edilmiş 8 *Rhizobium vitis* strainini PFGE tekniği ile karakterize etmiş, patojenik bir strain olan K-Ag-1 strainini kullanarak *chv* genlerinin fiziksel haritalamasını gerçekleştirmiştir. Total genomların kesiminde az sıklıkla kesim yapan *PacI* ve *PmeI* enzimleri kullanılmıştır. K-Ag-1 strainine ait genomun biri 3,6 Mb, diğeri 1,1 Mb büyüklüğünde iki halkasal kromozom ile 560 kb, 230 kb ve 70 kb büyüklüğünde üç plazmitten oluştuğu belirlenmiştir. Büyük kromozom üzerinde iki rDNA lokusu, *chvA*, *chvD*, *chvE*, *glgP*, *exoC* ve *ros* kromozomal virülens genleri, küçük kromozom üzerinde bir rDNA lokusu bulunduğu saptanmıştır. Küçük kromozom üzerinde kromozomal virülens gen tespit edilmemiştir. rDNA lokusunun genom üzerindeki yeri *Rhizobium tumefaciens* strainlerinde saptandığı gibi iken, kromozomal virülens genlerin konumu *Rhizobium rhizogenes* strainlerindeki konuma benzer bulunmuştur. PFGE analizi sonucunda, iki farklı enzim ile test edilen 8 strainden 3'ünün hemen hemen özdeş bir profil ortaya koyduğu, ancak 5 strainin tamamen kendilerine has genom profillerine sahip olduğu görülmüştür.

2008'de Kawaguchi ve arkadaşları (Kawaguchi vd 2008-b), 8'i patojenik olmayan, 26 *Rhizobium vitis* strainini SAT (Slide Agglutination Test) ve Rep-PCR (Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction) yöntemleri ile karakterize etmişlerdir. Strainlerin tanımlanmasında daha önce Sachadyn ve Kur (Sachadyn ve Kur 1997) tarafından tasarlanan tms2A/tms2B, Bian ve arkadaşları (Bian vd 2003) tarafından

tasarlanan VirD2A/VirD2C' ile Kawaguchi ve arkadaşları (Kawaguchi vd 2005-b) tarafından tasarlanan VCF3/VCR3 primerleri kullanılmıştır. Karakterizasyon için uygulanan SAT yönteminde somatik antijenlere karşı hazırlanan antiserumlar kullanılmıştır. rep-PCR yönteminde *pyrG* (CTP sentaz), *recA* (Rekombinaz A) ve *rpoD* (RNA polimeraz sigma faktör 70) genlerinin kısmi dizilerine özgün tasarlanan primerler kullanılmıştır. *pyrG* geninin 984 bp'lik kısmını amplifiye eden ApyrF1 ve ApyrR4 primerleri, *recA* geninin 480 bp'lik kısmını amplifiye eden recAF1 ve recAR2 primerleri ve *rpoD* geninin 748 bp'lik kısmını amplifiye eden ArpoF1 ve ArpoF2 primerleri Ichiman ve arkadaşları (Ichiman vd 2006) tarafından tasarlanmıştır. *pyrG*, *recA* ve *rpoD* genleri pek çok mutasyon barındıran ve hücrenin hayati olaylarını kodlayan genler olduklarından karakterizasyonda kullanılmak üzere seçilmiştir. Gerçekleştirilen rep-PCR çalışmaları neticesinde *Rhizobium vitis* strainlerinin, dördü patojenik strainlere ait, beş ayrı gruba ayrıldığı ve genetik açıdan heterojen bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen serolojik sonuçların büyük ölçüde rep-PCR sonuçları ile örtüştüğü ifade edilmiştir.

2008'de Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-b), bağlara zarar veren tümörjenik patojen türleri olan *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* türlerini tanılamak için onkogen spesifik yeni primerler tasarlamışlardır. Tamamı asmadan izole edilmiş 3 *Rhizobium tumefaciens*, 16 *Rhizobium vitis* straini üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda, tüm strainlerin tespiti ancak Multipleks PCR ile mümkün olmuştur. *PehA*, *virF* ve *virD2* genlerine özgün tasarlanan PGF/PGR (Szegedi ve Bottka 2002), VirFF₁/VirFR₂ ve VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ primerlerinin birlikte kullanımı ile oktopin, nopalin ve vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin hemen hemen tamamını tanılanabilmiştir. Bu primerlerle tespit edilemeyen strainlerin tespiti için farklı genlere özgün farklı primer setleri geliştirilmiş ve geçmişte farklı araştırmacıların tasarladığı bazı primerler kullanılarak bu strainlerin de tespiti sağlanmıştır. Oktopin ve nopalin strainlerine ait *virF* geninin amplifikasyonunda Bini ve arkadaşları tarafından tasarlanmış VirFF₁/VirFR₂ primerleri, vitopin strainlerine ait *virD2* geninin amplifikasyonunda VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ primerleri, vitopin strainlerine ait *6b* geninin amplifikasyonunda SF/SR primerleri, *Rhizobium* strainlerine ait *iaaH* geninin amplifikasyonunda iaaH-F2/iaaH-R1 ve iaaH-F10/iaaH-R10 primerleri, *Rhizobium vitis* strainlerine ait *iaaM* geninin amplifikasyonunda S4iaaM5/S4iaaM3 primerleri, *Rhizobium vitis* strainlerine ait *ocs* geninin amplifikasyonunda OCTF/OCTR primerleri, *Rhizobium* strainlerine ait *nos* geninin amplifikasyonunda NOPF/NOPR primerleri kullanılmıştır. Bu primer setleri haricinde, Szegedi ve Bottka tarafından tasarlanan (Szegedi ve Bottka 2002) PGF/PGR ve VisF/VisR, Haas tarafından tasarlanan (Haas vd 1995) VirD2A/VirD2C' ve VirD2A/VirD2F, Szegedi tarafından tasarlanan (Szegedi vd 2005) TF/TR ve NF/NR primerleri de kullanılmıştır. VirD2A/VirD2C' ve VirD2A/VirD2F primer setleri ile patojenik *Rhizobium* strainlerinin tanısı gerçekleştirilmiştir. VirFF₁/VirFR₂ primer seti ile oktopin ve nopalin katabolize eden strainler tanılanmış, VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ primer seti ile vitopin katabolize eden strainler tanılanmıştır. *pehA* genine özgün PGF/PGR primer seti ile *Rhizobium vitis* strainleri tanılanmış ve *Rhizobium tumefaciens* strainleri ayrılmıştır. OCTF/OCTR, NOPF/NOPR ve VisF/VisR primerleri ile *Rhizobium vitis* strainlerinin hangi tip opin katabolize edebildiği belirlenmiştir.

2008'de Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-a), asmalardan izole edilen 50 *Rhizobium vitis* strainini, *virD2* genine spesifik primerler ve türe spesifik monoklonal antikorlar ile tanılamışlardır. *Rhizobium vitis* strainlerinin serolojik tanısında Bishop ve arkadaşlarının (Bishop vd 1989) geliştirdiği, farklı *Rhizobium* türleri, farklı bitki patojenleri, simbiyontlar ve saprofitler ile reaksiyon vermeyen, sadece *Rhizobium vitis* ile reaksiyon veren AbF21-1D3G7C8 antikorunu kullanılmıştır. Tanılanan strainlerin hangi opin tipini katabolize ettiği spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Kantitatif PCR için *virD2* amplikonlarının dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi neticesinde, oktopin ve nopalın katabolize eden strainlerdeki *virD2* gen dizisi ile vitopin katabolize eden strainlerdeki *virD2* gen dizisinin farklılık gösterdiği belirlenmiş ve bu dizilere spesifik primerler dizayn edilmiştir. Farklı tiplerde opin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerin tamamının tanısı için, her iki primer seti ile Multipleks Real-Time PCR gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR ile tanılamada SYBR Green (Synergy Brands) kullanılmıştır. Tasarlanan primerlerin türe olan spesifikliği farklı patojenlere karşı denenerek test edilmiştir. Strain ayrımı için klasik PCR yönteminde, Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-b) tarafından tasarlanan OCTF/OCTR ve NOPF/NOPR ve Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan VisF/VisR primerleri kullanılmıştır. Oktopin katabolize eden strainlerde 475 bp, nopalın katabolize eden strainlerde 394 bp, vitopin katabolize eden strainlerde 561 bp'lik amplikonların olduğu gözlemlenmiştir. Test edilen strainlerin 37'sinin oktopin, 11'inin vitopin, 2'sinin nopalın katabolize eden strainler olduğu saptanmıştır. *virD2* geninin klasik PCR ile çoğaltılmasında, Haas tarafından tasarlanan VirD2A/VirD2C' primerleri kullanılmış, *virD2* geninin Real-Time PCR ile çoğaltılmasında 96 bp'lik ürün veren VIRD59F26/VIRD59R122 primer seti ile 102 bp'lik ürün veren VIRD62F23/VIRD62R135 primer seti kullanılmıştır. VIRD59F26/VIRD59R122 ve VIRD62F23/VIRD62R135 primer setleri aynı PCR reaksiyonunda kombine edilerek Multipleks PCR gerçekleştirildiğinde hem oktopin hem nopalın hem de vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tespit edilebildiği, fakat bazı *Rhizobium tumefaciens* strainlerinden de pozitif sonuç alınabildiği belirtilmiştir.

2008'de Kumagai ve Fabritius, asmalarda zarara sebebiyet veren en önemli *Rhizobium* türleri olan *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* türlerinin patojenik strainlerini tanılamak için daha önceki çalışmalarda kullanılan primerlerden bir seçki oluşturmuş ve bu primerlerle Bio-BCR çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada asmalardan izole edilen 22 *Rhizobium* straini ve daha önce tanılanmış *Rhizobium* cinsine ait 7 kontrol straini kullanılmıştır. Virülens spesifik primer olarak *virD2* genine spesifik VirD2A/VirD2C' (Haas vd 1995) ve VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ (Bini vd 2008-b), *virC* genine spesifik VCF3/VCR3 (Suzaki vd 2004), *virF* genine spesifik VirFF₁/VirFR₂ (Bini vd 2008-b) primerleri seçilmiştir. *Rhizobium vitis* strainlerinin belirlenmesi VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ ve VirFF₁/VirFR₂ primer seti kombinasyonu ile Multipleks PCR gerçekleştirilmesi ve *pehA* genine spesifik PGF/PGR (Szegedi ve Bottka 2002) primer setinin kullanılması ile sağlanmıştır. VCF3/VCR3 primer setinin patojenik *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin tespitinde en başarılı primer seti olduğu belirlenmiştir. Bu primer seti tüm patojenik strainleri tespit etmeyi başarırken VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ ve VirFF₁/VirFR₂ iki patojenik *Rhizobium vitis* straininin tespitinde başarısız olmuştur. VirD2A/VirD2C' primer seti tüm patojenik *Rhizobium tumefaciens* strainlerini tespit edebilmiştir. PGF/PGR primer setinin de tüm patojenik ve patojenik olmayan *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitinde başarılı olduğu ifade edilmiştir.

2009'da Palacio-Bielsa ve arkadaşları, 56 tümörijenik *Rhizobium* strainini, farklı konukçulardaki patojenisiteleri, opin kullanımı, 16S rRNA dizilemesi ve beş farklı primer seti kullanarak gerçekleştirdikleri kromozomal ve Ti plazmit üzerindeki genlerin amplifikasyonları ile tür seviyesinde tanılamaya çalışmışlardır. PCR ile tanılamamanın gerçekleştirilmesinde daha önce Nesme ve arkadaşları (Nesme vd 1990) tarafından tasarlanan *virB* ve *virG* genleri arasındaki intersistronik bölgeye ve *tmr* genine özgün FGP*virB*₁₁₊₂₁/FGP*virG*15' ve FGP*tmr*530/FGP*tmr*701 primer setleri, Eastwell ve arkadaşları (Eastwell vd 1995) tarafından tasarlanan *virA* ve *pehA* genlerine özgün primerleri ile Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1995) tarafından tasarlanan VCF/VCR primerleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan strainlerin 50 tanesinin *Rhizobium vitis*, 3 tanesinin *Rhizobium tumefaciens*, 3 tanesinin *Rhizobium rhizogenes* straini olduğu tespit edilmiştir. Yapılan patojenisite testleri neticesinde strainlerin tamamının asmada patojenik olduğunu tespit edilmiştir. Hemen hemen tüm *Rhizobium vitis* strainlerinin tütün ve domateste patojenik olduğu saptanmıştır. *Rhizobium vitis* strainlerinin 38'inin oktopin katabolize edebildiği belirlenmiştir. 16S rRNA geni dizileme analizleri sayesinde strainleri belirgin bir şekilde tür düzeyinde ayırmak mümkün olabilmektedir. Dizileme analizleri, *Rhizobium vitis* strainlerinin tür düzeyi altında da kendi arasında üç farklı gruba ayrılabilceğini ve *Rhizobium vitis* strainlerinde üç farklı tümörijenik plazmit tipi bulunduğunu göstermektedir. Çalışmada, *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes* ve *Rhizobium vitis* strainlerinin tamamının tanı ve tespitinde kullanılabilecek universal bir primer belirlenmeye çalışılmış ancak başarılı olunamamıştır.

Dizileme yöntemi ile tür düzeyinde tanılama güvenilir bir şekilde tanılama yapılabilmesine rağmen, yöntemin zaman alıcı, yüksek düzeyde teknik bilgi gerektiren ve masraflı bir yöntem olması yöntemin pratikteki önemini azaltmaktadır (Shams 2012).

2009'da Lim ve arkadaşları, *Rhizobium vitis* strainlerinin tanı ve teşhisinde kullanılmak üzere SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) primerler dizayn etmişlerdir. SCAR primerleri URP2R universal pirinç primeri kullanılarak amplifiye edilen, *Rhizobium vitis* strainlerine spesifik pAVS3 DNA fragmentinin gen dizisi esas alınarak tasarlanmıştır. Universal pirinç primerleri (URP) pirinç genomunun tekrarlı dizilerinden tasarlanmış fakat fungus ve bakteri türleri ile de polimorfik DNA parmak izi paternleri oluşturduğu belirlenmiş primerlerdir (Kang vd 2001, 2002-a, 2002-b, 2003, Jana vd 2005). Araştırmacılar, 12 farklı URP primerini *Rhizobium* cinsi bakteriler üzerinde test etmiş *Rhizobium vitis* strainlerinde ortak fragment olduğunu belirledikleri pAVS3 fragmentini *Rhizobium vitis* türü için markör olarak saptamışlardır. pAVS3 DNA fragmentinin *Rhizobium vitis* strainlerine olan spesifikliği farklı *Rhizobium* türlerinin ve farklı bitki patojeni bakterilerin genomik DNA'ları ile gerçekleştirilen Southern hibridizasyon testleri ile sınanmıştır. pAVS3 fragmentinin 670 bp'lik kısmının sekans analizi gerçekleştirilmiş, bu diziye uygun AVSP3-1F/AVSP3-1R ve AVSNP-3F/AVSNP-3R primer setleri tasarlanmıştır. Klasik PCR yöntemi için tasarlanan AVSP3-1F/AVSP3-1R primer seti pAVS3 DNA fragmentinin 500 bp'lik kısmını amplifiye ederken, Nested PCR için tasarlanan AVSNP-3F/AVSNP-3R primer seti pAVS3 DNA fragmentinin 400 bp'lik kısmını amplifiye etmektedir. Çalışmada 6'sı patojenik olmayan 64 *Rhizobium vitis* straini test edilmiştir. Tasarlanan primer setinin spesifikliğinin test edilmesinde *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium*, *rhizogenes*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli* gibi farklı *Rhizobium* cinsi bakterilerin yanında, *Sinorhizobium meliloti*, *Pectobacterium carotovorum* subsp.

carotovorum, *Dickeya chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve daha pek çok farklı bakteri türü kullanılmıştır. Her iki primer seti ile çalışmada yer alan tüm *Rhizobium vitis* strainleri tespit edilebilmiştir.

2009'da Slater ve arkadaşları, *Rhizobium radiobacter* K84 straini ve *Rhizobium vitis* S4 straininin genom sıralamasını çıkarmışlardır. *Rhizobium vitis* S4 straini vitopin katabolize eden ve sadece asmada hastalık oluşturan dar konukçu aralıklı, konukçusu olmayan bitkilerde hipersensitif reaksiyona neden olan bir *Rhizobium vitis* tip strainidir. Araştırmacılar bu dizileri daha önce genom dizisi çıkartılan *Rhizobium tumefaciens* C58 straini (Goodner vd 2001, Wood vd 2001) ile karşılaştırmışlar, *Rhizobiaceae* familyasının içerdiği farklı genom mimarilerine, strainlerin evrimsel ilişkilerine ve ikincil kromozomların meydana geliş mekanizmalarına ışık tutmaya çalışmışlardır. Dizileme için söz konusu strainlere ait genomlar mekaniksel yöntemler ile 2-4 kb'lık ve 4-8 kb'lık parçalara ayrılmış ve bu parçalar pUC18 vektörleri içine klonlanarak iki farklı gen kütüphanesi oluşturulmuştur. Kütüphanedeki kısmen örtüşen genom parçaları Shotgun dizileme yaklaşımı ile dizilenmiş ve Phred (Ewing ve Green 1998), Phrap (Ewing vd 1998) ve Consed (Gordon vd 1998) yazılımları ile düzenlenip sıraya konulmuştur. Araştırmacılar gerçekleştirdikleri dizilemenin hata oranını 10.000 bazda 1 bazdan az olarak tahmin etmişlerdir. Dizi analizleri neticesinde patojenik *Rhizobium* strainlerinin taşıdığı iki ana kromozomdan büyük olanının gen içeriği ve gen sıralaması açısından oldukça konservatif olduğu belirlenirken, ikincil kromozomdaki genlerin sıralaması ve içeriği bakımından daha esnek bir yapıda olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, ikincil kromozomun kromozomal genleri de bünyesine katmış olan atasal bir plazmitten evrildiğini öne sürmüşlerdir. İkincil kromozomun, birincil kromozomdan transfer edildiği düşünülen rRNA operonları ve bazı esansiyel genleri içeren büyük genom segmentlerine sahip olduğu saptanmıştır.

2010'da Costechareyre ve arkadaşları, aralarında *Rhizobium vitis* türünün de bulunduğu farklı konukçulardan izole edilmiş, 13 farklı türe ait patojenik ve patojenik olmayan 138 bakteri straininin *RecA* ve 16S rDNA gen dizilerini karşılaştırmışlar, *RecA* alel analizi ile *Rhizobium* cinsini tanılamaya çalışmışlardır. *RecA* gen dizisinin amplifikasyonunda, *Rhizobium tumefaciens* C58 straininde 1028 bp'lık amplifikasyon sağlayan dejenere F2898/F2899 primer seti, 16S rDNA dizisinin amplifikasyonunda Bruce ve arkadaşları (Bruce vd 1992) tarafından topraktaki bakterileri saptamak amacıyla tasarlanan yaklaşık 1,5 kb'lık amplifikasyon sağlayan PA/PH' primer seti kullanılmıştır. AFLP analizi kapsamında gerçekleştirilen DNA kesimlerinde *EcoRI* ve *MseI* enzimleri kullanılmıştır. Analizler neticesinde 138 strainde 50 farklı *RecA* aleli saptanmıştır. Bu alellerin 41'inin *Rhizobium tumefaciens*, 4'ünün *Rhizobium larrymoorei*, 2'sinin *Rhizobium vitis*, 1'inin *Rhizobium rubi*, 1'inin *Rhizobium rhizogenes* 1'inin de türü bilinmeyen bir *Rhizobium* straini, türüne ait olduğu belirlenmiştir. *Rhizobium* cinsi içinde *RecA* geninin büyük varyasyon gösterdiği, bu yüzden yöntemin genomik tür seviyesinde ayırım gerçekleştirebilecek nitelikte olduğu belirtilmiştir. Gerçekleştirilen AFLP analizlerinin de tür altı seviyesinde tanılama yapmaya olanak verdiği ifade edilmiştir. Araştırmacılar, AFLP paternlerinin özellikle filogenetik çalışmaların gerçekleştirilmesinde yol gösterici olabileceğini belirtmişlerdir.

2011’de Kawaguchi, 2008’de Kawaguchi ve arkadaşları (Kawaguchi vd 2008-b) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın genetik ayağını 44 *Rhizobium vitis* straini ile aynı primerleri kullanarak test etmiştir. Daha önce gerçekleştirilen çalışmada dördü patojenik strainlerden oluşan beş farklı genetik grup meydana geldiği tespit edilirken, bu çalışmada önceki çalışmada tespit edilen gruplardan ikisi birleştirilmiş ve strainler altısı patojenik yedi gruba ayrılmıştır.

2011’de Tolba ve Zaki, asma tümörlerinden izole ettikleri 12 *Rhizobium* strainini *Rhizobium vitis* strainlerine karşı geliştirilmiş antikorlar, asmadaki ur oluşturma kabiliyetleri, biyokimyasal ve fizyolojik testler ve PCR yöntemlerini kullanarak *Rhizobium vitis* olarak tanılamışlardır. Tanılanan etmenlerin kalanşo, ayçiçeği, datura, tütün ve sirkende ur oluşturma kabiliyetleri incelenmiş, etmenlerin konukçu aralığı belirlenmeye çalışılmıştır. Strainler arasındaki genetik farklılıkların tespitinde üç spesifik primer çifti ve Multipleks PCR kullanılmıştır. Tür düzeyinde tanılamamanın PCR ile gerçekleştirilmesinde Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan PGF/PGR primerleri, strainlerin sentezlediği opin tipinin PCR ile belirlenmesinde ise Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-b) tarafından tasarlanan VirFF₁/VirFR₂ ve VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ primerleri kullanılmıştır. VirFF₁/VirFR₂ ve VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ primerleri ile gerçekleştirilen reaksiyonlar neticesinde 12 strainden 8’inin oktopin katabolize eden, 4’ünün vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straini olduğu belirlenmiştir. 2 strain her iki primerle de pozitif sonuç vermiştir. Strainlerin genetik olarak, oktopin Ti plazmiti taşıyanlar, vitopin Ti plazmiti taşıyanlar ve hem oktopin hem vitopin Ti plazmiti taşıyanlar olarak üçe ayrıldığı belirlenmiştir.

2012’de Rouhrazi ve Rahimian, asmalardaki tümörlerden izole ettikleri 105 *Rhizobium* strainini, fenotipik özelliklerine, *virD2* ve *pehA* geni varlığına dayanarak karakterize etmişlerdir. 77 strainin *Rhizobium vitis*, 28 strainin *Rhizobium radiobacter* straini olduğu belirlenmiştir. 99 *vir* gen dizisi taşıdığı belirlenen strain arasında, 49 strainin oktopin, 35 strainin vitopin, 8 strainin nopalin katabolize edebildiği tespit edilmiştir. 7 strainin hangi opin tipini katabolize edebildiği tespit edilememiştir. Klasik PCR ile gerçekleştirilen tanılarda Haas ve arkadaşları (Haas vd 1995) tarafında tasarlanan VirD2A/VirD2C’, Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-b) tarafından tasarlanan OCTF/OCTR ve NOPF/NOPR ve Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan PGF/PGR ve VisF/VisR primerleri kullanılmıştır.

2012’de Hussam ve Katsunori, asmadan farklı kaynaklardan izole ettikleri geniş konukçu aralıklı 8 *Rhizobium vitis* strainini *virC* genine spesifik primerler ile tanılamışlardır. İzole edilen strainlerin patojenisitesi molohiya (*Corchorus olitorius*), tütün, domates, fasulye ve kalanşoda test edilmiştir. Test edilen strainlerin tamamının tüm konukçularda patojenik olduğu belirlenmiştir. *Rhizobium tumefaciens* strainlerini tanılamakta daha önce Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1995) tarafından tasarlanan hem Ti hem de Ri plazmitlerinde bulunan *virC* operonuna spesifik VCF/VCR primer seti kullanılmıştır. Test edilen tüm strainlerin bu primer seti ile pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Strainlerin Ti plazmit taşıyıp taşımadığının belirlenmesi Southern blot tekniği ile DNA hibridizasyonu gerçekleştirilmiştir. Strainlere ait genomik DNA’ların kesiminde *EcoRI* endonükleaz enzimi kullanılmıştır. Test edilen strainlerin tamamının Ti plazmit taşıdığı kaydedilmiştir.

2012’de Shams MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) yöntemi ile *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium larrymoorei*, *Rhizobium spp.*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium meliloti* gibi farklı türlere ait 118 *Rhizobium* strainini tanılamış ve strainlerin filogenetik analizlerini gerçekleştirilmiştir. MALDI-TOF MS sisteminde, bakteriyel koloniler bir matriks içinde konumlandırılmış şekilde bir lazerin önünde durmaktadır. Tanılama lazer atışları ile iyonize edilip desorbe olan hücre yüzeyindeki proteinlerin kendilerine has kütle/yük (m/z) oranlarının tespit edilmesi vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Desorbe olan iyonlar yüksek potansiyel farkı barındıran bir vakum ile hızlandırılmakta, hızlanan iyonların dedektöre ulaşım süreleri ve kütle/yük oranları ile dedektör tarafından saptanmaktadır. Tanılamada kullanılan proteinlere ait kütle/yük oranları 2.000 ila 20.000 Da arasında değiştirilebilmektedir. Analiz neticesinde *Rhizobium* strainlerinin benzer iyon profillerine sahip olduğu belirlenmiştir. Pikler, 2.000 ila 20.000 Da aralığında 150 karakteristik iyonun varlığına işaret etmektedir. *Rhizobium spp.*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium meliloti* türlerinde farklı iyon profilleri kaydedilmiştir. MALDI-TOF MS yönteminin farklı besi ortamlarından geliştirilmiş kolonileri tanılamada da başarılı olduğu kaydedilmiştir.

2012’de Campillo ve arkadaşları, ulusal kaynaklarla desteklenmiş araştırma projelerinin Avrupa düzeyinde koordinasyonunu sağlamak ve Avrupa bilim insanlarının ortak çalışmalarını desteklemek amacıyla kurulmuş olan COST (European Cooperation in Science and Technology) organizasyonu kapsamında taş çekirdekli, ceviz, badem, fındık, pıkan cevizi gibi bitkilerdeki patojenik bakteriyel etmenlerin tanısı ve tespiti ile ilgili bir çerçeve program yayınlamışlardır. Bakteriyel patojenlerin izolasyon metotları, izolasyonda kullanılabilecek besi ortamları, bakteriyel patojenlere ait tip strainler, uygulanabilecek biyokimyasal ve fizyolojik testler, patojenisite testleri, DNA izolasyon yöntemleri, PCR ile tanı ve teşhiste kullanılabilecek primerler, izole edilen patojenlerin muhafazası gibi tanı ve tespitin aşamalarında uygulanacak basamaklar bu program dahilinde bir çerçeveye oturtulmuştur. Program, *Rhizobium vitis* strainlerinin izolasyonunda potasyum tellürit (K_2TeO_3) içeren 3DG (Brisbane ve Kerr 1983) ve RS (Roy ve Sasser 1983) besi ortamlarının kullanımını önermektedir. *Rhizobium* cinsi bakterilerin tanı ve tespitinde önerilen biyokimyasal testler ise tellürit redüksiyonu, mannitolün tek karbon kaynağı olarak kullanımı ile üreaz ve eskülinaz hidroliz enzimlerinin varlığının tespiti olarak sıralanabilir. *Rhizobium vitis* türünün tespitinde ise *cis*-akonitik asidin metabolize edilip edilemediğinin tespiti ve poligalakturonik asit eklenmiş PGA ortamında (McGuire vd 1991) pektolitik aktivite varlığının belirlenmesi önerilmektedir. Serolojik testler *Rhizobium* cinsinin tanılanması için uygun görülmemiştir. Patojenisite testlerinin gerçekleştirilmesinde 3 haftalık domates veya 7 günlük ayçiçeği fidelerinin kullanılması uygun görülmüş, inokulumun optik yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml’ye karşılık gelen $OD_{600}=0,1$ olacak şekilde ayarlanması önerilmiştir. Patojenik *Rhizobium* strainlerinin tespitinde Kawaguchi ve arkadaşları (Kawaguchi vd 2005-b) tarafından tasarlanan VCF3/VCR3 ile Pulawska ve Sobiczewski (Pulawska ve Sobiczewski 2005) tarafından tasarlanan tms2F1/tms2R2 primer setleri, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin tespitinde Nesme ve arkadaşları (Nesme vd 1990) tarafından tasarlanan F14-*vir*/F749-*vir* primer setinin kullanılması önerilmiştir. Tür düzeyinde tanılamının gerçekleştirilmesinde ise PCR ve MALDI-TOF MS yöntemlerinin kullanılması önerilmiştir. PCR ile tanılamının gerçekleştirilmesinde, Pulawska ve

arkadaşları (Pulawska vd 2006) tarafından tasarlanan UF adı verilen ileri yönlü primer ile beraber, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin tanılanması için B1R, *Rhizobium radiobacter* strainlerinin tanılanması için B2R, *Rhizobium vitis* strainlerinin tanılanması için AvR, *Rhizobium rubi* strainlerinin tanılanması için ArR geri yönlü primerlerinin kullanılması tavsiye edilmiştir.

2012’de Pulawska ve arkadaşları (Pulawska vd 2012-b), krizantem ve kiraz eriği tümörlerinden izole ettikleri bakterilerin yeni bir *Rhizobium* straini olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında, günümüzde *Rhizobium skierniewicense* olarak adlandırılan *Rhizobium* strainini 16S rDNA dizileri ve yağ asidi profilleri bakımından diğer patojenik türlerle karşılaştırmışlardır. 16S rDNA amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesinde Weisburg ve arkadaşları tarafından tasarlanan (Weisburg vd 1991) fD1 ve rP2 primerleri kullanılmıştır. Krizantem ve kirazdan izole edilen 3 bakteri straininin gerçekleştirilen 16S rDNA analizleri, strainlerin kendi içinde %100 benzer olduğunu, *Rhizobium rubi* ile %99,6, *Rhizobium radiobacter* ile %98,7, *Rhizobium larrymoorei* ile %98,1 benzer olduğunu göstermiştir. *glnA* (Glutamin sentaz I), *gyrB* (DNA giraz B altünitesi) ve *rpoB* (RNA polimeraz β altünitesi) kromozomal genler üzerinde yapılan benzer çalışmalar da bu strainlerin *Rhizobium rubi* ile yakından akraba olduğunu göstermiştir. *glnA* geninin amplifikasyonunda Martens ve arkadaşları tarafından tasarlanan (Martens vd 2007) 896 bp’lik ürün veren *glnA.vitisF* ve *glnA.vitisR*, *gyrB* geninin amplifikasyonunda Yamamoto ve Harayama tarafından tasarlanan (Yamamoto ve Harayama 1995) 699 bp’lik ürün veren UP-1 ve UP-2r, *rpoB* geninin amplifikasyonunda Martens ve arkadaşları tarafından tasarlanan (Martens vd 2008) 930 bp’lik ürün veren *rpoB83F* ve *rpoB1061R* primerleri kullanılmıştır. Gen bazındaki benzerliklere karşı gerçekleştirilen DNA hibridizasyon analizleri *Rhizobium rubi* ile *Rhizobium skierniewicense* türleri arasındaki benzerliğin %48 olduğunu göstermiştir. *Rhizobium skierniewicense* strainlerinin %GC içeriği 57,2 olarak belirlenmiştir. *Rhizobium skierniewicense* türü, *Rhizobium tumefaciens* genomovar G14 genomik varyetesine karşılık gelmektedir (Shams vd 2012).

2012’de Pulawska ve arkadaşları (Pulawska vd 2012-a), kiraz eriği, kiraz, *Prunus avium*×*Prunus pseudocerasus* hibrit kiraz anacı, ahududu ve asma tümörlerinden izole ettikleri bakterilerin yeni bir *Rhizobium* straini olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında, günümüzde *Rhizobium nepotum* olarak adlandırılan *Rhizobium* strainini 16S rDNA dizileri ve yağ asidi profilleri bakımından diğer patojenik türlerle karşılaştırmışlardır. 16S rDNA amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesinde Weisburg ve arkadaşları tarafından tasarlanan (Weisburg vd 1991) fD1 ve rP2 primerleri kullanılmıştır. 16S rDNA üzerinde gerçekleştirilen dizi benzerlik analizleri bu bakterilerin *Rhizobium* cinsi içinde yer aldığını göstermiştir. 16S rDNA benzerlik analizleri, *Rhizobium nepotum* strainlerinin *Rhizobium radiobacter* ile %99,1, *Rhizobium skierniewicense* ile %98,8, *Rhizobium rubi* ile %98,6 *Rhizobium pusense* ile %97,9 ve *Rhizobium larrymoorei* ile %97,2 benzer olduğunu göstermiştir. Kromozomal *atpD* (ATP sentaz F1 β altünitesi), *glnA*, *gyrB*, *recA* ve *rpoB* genlerine dayalı gerçekleştirilen filogenetik analizler bu yeni bakteri türünün *Rhizobium radiobacter* ile yakınlığını teyit etmiştir. *atpD* geninin amplifikasyonunda Martens ve arkadaşları (Martens vd 2008) tarafından tasarlanan 418 bp’lik ürün veren *atpD352F* ve *atpD871R*, *RecA* geninin amplifikasyonunda Costechareyre ve arkadaşları (Costechareyre vd 2010) tarafından tasarlanan 429 bp’lik ürün veren F2898 ve F2899, *gyrB* geninin amplifikasyonunda

Yamamoto ve Harayama tarafından tasarlanan (Yamamoto ve Harayama 1995) 699 bp'lık ürün veren UP-1 ve UP-2r, *rpoB* geninin amplifikasyonunda Martens ve arkadaşları tarafından tasarlanan (Martens vd 2008) 877 bp'lık ürün veren *rpoB*83F ve *rpoB*1061R primerleri kullanılmıştır. Gen bazındaki benzerliklere karşın gerçekleştirilen DNA hibridizasyon analizleri *Rhizobium radiobacter* ile *Rhizobium nepotum* türleri arasındaki benzerliğin %45 olduğunu göstermiştir. Fenotipik ve fizyolojik özelliklerin de bu strainlerin yakın akraba diğer türlerden ayrıldığını göstermektedir. *Rhizobium nepotum* strainlerinin %GC içeriği 57,2 olarak belirlenmiştir.

2012'de Pulawska ve Kałuzna, asma, toprak, elma, kiraz, vişne, armut, şeftali domates, kavak, krizantem, ahududu, ağlayan incir gibi farklı konukçulardan izole edilen 59 *Rhizobium* strainini, *gyrB* dizi analizi, 16S rDNA dizi analizi RFLP analizi ve RAPD-PCR analizi ile tanımlamışlardır. *gyrB* geninin amplifikasyonunda Yamamoto ve Harayama tarafından tasarlanan (Yamamoto ve Harayama 1995) UP-1/UP-2r, primer seti kullanılmıştır. UP-1/UP-2r, primer seti ile elde edilen ampikonlar *Alw*21I, *Bsp*143II, *Mva*I ve *Hinf*I enzimleri ile kesilmiştir ve RFLP analizi gerçekleştirilmiştir. RFLP analizlerinde en fazla patern *Bsp*143II endonükleaz ile kesilen grupta elde edilmiştir. Toplam 21 RFLP grubu saptanmıştır. Bu durum *Rhizobium* cinsinin sanılandan daha kompleks bir yapıda olduğunun bir göstergesidir. Sekans analizi için her RFLP grubundan bir strain seçilmiş, seçilen bu strainlerin yanına *Rhizobium tumefaciens*, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium larrymoorei*, türlerinden bir strain türleri temsil etmek üzere eklenmiştir. Bazı *Rhizobium* strainleri de bu seçilmiş strainlere eklenerek dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Seçilen tüm bu strainlere ait 16S rDNA genleri de amplifiye edilmiş ve bu ampikonların da dizi analizi gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesinde Weisburg ve arkadaşları tarafından tasarlanan (Weisburg vd 1991) *fD1* ve *rP2* primerleri kullanılmıştır. RAPD-PCR analizlerinin gerçekleştirilmesinde tasarlanan OPA01, OPAR03, OPD04, OPU19 ve OPW20 isimli primerler kullanılmıştır. RFLP analizi, dizi analizi ve RAPD-PCR analizinden alınan sonuçlarla filogenetik ağaçlar oluşturulmuş, oluşturulan ağaçların büyük ölçüde örtüştüğü görülmüştür. En yüksek ayrımın *gyrB* geninin dizi analizinden elde edilen sonuçlarla oluşturulan filogenetik ağaçta olduğu ifade edilmiştir. Uygulanan metotlardan alınan sonuçlar genetik açıdan en heterojen grubun *Rhizobium tumefaciens* strainleri olduğunu göstermektedir.

2013'te Shams ve arkadaşları, *Rhizobium* strainlerini genomik varyete düzeyinde tanılamak amacıyla her tür veya genomvarın *RecA* dizisine spesifik primerler dizayn etmişlerdir. Çalışmada, farklı konukçulardan izole edilmiş *Rhizobium tumefaciens* genomvarları, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium larrymoorei*, *Rhizobium skierniewicense* ve *Rhizobium undicola* strainleri kullanılmıştır. *RecA* gen dizisinin PCR yöntemiyle amplifikasyonunda Costechareyre ve arkadaşları (Costechareyre vd 2010) tarafından tasarlanan *dejenere* F2898/F2899 primer seti kullanılmıştır. F2898/F2899 primer seti ile amplifiye edilen 1028 bp'lık bölgeler dizi analizine tabi tutulmuş ve her bir straine has gen dizisi elde edilmiştir. Elde edilen dizilerden, *Rhizobiaceae* familyasına özgün 779 bp'lık ürün veren F7386/F7387, *Rhizobium* cinsine özgün 453 bp'lık ürün veren F8360/F8361, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 1 genomik varyetesine özgün 813 bp'lık ürün veren F6782/F6786, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 2 genomik varyetesine özgün 633 bp'lık ürün veren F6790/F6786, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 3 genomik varyetesine özgün 401 bp'lık ürün veren F8232/F8227, *Rhizobium*

tumefaciens genomvar 4 genomik varyetesine özgün 511 bç'lik ürün veren F8533/F8827, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 5 genomik varyetesine özgün 290 bç'lik ürün veren F8232/F8228, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 6 genomik varyetesine özgün 442 bç'lik ürün veren F8392/F8229, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 7 genomik varyetesine özgün 502 bç'lik ürün veren F6788/F8413, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 8 genomik varyetesine 502 bç'lik ürün veren F6784/F6786, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 9 genomik varyetesine 315 bç'lik ürün veren F8359/F8230, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 13 genomik varyetesine özgün 358 bç'lik ürün veren F8232/F8231, *Rhizobium tumefaciens* genomvar 14 genomik varyetesine özgün 592 bç'lik ürün veren F9033/F9034, *Rhizobium vitis* türüne özgün 329 bç'lik ürün veren G0004/G0005, *Rhizobium rubi* türüne özgün 414 bç'lik ürün veren G0009/G0001, *Rhizobium larrymoorei* türüne özgün 357 bç'lik ürün veren F9186/F9187, *Rhizobium skierniewicense* türüne özgün 518 bç'lik ürün veren F9190/G0008, *Rhizobium undicola* türüne özgün 356 bç'lik ürün veren G0002/G0001 primer setleri tasarlanmış ve bu primer setleri ile strainlerin tanısı ve tespiti gerçekleştirilmiştir.

2013'te Chebil ve arkadaşları, 1-2 yaşlı hastalıklı asma dokularından izole ettikleri 50 DNA örneğini *pehA*, *virF* ve *virD2* genlerine spesifik primerler kullanarak Multipleks PCR yöntemi ile test etmişlerdir. Araştırmacılar, hemen hemen tüm örneklerdeki *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* strainlerine ait DNA'ları tespit etmeyi başarmışlardır. Analizler neticesinde hastalıklı doku örnekleri, oktopin, vitopin ve hem oktopin hem vitopin katabolize eden *Rhizobium* strainlerini barındıran örnekler olarak üç ana gruba ayrılmıştır. Tümörlerin oluşmasına neden olan strainlerin türünün belirlenmesi ve *Rhizobium vitis* ile *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin oluşturduğu tümörlerin birbirlerinden ayrılması için Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan PGF/PGR primerleri, tümörlerin oluşmasına neden olan strainlerin katabolize edebildiği opin tipinin belirlenebilmesi için ise Bini ve arkadaşları tarafından tasarlanan VirFF₁/VirFR₂ ve VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ primerleri kullanılarak Multipleks PCR gerçekleştirilmiştir. *virF*, *virD2* ve *pehA* genlerinin PCR ile amplifikasyonunda sırasıyla 382, 320 ve 466 bç'lik fragmentlerin meydana geldiği saptanmıştır. İzole edilen DNA örneklerinden birinin *pehA* ve *virD2* geni taşımayan bir straine ait olduğu, geriye kalan 49 DNA örneğinin *vir* bölgesi taşıyan patojenik *Rhizobium* strainlerine ait olduğu belirlenmiştir. 8 örneğin oktopin, 3 örneğin vitopin katabolize eden strainlere ait olduğu kaydedilmiştir. 38 DNA örneğinde ise *virF*, *virD2* ve *pehA* genlerinin PCR ile amplifikasyonunda meydana gelen 382, 320 ve 466 bç'lik fragmentlerin üçünün de meydana geldiği saptanmıştır. Test edilen patojenik strainlere ait tüm örneklerde sonuç alınması, test edilen örnekler arasında nopalin katabolize eden bir straine ait DNA örneği bulunmadığını göstermektedir.

2013'te Johnson ve arkadaşları, Real-Time PCR yöntemi ile patojenik *Rhizobium vitis* strainlerini tespit etmeye çalışmışlardır. Bitki dokusundan gerçekleştirilen tanı ve tespit çalışmasında, bitki kaynaklı PCR inhibitörlerinin reaksiyona olan olumsuz etkisini bertaraf etmek amacıyla DNA bitki ekstraktından Magnetic Capture Hybridization (MCH) ve Immuno-Magnetic Separation (IMS) yöntemleri ile ayrıştırılmıştır. Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-a) tarafından tasarlanan vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerine ait *virD2* genine spesifik primer setlerinden elde edilen amplikonlar kullanılarak, araştırmacılar tarafından virD2-F/virD2-R ve virD2.For1/virD2.Rev1 primer setleri dizayn edilmiştir. Çalışma sonucunda asma, elma, papatya, ahududu, ceviz

(*Juglans* spp.) gibi farklı konukçulardan izole edilmiş 22'si patojenik 27 *Rhizobium vitis* straini, tamamı patojenik 4 *Rhizobium tumefaciens* straini ve 3 *Rhizobium rhizogenes* straini arasından tüm patojenik *Rhizobium* strainleri tespit edilebilmiştir.

Real-Time PCR, PCR yöntemi ile DNA'nın amplifikasyonu esnasında hedef DNA molekülünün saptanması esasına dayanan PCR tabanlı bir laboratuvar tekniğidir. Prosedür genel prensipleri açısından PCR yöntemi ile benzer olmakla birlikte, temel fark reaksiyon esnasında çoğaltılan DNA dizisinin reaksiyon devam ederken tespit edilmesi ve miktarının kantitatif olarak belirlenebilmesidir (Anonim 2014-a). Real-Time PCR yönteminin PCR yöntemine göre avantajları, daha hızlı ve daha güvenilir sonuç vermesi, daha kontrollü bir sistem olduğundan çapraz bulaşma risklerinin daha düşük olması, daha az iş gücü gerektirmesi, daha kullanıcı dostu olması, daha kolay optimize edilebilmesi, kantitatif sonuç vermesi şeklinde sıralanabilir (Schaad ve Frederick 2002).

Real-Time PCR, bitki patojenlerinin tanı ve teşhisinde devrimsel bir yeniliktir. Genomik çağ ilerledikçe, daha fazla patojen genom dizisi ve patojen genomlarına spesifik primer setleri ve floresan probalar ulaşılabilir olmaktadır. Taşınabilir Real-Time PCR cihazları diagnostik çalışmaların direkt arazide veya laboratuvardan uzak lokasyonlarda gerçekleştirilmesine olanak vermektedir. Real-Time PCR ile gerçekleştirilen tanı ve teşhisler patojenin kontrolüne dair tedbirlerin veya eradikasyon prosedürlerinin daha doğru yürütülmesi sağlamaktadır. Bu sayede ürün kayıpları minimize edilebilmekte ve hastalık kontrol maliyetleri düşürülebilmektedir. Özellikle tohum, patates yumrusu, aşı kalemleri gibi asimptomatik üretim materyalindeki patojenlerin tanı ve teşhisi, az sayıda patojenin tanı ve teşhisine olanak veren hassas teknikler ile mümkün olmaktadır. Real-Time PCR sistemi uygun tasarlanmış prob ve primer seti ile DNA ekstraksiyonu yapılmadan saf bakteri kültürü veya enfekteli bitki özsuğu ile direkt tanı yapmaya da olanak vermektedir (Schaad ve Frederick 2002). Lakin bitki özsuğundaki bazı PCR inhibitörleri, patojenlerin tespitinde sistemin yanlış sonuç vermesine neden olabilmektedir (Rasmussen ve Wulff 1991, Weller vd 2000). Serolojik testler geliştirilene değin bakteriyel ve fungal etmenlerin tanı ve teşhisinde kullanılan en önemli metotlar etmenin kültür ortamına izolasyonu ve patojenisite testleri idi. Serolojik teknikler, bakteriyel etmenler için hızlı tanı imkanı sağlamıştır (Schaad ve Frederick 2002). Ancak serolojik testlerde hedeflenmeyen strainlerdeki bazı yaygın epitopların yanlış sonuçların ortaya çıkmasına neden olabildiği gösterilmiştir (Galzolari vd 1982, Crowley ve De Boer 1982, Bishop vd 1989). DNA temelli teknikler geliştirilene değin asimptomatik bitki materyallerinden hastalık etmenlerinin güvenilir bir şekilde tespiti gerçekleştirilememiştir. Spesifik hibridizasyon problemleri kullanılarak gerçekleştirilen DNA hibridizasyon teknikleri ise spesifik bir tanılamamanın gerçekleştirilmesinde oldukça kullanışlı olmalarına rağmen, yöntemin yeterince hassas olmaması, zaman alıcı ve teknik bilgi gerektiren bir yöntem olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. PCR yönteminin geliştirilmesi ile tanı ve teşhiste hedeflenen hassasiyete ulaşılmıştır (Schaad ve Frederick 2002).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyeel Strainler

Bu çalışma kapsamında Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda Prof. Dr. Hüseyin Basım tarafından oluşturulmuş kültür stoklarında yer alan yerli ve yabancı *Rhizobium vitis* strainleri ve farklı cins ve türlere ait bitki patojeni bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3).

Çizelge 3.1. Türkiye'de asmalardan izole edilen ve Real-Time PCR çalışmalarında kullanılan *Rhizobium vitis* strainleri

İzolat	Orijin	Referans	İzolat	Orijin	Referans
Tr 1	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 29	Türkiye	Nevşehir Argun 2001
Tr 2	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 30	Türkiye	Nevşehir Argun 2001
Tr 3	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 31	Türkiye	Nevşehir Argun 2001
Tr 4	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 32	Türkiye	Ankara Argun 2001
Tr 5	Türkiye	Ankara Argun 2001	Tr 33	Türkiye	Ankara Argun 2001
Tr 6	Türkiye	Ankara Argun 2001	Tr 34	Türkiye	Ankara Argun 2001
Tr 7	Türkiye	Ankara Argun 2001	Tr 35	Türkiye	Ankara Argun 2001
Tr 13	Türkiye	Kırıkkale Argun 2001	Tr 36	Türkiye	Nevşehir Argun 2001
Tr 15	Türkiye	Ankara Argun 2001	Tr 37	Türkiye	Nevşehir Argun 2001
Tr 22	Türkiye	Konya Argun 2001	Tr 45	Türkiye	Karaman Argun 2001
Tr 23	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 49	Türkiye	Konya Argun 2001
Tr 24	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 51	Türkiye	Nevşehir Argun 2001
Tr 25	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 52	Türkiye	Nevşehir Argun 2001
Tr 26	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 53	Türkiye	Nevşehir Argun 2001
Tr 27	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 59	Türkiye	Kırıkkale Argun 2001
Tr 28	Türkiye	Nevşehir Argun 2001	Tr 60	Türkiye	Kırıkkale Argun 2001

Çizelge 3.2. Real-Time PCR'da test edilen farklı *Rhizobium* türleri

İzolat	Bakteri Türü	Orijin	Konukçu	Referans
ICMP 10753	<i>Rhizobium vitis</i>	Avustralya	Asma	Ophel ve Kerr 1990
ICMP 18522	<i>Rhizobium vitis</i>	İran	Asma	Rouhrazi ve Rahimian 2012
AT 78	<i>Rhizobium tumefaciens</i>	Türkiye	Asma	Basım 2003
DSM-30132	<i>Rhizobium pisi</i>	ABD	Bezelye	Ramirez-Bahena vd 2008
DSM-30137	<i>Rhizobium phaseoli</i>	ABD	Fasulye	Malik 1988
DSM-30140	<i>Rhizobium lupini</i>	Almanya	Acı Bakla	Malik 1988
DSM-30147	<i>Rhizobium radiobacter</i>	Hollanda	Toprak	Holmes ve Roberts 1981
DSM-30148	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	ABD	Elma	Riker vd 1930
DSM-6772	<i>Rhizobium rubi</i>	ABD	Böğürtlen	Keane vd 1970
DSM-19331	<i>Rhizobium fabae</i>	Çin	Bakla	Tian vd 2008

Çizelge 3.3. Real-Time PCR’da test edilen farklı bitki patojeni bakteriler

İzolat	Bakteri Türü	Orijin	Konukçu	Referans
8408	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Türkiye	Karpuz	Basım 2008
HB2	<i>Bacillus subtilis</i>	Türkiye	Toprak	Basım 2008
Cmm 5	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Türkiye	Domates	Basım 2008
I2	<i>Erwinia amylovora</i>	Türkiye	Armut	Basım 2011
HBPCC1	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Türkiye	Domates	Basım 2004
HBPC1	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Türkiye	Domates	Basım 2004
I21	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Zeytin	Basım 2000
Td 40	<i>Pseudomonas tomato</i> pv. <i>tomato</i>	Türkiye	Domates	Basım 2003
Xav Kumluca	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Türkiye	Biber	Basım 2009

3.2. Primerler ve Probların Tasarlanması

Rhizobium vitis strainlerinin Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için, patojenik oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin *ocs* (oktopin sentaz), nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin *nos* (nopalin sentaz), vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin *vis* (vitopin sentaz), *virD2* ve *iaaM* (indol asetik asit sentaz) genlerine ait dizilerden problemler ve primerler tasarlanmıştır. Yerli *Rhizobium vitis* strainleri, OCTF/OCTR, NOPF/NOPR, S4iaaM5/S4iaaM3, VisF/VisR ve VirD2S4F₇₁₆, VirD2S4R₁₀₃₆ primer setleri ile test edilmiştir (Çizelge 3.5). Tüm yerli strainlerin oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri olduğu tespit edilmiştir. OCTF/OCTR primerleri (Bini vd 2008-b) kullanılarak yerli *Rhizobium vitis* strainlerinin sahip olduğu *ocs* geninin 475 bp’lık kısmı, NOPF/NOPR primerleri (Bini vd 2008-b) kullanılarak “International Collection of Microorganisms from Plants” kültür koleksiyonundan temin edilen ICMP 10753 straininin *nos* geninin 394 bp’lık kısmı klasik PCR ile çoğaltılmıştır. Klasik PCR yöntemi ile amplifiye edilen bölgelerin dizi analizi gerçekleştirilmiş, dizi analizi sonuçlarının gen bankasında yer alan ilgili diziler ile bire bir örtüştüğü görülmüştür. Klasik PCR yöntemi ile amplifiye edilen dizilerden *Rhizobium vitis*’in oktopin ve nopalin katabolize eden tiplerinin Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti için özel primerler ve problemler tasarlanmıştır (Çizelge 3.6).

Yurtdışından temin edilemeyen vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tanısında kullanılacak primer ve problemlerin tasarımında vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* S4 straininin, *vis*, *virD2* ve *iaaM* genlerinin gen bankasında bulunan dizileri kullanılmıştır (Çizelge 3.6). *Rhizobium vitis* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı, Çizelge 3.4’te gösterilmiştir (Sawada vd 1995).

Çizelge 3.4. *Rhizobium vitis* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	150	1
Denatürasyon	95	60	40
Bağlanma	55	60	
Uzama	72	120	
Son Uzama	72	420	1

Klasik PCR işleminde kullanılan PCR karışımı, toplam hacim 50 µl olacak şekilde 4 µl bakteriyel süspansiyon, primerlerin her birinden 1 µl, 8 µl dNTP karışımı, 5 µl 10× tampon çözelti, 3 µl MgCl₂, 0,25 µl *Taq* polimeraz ve 27,8 µl steril deiyonize saf su şeklindedir. Amplifikasyon için Techne TC-512 Gradient Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, İngiltere) kullanılmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri (15 µl), %2'lik agaroz jelde 80 voltta 120 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminde ve agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Baz 4,84 g, Asetik Asit [Glasiyel] 1,02 ml, 0,5 M EDTA [pH: 8,0] 2 ml, ddH₂O 1000 ml) kullanılmıştır.

Yürütme işlemi sonunda PCR ürünleri, etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile 20 dakika boyanmış ve ultraviyole ışıkta görüntülenmiştir. Görüntüleme için Vilber Lourmat SR 12575 transillüminatör (Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Almanya) ve BioCapt Version 11.02 programı kullanılmıştır.

Klasik PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonun hazırlanması için -86 °C de stoklanan *Rhizobium vitis* strainleri, RS (Roy & Sasser) seçici besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. Bu besi ortamında geliştirilen kolonilerden biri seçilmiş, seçilen koloni PDA (Patates Dekstroz Agar) içeren başka bir petriye aktarılmış ve 48 saat süre ile 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu ortamda geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspanse edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun 1×10⁸ cfu/ml olması sağlanmıştır. İnokulum konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. İnokulumun optik yoğunluğu 1×10⁸ cfu/ml'ye karşılık gelen OD₆₀₀=0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır (Burr vd 1997, 1999, Bini vd 2008-b, Palacio-Bielsa vd 2009, Tolba ve Zaki 2011, Rouhrazi ve Rahimian 2012).

Çizelge 3.5. Klasik PCR yöntemi ile *Rhizobium vitis*'in tanısı için kullanılan, *ocs*, *nos*, *vis*, *virD2* ve *iaaM* genlerine ait primerler

Primer Adı	Gen Bölgesi	Primer Dizisi	Ürün	Referans
OCTF,	Oktopin sentaz geni	5' GAATATGAGAAATCCGTCTCG 3'	475 bp	Bini vd 2008-b
OCTR		5' ACTCAGAGCTCGTGGCCTTG 3'		
NOPF,	Nopalın sentaz geni	5' GCAAACGTAAGTGTGGATC 3'	394 bp	Bini vd 2008-b
NOPR		5' CAAGCGAATACTCGAGACG 3'		
S4iaaM5,	Vitopin <i>iaaM</i> geni	5' CGCGTCCCCGTTTACACTA 3'	800 bp	Bini vd 2008-b
S4iaaM3		5' CGAGATCGCGCTTCAAGAT 3'		
VisF,	Vitopin sentaz geni	5' CCGGCCACTTCTGCTATCTGA 3'	561 bp	Szegedi ve Bottka 2002
VisR		5' CCATTCACCCGTTGCTGTTATT 3'		
VirD2S4F₇₁₆,	Vitopin <i>virD2</i> geni	5' GACCGCAAAACCTGCCAG 3'	320 bp	Bini vd 2008-b
VirD2S4R₁₀₃₆		5' GAGCCTGTATTGACGATGTC 3'		

Primerler ve problemlerin belirlenmesinde insan gen transkriptlerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi için oluşturulan LNA (Locked Nucleic Acid) sistemi kullanılmıştır (Petersen ve Wengel 2003). Çalışmada kullanılan LNA prob, bugün Real-Time PCR sistemleri için sıklıkla kullanılan 25-30 nükleotitlik uzun problemlardan farklılık göstermektedir. LNA problemler 8-9 nükleotid uzunluğunda fakat sahip olduğu son teknolojik özellikler nedeniyle uzun dizilere sahip problemler kadar güvenilir ve hassas sonuçlar elde edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan TaqMan (Holland vd 1991) problemler

için raportör boya fluorescein amidit (FAM), baskılayıcı boya ise karboksitetramethylrodamindir (TAMRA).

Çizelge 3.6. Real-Time PCR yöntemi ile *Rhizobium vitis*'in tanısı için geliştirilmiş, *ocs*, *nos*, *vis*, *virD2* ve *iaaM* genlerine ait primerler ve probalar

Primer Adı	Gen Bölgesi	Primer Dizisi	Prob Dizisi	Ürün
OCTF, OCTR	Oktopin sentaz geni	5' CTTGCTCGATGGAATCTCTTG3' 5' GCAACAGGGTTGGTATTT3'	5' CAGCAGGAT 3'	62 bç
NOPF, NOPR	Nopalin sentaz geni	5' CCGCATGAGTGATATAGTTGGA 3' 5' TCCTAGCCGTAAATAGCTGGG 3'	5' GAACAGCA 3'	78 bç
S4iaaM5, S4iaaM3	Vitopin <i>iaaM</i> geni	5' GTTCGCTTCCTCGCTTTG3' 5' AGCAGCGAAACATTTTCGTC3'	5' GCTGGATG3'	60 bç
VisF, VisR	Vitopin sentaz geni	5' CACAACCGGATTGGTATTTGA3' 5' TCCTTGTAACCACTGCAGTCG3'	5' TATGGAGGC 3'	60 bç
VirD2S4F₇₁₆, VirD2S4R₁₀₃₆	Vitopin <i>virD2</i> geni	5' AGTCAGTTTTCGCGCTCTGT3' 5' TTTTCGATGAAGTCGTTGCTG3'	5' CATCACCA 3'	66 bç

CTTGGGAGTTTCGATTTTCAGCATAGCCTTCGTAGGTCTCATAGAATTCTCTTGCGTTGCAGGCATGCCCA
CCATACCATTTTTTGGAATATGAGAAATCCGCTCTCGGACTCGAGTCCAAGCGCATCAACAATCGAAAGAC
GTTCTCTGCTCTATTGCGATAACACGCGTGATGGCTTGTGGGACAACTGCCGGTAGAATTTTGGGACCGG
CAATATCCCTTGCTCGATGGAATCTCTTGCGAGCTAGAATTCAGCAGGATGAGCAACAGGGTTGGTATTT
GAAAAAATATCGACGCGGGATGTTGATACCACTGAGGCGGATTTGGAAAGAGAACCTCGAAGCGCCCCCT
TAACCTCCTCGCTCAAAGGCTGAGTTGTGCGCAACTTCGAACGTTGCCTTCACACCGAGCATTAGCACACG
TGCTTGACACGGCGGCATGCATAAGGAGACGTTGTTGATTGATGACTGCGATCGGCGCGAAAGTTGGA
ACTAGAGTTTGCTTGCAAGCCAGAGACGTTGCGCTACCGGGCAAGGCCACGAGCACTGAGTTGCTCAGAT
TGAATTCGCCAACTCGCGCAGAATCCCTTGCTGGCCTAGGGTTGGAACCGTAAGAAAAATGAACGCCGC

Şekil 3.1. Klasik PCR ve Real-Time PCR'da *Rhizobium vitis*'in tanısı için kullanılan OCTF ve OCTR primerlerinin ve probun oktopin sentaz geni üzerindeki bağlanma yerleri (Sarı renk: Klasik PCR primerlerini, Mavi renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

ATTCCTGCAAGAGAGAATTGAGATGCAACCCACACGCTTTGGCAACCTTCGGCGCTCTTGCTCTATCTG
CTCTTGACCTTGCAACGTAAGTGTGGATCCTTACCATAAAAGAAAAAGCCGCTCTCGGCTCGTGGG
GTTGCTGCTCTAGTTCAAGAAGCCACTGCTCAGCTCTTTGGTAAGGGAATTGACAGGGTCGCGCACGC
TTCCGATGTTTCATGACAGCGGCAACCGCATGAGTGATATAGTTGGAAGCAACAGCACTGCAATGGTGG
GATGGGGATGATCCCTAGCCGTAAATAGCTGGGCGAAGATGATCTTGATATCTTCGGGTAGATCGATGACG
CCAACATCATTTTCGATGAATTGGGAAACACGACAGTCCGAAAGAAGCTTTCAATTCCTTAATGTTGACCT
TACATTTTTTTTTATCCGATAGCTTAGACGTTGTGGGCGAATTATCCGTCTCGAGTATTCGCTTGCAATTG
CAGTTGCCTCTCGTACTTCATGGAAAAGCCATGGCCGCAGACGAGAGAATATCCTTTTCTGCGAGTTCA

Şekil 3.2. Klasik PCR ve Real-Time PCR'da *Rhizobium vitis*'in tanısı için kullanılan NOPF ve NOPR primerlerinin ve probun nopalin sentaz geni üzerindeki bağlanma yerleri (Sarı renk: Klasik PCR primerlerini, Mavi renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

AATTTTCAATCGAGTTCATAAAGGCTGGCGTACATTCTTGACGCGGGTTTTGTAGATGGTGTTCAGCA
TT**CGCGTCCCCGTTTACACTA**ACTGAGTGTCTCCGGCTTCGTAACCTATGA**GTTCGCTTCCTCGCTTTG**GC
AGAAGTG**CTGGATG**CCTTC**AGCAGCGAAACATTTTCGTG**CGGAATAGAGAGAATCTTTAGGGGTGCTCA
CCCACCAGGTGGGGAGAAATGGACCAGAGATGTCGACATGGAGCTATTCAAAGAGCTCGGAGTGGGGTCG
GGCGGATTCCGGTCCGGTATTTGGGTGCGGCTTCATCGAGATATTGCGGTTGATAGTGAATGGCTATGAAG
ACAATGTAATGTTGCTGCTTGATGGAATAGAGGAAATCCACGAAGGCTATCTCAGCAGAAAGTTGGGTG
ATATTCAATCCGGGATCGGATAATCCACAAAGAGGTGAAGGAGATAATTAGGACCGAGTCAGGAATCTCG
CTAGCTATTGGCGAAGGAATGCATGCAACCTTTGATCGCGTGATCGTAACATCTGGCTTTACGAATATTC
AGTTGAGGCATCTCTTAACCAATGATGACAGCTTTTTTTCTTACGACGTTAACCAAGCGATCGAGAACAG
CCACATGACAGGCTCATCAAAGCTGTTTGTCTCACGCAGAATAAGTTCTGGAAAGCTGAAGAACTCCCT
TCCTGCATACTGACAACCGGTGTTGCCAAAGCAGTTTACTGTCTGGATTACGAGCCTGATAAACCGAGCG
GAAAAGGCCCTTGTAACCTTTGAGCTACACTTGGGAAGACGATTCCCATAACTCCTGACATTCGATAAAGG
AGAAAGATTTCAA**ATCTTGAAGCGCGATCTCG**CAAAATCATATCCTAGATTTGCGGATTTGCTTGAGCCG
GCTGATGGGGATTACGATAACAACATCATCCAGCACGACTGGATTCTGGACCCATATGCAGGCGGTGCTT

Şekil 3.3. Klasik PCR ve Real-Time PCR’da *Rhizobium vitis*’in tanısı için kullanılan S4iaaM5 ve S4iaaM3 primerlerinin ve probun vitopin Ti plazmitinde *VirD2* geni üzerindeki bağlanma yerleri (Sarı renk: Klasik PCR primerlerini, Mavi renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

GGGTTAGCGCCACCTAAGTTCATTGAGGCAAGAGTCCTGCCAGTCATAAAGAGGTCTCGTAGAGAACGT
TCCCGGCCTCCTTTATGACAGACTTCATCGCTGGAACCTGCACT**CCGGCCACTTCTGCTATCTGA**ACCCA
GAGCACCATGATGTGTTTGACATCTTCAGTTAAGTAGCGGTGATGCATTGTTGTGGGTGTCGCCACTTCA
GCATAACCTTCGTAGGTCTCAAAGAATTCCTTCCACTCGGTGGCCTGGCCGCCATACCACTTTTTAGAAAT
ATGTGAAACCTGTTTCGGACTCGAGGCCGAGCGCCGCAATAATCTCGAGGCGTTTATTGTCTAATTCCTG
AACACGCTCGATGGCTGCCGGAACAAACTCCCTGTAGAATTTAGGTAGAGGGCTCATACCACTTTTCAATC
GCATCTTTCGCCACCAGGATCCCTGGAGGATG**CACAACCGGATTGGTATTTGA**GAAAA**TATGGAGGG**AG
CA**TCCTTGTACCACTGCAGTGC**GTTTGGGAAAAGGGCCTCAAAACGACTTGTGAGATCGTTGCTCAGAA
GCTTGTGTCGGCAACCTCGAAGCAGGCTTTCACGCCAAGCATATGAACGCGTTCGCCGATACGGCGGCAG
GCGTAGGGCGACGTTGTTGATT**CAATAACAGCAACGGGTGAATGG**CTTGGGAACAAGATATTCTTACAAG
TCAGGGAAGTTGCACTACCTGGCAACGCGATGAGCACAGTTTCGCTCAGATCGAACTTACCAACTCGCG

Şekil 3.4. Klasik PCR ve Real-Time PCR’da *Rhizobium vitis*’in tanısı için kullanılan VisF ve VisR primerlerinin ve probun vitopin sentaz geni üzerindeki bağlanma yerleri (Sarı renk: Klasik PCR primerlerini, Mavi renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

TTTGGGCCCCCTGCTGCGGGCGATCGGCTGTGGCAGGCAATCCATCCGTAGCGATGTCGGTCTGCGACG
GGTTTGATCCAG**GAGCCTGTATTGACGATGTC**GGACCGTCCCCGGTAACCGGTACGTCCGTGATTGCCAC
TCCCGCCCGAACTCTGTTTACCCT**AGTCAGTTTTGCGCCTCTGT**CCTCATCCT**CATCACCA**CGAGGGCGT
TTTCGATGAAGTCGTTGCTGAACGTCGTCTCGCTTGTGGGTGCGTGACGGATTTCGATCGCCAAACCAG
TACCGGAAGCGCCTTCAACATCCCGCCATCGCCGTTTCGATCCGATTTCGTGCCCGGGAACGCCCTTCGGA
CATCGGTTGCAGATGCTCGTTTCGTTCCGACTTT**CTGGCAGGTTTTGCGGTC**GCTCACCGTACGACGAA
TCGAAGAATTGTTCCGGTTCGCGATCGTTTTCGCCGGGCGTGAAATGTTTCGAAATCAGGATCGTCGAAAC

Şekil 3.5. Klasik PCR ve Real-Time PCR’da *Rhizobium vitis*’in tanısı için kullanılan VirD2S4F₇₁₆ ve VirD2S4R₁₀₃₆ primerlerinin ve probun vitopin Ti plazmitinde *VirD2* geni üzerindeki bağlanma yerleri (Sarı renk: Klasik PCR primerlerini, Mavi renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

3.3. Real-Time PCR Optimizasyonu

Rhizobium vitis strainlerinin Real-Time PCR ile kısa sürede tanı ve tespiti için gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan Real-Time PCR programı, Çizelge 3.7’de gösterilmiştir. Her bir örnek için Real-Time PCR işleminde kullanılan PCR karışımı ise toplam hacim 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon ya da kalıp DNA, primerlerin her birinden 1,2 µl, 0,3 µl TaqMan prob, 4,8 µl dNTP karışımı, 3 µl 10× tampon çözelti, 7,2 µl MgCl₂, 0,36 µl *Taq* polimeraz ve 9,54 µl steril deiyonize saf su şeklindedir. Çalışmada Cepheid Smart Cycler II Real-Time PCR cihazı ve Cepheid Smart Cycler Software V.2.0c programı kullanılmıştır.

Çizelge 3.7. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *Rhizobium vitis* için oluşturulan Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	120	1
Denatürasyon	94	15	35
Bağlanma	58	10	
Uzama	72	10	
Son Uzama	72	120	1

3.4. Primerler ve Probların *Rhizobium vitis* Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi

Rhizobium vitis’e özel tasarlanan primerler ve problar kullanılarak kültür koleksiyonunda bulunan tüm *Rhizobium vitis* strainlerinin tanısı ve tespiti gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1). Real-Time PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonun hazırlanması için -86 °C de stoklanan *Rhizobium vitis* strainleri, RS seçici besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C’de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. RS besi ortamında geliştirilen kolonilerden biri seçilmiş, bu seçilen koloni PDA içeren başka bir petri kabına aktarılmış ve 48 saat süre ile 27 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu ortamda geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspanse edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun 1×10^8 cfu/ml olması sağlanmıştır. Süspansiyon konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 (Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) kullanılmıştır. Süspansiyonun optik yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml’ye karşılık gelen OD₆₀₀=0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5. Primerler ve Probların Saf DNA’dan Hassasiyetinin Belirlenmesi

Rhizobium vitis’in Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük DNA miktarının tespiti için saf DNA’dan hassasiyet çalışması yapılmıştır. Çalışma için kültür koleksiyonunda yer alan *Rhizobium vitis* Tr 1 straininden faydalanılmıştır. DNA izolasyonunda Thermo FastPrep FP120A-230 multi tüp homojenizatör (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ve Qbiogene/BIO101 FastDNA moleküler izolasyon kitini (MP Biomedicals, Kaliforniya, ABD) ihtiva eden kombine sistem kullanılmıştır. *Rhizobium vitis* strainlerinden izole edilen DNA’nın saflığı ve nanogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) pikogram düzeyinde konsantrasyonun

belirlenmesinde Invitrogen Qubit florometre (Invitrogen, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Real-Time PCR yönteminin hassasiyetinin belirlenmesinde 50 pg, 40 pg, 30 pg, 20 pg ve 10 pg DNA seviyeleri test edilmiştir. Pikogram düzeyine kadar seyreltmeler için steril deiyonize su kullanılmıştır. Elde edilen her bir seviyedeki DNA'lardan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primerler ve Probların Hassasiyetinin Belirlenmesi

Bakteriyel patojen *Rhizobium vitis*'in Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti için, patojen kültür koleksiyonundan alınıp RS besi ortamında geliştirilmiş, kolonilerden yoğun bir stok çözelti hazırlanmıştır. Oluşturulan stok çözeltiden 10^{-1} 'den 10^{-10} 'a kadar 10'un katları şeklinde seyreltmeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve bunlar ayrı ayrı tüplere konulmuştur. Elde edilen her bir solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır. Bu aşamada Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti hedeflendiğinden 10^{-1} 'den 10^{-10} 'a kadar seyreltilen ve ayrı tüplere alınan süspansiyonlardan 2 µl alınıp 50 µl steril deiyonize su içerisinde karıştırılmış ve RS besi ortamlarına steril yayma çubuk ile inoküle edilmiştir. İnokülasyondan sonra besi ortamlarında gelişen bakteri sayılarını tespit etmek için petriler 4 gün boyunca 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Asma baz materyallerinden Real-Time PCR ile tespit edilen bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla kantitatif Real-Time PCR yöntemi uygulanmıştır. Kantitatif Real-Time PCR işleminde belirlenen amplifikasyon değerine bağlı olarak oktopin ve nopalın katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri için regresyon eğrileri oluşturulmuştur. Regresyon eğrileri üzerinde eşik döngüsüne bağlı olarak örneklerdeki bakteri sayıları belirlenebilmiştir.

3.7. Primerler ve Probların Seçiciliğinin Belirlenmesi

Rhizobium vitis için geliştirilen primer ve probların özgüllüğünü belirlemek için farklı bakteri türleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Real-Time PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -86 °C de stoklanan, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Pseudomonas tomato* pv. *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* strainleri NA (Nütrient Agar), *Bacillus subtilis* straini PDA, *Erwinia amylovora* straini NSA (Nütrient Sükroz Agar) besi ortamlarını içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. Bu ortamlarda geliştirilen kolonilerden biri seçilerek steril deiyonize su ile süspanse edilmiştir. Bakteriyel konsantrasyonun 1×10^8 cfu/ml olması sağlanmıştır. Süspansiyonun konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. Süspansiyonun optik yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml'ye karşılık gelen $OD_{600} = 0,1$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.8. *Rhizobium vitis*'in Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti

Hastalıklı bitki dokularından *Rhizobium vitis*'in doğrudan tespiti için Sultani asma çeşidi (*Vitis vinifera* cv. Sultani) ve domates Klass F1 çeşidi ile oktopin ve nopalın katabolize eden patojenik *Rhizobium vitis* strainleri kullanılmıştır. *Rhizobium vitis* strainlerinin enfekteli asma baz materyallerinden tespiti için Şekil 3.7'deki düzenek kullanılarak asma baz materyallerindeki bitki özsuğu elde edilmiştir. Ekstrakte edilen solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işleminde kullanılmıştır.

Rhizobium vitis strainlerini enfekteli asma ve domates tümör dokularından tespiti için -86 °C de stoklanan *Rhizobium vitis* strainleri, RS seçici besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. RS besi ortamında geliştirilen kolonilerden biri seçilmiş, bu seçilen koloni PDA içeren başka bir petriye aktarılmış ve 48 saat süre ile 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu ortamda geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspanse edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun 1×10^8 cfu/ml olması sağlanmıştır. İnokulum konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. İnokulum optik yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml'ye karşılık gelen $OD_{600}=0,1$ olacak şekilde ayarlanmıştır.

Sağlıklı bitkilerin gövdeleri steril bisturi ile yaralandırılmış, açılan yara üzerine bakteriyel konsantrasyonu ayarlanmış bakteriyel süspanسیونlar püskürtülmüştür. Bitkiler, hastalığın düzgün seyri için geliştirme odalarına (Bitki Koruma Bölümü Kontrollü İklim Odaları) aktarılmıştır. İnoküle edilen bitkiler, simptomların gelişmesi için ortam sıcaklığı 25 ± 1 °C sıcaklıkta %50-70 nispi nemde inkübe edilmiştir. Bitkiler inkübasyon sürecinde, günde 12 saat boyunca aydınlatılmıştır. Aydınlatmada her biri 3050 lümen gücünde 10 adet floresan lamba kullanılmıştır. Asmalar için inkübasyon süresi 150 gün, domates için 60 gün olarak belirlenmiştir.

Tümör gelişiminin gözlenmesinin ardından tümörler gövdeden alınmış, %70'lik etanol ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Tümörler steril bir ortamda fosfat tampon eşliğinde ezilerek parçalanmış, patojenlerin fosfat tampon ($NaCl$ 7,2 g, Na_2HPO_4 1,48 g, K_2PO_4 0,43 g, ddH₂O 1000 ml) ile ezilerek *Rhizobium vitis* strainlerinin hastalıklı bitki dokularından tespitinde kullanılacak stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyonda bulunan bitki kaynaklı PCR inhibitörü maddelerin konsantrasyonları uygulanacak PCR işleminin başarımı etkileyebileceğinden stok solüsyonun on kat seyreltilerek bir solüsyon daha hazırlanmış ve her solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi uygulanmıştır. *Rhizobium vitis* straininin enfekteli bitki dokusundan tespit prosesi Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



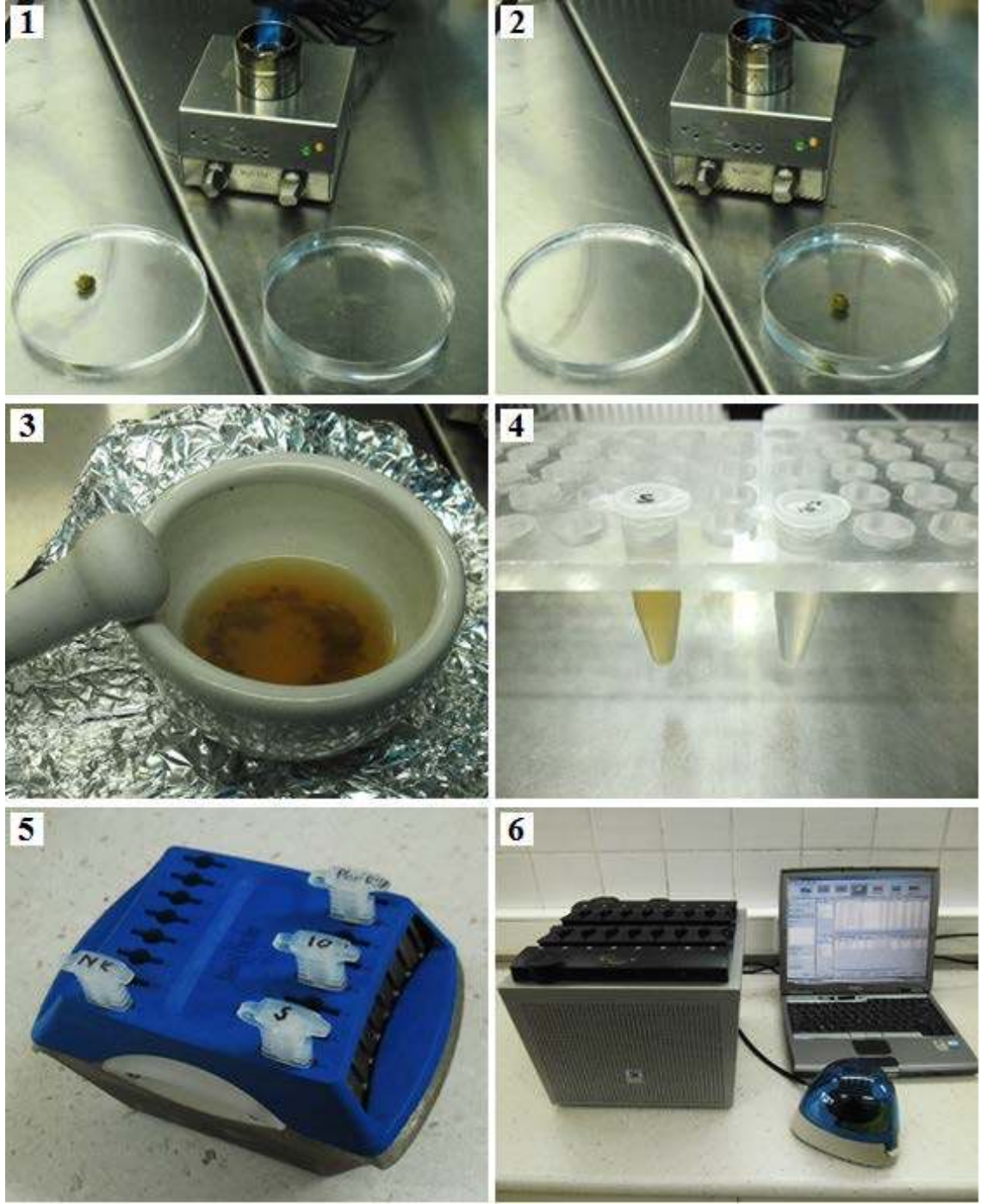
Şekil 3.6. Asma gövdesi üzerinde *Rhizobium vitis* tarafından oluşturulan tümörler (Bu çalışmadan)



Şekil 3.7. *Rhizobium vitis* asma baz materyallerinden ekstraksiyonu (Bu çalışmadan)



Şekil 3.8. Domates gövdesi üzerinde *Rhizobium vitis* tarafından oluşturulan tümörler (Bu çalışmadan)



Şekil 3.9. *Rhizobium vitis* strainlerini enfekteli asma ve domates tümör dokularından tespit prosesi. 1) %70'lik etil alkol ile yüzey sterilizasyonu, 2) steril deiyonize saf su ile etil alkolün uzaklaştırılması, 3) tümör dokusunun steril havanda fosfat tampon eşliğinde ezilerek Real-Time PCR'da kullanılacak stok solüsyonunun hazırlanması, 4) Hazırlanan stok solüsyonun seyreltilmesi, 5) analizi gerçekleştirilecek solüsyonların Real-Time PCR tüplerine aktarılması, 6) Real-Time PCR analizinin gerçekleştirilmesi (Bu çalışmadan)

Tasarlanan primer setleri ve problemlerin, stok solüsyonda bulunan bitki DNA'sı ile reaksiyon vermediğinin gösterilmesi amacıyla primer setleri ve problemler hazırlanan stok solüsyon haricinde saf bitki DNA'sı ile de test edilmiştir. Bitkiden DNA izolasyonunda Thermo FastPrep FP120A-230 multi tüp homojenizatör ve Qbiogene/BIO101 FastDNA moleküler izolasyon kitini ihtiva eden kombine sistem kullanılmıştır. Asma ve domates bitkilerinden izole edilen DNA'nın saflığı ve nanogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bitki DNA'larının konsantrasyonları yaklaşık 100-150 ng/μl olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.9. Real-Time Bio-PCR

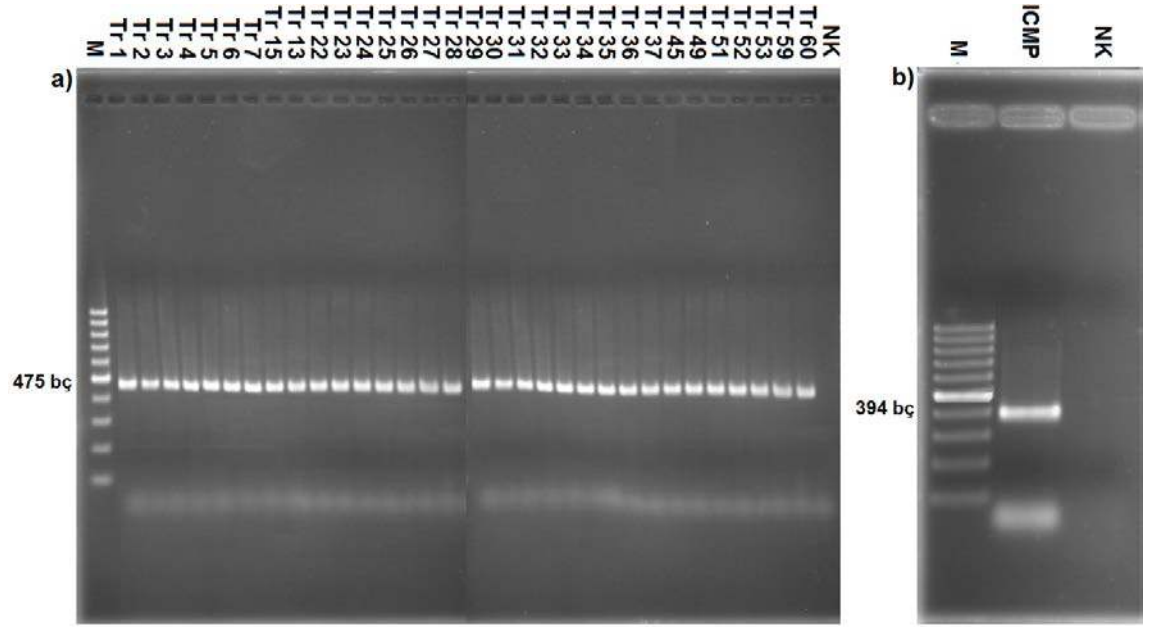
Real-Time PCR işlemi nükleik asit temelli çalışan bir yöntem olduğundan hastalıklı bitki materyalinde var olan ölü bakterilerin de tespiti mümkün olabilmektedir. Real-Time Bio-PCR yöntemi sadece canlı bakteriyi test etmeyi hedefleyen bir yöntemdir.

Bu amaçla öncelikle, bir bakteriyel süspansiyon hazırlanmış ve bu solüsyon 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar 10'un katları şeklinde seyreltilmiştir. Tüplerdeki örneklerden 2 μl alınıp 50 μl steril deiyonize su içerisinde karıştırılarak RS besi ortamlarına steril yayma çubuğu ile inokule edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Kumagai ve Fabritius 2008). Inkübasyondan sonra petrilere 1 ml steril deiyonize su eklenerek canlı olan bakterilerin suya geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen stok bakteriyel süspansiyon 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar seyreltilmiştir. Her seyreltmeden 2 μl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Rhizobium vitis*'in Klasik PCR ile Tanısı

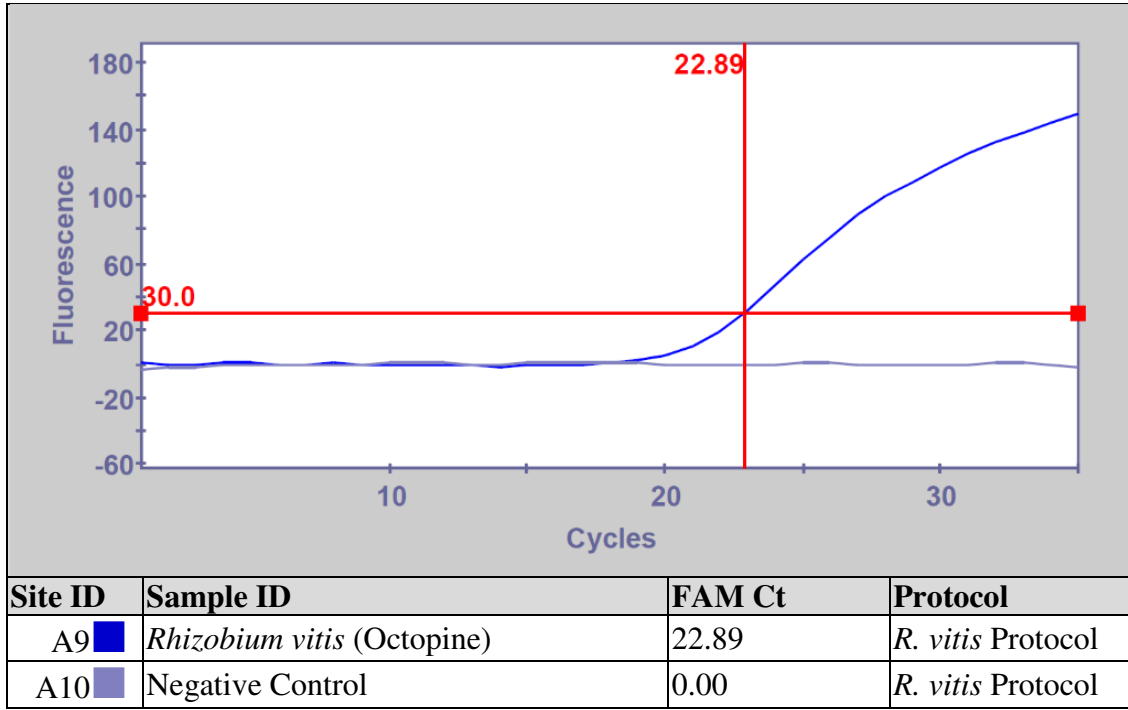
Rhizobium vitis'in klasik PCR ile tanısını gerçekleştirmek için kültür koleksiyonunda yer alan tüm *Rhizobium vitis* strainleri, *ocs* (oktopin sentaz), *nos* (nopalın sentaz), *vis* (vitopin sentaz), ve vitopin üreten strainlere has *virD2* ve *iaaM* (indol asetik asit sentaz) genlerine ait primer setleri ile test edilmiştir (Çizelge 3.5). Kültür koleksiyonunda yer alan yerli strainlerin tamamının oktopin sentaz geni, ICMP 10753 straininin nopalın sentaz geni taşıdığı saptanmıştır (Şekil 4.1).



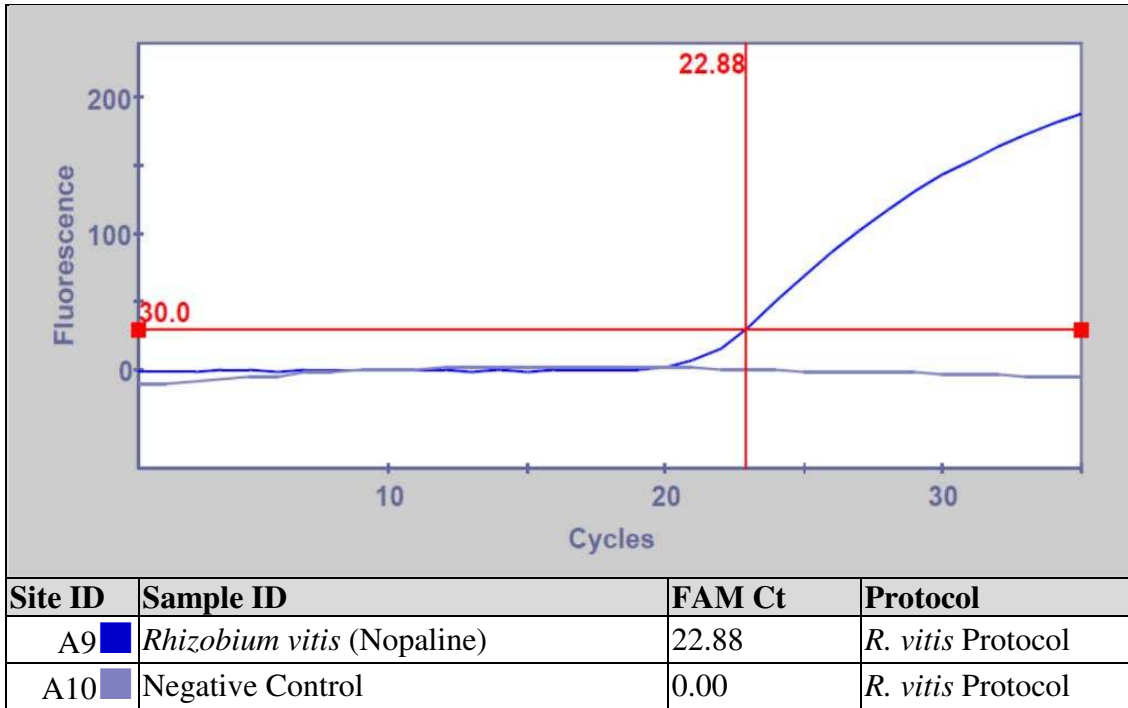
Şekil 4.1. Oktopin katabolize eden yerli *Rhizobium vitis* strainlerinin klasik PCR ile tanısı (a). Nopalın katabolize eden *Rhizobium vitis* ICMP 10753 straininin klasik PCR ile tanısı (b). Marker olarak 100 bç'lik DNA marker kullanılmıştır. M, markeri, NK, Negatif kontrolü, ICMP, ICMP 10753 strainini sembolize etmektedir

4.2. *Rhizobium vitis*'in Real-Time PCR ile Tanısı

Oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* Tr 1 ve nopalın katabolize eden ICMP 10753 straininden yararlanılarak primerlerin, probun ve Real-Time PCR programının kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3).

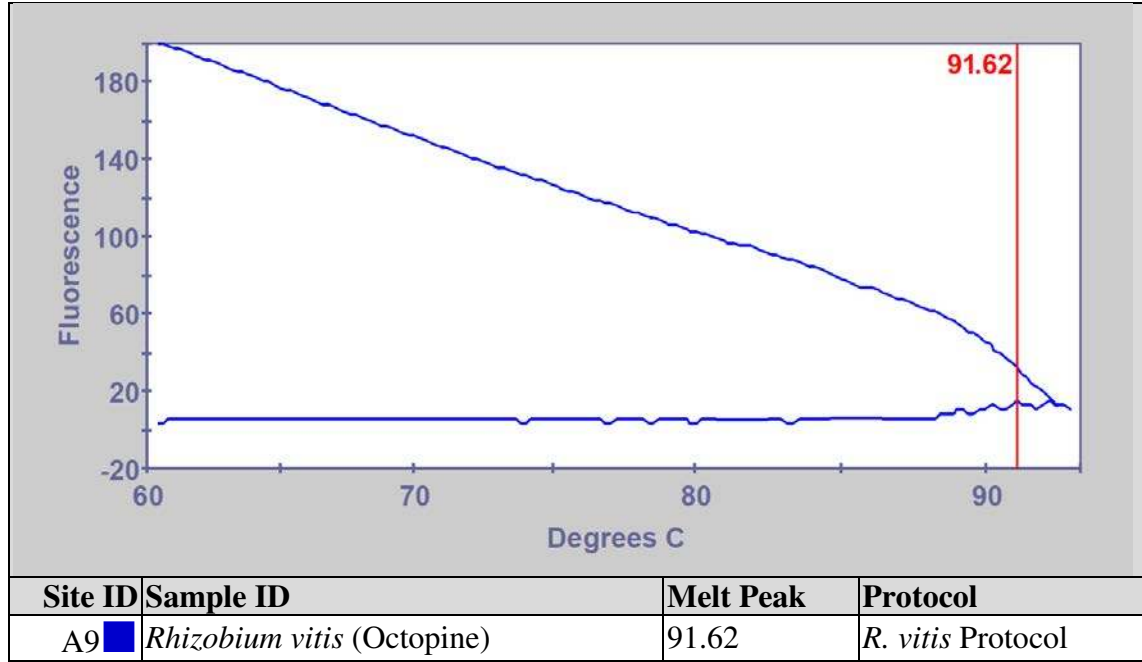


Şekil 4.2. Oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin Real-Time PCR ile tanısı

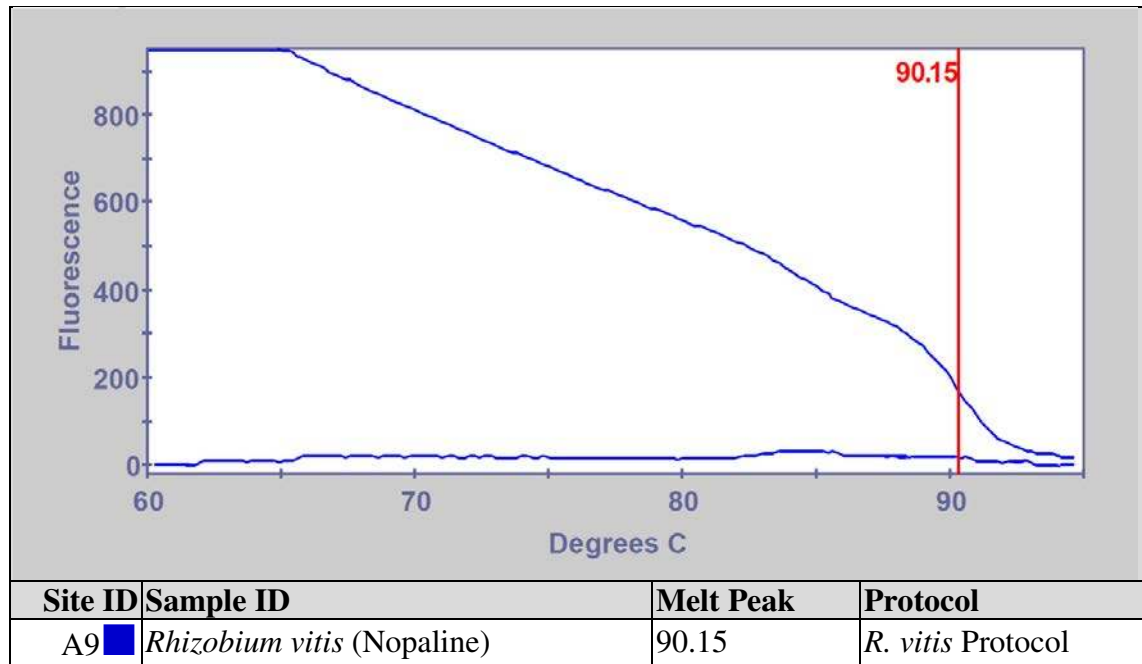


Şekil 4.3. Nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin Real-Time PCR ile tanısı

Rhizobium vitis'in tanısında kullanılan primerlerin ve Real-Time PCR yönteminin tek bir diziye spesifik olduğunu teyit etmek ve Real-Time PCR ile tek bir pik eğrisinin elde edildiğini göstermek amacıyla SYBR Green ile karşılaştırılmalı termal erime eğrisi elde edilmiştir. *Rhizobium vitis* için kullanılan primerlerin maksimum erime sıcaklığı OCTF-OCTR primer seti için 91,62°C (Şekil 4.4), NOPF-NOPR primer seti için 90,15°C (Şekil 4.5) olarak tespit edilmiştir.



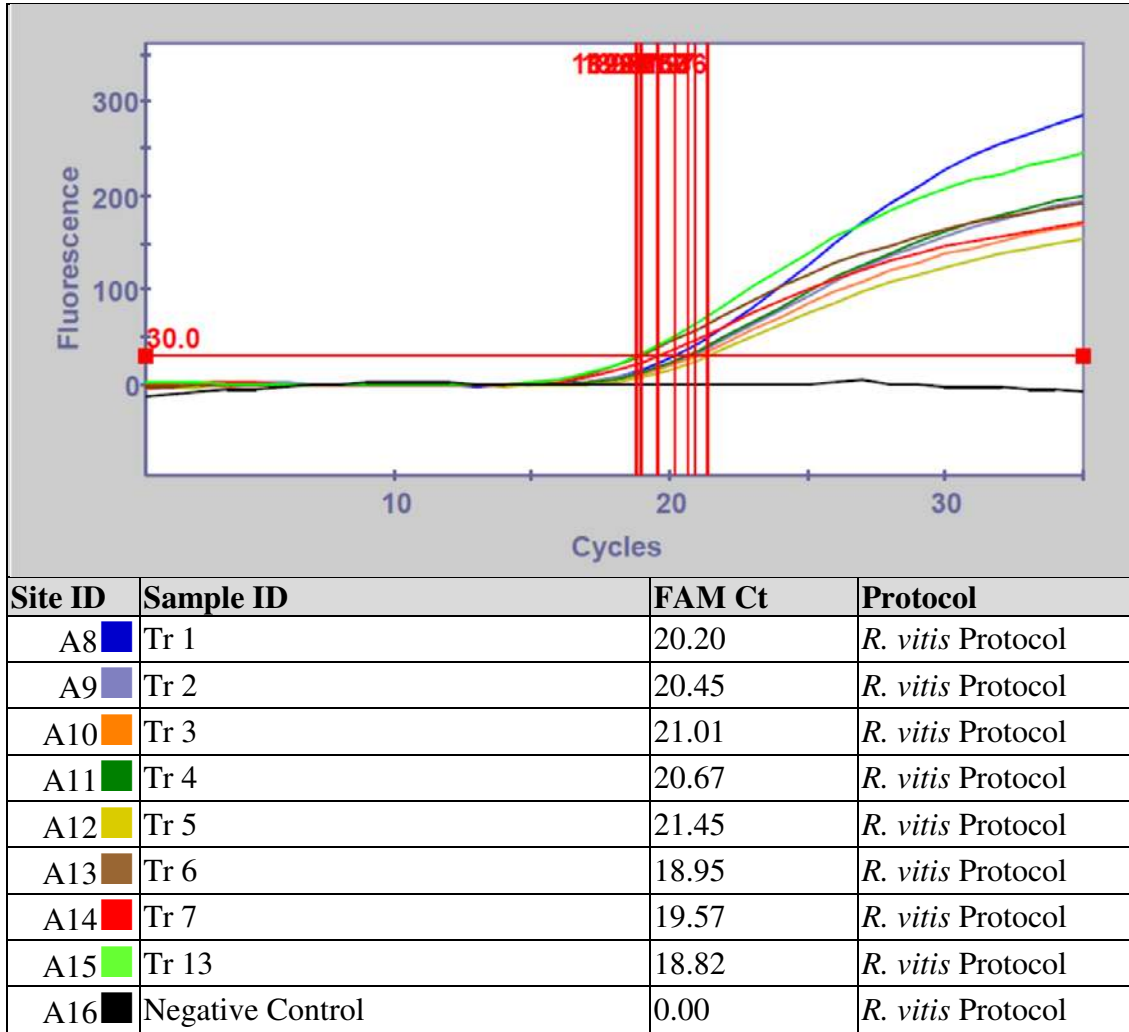
Şekil 4.4. Oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin termal erime eğrisi



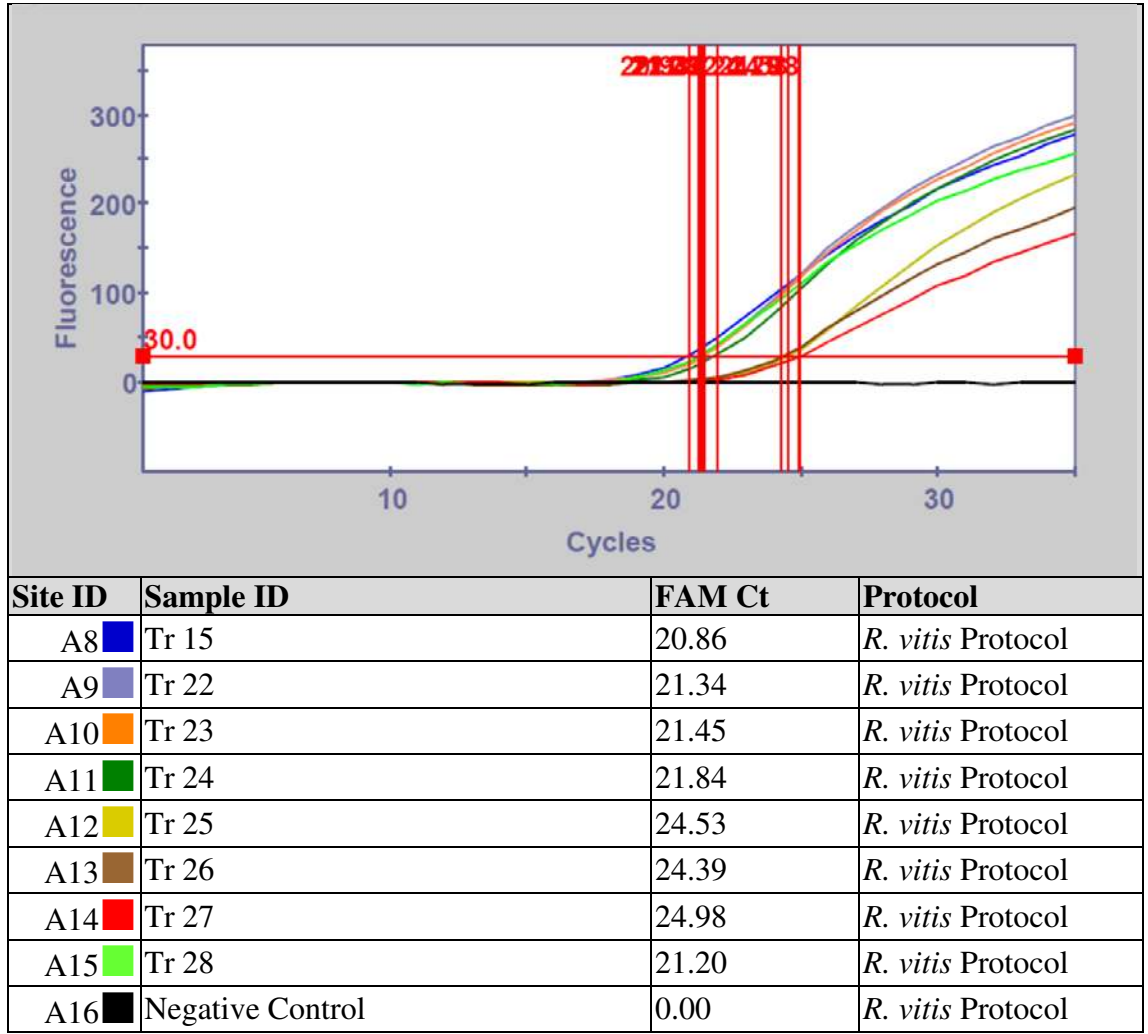
Şekil 4.5. Nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin termal erime eğrisi

4.3. *Rhizobium vitis*'in Tüm Strainlerinin Real-Time PCR ile Tanısı

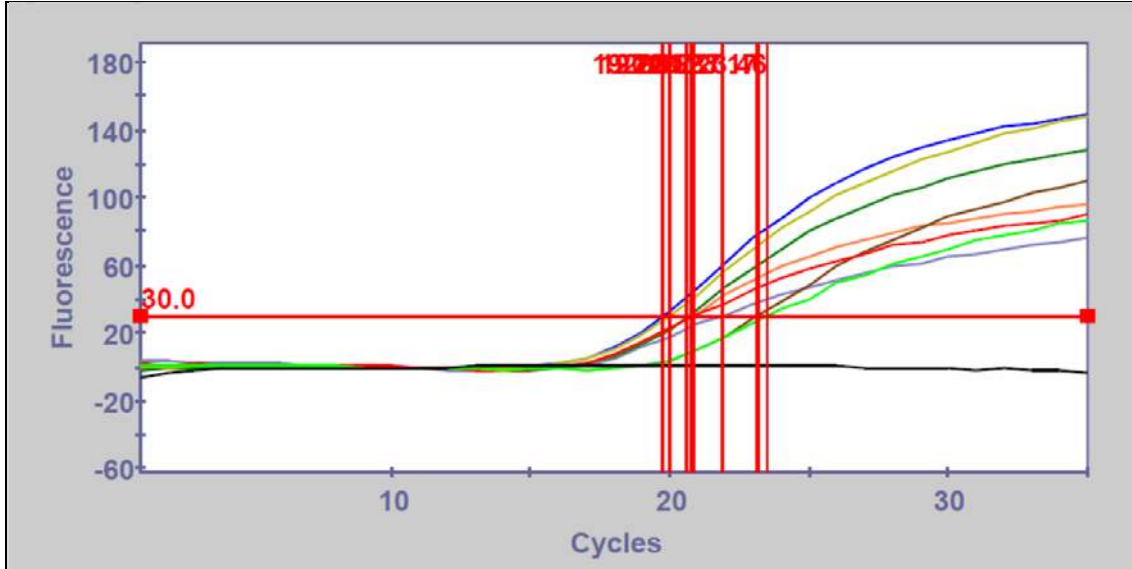
Rhizobium vitis'in Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için kültür koleksiyonunda yer alan tüm yerli ve yabancı *Rhizobium vitis* strainleri kullanılarak primerler ve problemlerin strainlere spesifikliğı test edilmiştir. Tasarlanan primerler ve problemlerin *Rhizobium vitis*'in farklı strainlerine de spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



Şekil 4.6. Oktopin katabolize eden yerli *Rhizobium vitis* strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti

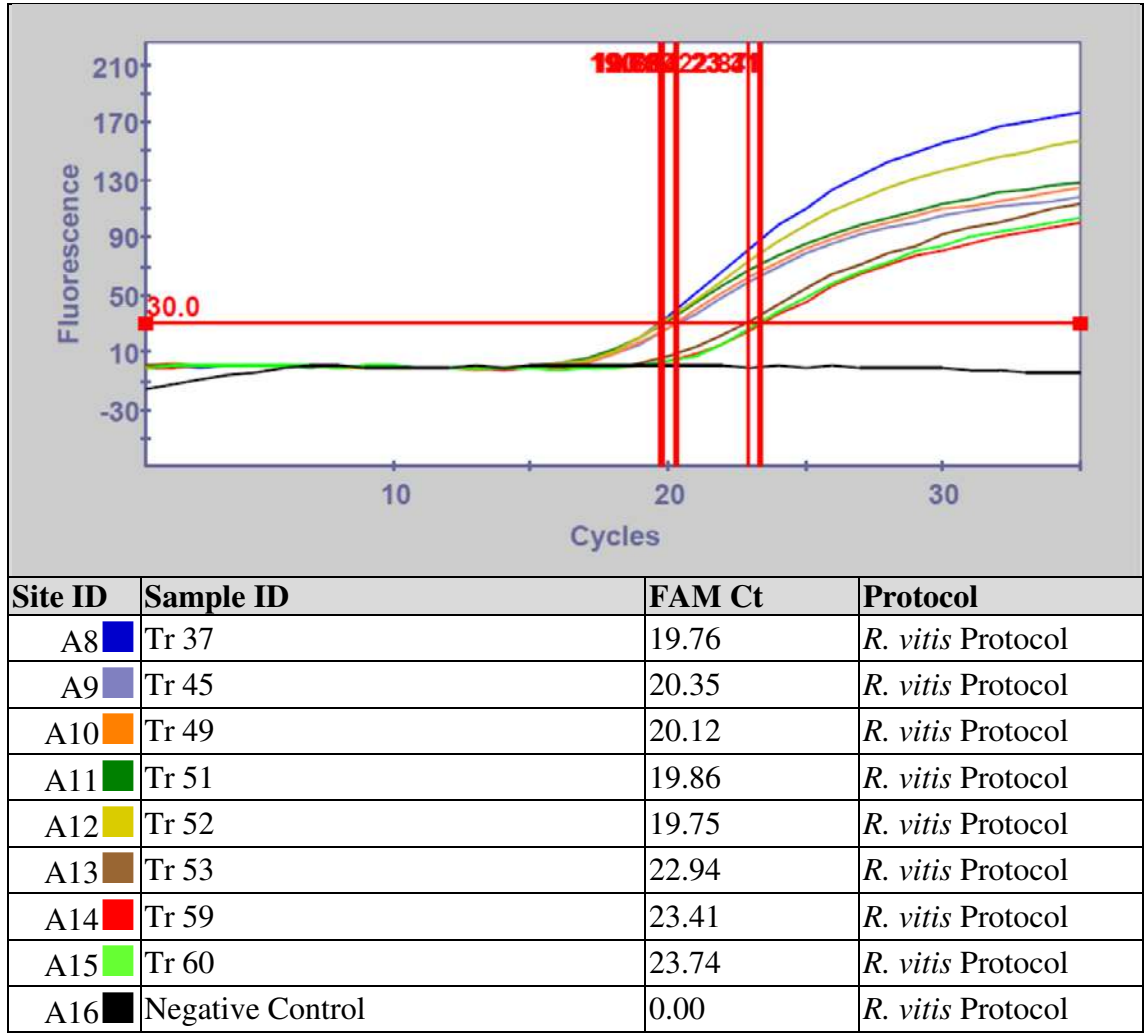


Şekil 4.7. Oktopin katabolize eden yerli *Rhizobium vitis* strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti

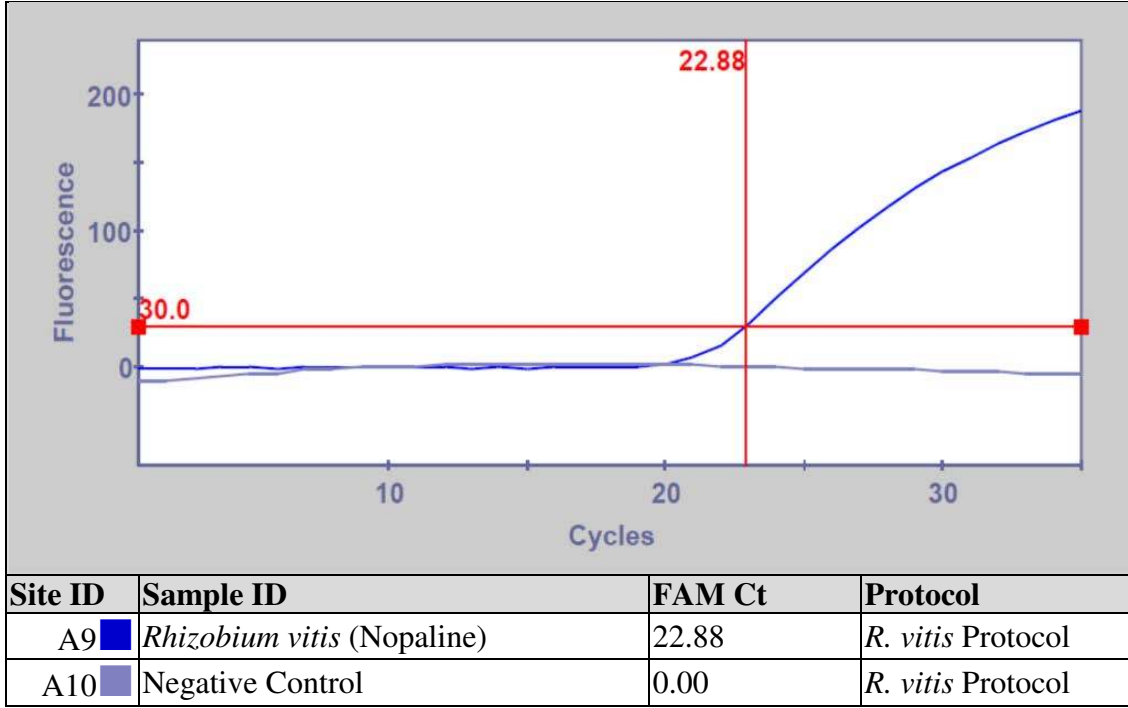


Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A8	Tr 29	19.85	<i>R. vitis</i> Protocol
A9	Tr 30	21.90	<i>R. vitis</i> Protocol
A10	Tr 31	20.46	<i>R. vitis</i> Protocol
A11	Tr 32	20.61	<i>R. vitis</i> Protocol
A12	Tr 33	19.99	<i>R. vitis</i> Protocol
A13	Tr 34	23.13	<i>R. vitis</i> Protocol
A14	Tr 35	20.77	<i>R. vitis</i> Protocol
A15	Tr 36	23.46	<i>R. vitis</i> Protocol
A16	Negative Control	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol

Şekil 4.8. Oktopin katabolize eden yerli *Rhizobium vitis* strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti



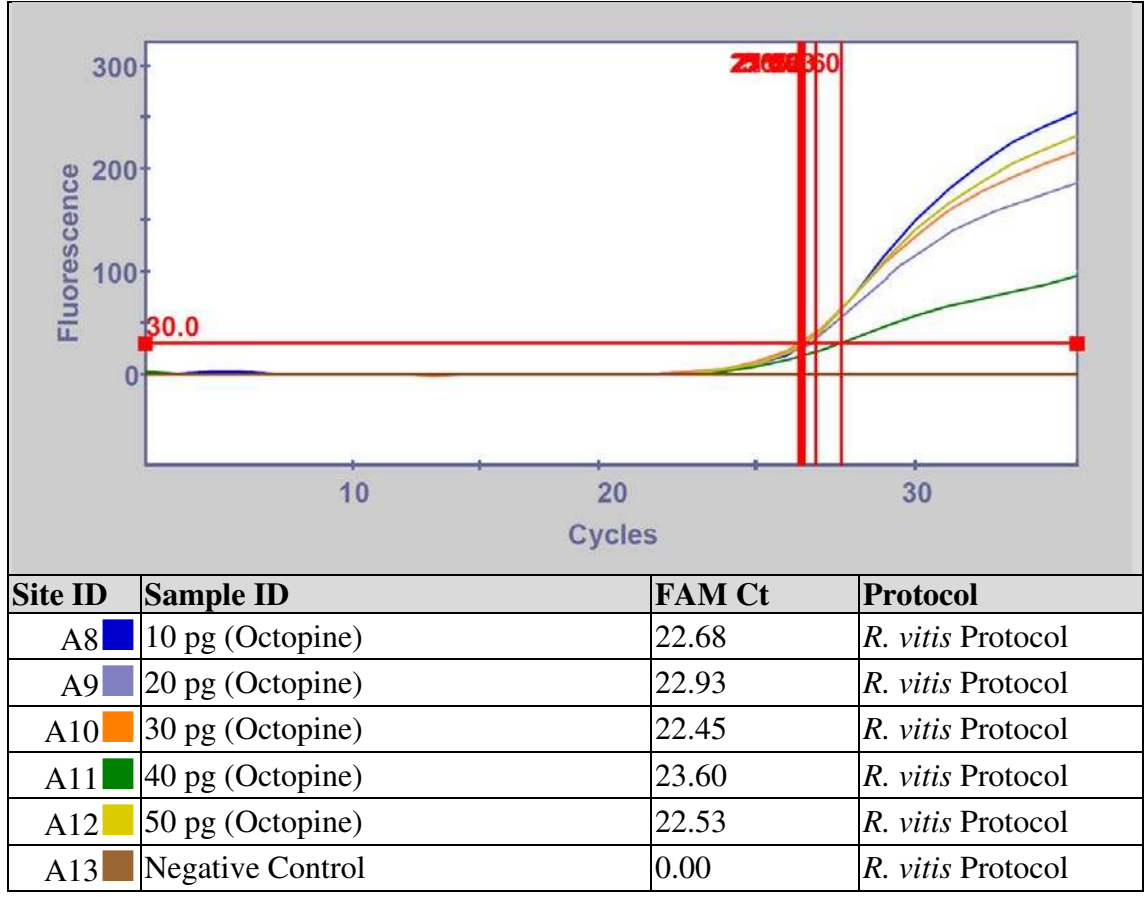
Şekil 4.9. Oktopin katabolize eden yerli *Rhizobium vitis* strainlerinin Real-Time PCR ile tespiti



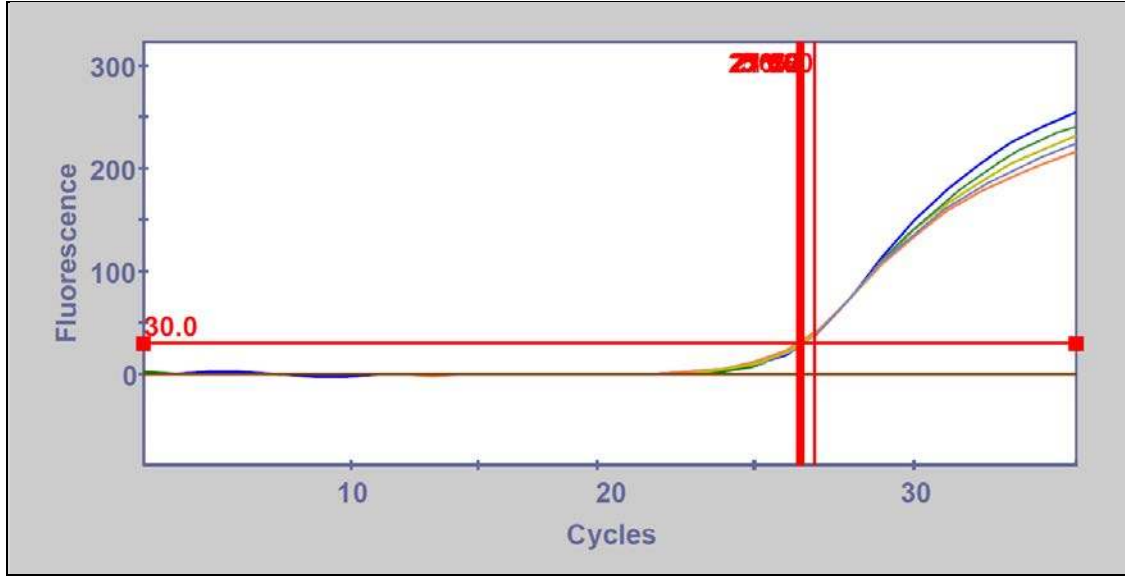
Şekil 4.10. Nopalin katabolize eden yabancı *Rhizobium vitis* ICMP 10753 straininin Real-Time PCR ile tespiti

4.4. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyeti

Real-Time PCR ile primerler ve probların genomik DNA'dan hassasiyetini belirlemek için *Rhizobium vitis* straininden izole edilen genomik DNA'nın önce nanogram düzeyinde devamında pikogram düzeyinde ölçümü yapılmıştır. Pikogram düzeyindeki ölçümünde 50 pg, 40 pg, 30 pg, 20 pg ve 10 pg olacak şekilde seyreltmeler yapılmış ve hem oktopin, hem de nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setlerinin genomik DNA'dan tespit limiti 10 pg olarak bulunmuştur (Şekil 4.11, Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti



Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A8	10 pg (Nopaline)	23.71	<i>R. vitis</i> Protocol
A9	20 pg (Nopaline)	23.62	<i>R. vitis</i> Protocol
A10	30 pg (Nopaline)	23.80	<i>R. vitis</i> Protocol
A11	40 pg (Nopaline)	23.60	<i>R. vitis</i> Protocol
A12	50 pg (Nopaline)	23.42	<i>R. vitis</i> Protocol
A13	Negative Control	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol

Şekil 4.12. Nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin saf DNA'dan hassasiyeti

4.5. Direkt Bakteriden Primerler ve Probların Hassasiyeti

Real-Time PCR ile *Rhizobium vitis* oktopin ve nopalin strainlerinin direkt bakteriyel hücreden tespit limiti 1 bakteri hücresi olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu işleme eş zamanlı olarak RS selektif besi ortamına yapılan inokülasyon sonrası *Rhizobium vitis* oktopin ve nopalin strainlerinin tespit limiti 1 bakteri hücresi, olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15).

Çizelge 4.1. Real-Time PCR ile *Rhizobium vitis* oktopin ve nopalin strainlerinin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

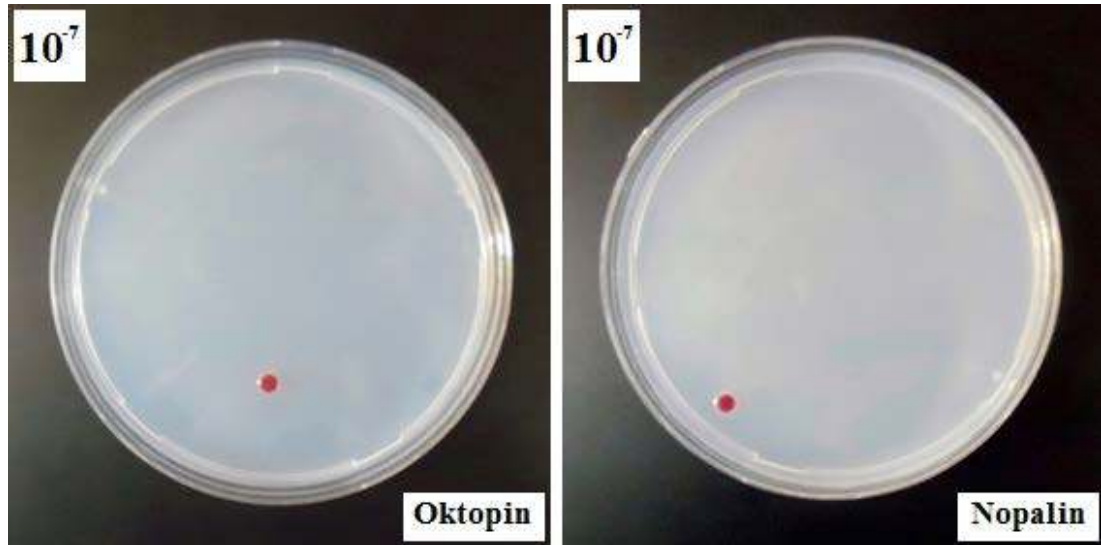
Konsantrasyon	FAM Ct		Bakteri Sayıları									
	<i>R. vitis</i> (O)	<i>R. vitis</i> (N)	<i>R. vitis</i> (O)			$\bar{x}$	std	<i>R. vitis</i> (N)			$\bar{x}$	std
Stok	24,98	24,50	*	*	*	-	-	*	*	*	-	-
10⁻¹	26,22	25,15	*	*	*	-	-	*	*	*	-	-
10⁻²	26,50	26,32	*	*	*	-	-	*	*	*	-	-
10⁻³	26,80	28,23	*	*	*	-	-	*	*	*	-	-
10⁻⁴	29,35	28,83	427	426	418	423	4,9	439	441	450	443	5,8
10⁻⁵	29,95	29,50	45	43	52	46,6	4,7	58	53	48	53	5
10⁻⁶	30,48	30,64	5	5	6	5,3	0,5	5	5	6	5,3	0,5
10⁻⁷	31,55	32,51	0	1	1	0,6	0,5	0	1	1	0,6	0,5
10⁻⁸	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻⁹	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10⁻¹⁰	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Negatif Kontrol	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

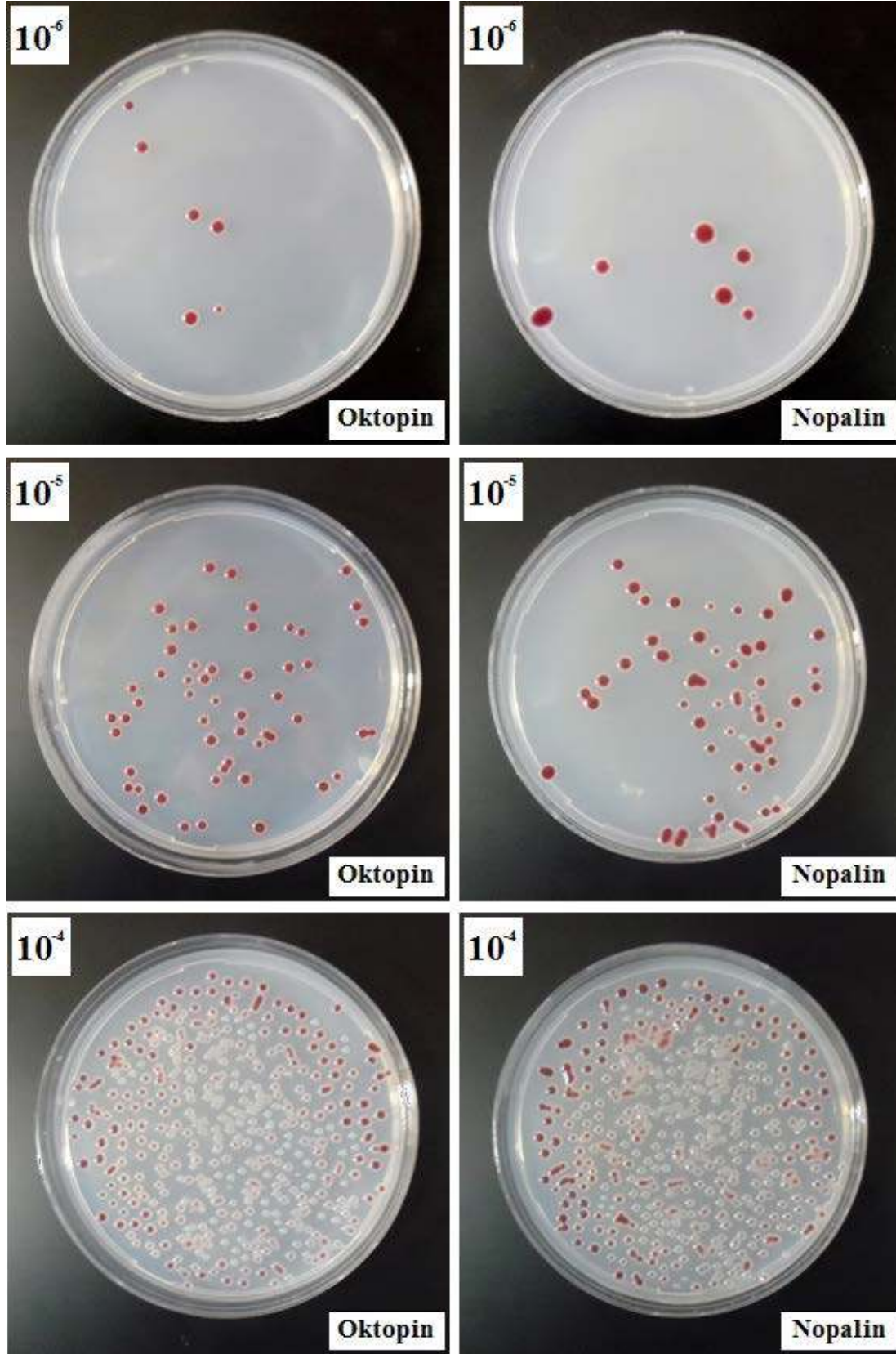
*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

std: Standart sapma

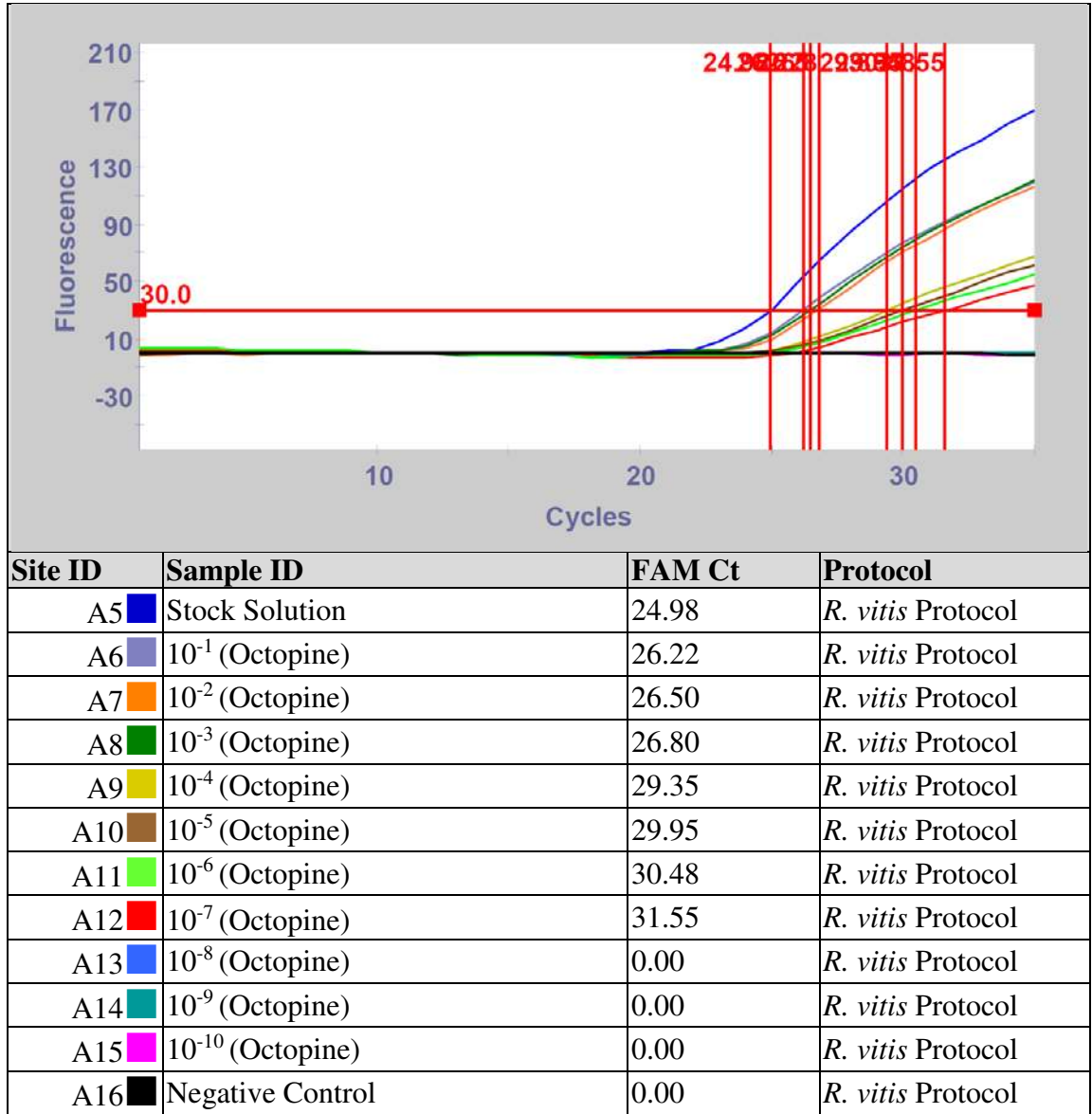
P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$: Aritmetik ortalama

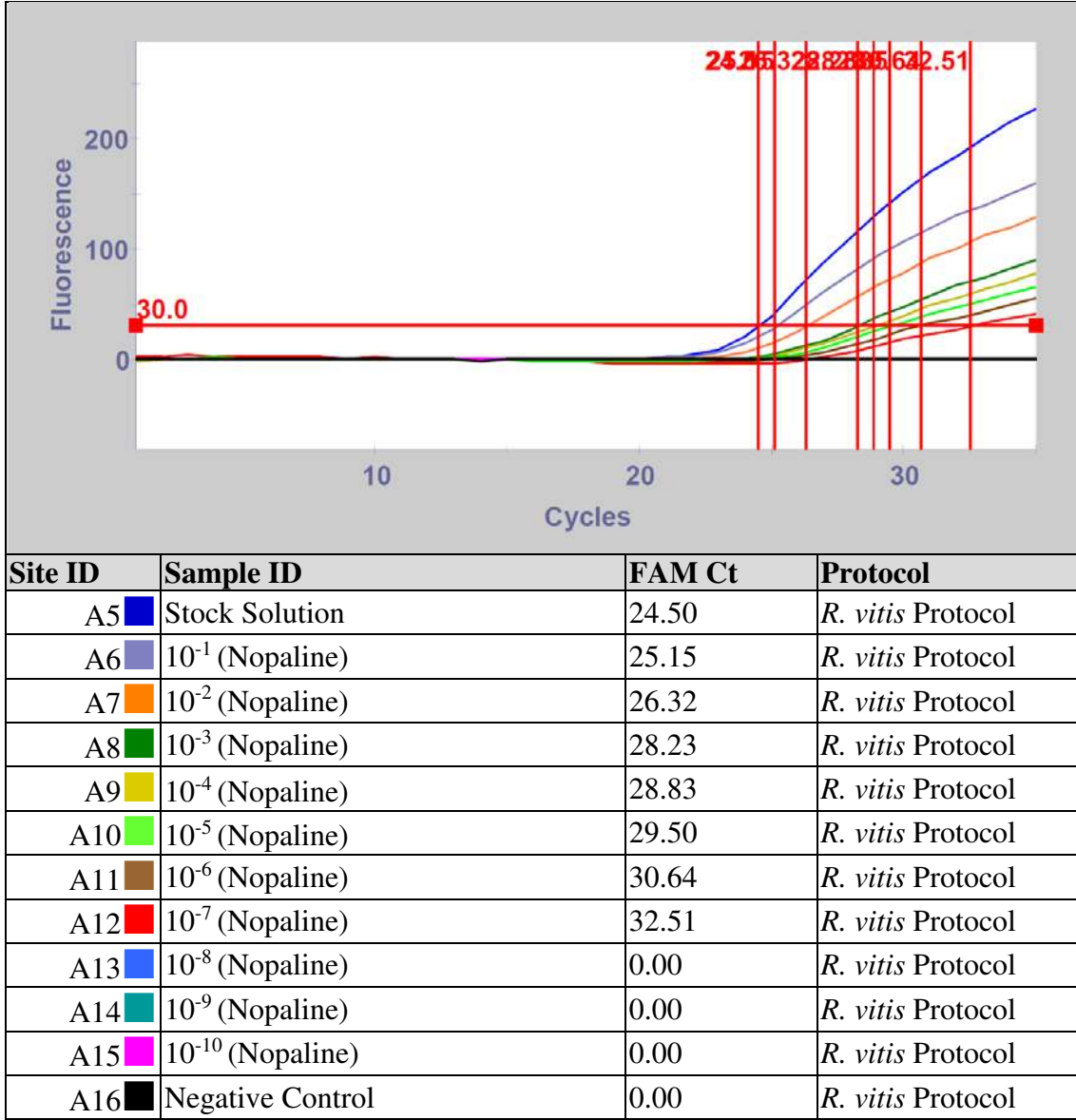




Şekil 4.13. Roy & Sasser seçici besi ortamında farklı seyreltmede tespit edilen en az bakterinin tespiti (Çizelge 4.1)

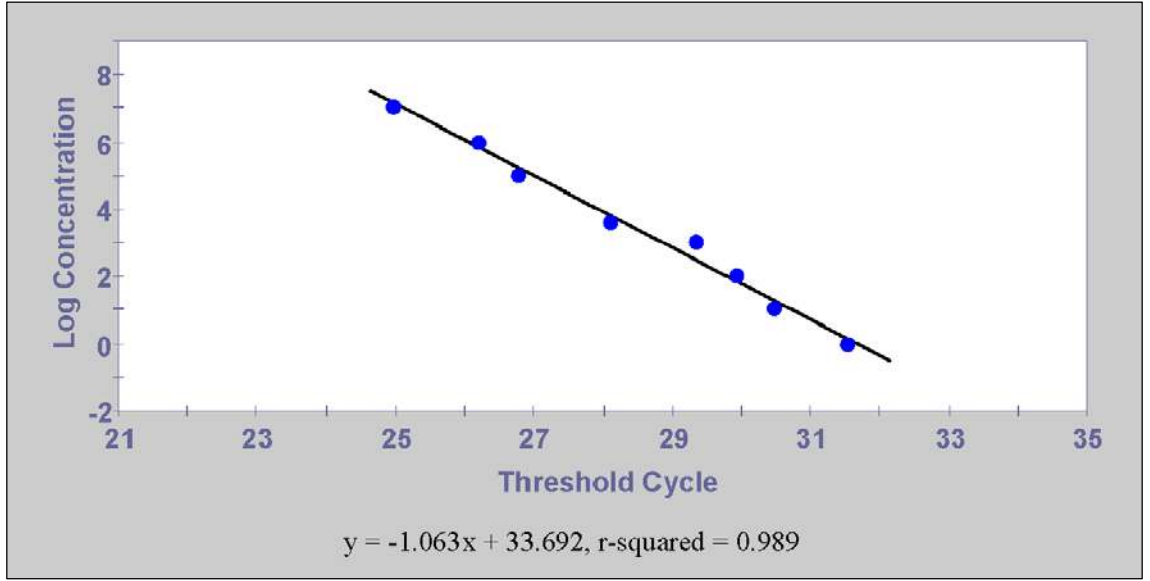


Şekil 4.14. Oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin bakteri hassasiyeti

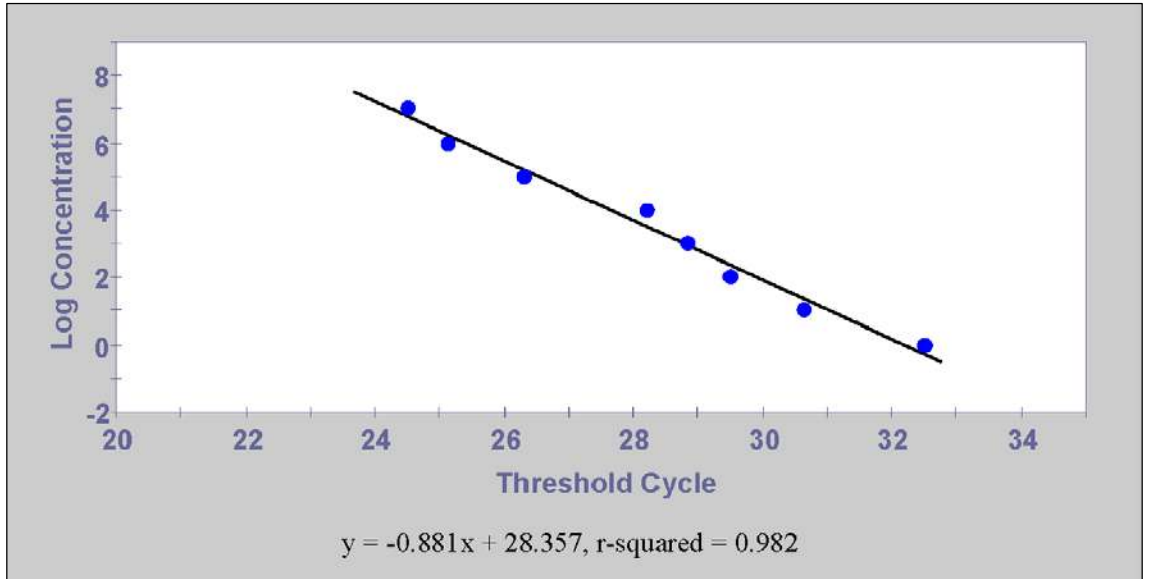


Şekil 4.15. Nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin bakteri hassasiyeti

Real-Time PCR eşik döngüsü (Ct) değerine bağlı olarak logaritmik olarak bakteri sayısını saptamaya yönelik referans bir regresyon eğrisi oluşturulmuştur. Oktopin strainlerine ait doğru denklemi $y = -1,063x + 33,692$ olarak belirlenirken nopalin strainlerine ait doğru denklemi $y = -0,881x + 28,357$ olarak belirlenmiştir. Denklemde y değişkeni bakteri sayısının logaritmik değerini, x değişkeni Real-Time PCR’da saptanan Ct değerini ifade etmektedir. Denklem bağımlı değişken olan bakteri sayısını ölçme gücünü ifade eden R² değeri ise oktopin strainleri için belirlenen denklem için 0,989, nopalin strainleri için belirlenen denklem için 0,982 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17).



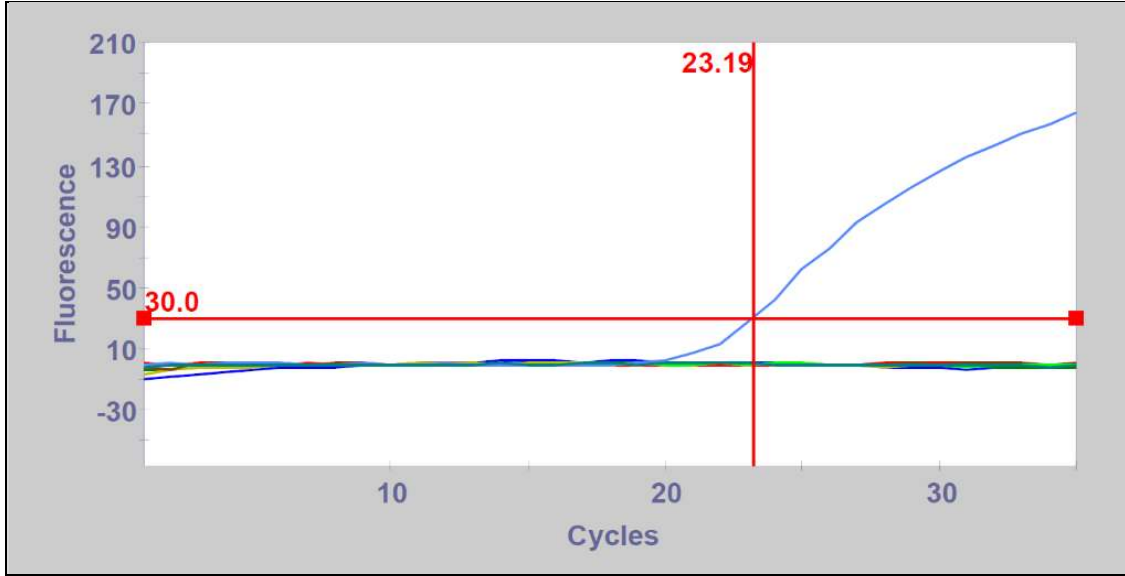
Şekil 4.16. Oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri için oluşturulan regresyon eğrisi



Şekil 4.17. Nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri için oluşturulan regresyon eğrisi

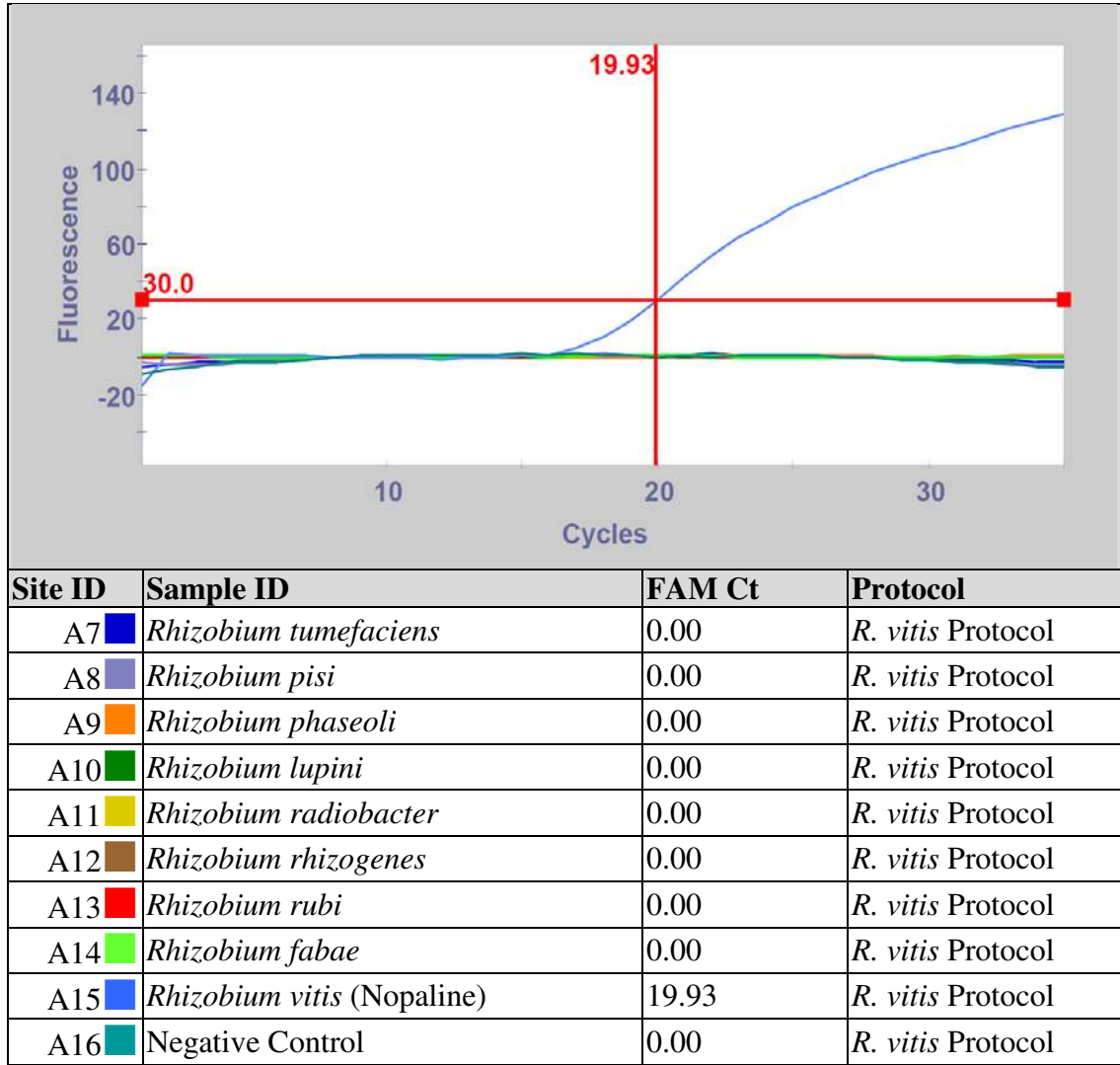
4.6. Primerler ve Proben Seçiciliği

Rhizobium vitis'in tanı ve tespiti için tasarlanan primerler ve probun seçiciliğini test etmek amacıyla, farklı *Rhizobium* türleri (Çizelge 3.2) ve türlere ait bitki patojeni bakteriler (Çizelge 3.3) ile Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonucunda *Rhizobium vitis* için tasarlanan primer prob setlerinin sadece *Rhizobium vitis*'e spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21).

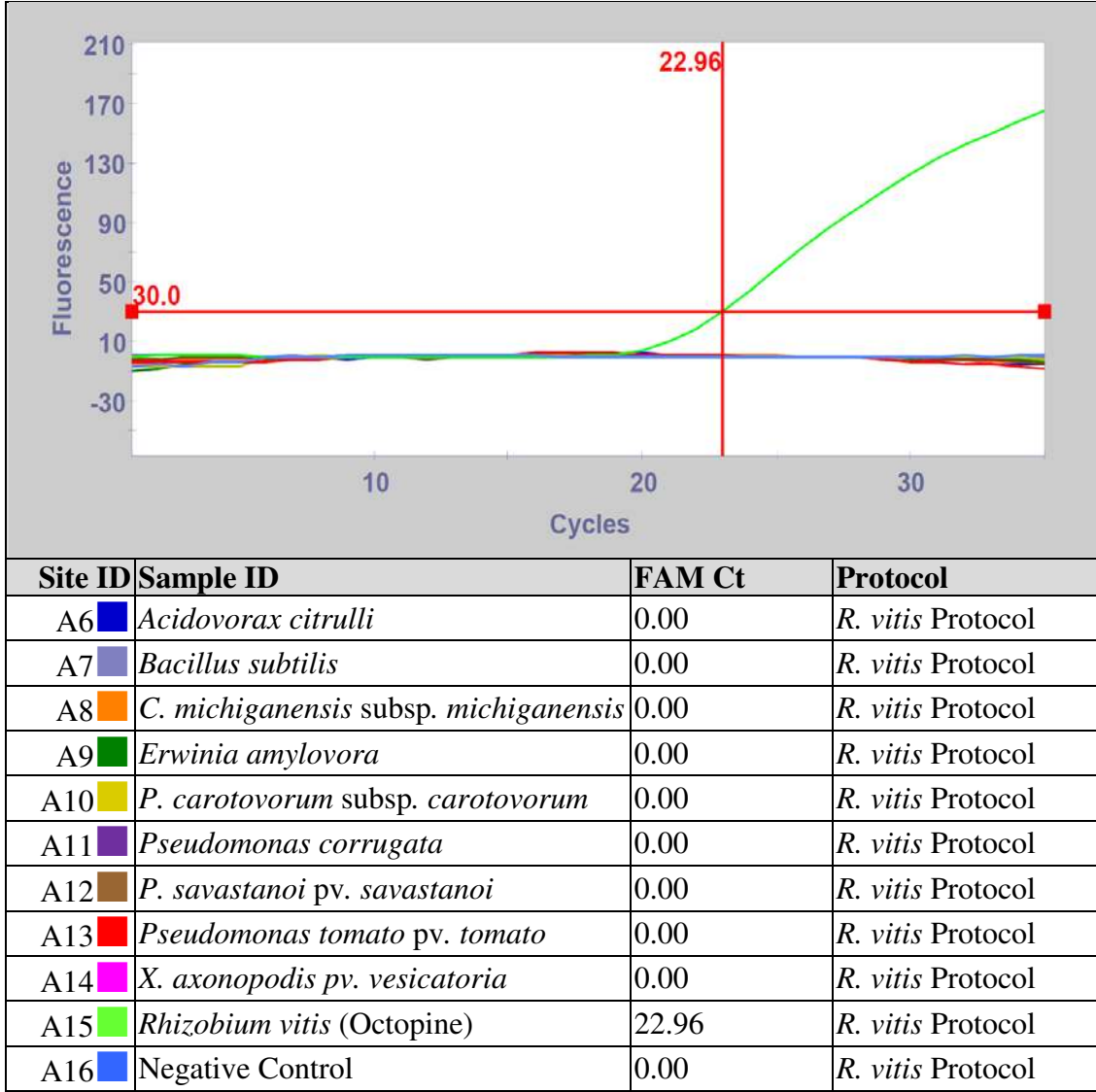


Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A7	<i>Rhizobium tumefaciens</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A8	<i>Rhizobium pisi</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A9	<i>Rhizobium phaseoli</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A10	<i>Rhizobium lupini</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A11	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A12	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A13	<i>Rhizobium rubi</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A14	<i>Rhizobium fabae</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A15	<i>Rhizobium vitis</i> (Octopine)	23.19	<i>R. vitis</i> Protocol
A16	Negative Control	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol

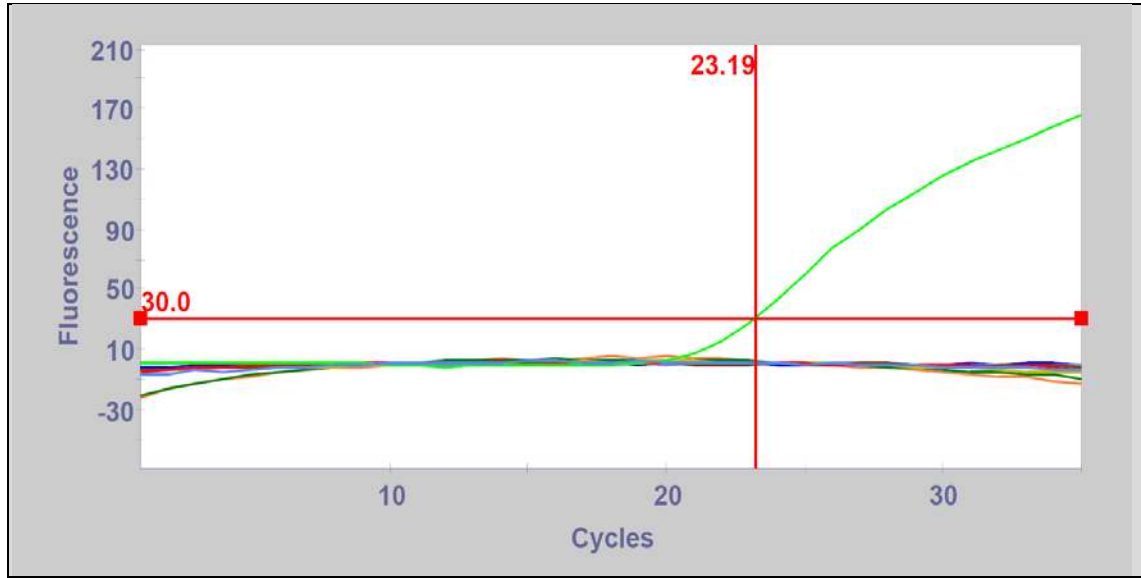
Şekil 4.18. Oktopin katabolize eden yerli *Rhizobium vitis* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin farklı *Rhizobium* türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi



Şekil 4.19. Nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin farklı *Rhizobium* türlerine karşı spesifikliğin belirlenmesi



Şekil 4.20. Oktopin katabolize eden yerli *Rhizobium vitis* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin farklı bitki patojeni bakterilere karşı spesifikliğin belirlenmesi

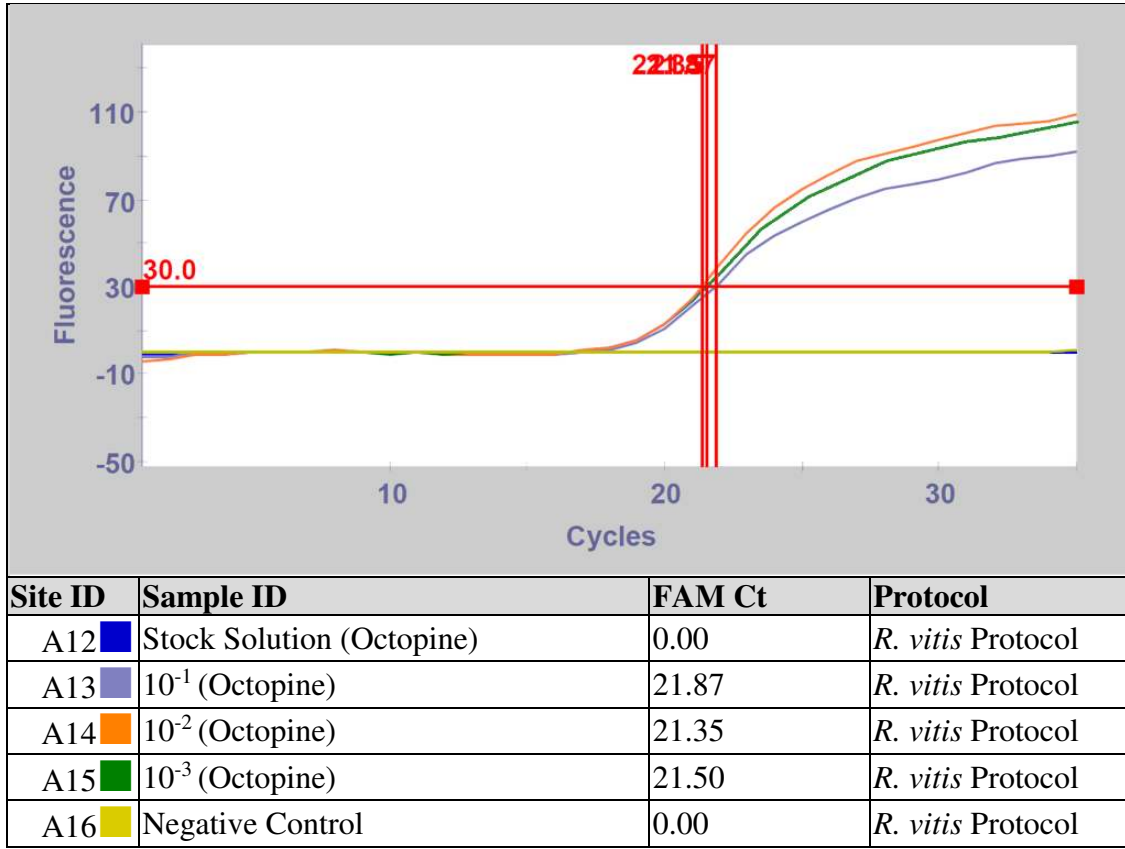


Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A6	<i>Acidovorax citrulli</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A7	<i>Bacillus subtilis</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A8	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A9	<i>Erwinia amylovora</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A10	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A11	<i>Pseudomonas corrugata</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A12	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A13	<i>Pseudomonas tomato</i> pv. <i>tomato</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A14	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol
A15	<i>Rhizobium vitis</i> (Nopaline)	23.19	<i>R. vitis</i> Protocol
A16	Negative Control	0.00	<i>R. vitis</i> Protocol

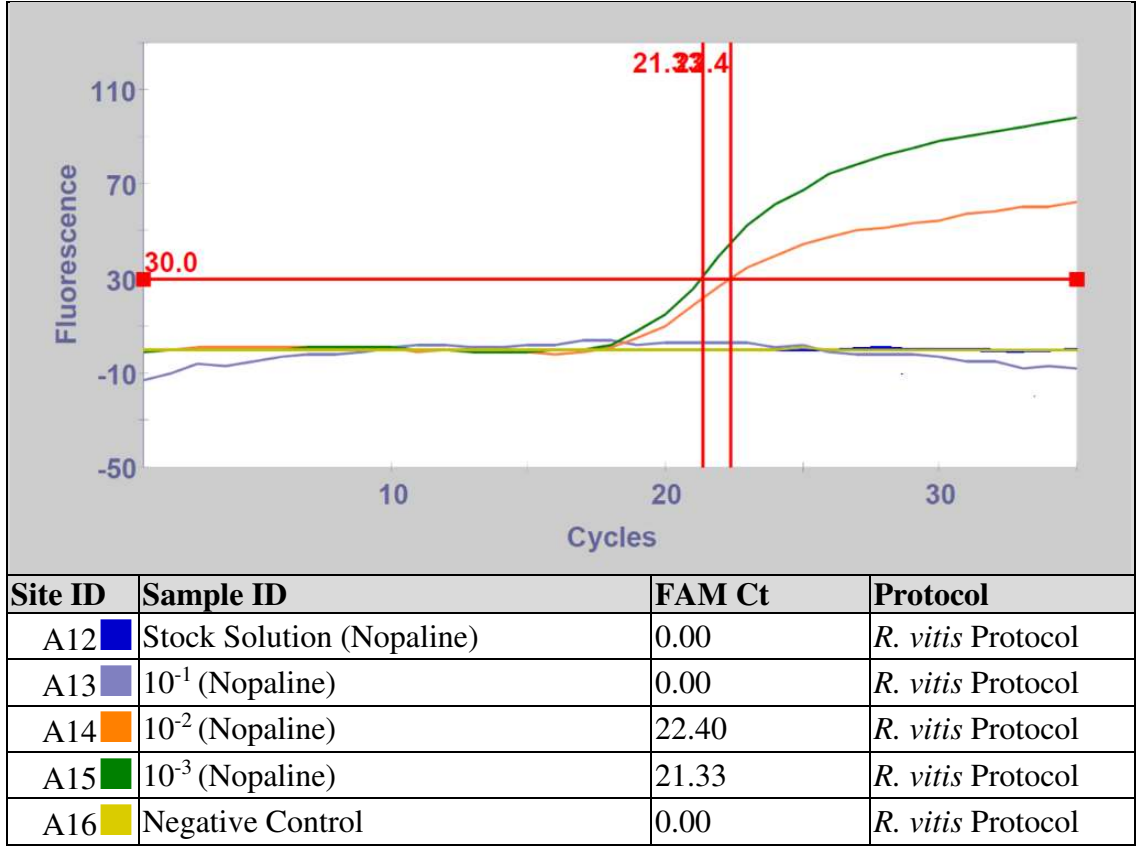
Şekil 4.21. Nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin farklı bitki patojeni bakterilere karşı spesifikliğinin belirlenmesi

4.7. Real-Time Bio-PCR

Real-Time PCR yöntemi ile hem canlı ve hem de ölü bakterilerin tespiti mümkün olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada yalnız canlı *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla Real-Time Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} seviyeleri ile yapılan Real-Time Bio-PCR işlemi sonucunda, *Rhizobium vitis* oktopin katabolize eden strainlerinde stok seviyesi yoğun olduğu için amplifikasyon meydana gelmemiş, ancak 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} seviyelerinde tespit gerçekleştirilmiştir. *Rhizobium vitis* nopalin katabolize eden strainlerinde stok ve 10^{-1} seviyeleri yoğun olduğu için amplifikasyon meydana gelmemiş, ancak 10^{-2} ve 10^{-3} seviyelerinde tespit patojen tespit edilebilmiştir (Şekil 4.22, Şekil 4.23).



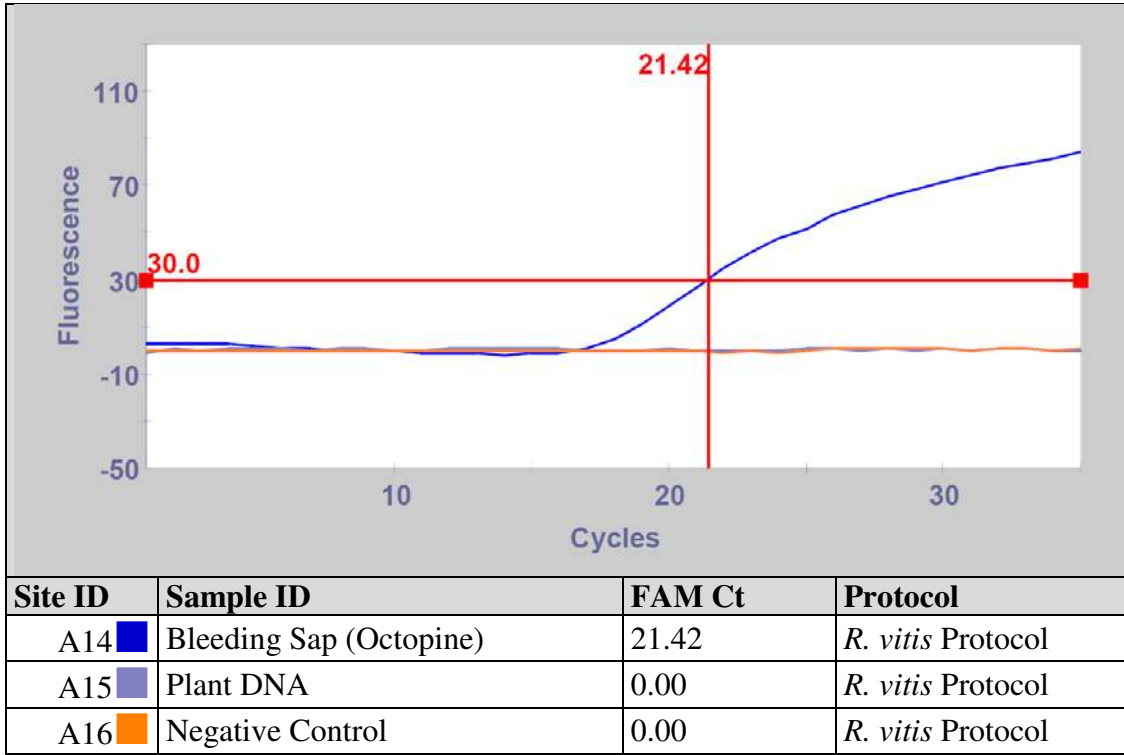
Şekil 4.22. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin tespiti



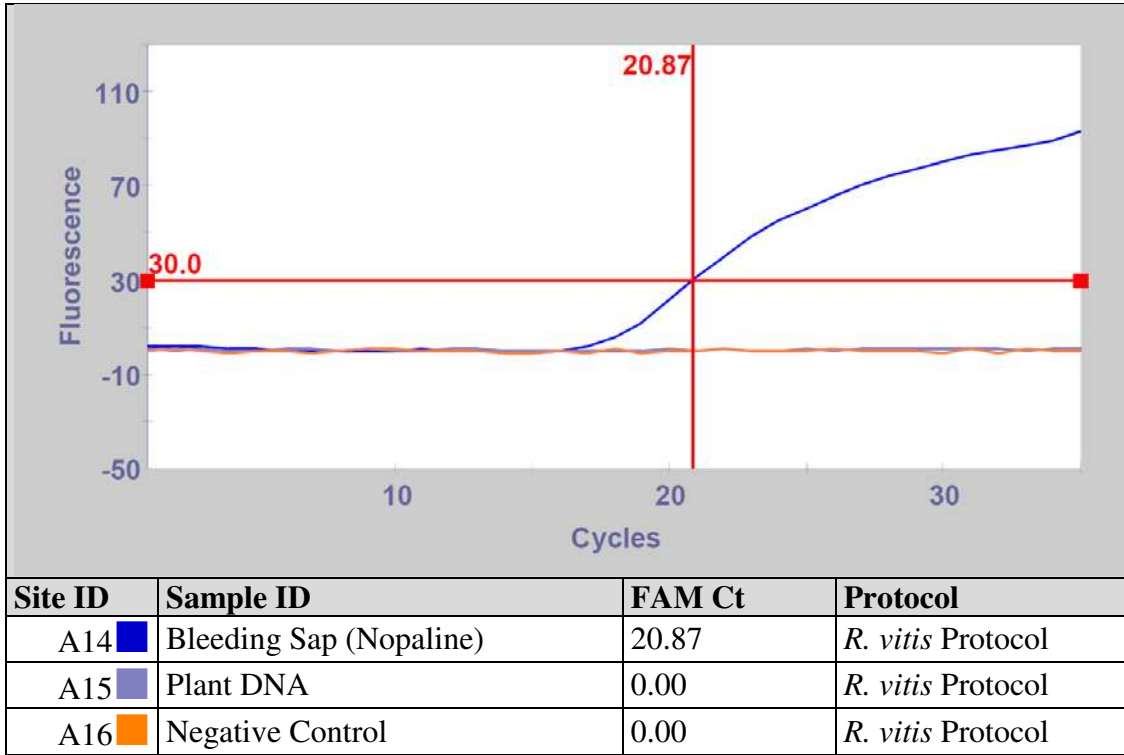
Şekil 4.23. Tasarlanan primer ve prob seti ile canlı nopalın katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin tespiti

4.8. *Rhizobium vitis*'in Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti

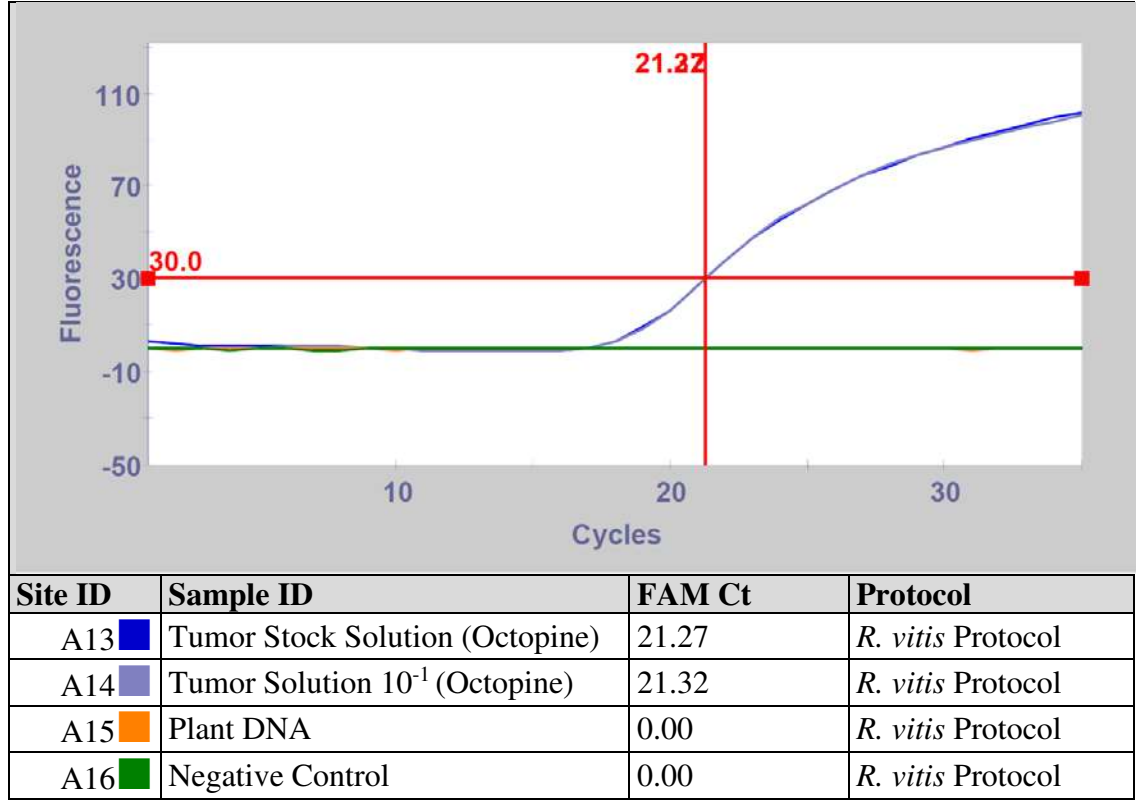
Asmada ürün ve kalite kayıplarına neden olan *Rhizobium vitis*'in hastalıklı bitki dokularından tespit edilebilirliğinin test edilmesinde domates bitkileri ve asma fidanları kullanılmıştır. Bitkilerdeki tümör dokularından enfekteli asma bitkilerinin dallarının iç dokularından elde edilen bitki özsuyundan hazırlanan solüsyonlar ile Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiş, oktopin ve nopalın katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tespiti gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan primer setleri ve problemlerin, stok solüsyonda bulunan bitki DNA'sı ile reaksiyon vermediği saf bitki DNA'sı kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29). Asmalarda tümör oluşumunun inokülasyon sonrası inkübasyonun 9. haftasında oluşmaya başladığı, domateslerde ise tümör oluşumunun inokülasyon sonrası inkübasyonun 3. haftasında meydana geldiği gözlemlenmiştir. *Rhizobium vitis*'in hastalıklı bitki dokularından tespitinde kullanılan asma kaynaklı tümörler 10 haftalık, domates kaynaklı tümörler 2 haftalıktır.



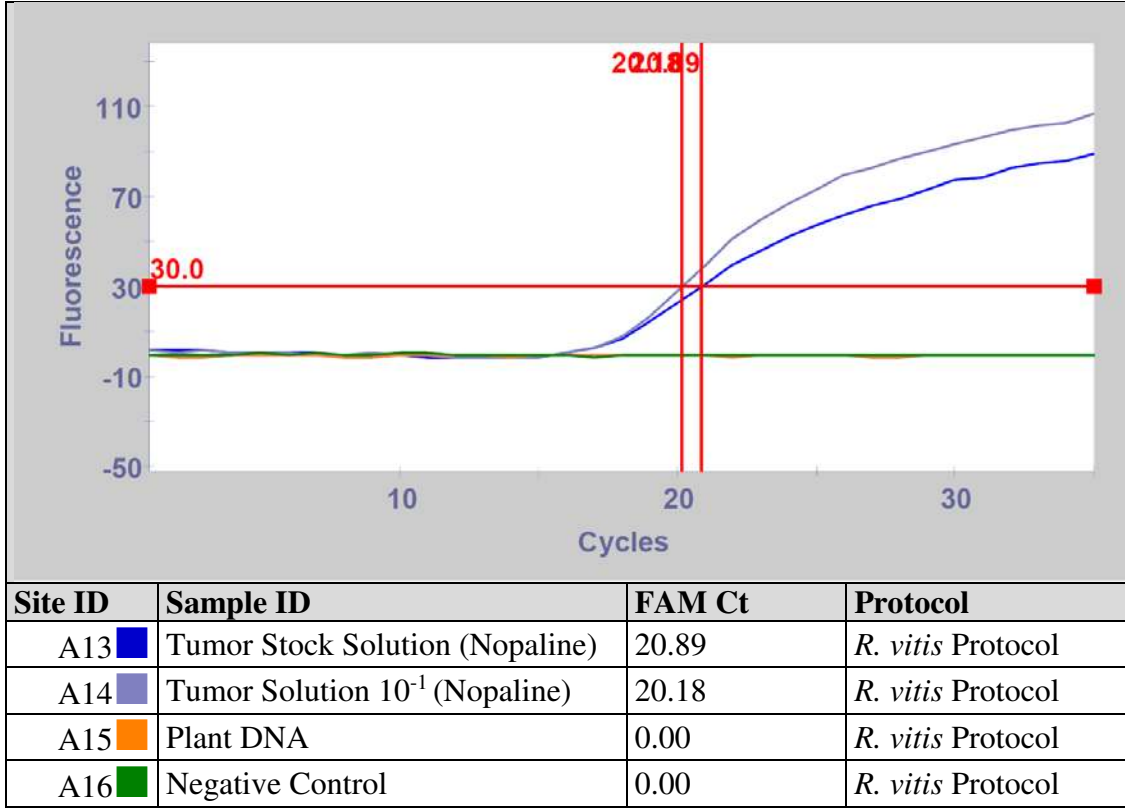
Şekil 4.24. Tasarlanan primer ve prob seti ile oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin asma özsuyundan tespiti



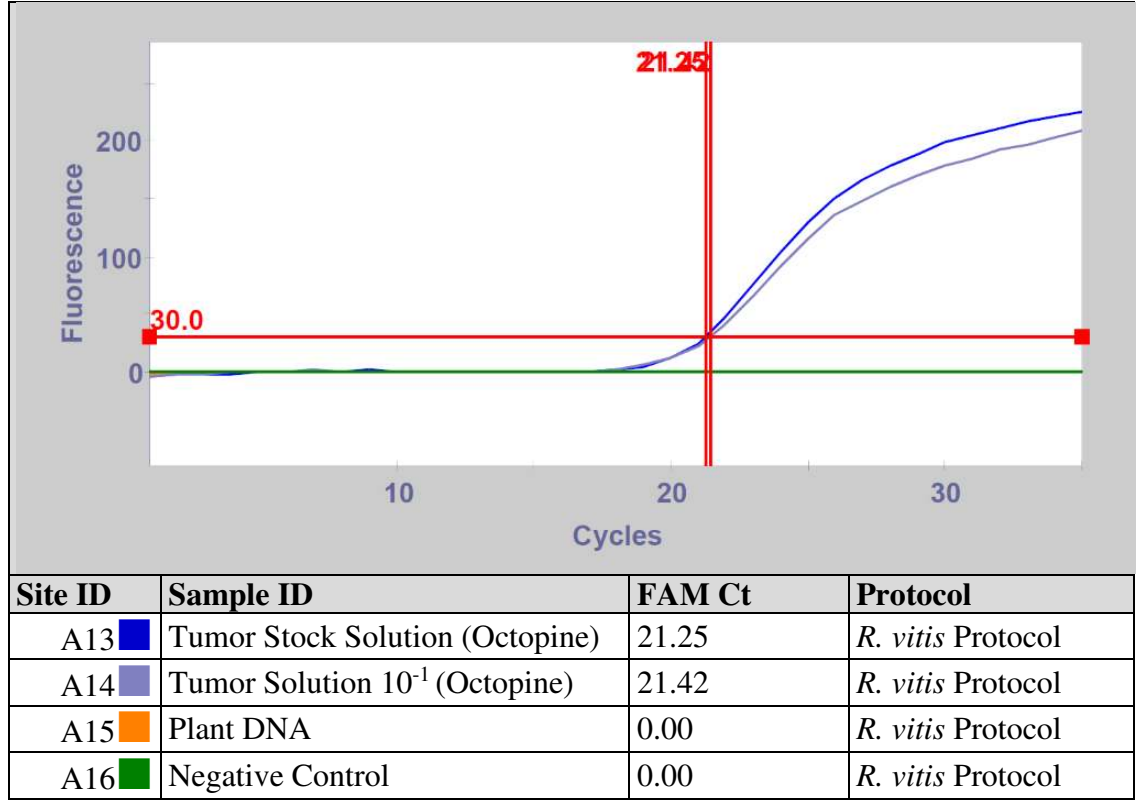
Şekil 4.25. Tasarlanan primer ve prob seti ile nopaline katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin asma özsuyundan tespiti



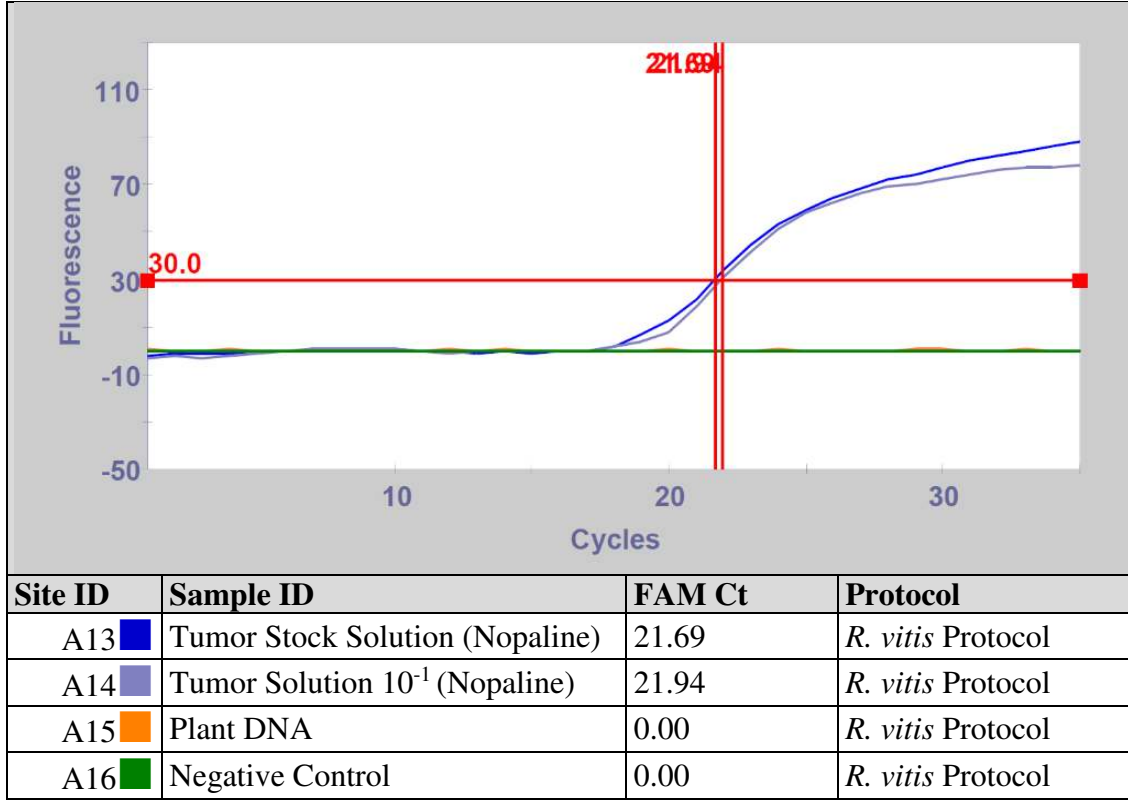
Şekil 4.26. Tasarlanan primer ve prob seti ile oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin enfekteli asma dokusundan tespiti



Şekil 4.27. Tasarlanan primer ve prob seti ile nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin enfekteli asma dokusundan tespiti



Şekil 4.28. Tasarlanan primer ve prob seti ile oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin enfekteli domates dokusundan tespiti



Şekil 4.29. Tasarlanan primer ve prob seti ile nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* straininin enfekteli domates dokusundan tespiti

5. TARTIŞMA

Bitki patojeni bakteriler, Dünya çapında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ekonomik kayıplar, genellikle ürün kaybına bağlı azalan üretim ile ortaya çıkan bakteriyel hastalığın kontrolü için, uygulanan prosedür ve stratejilerin getirdiği maliyetten kaynaklanır (Panagopoulos ve Psallidas 1973, Loubser 1978, Süle 1978, Dhanvantari 1983, Tarbah ve Goodman 1986, Burr vd 1987-b, Haas vd 1991, Filo vd 2013, Johnson vd 2013). Bitki patojeni bakterilerin kontrolünün güç olması, hastalıktan dolayı meydana gelen kayıpların minimize edilmesinde, koruyucu önlemlerin sahip olduğu önemi arttırmaktadır (Creasap ve Burr 2006, Anonim 2012-a). Bu bağlamda, bitki patojenlerinin hızlı ve kesin bir şekilde tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi, agronomik uygulamaların hayata geçirilmesinde büyük önem arz etmektedir (Schaad ve Frederick 2002).

Bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitinde mikroskopik gözlem, indikatör bitki testleri, biyokimyasal ve fizyolojik testler, boyama testleri, serolojik karakterizasyon gibi pek çok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler zaman alıcı olmalarının yanında, çoğu durumda yeterince hassas ve spesifik olamamaktadırlar. Yöntemlerin yeterince hızlı, hassas ve spesifik olmamaları, rutinde kullanımlarını büyük ölçüde sınırlandırmaktadır. Her ne kadar serolojik testlerin patojenlere spesifik hazırlanmış ticari formları hızlı analiz imkanı verse de, bu testler düşük hassasiyetleri nedeniyle latent enfeksiyonların tespit edilmesinde yanlış sonuçlar verebilmektedirler. Kısa sürede epidemiyeye sebep olabilen ve karantinaya tabi fitopatogenik bakterilerin tanı ve teşhisinde kullanılan yöntemlerin yüksek hassasiyete sahip olması ve hızlı sonuç vermesi önemli bir gerekliliktir (Schaad ve Frederick 2002).

Günümüzde bitki patojenlerinin tanı ve teşhisinde nükleik asit bazlı protokollerin daha fazla tercih edildiği bilinmektedir. Organizmalara ilişkin en doğru bilgilerin, organizmaların sahip oldukları nükleik asitlerde yer aldığı düşünüldüğünde, hastalık etmenlerinin tanı ve tespitleri için kullanılan diğer metotlara oranla nükleik asit temelli yöntemlerin kullanımı daha güvenilir sonuçlar vermektedir (Schaad vd 1995, Walcott ve Gitaitis 2000, Catara vd 2000, Baer vd 2001, Catara vd 2002, Kang vd 2003, Alimi vd 2011, Li vd 2011) Fakat klasik metotlar tamamen terk edilmemiş, bazı hallerde nükleik asit bazlı yöntemlerden elde edilen verileri desteklemede tamamlayıcı unsur olarak kullanılmaya devam etmektedir (Tolba ve Soliman 2013).

Laboratuvar pratiğinde yaygın şekilde kullanılan nükleik asit bazlı yöntemlerin başında, klasik PCR yöntemi gelmektedir. Klasik PCR yöntemi, keşfinden günümüze değin sağladığı avantajlardan ötürü pek çok bitki patojeninin tanı ve tespitinde kullanılmıştır (Schaad vd 1995, Walcott ve Gitaitis 2000, Catara vd 2000, Baer vd 2001, Catara vd 2002, Kang vd 2003, Alimi vd 2011, Li vd 2011). Ancak klasik PCR yönteminin, kontaminasyon riskleri taşınası, inhibitör maddelere hassasiyet, zaman alıcılık, eğitimli iş gücü gerekliliği gibi negatif yönleri de bulunmaktadır. Bunun yanında reaksiyonun başarısı, kullanılan polimeraz tipi, tampon çözelti ve dNTP solüsyonlarının konsantrasyonları, saflıkları ve stabiliteeleri, döngü parametreleri, DNA konsantrasyonu gibi pek çok farklı karakteristiğe bağlı olarak değişmektedir (Wassenegger 2001).

Klasik PCR yönteminin sonuçlarının irdelenebilmesi, ancak PCR sonucunda çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jelde yürütülmesi ve etidyum bromür ile boyanıp ultraviyole ışık altında görüntülenmesi ile mümkün olmaktadır. Yöntem her ne kadar nükleik asit bazlı olmayan yöntemlere oranla kısa sürede sonuç verse de, yürütme ve boyama işlemlerinin varlığı, yöntemin hızını, pratikliğini ve uygulanabilirliğini büyük ölçüde azaltmaktadır. Bu nedenle son yıllarda, patojenlerin erken tanı ve tespitleri için klasik PCR yönteminde sonuçların görülebilmesi için zorunlu olan işlemlere ihtiyaç duymayan, daha kısa sürede kesin sonuç veren, klasik PCR yönteminin pek çok dezavantajından arı, Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Real-Time PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi esasına dayanan, reaksiyonun meydana gelişi esnasında izlenebilmesine olanak veren, hızlı ve hassas yeni nesil bir PCR yöntemidir. Real-Time PCR yönteminde sonuçlar, klasik PCR ve diğer PCR varyantlarından farklı olarak kantitatif olarak elde edilebilmektedir. Real-Time PCR yönteminde tüm işlem kapalı bir PCR tüpü içerisinde ve tek seferde gerçekleştiği için kontaminasyon riski, klasik PCR metoduna göre çok daha düşüktür. Real-Time PCR yönteminde, klasik PCR metoduna nazaran daha az miktarda DNA ihtiyaç duyulmakta, bu nedenle daha hassas ve doğru sonuçlar elde edilebilmektedir. Ayrıca Real-Time PCR sisteminde, tüm PCR işlemi bir bilgisayar aracılığı ile gerçek zamanlı olarak kontrol edilebilmekte ve işlem istenildiğinde sonlandırılabilir. Real-Time PCR metoduyla patojenlerin tanı ve tespitleri, çift zincirli DNA sarmalı arasına bağlanarak 522 nm’de ışımaya veren SYBR Green adı verilen boya ile veya belirli bir DNA dizisine spesifik olan proba yapılmaktadır. SYBR Green belirli bir DNA dizisine spesifik olmadığından reaksiyon sonucunda oluşabilecek istenmeyen amplifikasyonlar veya iyi tasarlanmamış primerlerin dimerizasyonu neticesinde yanlış pozitif sonuç verebilmektedir. Günümüzde primer ve prob kimyasındaki gelişmeler sayesinde, Real-Time PCR farklı primer ve prob tipleri geliştirilmiş yöntem farklı ihtiyaçları da karşılayabilir bir yapıya kavuşmuştur (Wong ve Medrano 2005, Anonim 2014-1).

Real-Time PCR metodunun dezavantajları arasında yöntemin şu an için ekonomik olmaması, reaksiyon sırasında amplifiye edilen PCR ürününün daha sonraki çalışmalarda kullanılamaması, Real-Time PCR işlemi için SYBR Green gibi belirli bir DNA dizisine spesifik olmayan floresan boyaların kullanılması durumunda yanlış bağlanmalardan dolayı tutarsız sonuçlar ortaya çıkabilmesi ve yeterli teknik bilgi ve iyi yetişmiş eleman ihtiyacı gösterilebilir (Wong ve Medrano 2005).

Real-Time PCR yönteminin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitki dokularından patojenin tespitine olanak vermesi (Yılmaz ve Basım 2006, Basım ve Basım 2007, 2009, Çaplık ve Basım 2009, Bozan ve Basım 2011, Öztürk ve Basım 2011), bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamıştır. Bu çalışma ile Real-Time PCR yönteminin önemi ve hassaslığı bir kez daha ortaya konulmuştur.

Asma üretim materyallerinin eldesinde, çekirdekten çoğaltım, daldırma ile çoğaltım, çelik ile çoğaltım gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Asma fidanı üretiminde en yaygın kullanılan teknik, anaç ve kalem kısımlarının ayrı ayrı yetiştirilip birbirine aşılınması esasına dayanır (Creasy ve Creasy 2009). Asma fidanlarında anaç ve

kalem olarak kullanılacak tek yıllık sağlıklı sürgünler budanarak arazide tasnif edilip demetlenmekte ve depolanmak üzere işletmeye taşınmaktadır. Karanlık ve serin bir ortamda depolanan anaçların en üst ve en alt kısmında yer alan gözler hariç diğer gözleri köreltilmekte, bir gün boyunca suda bekletilen kalemler ise tek gözlü parçalar halinde kesilmektedir. Kesilen gözler ve anaçlar çeşit karışıklığına mahal vermeyecek bir düzen içerisinde aşı makinesi yardımı ile birleştirilmekte ve aşı yüzeyi parafin ile kaplanmaktadır. Aşı bölgesi parafinle kaplanan anaç ve kalemler, 26 C°'de, %80-85 nispi nemde, 21 gün inkübe edilerek, anaç ve kalemin kaynaşması sağlanmaktadır. Dikime hazır hale gelen çelikler, dikimden önce köklenmeyi teşvik etmesi için IBA (İndol Bütirik Asit) çözeltisine batırılmalarının ardından, tüplerin içine hazırlanmış fidan harcının içine dikilmektedir. Çeliklerin hazırlanma sürecinde gerek anaç gerek kalemler pek çok kez yaralandırılmakta ve Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis* ile enfekte olma riski ile karşı karşıya gelmektedir. Budama ve tasnif işlemlerinin arazide gerçekleştirilmesi budanan parçaların toprak ile temas etmesine neden olmaktadır. Anaç ve kalemlerin uygun şekilde kesimi ve birleştirilmesi esnasında meydana gelen yaralanmalar da *Rhizobium vitis* strainlerinin üretim materyaline girişi için büyük risk oluşturmaktadır. Birleştirilen anaç ve kalemlerin kaynaşması amacıyla *Rhizobium vitis* gelişimi için oldukça uygun olan 26 C°'de 21 gün inkübe edilmesi hastalık etmeninin bitki içine girmesi durumunda hastalık etmeninin bitkide hızlı bir şekilde gelişim göstermesine neden olabilmektedir. Bulaşma için risk taşıyan bu proseslerin sonrasında üretim materyalinin hastalığa dair hızlı ve hassas tespit yöntemleri ile kontrol edilmesi hastalıktan arı üretim materyali eldesinde büyük önem arz etmektedir (Anonim 2014-m).

Pratik kullanımda, üretim materyalinde bulunabilecek patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin hızlı ve kesin tanısının gerçekleştirilmesi çok önemlidir. *Rhizobium vitis* türünün sergilediği yüksek genetik farklılık patojenin tanı ve tespitini zorlaştırmaktadır. Bu zorluğun üstesinden gelmek için çalışmada sadece patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinde bulunan patojenisiteden sorumlu genler seçilmiş ve bu genlere uygun primerler dizayn edilmiştir. Prob mimarisinde, günümüzde kullanılan en gelişmiş prob sistemlerinden biri olan LNA (Locked Nucleic Acid) kullanılmıştır. LNA prob sistemde prob üzerinde yer alan DNA analogu monomerlerde bulunan şeker halkaları metilen bir köprü ile bağlandığından, monomerlerin her biri spesifik bağlanma için en uygun konformasyon olan N konformasyonunda sabit kalabilmektedirler. Bu sayede daha stabil bir yapıya kavuşan proplar, spesifik olmayan bağlanmalara izin vermemekte ve propların spesifik bölgelere olan bağlanma eğilimlerini artmaktadır. Reaksiyon esnasında meydana gelen primer bağlanmaları da sabit konformasyonlu LNA proplarda daha stabil olmaktadır. LNA proplara ait diziler, tasarımları gereği Real-Time PCR ile yapılan diğer çalışmalarda kullanılan propların dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Bu sayede prob dizisinin kendi içinde bağlanma olasılığı ortadan kalkmaktadır. Propların ve amplifiye edilen bölgenin kısa dizilerden oluşması amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine olanak vermektedir. LNA probun kimyasal yapısı, daha spesifik bir şekilde çalışılmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını garanti etmektedir.

Taç Gali ile mücadelede başarılı olabilmek için *Rhizobium vitis*'in hızlı, güvenilir tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi büyük önem arz etmektedir. *Rhizobium* türlerinin tanılanmasında, indikatör bitki kullanımı (Riker 1923, Brown 1927, Hildebrand 1942, McKeen 1954, Ark ve Schroth 1958, Öktem 1972, Burr ve Katz 1984, Tarbah ve

Goodman 1986, Burr vd 1987-b, Holmes 1988, Szegedi vd 1988, Bishop vd 1989, Ophel ve Kerr 1990, Sawada vd 1990, Bush ve Pueppke 1991, Haas vd 1991, Tolba ve Zaki 2011), fenotipik karakterlerin nümerik analizi (White 1972, Kersters vd 1973, Holmes ve Roberts 1981), biyokimyasal ve fizyolojik testler (Baldwin ve Fred 1927, Hofer 1941, Lange 1961, Graham 1964, Keane vd 1970, White 1972, Kersters vd 1973, Kerr ve Panagopoulos 1977, Süle 1978, Holmes ve Roberts 1981, Tarbah ve Goodman 1986, Bouzar ve Moore 1987-a, Ophel ve Kerr 1990, Bush ve Pueppke 1991, Haas vd 1991, Sawada ve Ieki 1992-b, Nagai-Miyata vd 1993, Sawada 1994, Bouzar vd 1995, Mohammadi ve Fatehi-Paykani 1999, Ride vd 2000, Argun vd 2002, Matthysse 2005, Genov vd 2006, Tolba ve Zaki 2011), serolojik testler (Coleman ve Reid 1945, Mushin vd 1958, Hochster ve Cole 1967, Graham 1971, Bouzar vd 1986, Alarcon vd 1987, Bouzar ve Moore 1987-b, Sawada vd 1992-b, 1992-c, Sawada 1994, Benlioğlu ve Özakman 1998, Kawaguchi vd 2008-b), yağ asidi profilleri (Sawada vd 1992-d, Bouzar vd 1993-a, Sawada 1994, Bouzar vd 1995, Jarvis vd 1996), DNA-DNA ilişkileri (De Ley 1972, 1974), DNA hibritlerinin termal stabilitelerinin ölçümü (De Ley vd 1973), çözülebilir proteinlerin elektroforetogramlarının karşılaştırılması (Kersters ve De Ley 1975) DNA'nın enzimle kesilerek oluşan profillerin karşılaştırılması (Bouzar ve Moore 1987-b) gibi pek çok farklı teknik kullanılmıştır.

Patojenik *Rhizobium* strainlerinin PCR yöntemi ile tanı ve tespitine dair ilk çalışma, Nesme ve arkadaşları (Nesme vd 1990) tarafından gerçekleştirilmiştir. Nesme ve arkadaşları, *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin tespiti için *virB* ve *virG* operonlarının arasındaki intersistronik bölgeye ve *tmr* genine spesifik primer setleri dizayn etmişlerdir. Fakat intersistronik bölge primerlerinin bağlandığı diziler, sadece nopalin katabolize eden strainlerde bulunduğundan, bu primer çifti oktopin ve vitopin katabolize eden strainleri tespit etmekte yetersiz kalmıştır. Primer tasarımlarının strainden straine değişiklik gösterebilen IS bölgelerini içeren şekilde geliştirilmiş olması primerlerin güvenilirliğini azaltmaktadır. *tmr* genine spesifik tasarlanmış primerlerle ise hem oktopin hem de nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin tanısı gerçekleştirilebilmiştir. Ancak bu primer seti de vitopin katabolize eden strainleri tanılamakta yetersiz kalmaktadır.

Picard ve arkadaşları (Picard vd 1992), toprakta yaşamını sürdüren bakterileri tanılamak amacıyla hızlı, spesifik bir yöntem geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Topraktaki bakterileri lizise uğratılması ve ortaya çıkan DNA'nın izole edilerek tanıda kullanılması şeklinde özetlenebilecek yöntemin, tanılama basamağında PCR yöntemi kullanılmıştır. Sistemin test edilmesi için nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* C58 straini ve *Frankia* spp. strainleri ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmacıların, nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainini tanılamak için *vir* bölgesine göre tasarladıkları primer seti olumlu sonuç vermiş, PCR sonucunda *Rhizobium tumefaciens* örneğinde fragment gözlenirken *Frankia* strainlerinde amplifikasyona rastlanmamıştır. Dizayn edilen primer setinin, sadece nopalin katabolize eden tek bir *Rhizobium* strainine karşı dizayn edilmiş olması ve primer spesifikliğinin sadece *Frankia* strainlerine karşı denenmiş olması primer setinin tanı ve tespit yeteneği ile spesifikliğini sorgulatmaktadır.

Dong ve arkadaşları (Dong vd 1992), patojenik ve patojenik olmayan *Rhizobium* strainlerinin ayrımını PCR ile gerçekleştirmek için oksin sentaz genine özgün iki primer seti tasarlamışlardır. Tasarlanan primer setlerinden biri geniş konukçu aralığı olan

strainlere spesifik iken, diğeri konukçu aralığı dar olan strainleri tanılamak amacıyla tasarlanmıştır. Dar konukçu aralığı olan strainler için tasarlanan primer seti patojenik strainlerin tamamını tespit etmeyi başaramamıştır. Geniş konukçu aralığı olan strainler için tasarlanan primer seti de, tüm patojenik strainleri tespit edememiş ve bazı patojenik olmayan strainler ile yanlış pozitif sonuç vermiştir. Hem geniş hem de dar konukçu aralıklı *Rhizobium* strainlerinin tespiti için tasarlanan primerlerin, tüm patojenik strainleri tespit etmede başarılı olamaması, patojenik olmayan bazı strainler ile pozitif sonuç vermesi ve primer setlerinin farklı bakteri cinslerine karşı test edilmemiş olması primer setlerinin güvenilirliğini sorgulatmaktadır. Bunun yanında, sistemde patojenik strainlerin tanısını yapabilmek için iki farklı primer setinin birden kullanılması bir gereklilik olarak ifade edilmiştir.

Schulz ve arkadaşları (Schulz vd 1993), üç farklı primer seti kullanarak, oktopin, nopalin ve vitopin katabolize eden geniş ve dar konukçu aralıklı *Rhizobium vitis* strainlerinin ayrı ayrı tespit edebilmişlerdir. Ancak oktopin katabolize eden strainlerde, strainin konukçu aralığı farklılıklarına bağlı olarak farklı fragment profillerinin ortaya çıkması, bu strainlerin tanı ve teşhisinin spesifik tek bir fragmentle yapılabilmesini engellemektedir. Bunun yanında, primer tasarımlarının strainden straine değişiklik gösterebilen IS bölgelerini içeren şekilde tasarlanmış olması primerlerin güvenilirliğini azaltmaktadır. Tasarlanan primer setleri *Rhizobium* cinsindeki farklı türlere ve farklı bitki patojeni bakterilere karşı denenmemiş olması primer setlerinin sadece *Rhizobium vitis* strainlerine has olduğu iddiasını zayıflatmaktadır.

Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1995), hem Ti hem de Ri plazmitlerindeki *virC* operonuna uygun VCF/VCR adını verdikleri bir primer seti tasarlamışlardır. Sawada ve arkadaşları, test ettikleri farklı *Rhizobium* türlerine ait patojenik strainlerin tümünü tespit etmekte başarılı olamamıştır. Tasarlanan primer setinin spesifikliği farklı cinslerdeki bitki patojeni bakteriler ile test edilmemiştir. Sawada ve arkadaşlarının tasarladığı bu primer seti, tanılamamanın tür düzeyinde gerçekleştirilmesine olanak vermese de, uzun yıllar pek çok araştırmacı tarafından, cins düzeyinde patojenik *Rhizobium* strainlerinin tanı ve tespitinde kullanılmıştır.

Haas ve arkadaşları (Haas vd 1995), *Rhizobium rhizogenes*, nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* ve oktopin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* strainlerine ait *virD2* gen dizilerini kullanarak, patojenik *Rhizobium* türlerinin *virD2* ve *ipt* genlerine spesifik farklı primerler geliştirmişlerdir. *VirD2* genine spesifik tasarlanan primerler ileri yönlü VirD2A ile geri yönlü VirD2C' ve VirD2E' primerleridir. Tasarlanan VirD2A/VirD2C' primerleri beraber kullanıldıklarında, *Rhizobium tumefaciens* strainleri ile 224 bp'lik, VirD2A/VirD2E' primerleri kullanıldığında *Rhizobium tumefaciens* strainleri ile 338 bp'lik amplikonların oluştuğu saptanmıştır. Patojenik olmayan bir *Rhizobium radiobacter* straininin de, *VirD2* genine spesifik bu primer setleri ile pozitif sonuç vermesi düşündürücüdür. *ipt* genine spesifik tasarlanan CYT/CYT' primer setinin ise belirli bir türe veya belirli bir cinse spesifik olmaması, primer setinin tanı ve tespitinde kullanılabilirliğini sınırlamıştır. Ancak Haas ve arkadaşları tarafından tasarlanan ileri yönlü VirD2A primeri ile geri yönlü VirD2C' ve VirD2E' primerleri kendinden sonra gerçekleştirilen pek çok tanılama çalışmasında farklı kombinasyonlar halinde kullanılmıştır.

Eastwell ve arkadaşları (Eastwell vd 1995), *Rhizobium vitis* strainlerini tespit etmek için *virA*, *pehA* ve *6a* genlerine spesifik primer setleri dizayn etmişlerdir. Tasarlanan *pehA* genine özgün ampikon veren primer seti ile *Rhizobium vitis* strainlerinin tespiti başarılı olmuştur. Bu primer seti kromozomal bir gen olan *pehA* genine özgün olarak tasarlandığından, her ne kadar *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitinde başarılı olsa da patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin ayrımının gerçekleştirilmesinde yetersiz kalmaktadır. Tasarlanan primer setlerinin farklı türdeki bitki patojeni bakterilere karşı nasıl reaksiyon verdiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. *virA* genine özgün tasarlanan primer seti ile çalışmadaki tüm *Rhizobium vitis* strainleri tespit edilememiştir. *6a* genine özgün tasarlanan primer seti ile de hedeflenen *Rhizobium tumefaciens* tespiti gerçekleştirilememiştir.

Kaufmann ve arkadaşları (Kaufmann vd 1996), asmalarda patojenisitelerini test ettiği, oktopin katabolize eden bir *Rhizobium vitis* straininin, *6b* genine spesifik 4095/4906 primer setini geliştirmişlerdir. 4095/4906 primer setinin oktopin katabolize eden tek bir *Rhizobium vitis* strainine göre tasarlanıp, sadece bu strain üzerinde test edilmiş bir primer seti olması güvenilirliğini azaltmaktadır. Primer setinin farklı tipte opin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerine veya *Rhizobium* cinsindeki farklı türlere karşı nasıl reaksiyon verdiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır.

Herlache ve arkadaşları (Herlache vd 1997), *pehA* genine spesifik bir primer seti dizayn ederek, bu gene sahip *Rhizobium vitis* strainlerini PCR ile tanılamıştır. Tasarlanan primerler ile çalışmada kullanılan *Rhizobium vitis* strainleri tanılanabilmiştir. Lakin aynı primer seti ile *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Ralstonia solanacearum* strainlerinde bulunan homolog poligalakturonaz enzim dizilerini de amplifiye edilebildiğinden tasarlanan primerlerin *Rhizobium vitis* strainlerine spesifik olmadığı kaydedilmiştir.

Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002), *Rhizobium* strainlerini dört farklı primer seti kullanarak PCR ile tanılamışlardır. *Rhizobium tumefaciens* strainini tanılamakta, daha önce Sawada ve arkadaşları (Sawada vd 1995) tarafından tasarlanan VCF/VCR primer seti kullanılmış, bu primer setinin *Rhizobium tumefaciens* straini haricinde pozitif sonuç vermediği görülmüştür. Bu çalışmada bu primer seti tek bir *Rhizobium tumefaciens* strainine karşı test edilmiştir ve tür düzeyinde tanılamada olumlu sonuç alınmıştır. Ancak daha önce bu primer seti ile gerçekleştirilen çalışmalarda VCF/VCR primer seti ile ne cins ne de tür düzeyinde spesifik bir tanılama gerçekleştirilemeyeceği görülmüştür. Tasarlanan Ti plazmitinde yer alan *virE2* genine spesifik *virE2PF/virE2PR* primer seti *Rhizobium tumefaciens* straininde pozitif sonuç verirken, bu primer setinin vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinde pozitif sonuç vermediği görülmüştür. Bunun yanında *virE2PF/virE2PR* primer seti oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri ile pozitif sonuç vermiştir. *virE2PF/virE2PR* primer seti, hem *Rhizobium tumefaciens* hem de bazı *Rhizobium vitis* strainlerinde pozitif sonuç verdiğinden, bu primer seti ile tür düzeyinde spesifik bir tanılamamanın gerçekleştirilemeyeceği görülmüştür. Tasarlanan *pehA* genine spesifik PGF/PGR primer seti ile tüm patojenik olan ve patojenik olmayan tüm *Rhizobium vitis* strainleri tanılanabilmiştir, ancak tek başına patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin tanılanması mümkün olmamıştır. Tasarlanan primerlerin hiç biri farklı cins bitki patojeni bakterilere karşı test edilmemiştir. VisF/VisR primerleri ile sadece vitopin katabolize

eden *Rhizobium vitis* strainleri tanılabilmektedir. Tasarlanan PGF/PGR primer seti, *Rhizobium vitis* strainlerinin diğer *Rhizobium* türlerinden ayrımında, VisF/VisR primer seti ise vitoplin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tanımlanmasında pek çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır.

Suzaki ve arkadaşları (Suzaki vd 2004), *virC* operonuna spesifik VCF2/VCR2, VCF3/VCR3, VCF4/VCR4 ve VCF5/VCR5 primerlerini tasarlamışlardır. VCF3/VCR3 primer seti ile çalışmadaki tüm patojenik *Rhizobium* strainleri başarıyla tespit edebilmiştir. Diğer primer setleri de tasarımlarında esas alınan VCF/VCR (Sawada vd 1995) primer setinden daha başarılı bulunmuştur. Fakat VCF2/VCR2, VCF4/VCR4 ve VCF5/VCR5 primer setleri tüm patojenik strainlerin tespit edilmesinde başarılı olamamıştır. Tasarlanan primerler farklı cins bitki patojeni bakterilere karşı test edilmemiştir.

Kawaguchi ve arkadaşları (Kawaguchi vd 2005-b), Multipleks PCR yöntemi ile *Rhizobium* strainlerini tanımlamasına olanak veren 16S rDNA bölgesine ve *virC* genlerine uygun primer setleri geliştirmişlerdir. Ab3-F3/Ab3-R4 primer seti *Rhizobium vitis* strainlerinin de dahil olduğu bazı *Rhizobium* strainlerindeki 16S rDNA bölgesinin bir kısmını amplifiye etmektedir. Ab3-F3/Ab3-R4 primer seti her ne kadar *Rhizobium vitis* strainleri ile pozitif sonuç vermiş olsa da farklı *Rhizobium* türleri ile pozitif sonuç vermesi bu primer seti ile tür düzeyinde spesifik bir tanımlama gerçekleştirilemeyeceğini göstermiştir. Patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin seçiliminin Ab3-F3/Ab3-R4 ve VCF3/VCR3 (Suzaki vd 2004) primer setlerinin birlikte kullanımı ile meydana gelen iki farklı fragment ile mümkün olduğu görülmüştür. Fakat patojenik *Rhizobium vitis* strainleri tespiti, tek bir spesifik primer seti ile gerçekleştirilememiştir.

Szegedi ve arkadaşları (Szegedi vd 2005), *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin PCR ile tanımlanmasında, VCF/VCR (Sawada vd 1995) primerleri ve VisF/VisR (Szegedi ve Bottka 2002) primerlerinin yanında tasarladıkları oktopin katabolize eden *Rhizobium* strainlerindeki *6b* genine spesifik TF/TR, nopalin katabolize eden *Rhizobium* strainlerindeki *6b* genine spesifik NF/NR, *Rhizobium vitis* strainlerindeki tartarat dehidrogenaz genine spesifik ttuCfw/ttuCrev primerlerini kullanılmıştır. İzole edilen *Rhizobium* strainlerinin tamamı, VCF/VCR primer seti ile pozitif sonuç vermiş ve bu strainlerin *Rhizobium tumefaciens* straini olduğu belirlenmiştir. Ancak *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin bazılarının, *Rhizobium vitis* strainlerindeki tartarat dehidrogenaz genine spesifik ttuCfw/ttuCrev primerleri ile pozitif sonuç verdiği kaydedilmiştir. Bu durum *Rhizobium tumefaciens* strainleri için tipik olmayan bir durumdur ve primer setinin güvenilirliğini sorgulatmaktadır. NF/NR primer setinin, nopalin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium vitis* strainleri ile amplikon verdiği saptanmıştır. Tasarlanan TF/TR primer seti, oktopin katabolize eden *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium vitis* strainleri ile test edilmiş, ancak tüm oktopin katabolize eden strainleri tespit etmek mümkün olmamıştır. Ortaya konan sonuçlar, tasarlanan primerlerin hiçbirisi ile tür düzeyinde spesifik bir tanımlama gerçekleştirilemeyeceğini göstermiştir.

Pulawska ve Sobiczewski (Pulawska ve Sobiczewski 2005), toprak kökenli tümörjenik *Rhizobium* strainlerini tanımlamasını amaçlayan *tms2* genine spesifik tms2A, tms2B, tms2F1, tms2R2 primerlerini dizayn etmişlerdir. Dizayn edilen primerler

aralarında *Rhizobium* türlerinin de bulunduğu, farklı toprak kökenli patojenlere karşı, farklı kombinasyonlar ile denenmiş, ancak hiçbir kombinasyonda tür veya cins düzeyinde spesifik bir tanı ve tespit gerçekleştirilememiştir.

Pulawska ve arkadaşları (Pulawska vd 2006), *Rhizobium* türlerini PCR ile tanılamak amacıyla, 23S rDNA dizisine göre farklı primerler tasarlamışlardır. UF primeri, 23S rDNA dizisine spesifik ileri yönlü bir primer olarak tasarlanmış, tasarlanan diğer dört geri yönlü primer farklı bir *Rhizobium* türüne özgün olacak şekilde dizayn edilmiştir. B1R primeri *Rhizobium tumefaciens* strainlerine, B2R primeri *Rhizobium rhizogenes* strainlerine, AvR primeri *Rhizobium vitis* strainlerine, ArR primeri *Rhizobium rubi* strainine spesifik tasarlanmıştır. UF ileri yönlü primeri ile kullanılan B1R primeri ile çalışmada kullanılan tüm *Rhizobium tumefaciens* strainleri, AvR primeri ile tüm *Rhizobium vitis* strainleri, ArR primeri ile tüm *Rhizobium rubi* strainleri spesifik bir şekilde tespit edilebilmiş, tür düzeyinde tanı ve tespit gerçekleştirilebilmiştir. UF ileri yönlü primeri ile B2R primeri beraber kullanıldığında, bu primer kombinasyonunun farklı *Rhizobium* cinsleri ile de pozitif sonuç verebildiği belirlenmiştir. Bu yüzden UF/B2R primer kombinasyonu ile *Rhizobium rhizogenes* strainlerinin spesifik bir şekilde tanılanması mümkün görülmemiştir. Çalışmada kullanılan primer kombinasyonları ile patojenik *Rhizobium* türlerini ayırmak da mümkün olmamaktadır.

Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-b), Szegedi ve Bottka (Szegedi ve Bottka 2002) tarafından tasarlanan PGF/PGR primer seti ve tasarladıkları *virF* ve *virD2* genlerine özgün VirFF₁/VirFR₂ ve VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ primer setlerini kullanarak, çalışmalarındaki *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin çoğunluğunu tanılayabilmişlerdir. Bu üç primer seti ile tanılanamayan strainlerin tanısı için farklı genlere özgün farklı primer setleri geliştirilmiş ve geçmişte farklı araştırmacıların tasarladığı bazı primerler kullanarak bu strainlerin de tanısı ve tespiti sağlanmıştır. Çalışmada olumlu sonuç veren primer setleri VirD2A/VirD2C', VirD2A/VirD2F, VirFF₁/VirFR₂, VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆, PGF/PGR primer setleri olarak sıralanabilir. VirD2A/VirD2C' ve VirD2A/VirD2F primer setleri ile patojenik *Rhizobium* strainleri, VirFF₁/VirFR₂ primer seti ile oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium* strainleri, VirD2S4F₇₁₆/VirD2S4R₁₀₃₆ primer seti ile vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri tanılanmıştır. PGF/PGR primer seti ile *Rhizobium vitis* strainleri tanılanabilmıştır. OCTF/OCTR, NOPF/NOPR ve VisF/VisR primerleri ile *Rhizobium vitis* ve *Rhizobium tumefaciens* strainlerinin hangi tip opin sentezlediği belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada test edilen primer setlerinden hiçbirisi tek başına patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin tespitine olanak vermemiştir.

Lim ve arkadaşları (Lim vd 2009), *Rhizobium vitis* strainlerinin tanısı için SCAR primerler dizayn etmişlerdir. AVSP3-1F/AVSP3-1R ve AVSNP-3F/AVSNP-3R primer setleri, URP2R universal pirinç primeri kullanarak amplifiye edilen *Rhizobium vitis* strainlerine spesifik pAVS3 DNA fragmentinin gen dizisi esas alınarak dizayn edilmiştir. AVSP3-1F/AVSP3-1R ve AVSNP-3F/AVSNP-3R primer setlerinin *Rhizobium vitis* strainlerine spesifik olduğu saptanmıştır. Lakin söz konusu primer setleri sadece patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin tanılanmasına olanak vermemektedir.

Shams ve arkadaşları, (Shams vd 2013) *Rhizobium* strainlerini genomik varyete düzeyinde tanılamak amacıyla, her tür veya genomvarın *RecA* dizisine spesifik primerler dizayn etmişlerdir. *RecA* gen dizileri, PCR yöntemiyle dejenere F2898/F2899 primer seti (Costechareyre vd 2010) kullanılarak amplifiye edilmiş, amplikonlar dizi analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen dizilerden, *Rhizobiaceae* familyasına özgün F7386/F7387, *Rhizobium* cinsine F8360/F8361, *Rhizobium tumefaciens* genomik varyetelerine özgün F6782/F6786, F6790/F6786, F8232/F8227, F8533/F8827, F8232/F8228, F8392/F8229, F6788/F8413, F6784/F6786, F8359/F8230, F8232/F8231, F9033/F9034, *Rhizobium vitis* türüne özgün G0004/G0005, *Rhizobium rubi* türüne özgün G0009/G0001, *Rhizobium larrymoorei* türüne özgün F9186/F9187, *Rhizobium skierniewicense* türüne özgün F9190/G0008, *Rhizobium undicola* türüne özgün G0002/G0001 primer setleri tasarlanmış ve bu primer setleri ile strainlerin tespiti gerçekleştirilmiştir. *Rhizobium vitis* strainleri kendilerine spesifik tasarlanan G0004/G0005 primer seti ile tanılabilmelerine karşın, bu primer seti ile patojenik strainlerin ayrımı mümkün olmamaktadır.

Farklı araştırmacılar tarafından *Rhizobium vitis* strainlerini tanılamak amacıyla pek çok primer seti tasarlanmıştır (Schulz vd 1993, Haas vd 1995, Eastwell vd 1995, Sawada vd 1995, Kaufmann vd 1996, Herlache vd 1997, Szegedi ve Bottka 2002, Suzaki vd 2004, Kawaguchi vd 2005-b, Pulawska ve Sobiczewski 2005, Szegedi vd 2005, Pulawska vd 2006, Bini vd 2008-a, 2008-b, Lim vd 2009, Shams vd 2013). Tasarlanan bu primerler uzun yıllar pek çok farklı araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Cubero vd 1999, Argun vd 2002, Genov vd 2006, Kumagai ve Fabritius 2008, Palacio-Bielsa vd 2009, Slater vd 2009, Costechareyre vd 2010, Kawaguchi 2011, Tolba ve Zaki 2011, Campillo vd 2012, Hussam ve Katsunori 2012, Pulawska vd 2012-a, 2012-b, Pulawska ve Kałuzna 2012, Rouhrazi ve Rahimian 2012, Shams 2012, Chebil vd 2013).

Real-Time PCR yönteminin; kolaylık, tekrarlanabilirlik, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilme, direkt bitkisel materyallerden tespit yapılabilme, gibi özellikleri son yıllarda bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Real-Time PCR ile günümüze kadar farklı bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitleriyle ilgili pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (Schaad vd 1999, 2000, 2002 Weller vd 2000, Van Beckhoven vd 2002, Salm ve Geider 2004, Cubero ve Graham 2005, Berg vd 2006, Sayler vd 2006, Yılmaz ve Basım 2006, Basım ve Basım 2007, 2009, De Bellis vd 2007, Benlioğlu ve Özyılmaz 2007, Dreo vd 2007, Fanelli vd 2007, Lehman vd 2008, Luo vd 2008, Pirc vd 2008, 2009, Vandroemme vd 2008, Çaplık ve Basım 2009, Gudmestad vd 2009, Ha vd 2009, He vd 2009, Mohammadi vd 2009, Bozan ve Basım 2011, Cottyn vd 2011, Gottsberger 2011, Licciardello vd 2011, Öztürk ve Basım 2011, Johnson ve Walcott 2012, Gallelli vd 2014).

Taç Gali hastalığından arı sağlıklı üretim materyali eldesi ve Taç Gali hastalığı ile mücadelede erken dönemde yapılan doğru, güvenilir ve hassas tanı ve tespit büyük önem arz etmesine rağmen, Taç Gali hastalık etmeni *Rhizobium vitis*'in Real-Time PCR ile tanısına yönelik çalışmaların sayısı oldukça azdır. *Rhizobium vitis*'in Real-Time PCR ile tanısına dair gerçekleştirilen çalışmalar 2008 yılında Bini ve arkadaşları ve 2013 yılında Johnson ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmalarla sınırlıdır.

Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-a), patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinin tek başına tespiti için *virD2* geninin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonucunda oktopin ve nopalin katabolize eden strainlerdeki *virD2* gen dizisi ile vitopin katabolize eden strainlerdeki *virD2* gen dizisinin iki farklı dizi olduğu belirlenmiş ve bu dizilere spesifik iki farklı primer tasarlanmıştır. VIRD59F26/VIRD59R122 ve VIRD62F23/VIRD62R135 primer setleri ile Multipleks Real-Time PCR gerçekleştirilerek farklı tiplerde opin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerin beraber tanılamak mümkün olmuştur. Real-Time PCR ile tanılamada SYBR Green nükleik asit boyası kullanılmıştır. Strain ayrımı için klasik PCR yönteminde, OCTF/OCTR ve NOPF/NOPR (Bini vd 2008-b) primer setleri ile VisF/VisR (Szegedi ve Bottka 2002) primer seti kullanılmıştır. Her ne kadar VIRD59F26/VIRD59R122 ve VIRD62F23/VIRD62R135 primer setleri aynı PCR reaksiyonunda kombine edilerek Multipleks PCR gerçekleştirildiğinde, hem oktopin hem nopalin hem de vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tespit edilebildiği belirlenmiş olsa da bazı *Rhizobium tumefaciens* strainlerinden de bu primer setleri ile pozitif sonuç alınabildiği rapor edilmiştir.

Johnson ve arkadaşları (Johnson vd 2013), Real-Time PCR yöntemi ile patojenik *Rhizobium vitis* strainlerini tespit etmeye çalışmışlardır. Bini ve arkadaşları (Bini vd 2008-a) tarafından tasarlanan, vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerine ait *virD2* genine spesifik primer setlerinden elde edilen ampliconlar kullanılarak, *virD2-F/virD2-R* ve *virD2.For1/virD2.Rev1* primer setleri dizayn edilmiştir. Tasarlanan primerler ile çalışmada yer alan *Rhizobium vitis*, *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium rhizogenes* türlerine ait tüm patojenik *Rhizobium* strainleri tespit edilebilmiştir.

Bu çalışmada, asmada önemli kayıplara neden olan *Rhizobium vitis*'in, bakteriyel hücreden ve hastalıklı bitki dokularından LNA prob kullanılarak direkt tanı ve tespitini kısa sürede ve kesin olarak gerçekleştirmek amacıyla Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Türkiye'den izole edilen *Rhizobium vitis* strainlerin arasında vitopin katabolize eden strainlere rastlanamamıştır. Tasarlanan problar ve primer setlerini test etmek amacıyla, nopalin katabolize eden ICMP 10753 ve vitopin katabolize eden ICMP 18522 strainleri Yeni Zelanda menşeli "International Collection of Microorganisms from Plants" (ICMP) kültür koleksiyonundan tedarik edilip çalışmaya eklenmiştir. Fakat gerçekleştirilen Real-Time PCR analizleri neticesinde yurt dışından tedarik edilen ICMP 18522 straininin vitopin değil oktopin katabolize eden bir *Rhizobium vitis* straini olduğu tespit edilmiştir. İleriki süreçte vitopin katabolize eden strainleri elinde bulunduran diğer araştırmacılar vitopin katabolize eden strainin tedarik edilmesi için çaba sarf edilmiş, ancak strain yurt dışından getirilememiştir. Geliştirilen yöntem ile primer ve problar kullanılarak oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin tanı ve tespiti başarıyla gerçekleştirilmiştir. Vitopin katabolize eden strainlerin tanı ve tespitinde kullanılmak üzere tasarlanan primer ve problar ise vitopin katabolize eden strainin tedarik sürecinde yaşanan sorunlardan ötürü gerçekleştirilememiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan *Rhizobium vitis* strainlerinde kullanıldığında vitopin straini olmadıkları tespit edilmiştir.

Geliştirilen yöntem LNA prob mimarisine sahip olduğundan, diğer araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen Real-Time PCR protokollerinden çok daha hassas ve kesin sonuç vermektedir. Daha önce klasik PCR yöntemi ile oktopin straininin tanı ve tespitinde

amplifiye edilen bölge 475 bp, nopalın straininin tanı ve tespitinde amplifiye edilen bölge 394 bp uzunluğundadır. Real-Time PCR yönteminde ise amplifiye edilen bölgeler oktopin straini için 62 bp, nopalın straini için 78 bp uzunluğundadır. Vitopin katabolize eden strainleri tanılamak için tasarlanan primerlerin amplifiye ettiği bölgeler ise 60-66 bp arasında değişmektedir (Çizelge 3.6). Amplifiye edilmesi hedeflenen bölgelerin kısa olması polimerizasyon reaksiyonu esnasında tespit için gerekli DNA amplifikasyonunun daha kısa sürede gerçekleşmesini sağlamak ve belirlenen PCR protokollerinde döngülerin daha kısa sürelerde tamamlanmasına olanak vermektedir. *Rhizobium vitis*'in tanı ve tespitinde kullanılan 42 döngülük klasik PCR yöntemi 170 dakikada tamamlanırken 37 döngülük Real-Time PCR yöntemi 33 dakikada tamamlanmaktadır. Ayrıca Real-Time PCR sistemi PCR prosesinin bir bilgisayar aracılığı ile gerçek zamanlı olarak kontrol edilebilmesine ve işlemin istenildiğinde sonlandırılmasına olanak verdiğinden, sonuç döngülerin tamamlanmasından önce elde edilebilmektedir. Bu araştırmada gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde Real-Time PCR ile *Rhizobium vitis*'in yaklaşık 20-25 dakikada tanılabildiği görülmüştür.

Klasik PCR yönteminde tespitin gerçekleştirilmesi için ortamda bulunması gereken bakteri yoğunluğu genellikle 5×10^2 ve 1×10^4 cfu/ml arasında değiştiği rapor edilmiştir (Haas vd 1995, Cubero vd 1999, Lim vd 2009). Real-Time PCR yönteminde bakteri yoğunluğu oktopin ve nopalın katabolize eden strainler için 1 bakteri hücresi olarak tespit edilmiştir. Yöntemin hassasiyetinin bu denli yüksek olması hastalığın belirti göstermeyen asma baz materyallerinde ve hastalığın erken dönemlerinde tespitine olanak vermektedir. Bu da patojenin daha erken dönemde teşhisi ve daha erken mücadele yöntemlerinin uygulanması bakımından önem taşımaktadır.

Real-Time PCR yöntemi ile ölü bakteri tespiti de mümkün olabildiğinden bu çalışmada Real-Time Bio-PCR yöntemi kullanılarak sadece canlı bakteri tespitinin yapılması sağlanmış, hastalık etmeninin tespiti hakkında daha güvenilir sonuçların elde edilebilmesine olanak sağlanmıştır.

Bunun yanında Real-Time PCR *Rhizobium vitis*'in tespiti hem direkt hastalıklı asma dokusundan hem de asma özsuyundan başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Direkt tespitin gerçekleştirilebilmiş olması geliştirilen yöntemin bitki içinde polimerizasyon reaksiyonunu inhibe edebilecek bileşenlere karşı hassasiyet göstermediğinin bir ifadesidir. Direkt bitki dokusundan tanı ve tespit imkanı Real-Time PCR işleminin sağlıklı sonuç vermesi için bakteriyel izolasyonun yapılması gerekliliğini ortadan kaldırmakta, sistemin uygulanabilirliğini ve hızını büyük ölçüde arttırmaktadır. Direkt bitki dokusunun geliştirilen sistemde kullanılabilmesi, taşınabilir Real-Time PCR cihazları ile tanı ve tespit çalışmaların direkt arazide veya laboratuvardan uzak lokasyonlarda gerçekleştirilmesinin önünü açmaktadır.

6. SONUÇ

Günümüzde mevcut tarım alanlarının sınırlarının zorlanmış olması ve tarımsal arazilerin miktarının arttırılmasının neredeyse imkansızlaşması, bilim çevrelerini harekete geçirmiş ve insanlığı birim alandan daha fazla ürün elde etme yoluna götürmüştür. Tarıma elverişli toprakların azalması, kullanılabilir su kaynaklarının çevre kirliliği ile özelliğini yitirmesi, artan Dünya ve ülke nüfusu ile birlikte değerlendirildiğinde, sürdürülebilir nitelikte, sağlıklı, güvenli ve yeterli gıda üretimiyle gıda güvenliği kaliteli bir yaşam ortamı oluşturmak önümüzdeki yıllarda kritik önem arz edecektir. Dünya’da son 30 yılda oluşan bilimsel ve teknolojik gelişmeler, özellikle verimlilikte önemli artışlara neden olmuştur. Türkiye’ de toplam bitkisel üretim yılda 90 ile 100 milyon ton seviyelerinde gerçekleşmektedir. Artık olağan dışı faktörler haricinde bu seviyelerin değişmesi beklenmemektedir.

Anadolu coğrafyası üzüm yetiştiriciliği bakımından Dünya için büyük öneme sahiptir. Yer kürenin bağcılık için en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan Türkiye, asmanın gen merkezi dahilinde olmasının yanı sıra, son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne sahiptir. Bağcılığın esas ürünü olan üzüm oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Türkiye’deki toplam meyve üretiminin büyük bir kısmını oluşturan üzüm kurutmalık ve sofralık olarak değerlendirilmekte, bir kısmının da şarap pekmez, sucuk, pestil ve sirke gibi ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Türkiye bağcılığı içe dönük bir yapıya sahiptir. Gerçekleştirilen üretimin büyük bölümü yurt içinde tüketilmekte, ancak küçük bir kısmı ihracata konu olmaktadır. İhracata konu olan kısmın büyük bir bölümü kuru üzüme aittir. Türkiye kuru üzüm üretiminde ve ihracatında Dünya’da ilk sırayı almaktadır.

Ülkemizde çok yıllık bahçe bitkileri tarımına ayrılan alanların önemli bir kısmı bağ alanlarıdır. Türkiye’de Doğu Anadolu’nun yüksek kesimleri ile Doğu Karadeniz sahil şeridi dışında kalan tüm bölgelerinde bağcılık yapılabilmektedir. Ülkemizde hem bağ üretim alanı, hem de üretim miktarı yönünden Ege Bölgesi birinci sırada gelmektedir. Bağ alanı ve üretim açısından ikinci sırada gelen Akdeniz Bölgesi’nin, sahil kuşağı erkenci, yayla kesimleri ise orta ya da geç mevsimde olgunlaşan üzüm çeşitlerinin yetiştiriciliği için elverişli koşullara sahiptir. Yüksek adaptasyon kabiliyetine sahip bir bitki olan asmanın özellikle diğer tarım ürünlerinin yetiştiriciliğine uygun olmayan iklim ve toprak koşullarına sahip alanların değerlendirilmesine olanak sağlaması bağcılığın önemini arttırmaktadır. Bağcılığın yılın hemen hemen her ayında yoğun iş gücü gerektiren bir faaliyet olması ve ülkemizde önemli bir konu olan istihdama bir ölçüde katkıda bulunması açısından da ayrı bir öneme sahiptir.

Dünya’da olduğu gibi Türkiye’de de son 50 yılda bağ alanlarındaki değişim incelendiğinde bağ alanlarında önemli bir azalma olduğu görülmektedir. Dünya bağ alanlarındaki azalışa rağmen üretimdeki artışı, yeni bağcılık sistemine, biyoteknoloji ve verimdeki artışa bağlanmaktadır. Türkiye’de bu artışın yeterli düzeyde olmamasının en önemli sebeplerinden biri hastalık ve zararlıların Türkiye’de verdiği zararlar gösterilebilir. Dünya’da oldukça geniş bir alanda kültürü yapılan asma, pek çok patojene karşı hassastır. Bağlarda, Taç Gali hastalığı tüm Dünya’da ve ülkemizde bağcılığı tehdit etmektedir. Söz konusu hastalıklar ile mücadelede erken uyarı, entegre ve biyolojik mücadele sistemleri yaygın ve etkin hale getirilemediği için veya yetersiz mücadeleden

dolayı, özellikle iklim koşullarının hastalık gelişmesi için uygun, ancak kontrolü için elverişsiz olduğu hallerde önemli ürün ve gelişme kayıpları meydana gelmektedir

Bağlarda meydana gelen hastalıklardan en önemlilerinden biri Taç Gali hastalığıdır. Taç Gali hastalığı, Dünya çapında üzüm yetiştiriciliği yapılan bölgelerin hemen hemen tamamında karşılaşılan, ekonomik açıdan en yıkıcı hastalıklardan biridir. Bağlarda Taç Gali hastalığına neden olan bakteriyel hastalık etmeni *Rhizobium vitis*'tir. Hastalık, asmanın üst aksamında tümörler ve asma köklerinde nekrotik dokular ile kendini gösterir. *Rhizobium vitis*, asmada odun boruları ile üst aksamlara taşınmakta ve çeşitli faktörler ile yaralanmış bitki üst aksamındaki hasarlı dokularda tümör oluşturmaktadır. Taç Gali hastalık etmenlerine karşı etkili bir mücadele yönteminin olmamasından dolayı, iklim koşullarının hastalık gelişimi için uygun olduğu bölgelerde, *Rhizobium vitis* önemli verim ve gelişme kayıplarına neden olmaktadır. Taç Gali hastalığı halen yürürlükte olan, İç Karantinaya Tabi Bitki Hastalık ve Zararlıları Hakkında Tebliğine göre ülkemizde iç karantinaya tabi hastalıklardan biridir. *Rhizobium vitis*'in asmalarda da sistemik olarak zarar yapması ve hastalıkla bulaşık vejetatif çoğaltma materyali kullanımı ile hızlı olarak yayılabilmesi, asma gibi ticari olarak tümüyle aşı yoluyla çoğalan bitkilerde bu patojenin yol açtığı verim ve kalite kayıplarının boyutunu aynı hızla artırmaktadır. Bu durum bağcılığın önemli bir kolu olan fidancılık için önemli bir tehlike arz etmektedir. Çünkü hastalık etmeni belirti vermeden üretim materyalleri vasıtası ile geniş alanlara yayılabilmekte ve erken dönemde fidanlıkarda oluşabilecek ırlar fidan ölümlerine sebep olabilmektedir. Taç Gali ile enfekteli çoğaltma materyali ile tesis edilecek bir bağ ileri dönemlerde yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalabilmektedir. Asma ölümlerinden veya tesis edilmiş bir bağın bu nedenle elden çıkmasından dolayı oluşacak maddi kayıp göz önüne alındığında hastalıktan arı materyal kullanımının ne kadar büyük bir önem arz ettiği daha iyi anlaşılabilir. Ancak Taç Gali hastalığından korunmada sadece temiz üretim materyali kullanımının yeterli olmadığı da aşıkardır. Çünkü hastalık etmeni *Rhizobium vitis*, hastalıklı asma artıklarında ve hatta diğer bitki artıklarında dahi canlılığını uzun yıllar sürdürebilmektedir.

Bakteriyel patojenlerin tanı ve tespitinde geçmişten günümüze kadar kullanılagelmiş pek çok farklı yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden başlıcaları hastalıklı bitki materyallerinden besi ortamlarına izolasyon, fiderde belirti izleme yöntemi, test bitkilerine inokülasyon yöntemi, bakteriyofaj yöntemi, serolojik yöntemler, biyokimyasal yöntemler, protein elektroforezi, mikroorganizmaların yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi, mikroskopi ve genetik farklılıkların esas alındığı modern biyoteknolojik yöntemlerinden olan nükleik asit hibridizasyonu, AFLP, RFLP, sekanslama, PFGE, klasik PCR ve Real-Time PCR yöntemleri olarak sıralanabilir. Günümüzde nükleik asit temelli yöntemler diğer yöntemlerle göre oldukça hızlı ve güvenilir olmasından ötürü daha fazla tercih edilmektedir. PCR, patojenlerin tanı ve tespitinde yeni bir çığır açmış, hedef DNA parçacığını çoğaltarak, bir patojenin varlığı yokluğu çok daha kısa sürelerde tespit edilebilir hale gelmiştir. PCR'da sıcaklık döngülerini oluşturmak için kullanılan termal döngü cihazlarının hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-Time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real-Time PCR'da oluşan amplikonların miktarı reaksiyon esnasında eş zamanlı olarak takip edilebilmektedir. Bu sayede artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek ve PCR esnasında eş zamanlı olarak reaksiyonun gidişine müdahalede bulunmak mümkün hale gelmiştir. Real-Time PCR sisteminde,

amplikonların agaroz jel elektroforezi ile ayrılması, DNA fragmentlerinin ultraviyole ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-Time PCR, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitki dokularından tanı ve tespitin gerçekleştirilmesine olanak vermesi ile öne çıkmaktadır. Real-Time PCR analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalar veya belirli bir diziye spesifik problar kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan en gelişmiş prob sistemlerinden biri spesifik bağlanmalar için en uygun prob konformasyonunu sağlayan ve probun spesifik diziye afinitesini maksimize eden LNA prob sistemidir. LNA problara ait diziler, Real-Time PCR ile yapılan diğer çalışmalarda kullanılan problemlerin dizilerinden uzunluk olarak daha kısa tasarlanabildiğinden prob dizisinin kendi içinde bağlanması olasılığı ortadan kalkmakta ve reaksiyonun daha kısa sürede sonuçlanması mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada, asmada hastalık oluşturan bakteriyel patojenlerden *Rhizobium vitis* ele alınmış, patojenin hızlı tanı ve tespiti için etkili, hassas ve kesin sonuç elde edilebilen moleküler bazlı bir yöntem geliştirilmiştir. Real-Time PCR yöntemin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitki dokularından tespit yapılabilmesi, bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamıştır. Bu çalışma ile Real-Time PCR yönteminin önemi ve hassaslığı bir kez daha ortaya konulmuştur.

Patojenik *Rhizobium vitis* strainlerinde bulunan, oktopin sentaz, nopalin sentaz, vitopin sentaz, *virD2* ve *iaaM* gen bölgelerine ait diziler kullanılarak primer setleri ve bu setlere uygun problemler tasarlanmıştır. Tasarlanan primer setleri ve problemler kullanılarak oktopin ve nopalin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri Real-Time PCR yöntemi ile tanılanmıştır. Türkiye’den izole edilmiş *Rhizobium vitis* strainlerinin tamamının oktopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainleri olduğu saptanmıştır. Vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* straini temin edilemediğinden vitopin katabolize eden strainlerin tanı ve tespitinde kullanılmak üzere tasarlanan primer setleri ve problemler ile tespit gerçekleştirilememiştir. Tanı ve tespitlerde uygulanan PCR protokolleri optimize edilerek analizin yaklaşık 20 ila 25 dakika içinde sonuçlanabilir niteliğe kavuşması sağlanmıştır. Termal erime eğrileri ile primer setleri ve problemler ile gerçekleştirilen amplifikasyonların tek bir diziye spesifik olduğu gösterilmiştir. Geliştirilen primer setleri ve problemler farklı bakteri türleri ve farklı *Rhizobium* türlerine karşı test edilerek oluşturdukları reaksiyonların sadece *Rhizobium vitis* türlerinin oktopin ve nopalin katabolize eden strainlere has olduğu belirlenmiştir. Tasarlanan primer ve problemlerin saf bakteri DNA’sından ve direkt bakteri hücrelerinden hassasiyet limitleri tespit edilmiş, 1 bakteri hücresinin dahi tespit edilebildiği gösterilmiştir. Real-Time Bio-PCR yöntemi ile sadece canlı bakterilerin yöntem ile tek başına tespit edilebildiği saptanmıştır.

Bu çalışmada geliştirilen primer setleri ve problemler ile Real-Time PCR yöntemi, *Rhizobium vitis*’in kesin ve güvenilir tanı çalışmalarına önemli katkı sağlanmıştır. Tanı ve tespitin Real-Time PCR sistemi ile oluşturulmuş olması hastalığa dair tanı ve tespitlerin arazide gerçekleştirilmesine olanak vermekte ve sistemin ziraat gibi uygulamalı bir bilim dalındaki kullanılabilirliğini ve çok yönlülüğünü büyük ölçüde arttırmaktadır.

Geliştirilen yöntemin yaygınlaştırılması sonucunda kısa sürede *Rhizobium vitis* ile bulaşık üretim materyallerinin tespiti mümkün olabilecek, fidan üretiminde ve sonuçta bitkisel üretimde temiz üretim materyali kullanımı sağlanarak Taç Gali hastalık etmeninin oluşturacağı kayıpların önüne geçilmesine büyük katkı sağlanacaktır. *Rhizobium vitis* karantinaya tabi bir hastalık etmeni olduğu için yurtdışından gelen üretim materyallerinin kısa ve etkili olan LNA prob kullanılarak Real-Time PCR yöntemiyle kısa bir sürede bitkilerin taranması önem arz etmektedir. Bu sayede ülkemizde bulunmadığı belirlenen nopalin ve vitopin katabolize eden *Rhizobium vitis* strainlerinin, ülkemize üretim materyali ile girişi önlenebilecektir. *Rhizobium vitis* strainlerinin hastalıklı dokularından alınan örneklerden tespitinin kolay aynı zamanda pratik bir şekilde gerçekleştirilebilmesi sağlanmış olması hastalığın tanı ve tespiti kadar epidemiyolojisinin saptanmasında da önem arz etmektedir.

Taç Gali, asmalarda görülen en tehlikeli hastalıklardan biridir ve üretimi büyük ölçüde sınırlamaktadır. Bu çalışmada, *Rhizobium vitis*'in hızlı ve güvenilir tanısını gerçekleştirebilmek için primer ve prob geliştirilmiş ve Taç Gali hastalık etmenini hastalıklı dokulardan ve baz materyallerinden kesin ve güvenilir tespiti sağlanmıştır. Bu çalışma ayrıca kantitatif olarak asma baz materyallerinin *Rhizobium vitis*'in oktopin ve nopalin strainlerinin belirlenmesi ile ilgili ilk çalışmadır. Bu çalışmada uygulanan kantitatif Real-Time PCR işlemi ile oluşturulan regresyon eğrileri (Şekil 4.16, Şekil 4.17) sayesinde oktopin ve nopalin strainleri ile asma baz materyallerinin bulaşıklılık oranlarını ortaya çıkarılabilme olanağı da sağlanmıştır. Bu sayede Taç Gali'nin oluşturacağı zarar en aza indirgenebilecek ve bu konuda daha genişletilmiş araştırmaların ortaya çıkmasına katkı sağlanabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- ABE, M., KAWAMURA, R., HIGASHI, S., MORI, S., SHIBATA, M. and UCHIUMI, T. 1998. Transfer of the symbiotic plasmid from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44 (1): 65-74.
- ABUODEH, R.O., ORBACH, M.J., MANDEL, M.A., DAS, A. and GALGIANI, J.N. 2000. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Infect. Dis.*, 181 (6): 2106-2110.
- AĞAOĞLU, Y.S. 1986. Bağcılık. Türkiye İş Bankası Yayınları, Ankara, 23 s.
- AĞAOĞLU, Y.S., ÇELİK, H., ÇELİK, M., FİDAN, Y., GÜLŞEN, Y., GÜNAY, A., HALLORAN, N., KÖKSAL, İ. ve YANMAZ, R. 1997. Genel Bahçe Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları, Ankara, 369 s.
- AĞAOĞLU, Y.S., SÖYLEMEZOĞLU, G., MARASALI, B., ÇALIŞKAN, M., ERGÜL, A. ve TÜRKBEN, C. 1998. Bazı yerli ve yabancı kökenli üzüm çeşitlerinin poliakrilamid jel elektroforez tekniği ile tane kökenli izoenzimlerden yararlanılarak ayrımları. Türkiye IV. Bağcılık Sempozyumu, ss. 145-151, 20-23 Ekim, Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- AKIYOSHI, D.E., KLEE, H., AMASINO, R.M., NESTER, E.W. and GORDON, M.P. 1984. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (19): 5994-5998.
- AKTAŞ, E. ve TAN, S. 2007. Tarım politikasındaki değişiklikler ve bağcılık: Çanakkale ili örneği. 2. Troas Bölgesi Değerleri Sempozyumu, ss. 199-211, 31 Ağustos - 02 Eylül, İntepe Belediyesi/Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.
- ALONI, R. 1995. The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In: P.J. Davies (Editor), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Springer, pp. 531-546, Dordrecht.
- ALARCON, B., LOPEZ, M.M., CAMBRA, M. and ORTIZ, J. 1987. Comparative study of *Agrobacterium* biotypes 1, 2 and 3 by electrophoresis and serological methods. *J. Appl. Bacteriol.*, 62 (4): 295-308.
- ALBIACH, M.R. and LOPEZ, M.M. 1992. Plasmid heterogeneity in Spanish isolates of *Agrobacterium tumefaciens* from thirteen different hosts. *Appl. Environ. Microb.*, 58 (8): 2683-2687.
- ALEXANDROVA, M., BAZZI, C. and HOLST, O. 2000. Protective effect of bacterial lipopolisaccharides in the grapevine-*Agrobacterium vitis* interaction. *Vitis*, 39 (2): 67-70.
- ALIMI, M., RAHIMIAN, H., HASSANZADEH, N., DARZI, M.T., AHMADIKHAH, A., HEYDARI, A. and BALESTRA, G.M. 2011. First detection of *Pseudomonas viridiflava*, the causal agent of blossom blight in apple by using specific designed primers. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5 (26): 4708-4713.
- ALLARDET-SERVENT, A., MICHAUX-CHARACHON, S., JUMAS-BILAK, E., KARAYAN, L. and RAMUZ, M. 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J. Bacteriol.*, 175 (24): 7869-7874.
- ALLEWELDT, G. and POSSINGHAM, J.V. 1988. Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 75 (5): 669-673.

- ANDERSON, A.R. and MOORE, L.W. 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 69 (4): 320-323.
- ANKENBAUER, R.G. and NESTER, E.W. 1990. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. *J. Bacteriol.*, 172 (11): 6442-6446.
- ANONİM, 2008. Kök Kanseri *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn Zirai Mücadele Teknik Talimatı Cilt IV. Başak Matbaası, Ankara, 388 s.
- ANONİM, 2010. <http://www.oiv.int> (Son erişim tarihi: 18.07.2012)
- ANONİM, 2011. <http://www.tagem.gov.tr> (Son erişim tarihi: 13.11.2012)
- ANONİM, 2012-a. <http://www.tarimyayin.gov.tr> (Son erişim tarihi: 03.09.2012)
- ANONİM, 2012-b. <http://faostat.fao.org> (Son erişim tarihi: 23.07.2014)
- ANONİM, 2012-c. <http://www.tzob.org.tr> (Son erişim tarihi: 07.10.2012)
- ANONİM, 2013. <http://www.tuik.gov.tr> (Son erişim tarihi: 17.06.2014)
- ANONİM, 2014-a. <http://en.wikipedia.org> (Son erişim tarihi: 17.06.2014)
- ANONİM, 2014-b. <http://www.exiqon.com> (Son erişim tarihi: 21.07.2014)
- ANONİM, 2014-c. <http://www.uniprot.org> (Son erişim tarihi: 02.08.2014)
- ANONİM, 2014-d. <http://www.theplantlist.org> (Son erişim tarihi: 17.08.2014)
- ANONİM, 2014-e. <http://www.hrp.org.uk> (Son erişim tarihi: 12.09.2014)
- ANONİM, 2014-f. <http://ndb.nal.usda.gov> (Son erişim tarihi: 15.09.2014)
- ANONİM, 2014-g. <http://chartsbin.com> (Son erişim tarihi: 28.09.2014)
- ANONİM, 2014-h. <http://www.resmigazete.gov.tr> (Son erişim tarihi: 17.06.2014)
- ANONİM, 2014-i. <http://www.genres.de> (Son erişim tarihi: 03.10.2014)
- ANONİM, 2014-j. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Son erişim tarihi: 08.10.2014)
- ANONİM, 2014-k. <http://www.newbioproducts.net> (Son erişim tarihi: 19.10.2014)
- ANONİM, 2014-l. <http://www6.appliedbiosystems.com> (Son erişim tarihi: 22.11.2014)
- ANONİM, 2014-m. Manisa Bağcılık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, İşletme iş akış şeması.
- ARGUN, N. 2001. Orta Anadolu bağlarında Taç Uruna neden olan *Agrobacterium vitis*'in bölgesel dağılımı ve bazı biyolojik özellikleri üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 84 s.
- ARGUN, N., MOMOL, M.T., MADEN, S., MOMOL, E.A., REID, C.L., CELİK, H. and BURR, T.J. 2002. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in the Central Anatolia region. *Plant Dis.*, 86 (2): 162-166.
- ARK, P.A. and SCHROTH, M.N. 1958. Use of slices of carrot and other fleshy root to detect crown gall bacteria in soil. *Plant Dis. Rep.*, 43: 1279-1281.
- ARROYO-GARCIA, R. et al. 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Mol. Ecol.*, 15 (12): 3707-3714.
- BAER, D., MITZEL, E., PASCHE, J. and GUDMESTAD, N.C. 2001. PCR Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*-infected tuber samples in a plate capture assay. *Amer. J. Potato Res.*, 78: 269-277.
- BALDWIN, I.L. and FRED, E.B. 1927. The fermentation characters of the root nodule bacteria of the Leguminosae. *Soil Sci.*, 24 (3): 217.
- BARKER, R., IDLER, K.B., THOMPSON, D.V. and KEMP, J.D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi 15955. *Plant Mol. Biol.*, 2 (6): 335-350.

- BARRY, G.F., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. and BRAND, L. 1984. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (15): 4776-4780.
- BASIM, H. ve BASIM, E. 2007. TaqMan Real-Time PCR ile *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*’nun tanısı ve tespiti. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, ss. 104, 27-29 Ağustos, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- BASIM, E. ve BASIM, H. 2009. Batı Akdeniz Bölgesi’ndeki bağ alanlarında Pierce Hastalığı etmeni *Xylella fastidiosa*’nın tanısı, tespiti ve moleküler karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, ss. 156, 15-18 Temmuz, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- BAZZI, C., PIAZZA, C. and BURR, T.J. 1987. Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings. *EPPO Bulletin*, 17 (1): 105-112.
- BAZZI, C., ALEXANDROVA, M., STEFANI, E., ANACLERIO, F. and BURR, T.J. 1999. Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic *Agrobacterium. Vitis*, 38 (1): 31-35.
- BEAULIEU, C., COULOMBE, L.J., GRANGER, R.L., MIKI, B., BEAUCHAMP, C., ROSSIGNOL, G. and DION, P. 1983. Characterization of opine-utilizing bacteria isolated from Quebec. *Phytoprotection*, 64 (2): 61-68.
- BEIJERINCK, M.W. and Van DELDEN, A. 1902 Über die assimilation des freien stickstoffs durch bakterien. *Zentr. Bakt. Parasitenk.*, 9: 3-43.
- BELL, C.R., DICKEY, G.A. and CHAN, J.W.Y.F. 1995. Variable response of bacteria isolated from grapevine xylem to control grape crown gall disease in planta. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46 (4): 499-508.
- BENLİOĞLU, K. ve ÖZAKMAN, M. 1998. Bağ üretim materyalinde Kök Uru etmeni *Agrobacterium tumefaciens*’in saptanması. *Turk. J. Agric. For.*, 22: 167-174.
- BENLİOĞLU, K. ve ÖZYILMAZ, Ü. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in moleküler beacon probe ve fluoresan PCR testi ile saptanması. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, ss. 103, 27-29 Ağustos, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- BERG, T., TESORIERO, L. and HAILSTONES, L.D. 2006. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Lett. Appl. Microbiol.*, 42 (6): 624-630.
- BERGER, B.R. and CHRISTIE, P.J. 1993. The *Agrobacterium tumefaciens virB4* gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *J. Bacteriol.*, 175 (6): 1723-1734.
- BERGER, B.R. and CHRISTIE, P.J. 1994. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J. Bacteriol.*, 176 (12): 3646-3660.
- BIAN, S.T., YABUKI, J., MATSUMOTO, S., KAGEYAMA, K. and FUKUI, H. 2003. PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.*, 69 (4): 258-266.
- BIEN, E., LORENZ, D., EICHHORN, K. and PLAPP, R. 1990. Isolation and characterization of *Agrobacterium tumefaciens* from the German vine region Rheinpfalz. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz.*, 97 (3): 313-322.
- BINI, F., GEIDER, K. and BAZZI, C. 2008-a. Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel *virD2* gene-specific primers that discriminate two subgroups. *Eur. J. Plant Pathol.*, 122 (3): 403-411.

- BINI, F., KUCZMOG, A., PUTNOKY, P., OTTEN, L., BAZZI, C., BURR, T.J. and SZEGEDI, E. 2008-b. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis*, 47 (3): 181-189.
- BINNS, A.N. 2008. Brief history of research on *Agrobacterium tumefaciens*: 1900-1980s. In: T. Tzfira, V. Citovsky (Editors), *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Springer, pp. 523-563, New York.
- BINNS, A.N., BEAUPRE, C.E. and DALE, M. 1995. Inhibition of VirB-mediated transfer of diverse substrate from *Agrobacterium tumefaciens* by the IncQ plasmid RSF1010. *J. Bacteriol.*, 177 (17): 4890-4899.
- BINNS, A.N. and THOMASHOW, M.F. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annu. Rev. Microbiol.*, 42: 575-606.
- BIONDI, E., BINI, F., ANACLERIO, F. and BAZZI, C. 2009. Effect of bioagents and resistance inducers on grapevine crown gall. *Phytopathol. Mediterr.*, 48 (3): 379-384.
- BISHOP, A.L., BURR, T.J., MITTAK, V.L. and KATZ, B.H. 1989. A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilization for indexing grapevine propagation material. *Phytopathology*, 79 (9): 995-998.
- BISHOP, A.L., KATZ, B.H. and BURR, T.J. 1988. Infection of grapevines by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. *Phytopathology*, 78 (7): 945-948.
- BLUMENTHAL, F. and HIRSCHFELD, H. 1919 Untersuchungen über bösartige geschwülste bei pflanzen und ihre erreger. *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 16 (1): 51-58.
- BLUMENTHAL, F., AULER, H. and MEYER, P. 1924. Über das vorkommen neoplastischer bakterien in menschlichen krebsgeschwülsten. *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 21 (5): 387-410.
- BOMHOFF, G, KLAPWIJK, P.M., KESTER, H.C.M., SCHILPEROORT, R.A., HERNALSTEENS, J.P. and SCHELL, J. 1976. Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.*, 145 (2): 177-181.
- BOUZAR, H. 1994. Request for a judicial opinion concerning the type species of *Agrobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 (2): 373-374.
- BOUZAR, H., CHILTON, W.S., NESME, X., DESSAUX, Y., VAUDEQUIN, V., PETIT, A., JONES, J.B. and HODGE, N.C. 1995. A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (1): 65-73.
- BOUZAR, H. and JONES, J.B. 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 (3): 1023-1026.
- BOUZAR, H. and MOORE L.W. 1987-a. Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass prairie. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (4): 717-721.
- BOUZAR, H. and MOORE L.W. 1987-b. Complementary methodologies to identify specific *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, (11): 2660-2665.
- BOUZAR, H., MOORE, L.W. and SCHAAD, N.W. 1986. Serological relationship between 50 S ribosomal subunits from strains of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Phytopathology*, 76 (11): 1265-1269.
- BOUZAR, H., DAOUZLI, N., KRIMI, Z., ALIM, A. and KHEMICI, E. 1991. Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium*

- tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agron, J.*, 11 (10): 901-908.
- BOUZAR, H., JONES J.B. and HODGE, N.C. 1993-a. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology*, 83 (7): 733-739.
- BOUZAR, H., OUADAH, D., KRIMI, Z., JONES, J.B., TROVATO, M., PETIT A. and DESSAUX, Y. 1993-b. Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (5): 1310-1317.
- BOZAN, G. ve BASIM, H. 2011. Kantitatif Real-Time PCR ile Ateş Yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora*'nın tespiti ve tanısı. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, ss. 58, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş.
- BRAUN, A.C. 1943. Studies on tumor inception in the crown-gall disease. *Am. J. Bot.*, 30 (9): 674-677.
- BRAUN, A.C. 1947. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown-gall. *Am. J. Bot.*, 34 (4): 234-240.
- BRAUN, A.C. and WHITE, P.R. 1943. Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown-gall tumors. *Phytopathology*, 33: 85-100.
- BRAVO-ANGEL, A.M., HOHN, B. and TINLAND, B. 1998. The omega sequence of VirD2 is important but not essential for efficient transfer of the T-DNA by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 11 (1): 57-63.
- BRISBANE, P.G. and KERR A. 1983. Selective media for the three biovars of *Agrobacterium*. *J. Appl. Bacteriol.*, 54 (3): 425-431.
- BRISSET, M.N., RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., BURR, T.J. and COLLMER, A. 1991. Attachment, chemotaxis, and multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 and biovar 3 on grapevine and pea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (11): 3178-3182.
- BRITTON, M.T., ESCOBAR, M.A. and DANDEKAR, A.M. 2008. The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. In: T. Tzfira, V. Citovsky (Editors), *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Springer, pp. 523-563, New York.
- BROM, S., MARTINEZ, E., DAVILA, G. and PALACIOS, R. 1988. Narrow-host-range and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (5): 1280-1283.
- BROWN Jr W. M. 1998. <http://bugwood.org> (Son erişim tarihi: 16.09.2013)
- BROWN, N.A. 1927. Sweet pea fasciation a form of crown gall. *Phytopathology*, 17: 29-30.
- BRUCE, K.D., HIORNS, W.D., HOBMAN, J.L., OSBORN, A.M., STRIKE, P., RITCHIE, D.A. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (10): 3413-3416.
- BUCKINGHAM, L. 2011. Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications. F.A. Davis Company, pp. 537, Philadelphia
- BUCHHOLZ, W.B. and THOMASHOW, M.F. 1984. Comparison of T-DNA oncogene complements of *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmids with limited and wide host ranges. *J. Bacteriol.*, 160 (1): 319-326.

- BUNDOCK, P., Den DULK-RAS, A., BEIJERSBERGEN, A. and HOOYKAAS, P.J.J. 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 14 (13): 3206-3214.
- BUNDOCK, P. and HOOYKAAS, P.J.J. 1996. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (26): 15272-15275.
- BURR, T.J. 2004. Grape Crown Gall Biology and Strategies for Control. *Foundation Plant Services FPS Grape Program Newsletter*, 4: 16-18.
- BURR, T.J., BAZZI, C., SULE, S. and OTTEN, L. 1998. Crown gall of grape, biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis.*, 82 (12): 1288-1297.
- BURR, T.J., BISHOP, A.L., KATZ, B.H., BLANCHARD, L.M. and BAZZI, C. 1987-a. A root specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3. *Phytopathology*, 77 (10): 1424-1427.
- BURR, T.J. and KATZ, B.H. 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap and from vineyard soil. *Phytopathology*, 73 (2): 163-165.
- BURR, T.J. and KATZ, B.H. 1984. Grapevine cuttings as potential of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Dis.*, 68 (11): 976-978.
- BURR, T.J., KATZ, B.H. and BISHOP, A.L. 1987-b. Populations of *Agrobacterium* in vineyard and nonvineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Dis.*, 71 (7): 617-620.
- BURR, T.J., KATZ, B.H., BISHOP, A.L., MEYERS, C.A. and MITTAK, V.L. 1988. Effect of shoot age and tip culture propagation of grapes on systemic infestations by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39: 67-70.
- BURR, T.J. and OTTEN, L. 1999. Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 53-80.
- BURR, T.J. and REID, C.L. 1994. Biological control of grape crown gall with non-tumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45 (2): 213-219.
- BURR, T.J., REID, C.L., ADAMS, C.E. and MOMOL, E.A. 1999. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia* vines. *Plant Dis.*, 83 (2): 102-107.
- BURR, T.J., REID, C.L., TAGLIATI, E., BAZZI, C. and SULE, S. 1997. Biological control of grape crown gall by strain F2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment sites on grape cells. *Phytopathology*, 87 (7): 706-711.
- BURR, T.J., REID, C.L., YOSHIMURA, M., MOMOL, E.A. and BAZZI, C. 1995. Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. *Plant Dis.*, 79 (7): 677-682.
- BUSH, A.L. and PUEPPKE, S.G. 1991. Characterization of an unusual new *Agrobacterium tumefaciens* strain from *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (9): 2468-2472.
- BYRNE, M.C., KOPLOW, J., DAVID, C., TEMPE, J. and CHILTON, M.D. 1983. Structure of T-DNA in roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Mol. Appl. Genet.*, 2 (2): 201-209.
- CAMPILLO, T., LAVIRE, C., SHAMS, M., POTHIER, J.F. and PULAWSKA, J. 2012. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *J. Plant Pathol.*, 94 (1): 97-104.

- CANADAY, J., GERARD, J.C., CROUZET, P. and OTTEN, L. 1992. Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4. *Mol. Gen. Genet.*, 235 (2-3): 292-303.
- CANFIELD, M.L. and 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 (4): 440-443.
- CANGELOSI, G.A., ANKENBAUER, R.G. and NESTER, E.W. 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic protein and a transmembrane signal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (17): 6708-6712.
- CANGELOSI, G.A., BEST, E.A., MARTINETTI, C. and NESTER, E.W. 1991. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens*. *Method. Enzymol.*, 145: 177-181.
- CANGELOSI, G.A., HUNG, L., PUVANESARAJAH, V., STACEY, G., OZGA, D.A., LEIGH, J.A. and NESTER, E.W. 1987. Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. *J. Bacteriol.*, 169 (5): 2086-2091.
- CARLSON, R.W. 1982 Surface chemistry. In: W. Broughton (Editor), Nitrogen Fixation II Biology of Nitrogen-Fixing Organisms Vol: 2, Oxford University Press, pp. 199-234, Oxford.
- CATARA, V., ARNOLD, D.L., CIRVILLERI, G., BELLA, P. and VIVIAN, A. 2000. Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of *Pseudomonas corrugata* by PCR amplification: Evidence for two distinct genomic groups. *Eur. J. Plant Pathol.*, 106 (8): 753-762.
- CATARA, V., SUTRA, L., MORINEAU, A., ACHOUAK, W., CHRISTEN, R. and GARDAN, L. 2002. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52 (5): 1749-1758.
- CAVARA, F. 1897. Tubercolosi della vite. Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. *Staz. Sper. Agrarie Italiane*, 30: 483-487
- CHANG, C.C., JAYASWAL, R.K., CHEN, C.M. and GELVIN, S.B. 1989. Altered imino diacid synthesis and transcription in crown gall tumors with transposon Tn5 insertions in the 3' end of the octopine synthase gene. *J. Bacteriol.*, 171 (11): 5922-5927.
- CHATEAU, S., SANGWAN, R. and SANGWAN-NORREEL, B. 2000. Competence of *Arabidopsis thaliana* genotypes and mutants for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer: role of phytohormones. *J. Exp. Bot.*, 51 (353): 1961-1968.
- CHEBIL, S., FERSI, R., CHENENAOU, S., ABDELLATIF, E., DURANTE, G., ZACCHI, E., RHOUMA, A. and MLIKI, A. 2013. Occurrence of *Agrobacterium vitis* carrying two opine-type plasmids in Tunisian vineyards. *J. Plant Pathol., Microb.*, 4 (5): 1-4.
- CHEN, F., GUO, Y.B., WANG, J.H., LI, J.Y. and WANG, H.M. 2007. Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2. *Plant Dis.*, 91 (8): 957-963.
- CHEN, F., LI, J.Y., GUO, Y.B., WANG, J.H. and WANG, H.M. 2009. Biological control of grapevine crown gall: purification and partial characterization of an antibacterial substance produced by *Rahnella aquatilis* strain HX2. *Eur. J. Plant Pathol.*, 124 (3): 427-437.
- CHILTON, M.D., DRUMMOND, M.H., MERLO, D.J., SCIAKY, D., MONTOYA, A.L., GORDON, M.P. and NESTER, E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid

- DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11 (2): 263-271.
- CHILTON, M.D., SAIKI, R.K., YADAV, N., GORDON, M.P. and QUETIER, F. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (7): 4060-4064.
- CHILTON, W.S., STOMP, A.M., BERINGUE, V., BOUZAR, H., VAUDEQUIN-DRANSART, V., PETIT, A. and DESSAUX, Y. 1995. The chrysopine family of amadori-type crown gall opines. *Phytochemistry*, 40 (3): 619-628.
- CHILTON, W.S., PETIT, A., CHILTON, M.D. and DESSAUX, Y. 2001 Structure and characterization of the crown gall opines heliopine, vitopine and rideopine. *Phytochemistry*, 58 (1): 137-142.
- CHRISTIE, P.J. 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.*, 40 (2): 294-305.
- CHRISTIE, P.J. 2004. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1694 (1-3): 219-234.
- CHYI, Y.S., JORGENSEN, R.A., GOLDSTEIN, D., TANKSLEY, S.D. and LOAIZA-FIGUEROA, F. 1986. Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.*, 204 (1): 64-69.
- CLARE, B.G., KERR, A. and JONES, D.A. 1990. Characteristics of the nopaline catabolic plasmid in *Agrobacterium* strains K84 and K1026 used for biological control of crown gall disease. *Plasmid*, 23 (2): 126-137.
- CLARK, A.G. 1969. A selective medium for the isolation of *Agrobacterium* species. *J. Appl. Microbiol.*, 32 (3): 348-351.
- COLEMAN, M.F. and REID, J.J. 1945. A serological study of strains of *Alcaligenes radiobacter* and *Phytomonas tumefaciens* in the "M" and "S" phases. *J. Bacteriol.*, 49 (2): 187-192.
- CONN, H.J. 1942. Validity of the genus *Alcaligenes*. *J. Bacteriol.*, 44 (2): 353-360.
- COOKSEY, D.A. and MOORE, L.W. 1980. Biological control of crown gall with fungal and bacterial antagonists. *Phytopathology*, 70 (6): 506-509.
- COSTECHAREYRE, D., RHOUMA, A., LAVIRE, C., PORTIER, P., CHAPULLIOT, D., BERTOLLA, F., BOUBAKER, A., DESSAUX, Y. and NESME, X. 2010. Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. *Microb. Ecol.*, 60 (4): 862-872.
- COTTYN, B., BAEYEN, S., PAUWELYN, E., VERBAENDERT, I., De VOS, P., BLEYAERT, P., HOFTE, M. and MAES, M. 2011. Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathol.*, 60 (3): 453-461.
- CROUZET, P. and OTTEN, L. 1995. Sequence and mutational analysis of a tartrate utilization operon from *Agrobacterium vitis*. *J. Bacteriol.*, 177 (22): 6518-6526.
- CREASAP, J.E., REID, C.L., GOFFINET, M.C., ALONI, R., ULLRICH, C. and 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 (4): 362-367.
- CREASAP, J.E. and BURR, T.J. 2006. Grape crown gall. *Cornell University Extension NYS IPM Fact Sheets*, 1-2.
- CREASY, G.L. and CREASY L.L. 2009. Grapes. MPG Books Group, Cambridge, 295 p.

- CROWLEY, C.F. and De BOER, S.H. 1982. Nonpathogenic bacteria associated with potato stems cross-react with *Corynebacterium sepedonicum* in immunofluorescence. *Am. J. Potato Res.*, 59 (1): 1-7.
- CUBERO, J. and GRAHAM, H.J. 2005. Quantitative real-time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95 (11): 1333-1340.
- CUBERO, J. and LOPEZ, M.M. 2001. An efficient microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107 (7): 757-760.
- CUBERO, J., MARTINEZ, M.C., LLOP, P. and LOPEZ, M.M. 1999. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *J. Appl. Microbiol.*, 86 (4): 591-602.
- ÇAPLIK, D. ve BASIM, H. 2009. Domates Bakteriyel Kanseri etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve Domates Bakteriyel Yaprak Lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın LNA probe'a dayalı Real-Time PCR ile tanısı ve saptanması. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, ss. 138, 15-18 Temmuz, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- ÇELİK, S. 1998. Bağcılık (Ampeloloji) Cilt:1. Anadolu Matbaası, Tekirdağ, 426 s.
- ÇELİK, H., AĞAOĞLU, Y.S., FİDAN, Y., MARASALI, B. ve SÖYLEMEZOĞLU, G. 1998. Genel Bağcılık. Sunfidan Mesleki Kitaplar Serisi, Ankara, 253 s.
- ÇELİK, H., ÇELİK, S., KUNTER, B., SÖYLEMEZOĞLU, G., BOZ, Y., ÖZER, C. ve ATAĞ, A. 2005. Bağcılıkta gelişme ve üretim hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, ss. 565-588, 3-7 Ocak, Milli Kütüphane, Ankara.
- ÇELİK, H., KUNTER, B., SÖYLEMEZOĞLU, G., ERGÜL, A., ÇELİK, H., KARATAŞ, H., ÖZDEMİR, G. ve ATAĞ, A. 2010. Bağcılığın geliştirilmesi yöntemleri ve üretim hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, ss. 493-513, 11-15 Ocak, Milli Kütüphane, Ankara.
- ÇELİK, H., MARASALI, B., SÖYLEMEZOĞLU, G., TANGOLAR, S. ve GÜNDÜZ, M., 2000. Bağcılıkta üretim hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, ss. 645-678, 17-21 Ocak, Milli Kütüphane, Ankara.
- ÇETİN, B. ve TİPİ, T. 1998. Türkiye Bağcılığındaki Gelişmeler. Türkiye IV. Bağcılık Sempozyumu, ss. 171-175, 20-23 Ekim, Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- De BELLIS, P., SCHENA, L. and CARIDDI, C. 2007. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *Eur. J. Plant Pathol.*, 118 (1): 11-22.
- De CASTRO, C., MOLINARO, A., LANZETTA, R., SILIPO, A. and PARRILLI, M. 2008. Lipopolysaccharide structures from *Agrobacterium* and *Rhizobiaceae* species. *Carbohydr. Res.*, 343 (12): 1924-1933.
- De CLEENE, M. 1979. Crown gall: economic importance and control. *Zentralbl. Bakteriol. Naturwiss.*, 134 (6): 551-554.
- De CLEENE, M. and De LEY, J. 1976. The host range of crown gall. *Bot. Rev.*, 42 (4): 389-466.
- De CLEENE, M. and De LEY, J. 1981. The host range of infectious hairyroot. *Bot. Rev.*, 47 (2): 147-194.
- De GROOT, M.J.A., BUNDOCK, P., HOOYKAAS, P.J.J. and BEIJERSBERGEN, A.G.M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.*, 16 (9): 839-842.

- De la RIVA, G.A., GONZALEZ-CABRERA, J., VAZQUEZ-PADRON, R. and AYRA-PARDO, C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. *Electron. J. Biotechnol.*, 1 (3): 1-16.
- De LEY, J. 1972. *Agrobacterium*: Intrageneric relationships and evolution. 3rd International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, pp. 251-259, 14-21 April, Pudoc, Wageningen.
- De LEY, J. 1974. Phylogeny of procaryotes. *Taxon*, 23 (2): 291-300.
- De LEY, J., BERNAERTS, M., RASSEL, A. and GUILMOT, J. 1966. Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.*, 43 (1): 7-17.
- De LEY, J., TIJTGAT, R., De SMEDT, J. and MICHIELS, M. 1973. Thermal stability of DNA:DNA hybrids within the genus *Agrobacterium*. *Microbiology*, 78 (2): 241-252.
- De VOS, G., DEBEUCKELEER, M., Van MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1981. Restriction endonuclease mapping of the octopine tumor-inducing plasmid pTiAch5 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid*, 6 (2): 249-253.
- DESSAUX, Y., PETIT, A. and TEMPE, J. 1993. Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. *Phytochemistry*, 34 (1): 31-38.
- DESSAUX, Y., PETIT, A., FARRAND, S.K. and MURPHY, P.J. 1998. Opines and opine-like molecules involved in plant-Rhizobiaceae interactions. In: H.P. Spink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, (Editors), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*, Kluwer Academic, pp. 173-197, Dordrecht.
- DHANVANTARI, B.N. 1983. Etiology of grape crown gall in Ontario. *Can. J. Bot.*, 61 (10): 2641-2646.
- DONG, L.C., SUN, C.W., THIES, K.L., LUTHE, D.S. and GRAVES, Jr. C.H. 1992. Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 82 (4): 434-439.
- DONNER, S.C., JONES D.A., McCLURE N.C., ROSEWARNE, G.M., TATE, M.E., KERR, A., FAJARDO, N.N. and CLARE, B.G. 1993. Agrocin 434, a new plasmid encoded agrocin from the biocontrol *Agrobacterium* strains K84 and K1026, which inhibits biovar 2 agrobacteria. *Physiol. Mol. Plant P.*, 42 (3): 185-194.
- DREO, T., GRUDEN, K., MANCEAU, C., JANSE, J.D. and RAVNIKAR, M. 2007. Development of a real-time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathol.*, 56 (1): 9-16.
- DUGGAR, B.M. 1909. *Fungous Diseases of Plants*. Ginn and Co, New York, 508 p.
- DURRENBERGER, F., CRAMERI, A., HOHN, B. and KOUKOLIKOVA-NICOLA, Z. 1989. Covalently bound VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (23): 9154-9158.
- EASTWELL, K.C., WILLIS, L.G. and CAVILEER, T.D. 1995. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Dis.*, 79 (8): 822-827.
- EASTWELL, K.C., SHOLBERG, P.L. and SAYLER, R.J. 2006. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Prot.*, 25 (11): 1191-1200.

- EINSET, J. and PRATT, C. 1975. Grapes. In: J. Jenick, J.N. Moore (Editors), *Advances in Fruit Breeding*, Purdue University Press, pp. 130-148, Indiana.
- ELLIS, J.G., KERR, A., Van MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1979. *Agrobacterium* genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. *Physiol. Plant Pathol.*, 15 (3): 311-319.
- ELLIS, J.G., KERR, A., PETIT, A. and TEMPE, J. 1982. Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids-the role of agrocinopines. *Mol. Gen. Genet.*, 186 (2): 269-274.
- ERGENOĞLU, F. ve TANGOLAR, S. 2000. Bağcılık için pratik bilgiler. Türkiye Tarımsal Araştırma Projesi Yayınları, Adana, 33 s.
- ESAU, K. 1948. Phloem structure in the grapevine, and its seasonal changes. *Hilgardia*, 18 (5): 217-296.
- ESCOBAR, M.A. and DENDEKAR, A.M. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci.*, 8 (8): 380-386.
- ENGLER, G., DEPICKER, A., MAENHAUT, R., VILLARROEL, R., Van MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1981. Physical mapping of DNA base sequence homologies between an octopine and a nopaline Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Mol. Biol.*, 152 (2): 183-208.
- EWING, B. and GREEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. error probabilities. *Genome Res.*, 8 (3): 186-194.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C. and GREEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. accuracy assessment. *Genome Res.*, 8 (3): 175-185.
- FABRE, E. and DUNAL, F. 1853. Observations sur les maladies régnantes de la vigne. *Bull. Soc. Cent. Agric. Dep. Herault*, 40: 46.
- FAJARDO, N.N., TATE, M.E. and CLARE, B.G. 1995. Agrocin 434: an additional biological control component for crown gall. In: M.H. Ryder, P.M. Stephens, G.D. Bowen (Editors), *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria*, CSIRO Division of Soils, pp. 128-130, Adelaide.
- FANELLI, V., CARIDDI, C. and FINETTI-SIALER, M. 2007. Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. *Plant Pathol.*, 56 (4): 683-691.
- FARRAND, S.K. 1990. *Agrobacterium radiobacter* strain K84: a model control system. In: R.R. Baker, P.E. Dunn (Editors), *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*, Wiley-Liss, pp. 679-691, New York.
- FARRAND, S.K. and WANG, C. 1992. Do we really understand crown gall control by *Agrobacterium radiobacter* strain K84? In: E.C. Tjamos, G.C. Papavizas, R.J. Cook (Editors), *Biological Control of Plant Diseases*, Plenum Press, pp. 287-293, New York.
- FATAHI, R., EBADI, A., BASSIL, N., MEHLENBACHER, S.A. and ZAMANI, Z. 2003. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers. *Vitis*, 42 (4): 185-192.
- FERREIRA, J.H.S. and Van ZYL, F.G.H. 1986. Susceptibility of grape-vine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 7 (2): 101-104.
- FİDAN, Y. 1985. Özel Bağcılık. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 176 s.

- FILO, A., SABBATINI, P., SUNDIN, G.W., ZABADAL, T.J., SAFIR, G.R. and COUSINS, P. S. 2013. Grapevine crown gall suppression using biological control and genetic engineering: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.*, 64 (1): 1-14.
- FORTIN, C., MARQUIS, C., NESTER, E.W. and DION, P. 1993. Dynamic structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids. *J. Bacteriol.*, 175 (15): 4790-4799.
- FOURNIER, P., De RUFFRAY, P. and OTTEN, L. 1994. Natural instability of *Agrobacterium vitis* Ti plasmid due to unusual duplication of a 23-kb DNA fragment. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 7 (2): 164-172.
- FRONZES, R., CHRISTIE, P.J. and WAKSMAN, G. 2009. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7 (10): 703-714.
- GALLELLI, A., TALOCCI, S., PILOTTI, M. and LORETI, S. 2014. Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathol.*, 63 (2): 264-276.
- GALZOLARI, C., BAZZI, C. and MAZZUCHI, U. 1982. Cross-reactions between *Corynebacterium sepedonicum* and *Arthrobacter polychromogenes* in immunofluorescent staining. *Potato Res.*, 25 (3): 239-246.
- GELVIN, S.B. 1992. Chemical signaling between *Agrobacterium* and its host plant. In: D.P.S Verma (Editor), *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*, CRC Press, pp. 137-167, Florida.
- GELVIN, S.B. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 223-256.
- GELVIN, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the 'gene-jockeying' tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67 (1): 16-37
- GENÇTAN, T., TUGAY, M.E., GEÇİT, H.H., BOZKURT, B., ERGUN, E., EKİZ, H., YALVAÇ, K., GEVREK, M.N., ELÇİ, A. ve BALKAN, A. 2005. Türkiye'de tohumluk, fide ve fidan üretimi ve kullanımı. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, ss. 803-823, 3-7 Ocak, Milli Kütüphane, Ankara.
- GENOV, I., ATANASSOV, I., TSVETKOV, I. and ATANASSOV, A. 2006. Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, *V. vinifera* ssp. *silvestris*. *Vitis*, 45 (2): 97-101.
- GERARD, J.C., CANADAY, J., SZEGEDI, E., DELASALLE, H. and OTTEN, L. 1992. Physical map of the vitopine Ti plasmid pTiS4. *Plasmid*, 28 (2): 146-156.
- GİDER, S. vd 2002. Bağcılık. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Teşkilatlanma ve Destekleme Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara, 132 s.
- GOODMAN, R.N., GRIMM, R. and FRANK, M. 1993. The influence of grape rootstocks on the crown gall infection process and tumor development. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44 (1): 22-26.
- GOODNER, B. et al. 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294 (5550): 2323-2328.
- GORDON, D., ABAJIAN, C. and GREEN, P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.*, 8 (3): 195-202.
- GOTTSBERGER, R.A. 2010. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51 (3): 285-292.
- GÖKSEL, N. 1953. Kök uru hastalığı ve mücadelesi. Tarım Vekâleti Yayınları, Ankara, 30 s.

- GRAHAM, P.H. 1964. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.*, 35 (3): 511-517.
- GRAHAM, P.H. 1971. Serological studies with *Agrobacterium radiobacter*, *A. tumefaciens*, and *Rhizobium* strains. *Arch. Mikrobiol.*, 78 (1): 70-75.
- GRALL, S., ROULLAND, C., GUILLAUME, J. and MANCEAU, C. 2005. Bleeding sap and old wood are the two main sources of contamination of merging organs of vine plants by *Xylophilus ampelinus*, the causal agent of bacterial necrosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (12): 8292-8300.
- GUDMESTAD, N.C., MALLIK, I., PASCHE, J.S., ERSON, N.R. and KINZER, K. 2009. A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulase a gene sequence. *Plant Dis.*, 93 (6): 649-659.
- GUPTA, A.K., KISHORE, K., BHARDWAJ, S.S., AMAN, T., SAPNA, D., JARIAL, R. S., CHHAYA, S., SINGH, K.P., SRIVASTAVA, D.K. and RUP, L. 2010. Biological control of crown gall on peach and cherry rootstock colt by native *Agrobacterium radiobacter* isolates. *Open Horticul. J.*, 3: 1-10.
- GUYON, P., PETIT, A., TEMPE, J. and DESSAUX, Y. 1993. Transformed plants producing opines specifically promote growth of opine-degrading agrobacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 6 (1): 92-98.
- HA, Y., FESSEHAIE, A., LING, K.S., WECHTER, W.P., KEINATH, A.P. and WALCOTT, R.R. 2009. Simultaneous detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Didymella bryoniae* in cucurbit seedlots using magnetic capture hybridization and real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 99 (6): 666-678.
- HAAS, J.H., MOORE, L.W., REAM, W. and MANULIS, S. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (8): 2879-2884.
- HAAS, J.H., ZVEIBIL, A., ZUTRA, D., TANNE, E. and MANULIS, S. 1991. The presence of crown gall of grape incited by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in Israel. *Phytoparasitica*, 19 (4): 311-318.
- HANSEN, G., TEMPE, J. and BREVET, J. 1992. A T-DNA transfer stimulator sequence in the vicinity of the right border of pRi8196. *Plant Mol. Biol.*, 20 (1): 113-122.
- HAO, G., ZHANG, H., ZHENG, D. and BURR, T.J. 2005. *luxR* homolog *avhR* in *Agrobacterium vitis* affects the development of a grapespecific necrosis and a tobacco hypersensitive response. *J. Bacteriol.*, 187 (1): 185-192.
- HARTMAN, J. 2007. Grape crown gall. *University of Kentucky College of Agriculture Extension Fact Sheets*, (11): 1-3.
- HAYMAN, G.T. and FARRAND, S.K. 1988. Characterization and mapping of the agrocinopine-agrocin 84 locus on the nopaline Ti plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.*, 170 (4): 1759-1767.
- HE, Y., FESSEHAIE, A., SHEPHERD, L., MUNKVOLD, G. 2009. A diagnostic real-time PCR assay for the detection and quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. *Phytopathology*, 99 (6): S34.
- HEDGCOCK, G.G. 1910-a. Field studies of the crown gall of the grape. *U.S. Dep. Agric. Bureau Plant Industry Bull.*, 183: 1-40.
- HEDGCOCK, G.G. 1910-b. Field studies of the crown gall and hairy root of the apple tree, , *U.S. Dep. Agric. Bureau Plant Industry Bull.*, 186: 1-108.

- HENSON, J.M. and FRENCH, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31: 81-109.
- HERLACHE, T.C., HOTCHKISS, A.T. Jr., BURR, T.J. and COLLMER, A. 1997. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1): 338-346.
- HERLACHE, T.C. and TRIPLETT, E.W. 2002. Expression of a crown gall biological control phenotype in an avirulent strain of *Agrobacterium vitis* by addition of the trifolitoxin production and resistance genes. *BMC Biotechnol.*, 2 (2): 1-7.
- HILDEBRAND, E.M. 1940. Cane gall of brambles caused by *Phytomonas rubi* n. sp. *J. Agr. Res.*, 61 (9): 685-696.
- HILDEBRAND, E.M. 1942. A micrurgical study of crown gall infection in tomato. *J. Agr. Res.*, 65 (1): 45-59.
- HOFER, A.W. 1941. A characterization of *Bacterium radiobacter* (Beijerinck and Van Delden) Löhnis. *J. Bacteriol.*, 41 (2): 193-224.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R. and GELFAND, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (16): 7276-7280.
- HOLMES, B. 1988. The Taxonomy of *Agrobacterium*. *Acta Hort.*, 225: 47-52
- HOLMES, B. and ROBERTS, P. 1981. The classification, identification and nomenclature of agrobacteria, incorporating revised descriptions for each of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn 1942, *Agrobacterium rhizogenes* (Riker *et al.*) Conn 1042, and *Agrobacterium rubi* (Hildebrand) Starr & Weiss 1943. *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 443-467.
- HOOD, E.E., JEN, G., KAYES, L., KRAMER, J., FRALEY, R.T. and CHILTON, M.D. 1984. Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Nature Biotechnol.*, 2: 702-709.
- HOOYKAAS, P.J.J., KLAPWIJK, P.M., NUTI, M.P., SCHILPEROORT, R.A. and RORSCH, A. 1977. Transfer of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium ex-plantia*. *J. Gen. Microbiol.*, 98 (2): 477-484.
- HOOYKAAS, P.J.J., HOFKER, M., DEN DULK-RAS, H. and SCHILPEROORT, R.A. 1984. A comparison of virulence determinants in an octopine Ti plasmid, a nopaline Ti plasmid, and an Ri plasmid by complementation analysis of *Agrobacterium tumefaciens* mutants. *Plasmid*, 11 (3): 195-205.
- HOCHSTER, R.M. and COLE S.E. 1967. Serological comparisons between strains of *Agrobacterium tumefaciens*. *Can. J. Microbiol.*, 13 (5): 569-572.
- HUSSAM, H.A. and KATSUNORI, S. 2012. The broad host range of *Agrobacterium vitis* and molecular detection of Ti plasmid. The Egyptian Journal of Botany 2nd International Conference, pp. 65-77, 29-30 April, Minya University, Minya.
- ICHIMAN, Y., YOSHIDA, T., NOGUCHI, M., SOMEYA, N., TSUCHIYA, K., NAKAJIMA, M., AKUTSU, K. and SAWADA, H. 2006. Phylogenetic analysis of the genera *Agrobacterium* and *Rhizobium* based on five essential genes. *Jpn. J. Phytopathol.*, 72 (4): 305.
- INZE, D., FOLLIN, A., Van LIJSEBETTENS, M., SIMOENS, C., GENETELLO, C., Van MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1984. Genetic analysis of the individual

- T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*, further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.*, 194 (1-2): 265-274.
- IRELAN, N.A. and MEREDITH, C.P. 1996. Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis* using randomly amplified polymorphic DNA. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47 (2): 145-151.
- İYRİBOZ, N. 1938. Bağ hastalıkları. *Ziraat Vekâleti Neşriyatı*, 323: 109-111.
- JACKSON, R.S. 2008. Wine Science, Third Edition: Principles and Applications. Academic Press, Massachusetts, 751 p.
- JANA, T.K., SINGH, N.K., KOUNDAL, K.R. and SHARMA, T.R. 2005. Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. *Can. J. Microbiol.*, 51 (2): 159-164.
- JARVIS, B.D.W., SIVAKUMARAN, S., TIGHE, S.W. and GILLIS, M. 1996. Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. *Plant Soil*, 184 (1): 143-158.
- JEN, G.C. and CHILTON, M.D. 1986. The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (11): 3895-3899.
- JIN, S., ROITSCH, T., AKENBAUER, R.G., GORDON, M.P. and NESTER, E.W. 1990. The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for vir gene regulation. *J. Bacteriol.*, 172 (2): 525-530.
- JOHNSON, K.L. and WALCOTT, R.R. 2012. Progress towards a real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Pepino mosaic virus in tomato seed. *J. Phytopathol.*, 160 (7-8): 353-363.
- JOHNSON, K.L. ZHENG, D., KAEWNUM, S., REID, C.L. and BURR, T.J. 2013. Development of a magnetic capture hybridization real-time PCR assay for detection of tumorigenic *Agrobacterium vitis* in grapevines. *Phytopathology*, 103 (6): 633-640.
- JONES, D.A., RYDER, M.H., CLARE, B.G., FARRAND, S.K. and KERR, A. 1988. Construction of a Tra⁻ deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. *Mol. Gen. Genet.*, 212 (2): 207-214.
- JONES D.A. and KERR, A. 1989. *Agrobacterium radiobacter* strain K1026, a genetically engineered derivative of strain K84 for biological control of crown gall. *Plant Dis.*, 73 (1): 15-18.
- JOUANIN, L. 1984. Restriction map of an agropine-type Ri-plasmid and its homologies with Ti-plasmids. *Plasmid*, 12 (2): 91-102.
- JOUANIN, L., BOUCHEZ, D., DRONG, R.F., TEPFER, D. and SLIGHTOM, J.L. 1989. Analysis of TR-DNA/plant junctions in the genome of a *Convolvulus arvensis* clone transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Plant Mol. Biol.*, 12 (1): 75-85.
- KADO, C.I. and HESKETT, M.G. 1970. Selective media from isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60 (6): 969-976.
- KADO, C.I. 1994. Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the virB operon in sex pilus assembly and synthesis. *Mol. Microbiol.*, 12 (1): 17-22.
- KANG, H.W., PARK, D.S., PARK, Y.J., YOU, C.H., LEE, B.M., EUN, M.Y. and GO, S.J. 2001. Genomic differentiation among oyster mushroom cultivars released in Korea by URP-PCR fingerprinting. *Mycobiology*, 29 (2): 85-89.

- KANG, H.W, GO, S.J. and EUN, M.Y. 2002-a. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers (URPs) generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol. Cells*, 13 (2): 281-287.
- KANG, H.W., PARK, D.S., PARK, Y.J., LEE, B.M., CHO, S.M., KIM, K.T., SEO, G.S. and GO, S.J. 2002-b. PCR based detection of *Phellinus linteus* using specific primers generated from universal rice primer (URP) derived PCR polymorphic band. *Mycobiology*, 30 (4): 202-207.
- KANG, H.W., KWON, S.W. and GO, S.J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathol.*, 52 (2): 127-133.
- KARABAYIR, C. ve TOSUN, M. 2005. Şarap Sektör Araştırması. Türkiye Kalkınma Bankası Yayınları, Ankara, 46 s.
- KARACA, İ. 1956. Orta Anadolu, Orman ve Meyve Ağaçlarında görülen menşei Nebati ve Hayvani Önemli Uurların Amili ve Morfolojileri Hakkında Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 134 s.
- KARACA, N. 2006. Kalecik Karası'nın 4 ve 23 no'lu klonunda baz materyal elde edilmesine yönelik olarak yapılan meristem kültürü yönteminin optimizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 82 s.
- KAUFFMANN, F. 1926. Über bakterienbefunde in mäusecarcinomen, *Z. Krebsforsch.*, 23 (6): 502-507.
- KAUFMANN, M., KASSEMAYER, H.H. and OTTEN, L. 1996. Isolation of *Agrobacterium vitis* from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation. *Vitis*, 35 (3): 151-153.
- KAWAGUCHI, A. 2011. Genetic diversity of *Rhizobium vitis* strains in Japan based on multilocus sequence analysis of *pyrG*, *recA* and *rpoD*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 77 (5): 299-303.
- KAWAGUCHI, A., INOUE, K. and ICHINOSE, Y. 2008-a. Biological control of crown gall of grapevine, rose, and tomato by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *Phytopathology*, 98 (11): 1218-1225.
- KAWAGUCHI, A., INOUE, K. and NASU, H. 2005-a. Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *J. Gen. Plant Pathol.*, 71 (6): 422-430.
- KAWAGUCHI, A., INOUE, K. and NASU, H. 2007. Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *J. Gen. Plant Pathol.*, 73 (2): 133-138.
- KAWAGUCHI, A., SAWADA, H. and ICHINOSE, Y. 2008-b. Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. *Plant Pathol.*, 57 (4): 747-753.
- KAWAGUCHI, A., SAWADA, H., INOUE, K. and NASU, H. 2005-b. Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. *J. Gen. Plant Pathol.*, 71 (1): 54-59.
- KEANE, P.J., KERR, A. and NEW, P.B. 1970. Crown gall of stone fruit II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23 (3): 585-595.
- KELLER, M. 2010. The Science of Grapevines. Academic Press, Massachusetts, 400 p.
- KENNEDY, B.W. and ALCORN, S.M. 1980. Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Dis.*, 64 (7): 674-676.

- KERR, A. 1971. Acquisition of virulence by non-pathogenic isolates of *Agrobacterium radiobacter*. *Physiol. Plant Pathol.*, 1 (3): 241-246.
- KERR, A. 1972. Biological control of crown gall: seed inoculation. *J. Appl. Bacteriol.*, 35 (3): 493-497.
- KERR, A. 1986. The genus *Agrobacterium*. In: A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (Editors), *The Prokaryotes*, Springer, pp. 2214-2235, New York.
- KERR, A. and HTAY, K. 1974. Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol. Plant Pathol.*, 4 (1): 37-44.
- KERR, A., MANIGAULT, P. and TEMPE, J. 1977. Transfer of virulence *in vivo* and *in vitro* in *Agrobacterium*. *Nature*, 265 (5594): 560-561.
- KERR, A. and PANAGOPOULOS, C.G. 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *J. Phytopathol.*, 90 (2): 172-179.
- KERR, A. and TATE, M.E. 1984. Agrocins and the biological control of crown gall. *Microbiol. Sci.*, 1 (1): 1-4.
- KERRIDGE G.H. and ANTCLIFF A.J. 2000. *Wine Grape Varieties*. CSIRO Publishing, Melbourne, 205 p.
- KERSTERS, K., De LEY, J. SNEATH, P.H.A. and SACKIN M. 1973. Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.*, 78 (2): 227-239.
- KERSTERS, K. and De LEY, J. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.*, 87 (2): 333-342.
- KERSTERS, K. and De LEY, J. 1984. Genus *Agrobacterium*. In: N.R. Krieg, J.G. Holt (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, pp. 244-254, Baltimore.
- KHMEL, I.A., SOROKINA, T.A., LEMANOVA, N.B., LIPASOVA, V.A., METLITSKI, O.Z., BURDEINAYA, T.V. and CHERNIN, L.S. 1998. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. *Biocontrol Sci. Tech.*, 8 (1): 45-57.
- KHLAIF, H. 2003. Effect of soil solarization on total *Agrobacterium* spp. population, inoculated *Agrobacterium tumefaciens*, and on the development of crown gall. *J. Plant Pathol.*, 85 (2): 117-122.
- KIM, K.S., BAEK, C.H., LEE, J.K., YANG, J.M. and FARRAND, S.K. 2001. Intracellular accumulation of mannopine, an opine produced by crown gall tumors, transiently inhibits growth of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14 (6): 793-803.
- KNAUF, V.C., PANAGOPOULOS, C.G. and NESTER, E.W. 1983. Comparison of Ti plasmids from three different biotypes of *Agrobacterium* isolated from grapevine. *J. Bacteriol.*, 153 (3): 1535-1542.
- KNAUF, V.C., YANOFSKY, M., MONTROYA, A. and NESTER, E. 1984. Physical and functional map of an *Agrobacterium tumefaciens* tumor inducing plasmid that confers a narrow host range. *J. Bacteriol.*, 160 (2): 564-568.
- KOMARI, T., HALPERIN, W. and NESTER, E.W. 1986. Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542. *J. Bacteriol.*, 166 (1): 88-94.
- KOTTEK, M., GRIESER, J., BECK, C., RUDOLF, B. and RUBEL, F. 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Z.*, 15 (3): 259-263.

- KRIMI, Z., PETIT, A., MOUGEL, C., DESSAUX, Y. and NESME, X. 2002. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (7): 3358-3365.
- KUCZMOG, A. 2012. Mapping of *Agrobacterium* resistance in grapevine. Ph.D. Thesis, University of Pécs, 10 p.
- KUCZMOG, A., GALAMBOS, A., HORVATH, S., MATAI, A., KOZMA, P., SZEGEDI, E. and PUTNOKY, P. 2012. Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 125 (7): 1565-1574.
- KUMAGAI, L. and FABRITIUS, A.L. 2008. Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in grapevine using Multiplex Bio-PCR. 2nd Annual National Viticulture Research Conference, pp. 42-43, 9-11 July, University of California, California.
- KUNIK, T., TZFIRA, T., KAPULNIK, Y., GAFNI, Y., DINGWALL, C. and CITOVSKY, V. 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (4): 1871-1876.
- KUNTAY, S. 1942. Fitopatoloji dersleri. Ziraat Vekâleti Neşriyatı, 930: 265.
- KUYKENDALL, L.D., YOUNG, J.M., MARTINEZ-ROMERO, E., KERR, A. and SAWADA, H. 2005. Genus I. *Rhizobium* Frank 1889, Genus II *Agrobacterium*. In: G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Staley (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C*, Springer, pp. 325-340, New York.
- LACROIX, B., LI, J., TZFIRA, T. and CITOVSKY, V. 2006. Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 84 (3-4): 333-345.
- LALIMAN, L. 1872. Étude sur les Divers Phylloxéra et Leurs Médications. Librairie de la Maison Rustique, Paris, 40 s.
- LANGE, R.T. 1961. Nodule Bacteria associated with the indigenous Leguminosae of South-Western Australia. *J. Gen. Microbiol.*, 61 (26): 351-359.
- LASSALLE, F. et al. 2011. Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol. Evol.*, 3: 762-781.
- LEHMAN, S.M., KIM, W.S., CASTLE, A.J. and SVIRCEV, A.M. 2008. Duplex real time polymerase chain reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms. *Phytopathology*, 98 (6): 673-679.
- LEHOCZKY, J. 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine, after natural infection. *J. Phytopathol.*, 63 (3): 239-246.
- LEHOCZKY, J. 1971. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. *Vitis*, 10: 215-221.
- LEHOCZKY, J. 1978. Root system of the grapevine as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, pp. 239-243, 27 August-2 September, The French National Institute for Agricultural Research, Angers.
- LEMMERS, M., De BEUCKELEER, M., HOLSTERS, M., ZAMBRYSKI, P., DEPICKER, A., HERNALSTEENS, J.P., Van MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1980. Internal organization boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline crown gall tumours. *J. Mol. Biol.*, 144 (3): 355-378.

- LEVIN, I. and LEVINE, M. 1920. Malignancy of the crown gall and its analogy to animal cancer. *J. Cancer Res.*, 5: 243-260.
- LEVINE, M. 1919. Studies on plant cancers-I. The mechanism of the formation of the leafy crown gall. *Bull. Torr. Bot. Club*, 46 (11): 447-452.
- LEVINE, M. 1921-a. Studies on plant cancers-II. The behavior of crown gall on the rubber plant (*Ficus elastica*). *Mycologia*, 13 (1): 1-11.
- LEVINE, M. 1921-b. Studies on plant cancers-III. The nature of the soil as a determining factor in the health of the beet, *Beta vulgaris*, and the relation to the size and weight of the crown gall, produced by inoculation with *Bacterium tumefaciens*. *Am. J. Botany*, 8: 507-525.
- LEVINE, M. 1923-a. Studies on plant cancers-IV. The effect of inoculating various quantities of different dilutions of *Bacterium tumefaciens* into the tobacco plant. *Bull. Torr. Bot. Club*, 50 (7): 231-243.
- LEVINE, M. 1923-b. Leafy crown galls on tobacco plants resulting from *Bacterium tumefaciens* inoculations. *Phytopathology*, 13 (5-7): 107-116.
- LEVINE, M. 1924. Studies on plant cancers-VI. Further studies on the behavior of crown gall on the rubber plant (*Ficus elastica*). *Mycologia*, 16 (1): 24-29.
- LEVINE, M. 1931. Studies in the cytology of cancer. *Am. J. Cancer*, 15 (144): 1410-1494.
- LI, J.Y., CHEN, F., WANG, J.H. and WANG, H.M. 2005. Colonization of crown gall biocontrol agent-*Agrobacterium vitis* strain E26 on grapevine. *Acta Phytopathol. Sin.*, 35 (1): 78-83.
- LI, P., LIN, B., SHEN, H. and PU, X. 2011. Species specific detection of *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in infected banana tissues, soil and water. *Afr. J. Biotechnol.*, 10 (74): 16774-16780.
- LIANG, Z., WANG, H. and WANG, J. 2001. Preliminary study on effectiveness and the stability of E26 on controlling crown gall disease. *J. Chin. Agric. Univ.* 6: 91-95.
- LICCIARDELLO, G., BELLA, P. and CATARA, V. 2011. Quantitative detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* in tomato plants by duplex real-time PCR. *J. Plant Pathol.*, 93 (3): 595-602.
- LIESKE, R. 1928. Untersuchungen über die krebskrankheit bei pflanzen, tieren und menschen. *Zbl. Bakt.*, 108: 118-146.
- LIM, S.H., KIM, J.G. and KANG, H.W. 2009. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains. *Microbiol. Res.*, 164 (4): 451-460.
- LIORET, C. 1956. Sur la mise en evidence d'un acide amine non identifie particulier aux tissus de crown-gall. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg.* 2: 76.
- LLOP, P., LASTRA, B., MARSAL, H., MURILLO, J. and LOPEZ, M.M. 2003. Tracking *Agrobacterium* strains by a RAPD system to identify single colonies from plant tumours. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109 (4): 381-389.
- LOCKE, S.B., RIKER, A.J. and DUGGAR, B.M. 1938. Growth substance and the development of crown gall. *J. Agric. Res.*, 57 (1): 21-39.
- LOPEZ, M.M., GORRIS, M.T., TEMPRANO, F.J. and ORIVE, R.J. 1987. Results of seven years of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* in Spain. *EPPO Bulletin*, 17 (2): 273-280.
- LOPEZ, M.M., GORRIS, M.T., SALCEDO, C.I., MONTOJO, A.M. and MIRO, M. 1989. Evidence of biological control of *Agrobacterium tumefaciens* strains

- sensitive and resistant to agrocin 84 by different *Agrobacterium radiobacter* strains on stone fruit trees. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (3): 741-746.
- LOUBSER, J. T. 1978. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 on grapevine in South Africa. *Plant Dis. Rep.*, 62 (8): 630-631.
- LOUWS, F., RADEMAKER, J. and De BRUIJN, F. 1999. The three ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 81-125.
- LUO, L. X., WALTERS, C., BOLKAN, H., LIU, X.L. and LI, J.Q. 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathol.*, 57 (2): 332-337.
- MA, D.Q., YANOFSKY, M.F., GORDON, M.P. and NESTER, E.W. 1987. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine tumors in China. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (6): 1338-1343.
- MACRAE, S., THOMSON, J.A. and Van STADEN, J. 1988. Colonization of tomato plants by two agrocin-producing strains of *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (12): 3133-3137.
- MAHMOODZADEH, H. and DOULATI BANEH, H. 2008. Susceptibility of some grapevine cultivars and rootstocks to crown gall disease. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 29 (2): 79-84.
- MAHMOODZADEH, H., NAZIMEH, A., MAJIDI, I, PAYGAMI, I and KHALIGHI, A. 2004. Evaluation of crown gall resistance in *Vitis vinifera* and hybrids of *Vitis* spp. *Vitis*, 43 (2): 75-79.
- MALIK, K.A. 1988. A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 8 (5): 259-271.
- MARTENS, M., DELAERE, M., COOPMAN, R., De VOS, P., GILLIS, M. and WILLEMS, A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57 (3): 489-503.
- MARTENS, M., DAWYNDT, P., COOPMAN, R., GILLIS, M., De VOS, P. and WILLEMS, A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58 (1): 200-214.
- MARTINEZ, E., PALACIOS, R. and SANCHEZ, F. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.*, 169 (6): 2828-2834.
- MATTHYSSE, A.G. 1983. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol.*, 154 (2): 906-915.
- MATTHYSSE, A.G. 2005. The genus *Agrobacterium*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Editors), *The Prokaryotes Volume 5*, Springer, pp. 91-114, New York.
- MATTHYSSE, A.G., HOLMES, K.V. and GURLITZ, R.H. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bacteriol.*, 145 (1): 583-595.
- MATTHYSSE, A.G. and STUMP, A.J. 1976. The presence of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid DNA in crown gall tumour cells. *J. Gen. Microbiol.*, 95 (1): 9-16.
- MATTHYSSE, A.G., WYMAN, P.M. and HOLMES, K.V. 1978. Plasmid-dependent attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to plant tissue culture cells. *Infect. Immunol.*, 22 (2): 516-522.

- McCLURE, N.C., AHMADI, A.R. and CLARE, B.G. 1998. Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (10): 3977-3982.
- McGOVERN, P.E., GLUSKER, D.L., EXNER, L.J. and VOIGT, M.M. 1996. Neolithic resinated wine. *Nature*, 381 (6582): 480-481.
- McGUIRE, R.G., RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., COLLMER, A. and BURR, T.J. 1991. Polygalacturonase production by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (3): 660-664.
- McKEEN, W.E. 1954. An anatomical study of cane and grown galls. *Can. J. Bot.*, 32 (4): 527-530.
- MERLO, D.J. and NESTER, E.W. 1977. Plasmids in avirulent strains of *Agrobacterium*. *J. Bacteriol.*, 129 (1): 76-80.
- MICHEL, M.F., BRASILEIRO, A.C., DEPIERREUX, C., OTTEN, L., DELMOTTE, F. and JOUANIN, L. 1990. Identification of different *Agrobacterium* strains isolated from the same forest nursery. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (11): 3537-3545.
- MICHIELSE, C.B., HOOYKAAS, P.J.J., Van Den HONDEL, C.A. and RAM, A.F. 2005. *Agrobacterium* mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.*, 48 (1): 1-17.
- MILLER, H.J. 1975. Leaf, stem, crown, and root galls induced in *Chrysanthemum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, 65 (7): 805-811
- MILLER, H.J. and VRUGGINK, H. 1981. An assessment of biochemical and serological tests for *Agrobacterium radiobacter* subsp. *tumefaciens*. *J. Phytopathol.*, 102 (3): 292-300.
- MOFFETT, M.L. and COLWELL, R.R. 1968. Adansonian analysis of the Rhizobiaceae. *J. Gen. Microbiol.*, 51 (2): 245-266.
- MOHAMMADI, M. and FATEHI-PAYKANI, R. 1999. Phenotypical characterization of Iranian isolates of *Agrobacterium vitis*, the causal agent of crown gall disease of grapevine. *Vitis*, 28 (3): 115-121.
- MOHAMMADI, M., MOLTMANN, E., ZELLER, W. and GEIDER, K. 2009. Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with real-time PCR. *Eur. J. Plant Pathol.*, 124 (2): 293-302.
- MOMOL, E.A., BURR, T.J., REID, C.L., MOMOL, M.T., HSEU, S.H. and OTTEN, L. 1998. Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* as determined by DNA fingerprints of the 5' -end of the 23S rRNA gene and random amplified polymorphic DNA. *J. Appl. Microbiol.*, 85 (4): 685-692.
- MONTOYA, A.L., CHILTON, M.D., GORDON, M.P., SCIAKY, D. and NESTER, E.W. 1977. Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells: role of plasmid genes. *J. Bacteriol.*, 129 (1): 101-107.
- MOORE, L.W., ERSON, A. and KADO, C.I. 1980. *Agrobacterium*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. N.W. Schaad, J.B. Jones, W. Chun (Editors), American Phytopathological Society Press, pp. 17-25, Minnesota.
- MOORE, L.W. and CANFIELD, M. 1996. Biology of *Agrobacterium* and management of crown gall disease. In: R. Hall (Editor), Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens, American Phytopathological Society Press, pp. 151-191, Minnesota.

- MOORE, L.W., CHLTON, W.S. and CANFIELD, M.L. 1997. Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1): 201-207.
- MOORE, L.W. and WARREN, G. 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 17: 163-179.
- MORIGUCHI, K., MAEDA, Y., SATOU, M., HARDAYANI, N.S., KATAOKA, M., TANAKA, N. and YOSHIDA, K. 2001. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J. Mol. Biol.* 307 (3): 771-784.
- MOUSTAFA DARWEISH, F.A. 1966. A Study of the genus *Pseudomonas* with special reference to the species pathogenic to plants. Ph.D. Thesis, University of Edinburgh, 140 p.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. and ERLICH, H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro: The Polymerase Chain Reaction. 51st Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, pp. 263-273, 28 May-4 June, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- MURPHY, P.J. and ROBERTS W.P. 1979. A basis for agrocin 84 sensitivity in *Agrobacterium radiobacter*. *J. Gen. Microbiol.*, 114 (1): 207-213.
- MUSHIN, R., NAYLOR, J. and LAHOVARY, N. 1958. Studies on plant pathogenic bacteria. *Aust. J. Biol. Sci.*, 12 (3): 233-246.
- NAIR, G.R., LIU, Z.U. and BINNS, A.N. 2003. Reexamining the role of the cryptic plasmid pAtC58 in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. *Plant Physiol.*, 133 (3): 989-999.
- NAGAI-MIYATA, Y., TSUYUKI, K.I., SUGITANI, T., EBASHI, T. and NAKAJIMA, Y. 1993. Isolation and characterization of a trehalulose-producing strain of *Agrobacterium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57 (12): 2049-2053.
- NAVARRO, E., SIMONET, P., NORMAND, P. and BARDI, R. 1992. Characterization of natural population of *Nitrobacter* spp. using PCR-RFLP analysis of ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol.*, 157 (2): 107-115.
- NESME, X., LECLERC, M.C. and BARDIN, R. 1990. PCR detection of an original endosymbiont: the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. In: P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A.M. Margulis, L. Greinier, D. Smith (Editors), Endocytobiology, Institut National de la Recherche Agronomique Press, pp. 47-50, Paris.
- NESME, X., VANEECHOUTTE, M., ORSO, S., HOSTE, B. and SWINGS, J. 1995. Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR amplified 16S rRNA gene. *Syst. Appl. Microbiol.*, 18 (1): 127-135.
- NEW, P.B. and KERR, A. 1971. A selective medium for *Agrobacterium radiobacter* biotype 2. *J. Appl. Bact.*, 34 (1): 233-236.
- NEW P.B. and KERR, A. 1972. Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *J. Appl. Bact.*, 35 (2): 279-287.
- ODILE, C., REJEAN, B., JACQUES, L. and WENDY, M. 2006. Identification Guide to the Major Diseases of Grapes. Agriculture and Agri-Food Press, Quebec, 31 p.
- OGER, P., DESSAUX, Y., PETIT, A., GARDAN, L., MANCEAU, C., CHOMEL, C. and NESME, X. 1998. Validity, sensitivity and resolution limit of the PCR-RFLP

- analysis of the rrs (16S rRNA gene) as a tool to identify soil-borne and plant-associated bacterial populations. *Genet. Sel. Evol.*, 30 (1): 311-321.
- OPHEL, K. and KERR, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40 (3): 236-241.
- ORAMAN, M.N. 1965. Yeni Bağcılık. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 253 s.
- OTTEN, L., CROUZET, P., SALOMONE, J.Y., De RUFFRAY, P. and SZEGEDI, E. 1995. *Agrobacterium vitis* strain AB3 harbors two independent tartrate utilization systems, one of which is encoded by the Ti plasmid. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8 (1): 138-146.
- OTTEN, L. and De RUFFRAY, P. 1994. *Agrobacterium vitis* nopaline Ti plasmid pTiAB4: relationship to other Ti plasmids and T-DNA structure. *Mol. Gen. Genet.*, 245 (4): 493-505.
- OTTEN, L., De RUFFRAY, P., MOMOL, E.A., MOMOL, M.T. and BURR, T.J. 1996. Phylogenetic relationships between *Agrobacterium vitis* isolates and their Ti plasmids. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 9 (9): 782-786.
- OTTEN, L., GERARD, J.C. and De RUFFRAY, P. 1993. The Ti plasmid from the wide host range *Agrobacterium vitis* strain Tm4 map and homology with other Ti plasmids. *Plasmid*, 29 (2): 154-159.
- ÖKTEM, Y.E. 1972. Kök uru etmeni (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn.)'nin topraktan izolasyonu ve indikatör bitkiler yardımıyla teşhisi üzerinde çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 12 (3): 187-196.
- ÖKTEM, Y.E. 1978. Orta Anadolu Bölgesi bağlarında zarar yapan kök uru hastalığı (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend)'nin sürveyi, zarar oranının tesbiti, çeşit reaksiyonları ile kimyasal ve biyolojik savaş yöntemleri üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 123 s.
- ÖZDEMİR, G. 2005. Farklı kireç içerikli topraklarda yetiştirilen asma genotiplerinde değişik uygulamaların Fe alımı üzerine etkilerinin morfolojik ve fizyolojik yönden incelenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, 184 s.
- ÖZTÜRK, N. ve BASIM, H. 2011. Fasulye Bakteriyel Yaprak Yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) ve Bakteriyel Hale Lekesi (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) etmenlerinin LNA probu kullanılarak Real-Time PCR ile tespiti ve tanılanması. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, ss. 59, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş.
- PACURAR, D.I., THORDAL-CHRISTENSEN, H., PACURAR, M.L., PAMFIL, D., BOTEZ, C. and BELLINI, C. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*: from crown gall tumors to genetic transformation. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 76 (2): 76-81.
- PALACIO-BIELSA, A., GONZALEZ-ABOLAFIO, R., ALVAREZ, B., LASTRA, B., CAMBRA, M.A., SALCEDO, C.I., LOPEZ, M.M. and PENYALVER, R. 2009. Chromosomal and Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three *Agrobacterium* species isolated from grapevine tumours. *Plant Pathol.*, 58 (3): 584-593.
- PAN, S.Q., CHARLES, T., JIN, S., WU, Z.L. and NESTER, E.W. 1993. Preformed dimeric state of the sensor protein VirA is involved in plant-*Agrobacterium* signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (21): 9939-9943.
- PANAGOPOULOS, C.G. and PSALLIDAS, P.G. 1973. Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E. F. Smith & Townsend) Conn. *J. Appl. Bacteriol.*, 36 (2): 233-240.

- PANAGOPOULOS, C.G., PSALLIDAS, P.G. and ALIVIZATOS, A.S. 1979. Evidence of a breakdown in the effectiveness of biological control of crown gall. In: B. Schippers, W. Gams (Editors), *Soil-Borne Plant Pathogens*, Academic Press, pp. 569-578, London.
- PANDAY, D., SCHUMANN, P. and DAS, S.K. 2011. *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61 (11): 2632-2639.
- PANSEGRAU, W. and LANKA, E. 1996. Enzymology of DNA transfer by conjugative mechanisms. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 54: 197-251.
- PATEL, M.K. 1926. An improved method for isolating *Pseudomonas tumefaciens* S. M. and Town. *Phytopathology*, 16: 577.
- PATON, A.M. 1959. Enhancement of pigment production of *Pseudomonas*. *Nature*, 184: 1254.
- PAULUS, F., HUSS, B., BONNARD, G., RIDE, M., SZEGEDI, E., TEMPE, J., PETIT, A. and OTTEN, L. 1989. Molecular systematics of biotype III of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2 (2): 64-74.
- PAULUS, F., CANADAY, J. and OTTEN, L. 1991. Limited host range Ti plasmids: recent origin from wide host range Ti plasmids and involvement of a novel IS element, IS868. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 4 (2): 190-197.
- PENYALVER, R. and LOPEZ, M.M. 1999. Co-colonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and nonpathogenic strains K84 and K1026, used for crown gall biocontrol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (5): 1936-1940.
- PENYALVER, R., VICEDO, B. and LOPEZ, M.M. 2000. Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. *Eur. J. Plant Pathol.*, 106 (9): 801-810.
- PEARSON, R.C. and GOHEEN, A.C. 1988. *Compendium of Grape Diseases*. APS Press Minnesota, 121 p.
- PETERSEN, M. and WENGEL, J. 2003. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.*, 21 (2): 74-81.
- PETIT, A., DAVID, C., DAHL, G.A., ELLIS, J.G., GUYON, P., CASSEDELBART, F. and TEMPE, J. 1983. Further extension of the opine concept-plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.*, 190 (2): 204-214.
- PICARD, C., PONSONNET, C., PAGET, E., NESME, X. and SIMONET, P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (9): 2717-2722.
- PIERS, K.L., HEATH, J.D., LIANG, X., STEPHENS, K.M. and NESTER, E.W. 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (4): 1613-1618.
- PIRC, M., DREO, T. and RAVNIKAR, M. 2008. Real-Time PCR for testing of symptomless fire blight samples. *Acta Hort.*, 793: 533-538.
- PIRC, M., RAVNIKAR, M., TOMLINSON, J. and DREO, T. 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathol.*, 58 (5): 872-881.
- PIONNAT, S., KELLER, H., HERICHER, D., BETTACHINI, A., DESSAUX, Y., NESME, X. and PONCET, C. 1999. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (9): 4197-4206.

- PLANCHON, J.E. 1868 Nouvelles observations sur le puceron de la vigne (*Phylloxera vastatrix* (nuper *Rhizaphis*, Planch.). *Cr. Acad. Sci.*, 67 (8): 588-594.
- POMPONI, M., SPANO, L., SABBADINI, M.G. and COSTANTINO, P. 1983. Restriction endonuclease mapping of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plasmid*, 10 (2): 119-129.
- PONSONNET, C. and NESME, X. 1994. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.*, 161 (4): 300-309.
- PORTIER, P., FISCHER-Le SAUX, M., MOUGEL, C., LERONDELLE, C., CHAPULLIOT, D., THIOULOUSE, J. and NESME, X. 2006. Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (11): 7123-7131.
- POWERS, T. 2002. Vineyard Simple. Alhambra Valley Publications, San Francisco, 116 p.
- PU, X.A. and GOODMAN, R.N. 1993-a. Effects of fumigation and biological control on infection of indexed crown gall free grape plants. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44 (3): 241-248.
- PU, X.A. and GOODMAN, R.N. 1993-b. Tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grape plants. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44 (3): 249-254.
- PULAWSKA, J. 2010. Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp. *J. Plant Pathol.*, 92 (1): 87-98.
- PULAWSKA, J. and KAŁUZNA, M. 2012. Phylogenetic relationship and genetic diversity of *Agrobacterium* spp. isolated in Poland based on *gyrB* gene sequence analysis and RAPD. *Eur. J. Plant Pathol.*, 133 (2): 379-390.
- PULAWSKA, J., MAES, M., WILLEMS, A. and SOBICZEWSKI, P. 2000. Phylogenetic analysis of 23S rRNA gene sequences of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* strains. *System. Appl. Microbiol.*, 23 (2): 238-244.
- PULAWSKA, J. and SOBICZEWSKI, P. 2005. Development of a semi-nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *J. Appl. Microbiol.*, 98 (3): 710-721.
- PULAWSKA, J., WILLEMS, A. and SOBICZEWSKI, P. 2006. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29 (6): 470-479.
- PULAWSKA, J., WILLEMS, A., De MEYER, S.E. and SULE, S. 2012-a. *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Syst. Appl. Microbiol.*, 35 (4): 215- 220.
- PULAWSKA, J., WILLEMS, A. and SOBICZEWSKI, P. 2012-b. *Rhizobium skierniewicense* sp. nov., isolated from tumours on chrysanthemum and cherry plum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62 (4): 895-899.
- RAIO, A., PELUSO, R., NESME, X. and ZOINA, A. 2004. Chromosomal and plasmid diversity of *Agrobacterium* strains isolated from *Ficus benjamina* tumors. *Eur. J. Plant Pathol.*, 110 (2): 163-174.

- RAMIREZ-BAHENA, M.H., GARCIA-FRAILE, P., PEIX, A., VALVERDE, A., RIVAS, R., IGUAL, J.M., MATEOS, P.F., MARTINEZ-MOLINA, E. and VELAZQUEZ, E. 2008. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58 (11): 2484-2490.
- RASMUSSEN, O.F. and WULFF, B.S. 1991. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* using PCR. Proceedings 4th International Working Group on *Pseudomonas syringae* Pathovars, pp. 369-376, 10-13 June, Stamperia Granducale, Florence.
- REAM, W. 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 27: 583-618.
- REES, D., FARRELL, G. and ORCHARD, J. 2012. Crop Post-Harvest: Science and Technology, Perishables. Wiley-Blackwell Press, New Jersey, 464 p.
- REICHERT, F. 1925. Über die tumorerzeugenden bakterien. *Ztschr. f. Krebsforsch.*, 22 (5): 446-449.
- REZMER, C., SCHLICHTING, R., WACHTER, R. and ULLRICH, C. 1999. Identification and localization of transformed cells in *Agrobacterium tumefaciens* induced plant tumors. *Planta*, 209 (4): 399-405.
- RHOUMA, A., BOUBAKER, A., NESME, X. and DESSAUX, Y. 2006. Plasmid and chromosomal diversity of a Tunisian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Tunis. J. Plant Prot.*, 1 (2): 73-84.
- RIDE, M., RIDE, S., PETIT, A., BOLLET, C., DESSAUX, Y. and GARDAN, L. 2000. Characterization of plasmid borne and chromosome encoded trait of *Agrobacterium* biovar 1, 2 and 3 strains from France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (5): 1818-1825.
- RIKER, A.J. 1923. Some morphological responses of the host tissue to the crown gall organism. *J. Agric. Res.*, 26 (9): 425-434.
- RIKER, A.J. 1926. Studies on the influence of some environmental factors on the development of crown gall. *J. Agric. Res.*, 32 (1): 83-96.
- RIKER, A.J. 1927. Cytological studies of crown gall tissue. *Am. J. Bot.*, 14 (1): 25-37.
- RIKER, A.J., BANFIELD, W.M., WRIGHT, W.H., KEITT, G.W. and SAGEN, H.E. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agr. Res.*, 41 (7): 507-540.
- RISULEO, G., BATTISTONI, P. and CONSTANTINO, P. 1982. Regions of homology between tumorigenic plasmids from *Agrobacterium rhizogenes* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid*, 7 (1): 45-51.
- RODRIGUEZ-PALENZUELA, P., BURR, T.J. and COLLMER, A. 1991. Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *J. Bacteriol.*, 173, (20): 6547-6552.
- ROGOWSKY, P.M., POWELL, B.S., SHIRASU, K., LIM, T.S., MOREL, P., ZYPRIAN, E.M., STECK, T.R. and KADO, C.I. 1990. Molecular characterization of the *vir* regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63 kbp regulon cloned as single unit. *Plasmid*, 23 (2): 85-106.
- ROSSI, L., HOHN, B. and TINLAND, B. 1996. Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium*

- tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1): 126-130.
- ROUHRAZI, K. and RAHIMIAN, H. 2012. Characterization of Iranian grapevine isolates of *Rhizobium* (*Agrobacterium*) spp. *J. Plant Pathol.*, 94 (3): 555-560.
- ROY, M. and SASSER, M. 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology*, 73 (2): 810.
- RUFFNER, H. 1982. Metabolism of tartaric and malic acid in *Vitis*. *Vitis*, 21 (3-4): 247-259.
- RYDER, M.H., SLOTA, J.E., SCARIM, A. and FARRAND, S.K. 1987. Genetic analysis of agrocin 84 production and immunity in *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.*, 169 (9): 4184-4189.
- SABIR, A. 2002. Tüplü asma fidanı üretiminde değişik IBA ve NAA uygulamalarının farklı/çeşit anaç kombinasyonlarında fidan randımanına etkileri üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, 57 s.
- SACHADYN, P. and KUR, J. 1997. A new PCR systems for *Agrobacterium tumefaciens* detection based on amplification of T-DNA fragment. *Acta Microbiol. Pol.*, 46 (2): 145-156.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. and ERLICH, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487-491.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. and ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732): 1350-1354.
- SALM, H. and GEIDER, K. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathol.*, 53 (5): 602-610.
- SALOMONE, J.Y., CROUZET, P., De RUFFRAY, P. and OTTEN, L. 1996. Characterization and distribution of tartarate utilization genes in the grapevine pathogen *Agrobacterium vitis*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 9 (5): 401-408.
- SASSER, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. *Microbial ID, Inc.*, 1-6.
- SAWADA, H. 1994. Studies on differentiation and taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. Extra*, 5: 1-110.
- SAWADA, H., ICKI, H., OYAIZU, H. and MATUMOTO, S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43 (4): 694-702.
- SAWADA, H. and IEKI, H. 1992-a. *Agrobacterium* crown gall of kiwifruit caused by *tumefaciens* in Japan. *Plant Dis.*, 76 (2): 212.
- SAWADA, H. and IEKI, H. 1992-b. Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 58: 37-45.
- SAWADA, H., IEKI, H., KOBAYASHI, S. and OIYAMA, I. 1992-a. Grouping of tumorigenic *Agrobacterium* spp. based on Ti plasmid-related phenotypes. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 58: 244-252.
- SAWADA, H., IEKI, H. and MATSUDA, I. 1995. PCR detection of Ti and Ri Plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (2): 828-831.

- SAWADA, H., IEKI, H., OYAIZU, H. and MATSUMOTO, S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43 (4): 694-702.
- SAWADA, H., IEKI, H. and TAKIKAWA, Y. 1990. Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 56: 199-206.
- SAWADA, H., IMADA, J. and IEKI, H. 1992-b. Serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 determined using somatic antigens. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 58: 52-57.
- SAWADA, H., IMADA, J. and IEKI, H. 1992-c. Evaluation of serodiagnosis for differentiating serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 58: 91-94.
- SAWADA, H., TAKIKAWA, Y. and IEKI, H. 1992-d. Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 58: 46-51.
- SAYLER, R.J., CARTWRIGHT, R.D. and YANG, Y. 2006. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *Plant Dis.*, 90 (5): 603-610.
- SCHAAD, N.W., CHEONG, S.S., TAMAKI, S., HATZIOUKAS, E. and PANOPOULOS, N.J. 1995. A combined biological amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*, 85 (2): 243-248.
- SCHAAD, N.W., BERTHIER-SCHAAD, Y., SECHLER, A. and KNORR, D. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. *Plant Dis.*, 83 (12): 1095-1100.
- SCHAAD, N.W., SONG, W.Y. and HATZIOUKAS, E. 2000. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. United States Patent No. 6146834.
- SCHAAD, N.W. and FREDERICK, R.D. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can. J. Plant Pathol.*, 24 (3): 250-258.
- SCHAAD, N.W., OPGENORTH, D. and GAUSH, P. 2002. Real-time PCR for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology*, 92 (7): 721-728.
- SCHROEDER, G., WAFFENSCHMIDT, S., WEILER, E.W. and SCHROEDER, J. 1984. The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *Eur. J. Biochem.*, 138 (2): 387-391.
- SCHROTH, M.N., McCHAIN, A.H., FOOTT, J.H. and HUISMAN, O.C. 1988. Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant Dis.*, 72 (3): 241-246.
- SCHROTH, M.N., THOMPSON, J.P. and HILDEBRAND, D.C. 1965. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*-*A. radiobacter* group from soil. *Phytopathology*, 55: 645-647.
- SCHROTH, M.N., WEINHOLD, A.R., McCAIN, A.H., HILDEBRAND, D.C. and ROSS, N. 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia*, 40 (15): 537-552.
- SCHULZ, T.F., LORENZ, D., EICHHORN, K.W. and OTTEN, L. 1993. Amplification of different marker sequences for identification of *Agrobacterium vitis* strains. *Vitis*, 32 (3): 179-182.

- SCIACKY, D., MONTROYA, A.L. and CHILTON, M.D. 1978. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmid*, 1 (2): 238-253.
- SCOGGAN, H. J. 1978. Flora of Canada. Ottawa Publication, Ottawa 545 p.
- SHAFFER, R., SAMPAIO, T.L., PINKERTON, J. and VASCONCELOS, M.C. 2004. Grapevine Rootstocks for Oregon Vineyards. *Ohio State University Extension Fact Sheets*, 1-11.
- SHAMS, M. 2012. Assessing the diversity of agrobacterial populations. Ph.D. Thesis, Claude Bernard University, 96 p.
- SHAMS, M., CAMPILLO, T., LAVIRE, C., MULLER, D., NESME, X. and VIAL, L. 2012. Rapid and Efficient Methods to Isolate, Type Strains and Determine Species of *Agrobacterium* spp. in Pure Culture and Complex Environments. In: J.C. Jimenez-Lopez (Editor), *Biochemical Testing*, InTech Press, pp. 3-20, New York.
- SHAMS, M., VIAL, L., CHAPULLIOT, D., NESME, X. and LAVIRE, C. 2013. Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using recA-based PCR. *Syst. Appl. Microbiol.*, 36 (5): 351- 358.
- SHEIKHOLESLAM, S., LIN, B.C. and KADO, C.I. 1979. Multiple-size plasmids in *Agrobacterium radiobacter* and *A. tumefaciens*. *Phytopathology*, 69 (1): 54-58.
- SHENG, J. and CITOVSKY, V. 1996. *Agrobacterium* plant cell DNA transport: have virulence proteins will travel. *Plant Cell*, 8 (10): 1699-1710.
- SHIM, J.S., FARRAND, S.K. and KERR, A. 1987. Biological control of crown gall: construction and testing of new biocontrol agents. *Phytopathology*, 77 (3): 463-466.
- SLATER, S.C., GOODNER, B.W., SETUBAL, J.C., GOLDMAN, B.S., WOOD, D.W. and NESTER, E.W. 2008. The *Agrobacterium tumefaciens* C58 Genome. T. Tzfira, V. Citovsky (Editors), *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Springer, pp. 149-181, New York.
- SLATER, S.C. et al. 2009. Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J. Bacteriol.*, 191 (8): 2501-2511.
- SMIT, G., LOGMAN, T.J., BOERRIGTER, M.E., KIJNE, J.W. and LUGTENBERG, B.J. 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae Ca²⁺ dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips. *J. Bacteriol.*, 171 (7): 4054-4062.
- SMITH, E.F. 1916. Crown gall studies showing changes in plant structures due to a changed stimulus. *J. Agric. Res.*, 6: 179-182.
- SMITH, E.F. and TOWNSEND, C.O. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25 (643): 671-673.
- SMITH, E.F., BROWN, N.A. and McCULLOCH, L. 1912. The structure and development of crown gall. *U.S. Dep. Agric. Bureau Plant Industry Bull.*, 255: 1-60.
- SMITH, E.F., BROWN, N.A. and TOWNSEND, C.O. 1911. Crown gall of plants: its cause and remedy. *U.S. Dep. Agric. Bureau Plant Industry Bull.*, 213: 1-200.
- SOLTANI, J., Van HEUSDEN, G.P.H. and HOOYKAAS, P.J.J. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of non-plant organisms: from biology to biotechnology. T. Tzfira, V. Citovsky (Editors), *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*, Springer, pp. 649-675, New York.

- SÖYLEMEZOĞLU, G., AĞAOĞLU, Y. S., MARASALI, B., ERGÜL, A., ÇALIŞKAN, M. ve TÜRK BEN, C. 1998. Üzüm çeşitlerinin yaprak kökenli kateşol oksidaz (Co), Peroksidaz (Per) ve Esteraz (Est) izoenzimlerinden yararlanılarak tanımlanmaları. Türkiye IV. Bağcılık Sempozyumu, ss. 138-144, 20-23 Ekim, Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova.
- SÖYLEMEZOĞLU, G., DUMANOĞLU, H., ÇELİK, H., KUNTER, B., ATICI, A. ve TAHMAZ, H. 2010. Türkiye’de Asma ve Meyve Fidanı Üretimi ve Kullanımı. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, ss. 891-907, 11-15 Ocak, Milli Kùtùphane, Ankara.
- STAPHORST, J.L., Van ZYL, F.G.H., STRIJDOM, W.B. and GROENEWOLD, Z.E. 1985. Agrocine-producing pathogenic and nonpathogenic biotype-3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype-3 pathogens. *Curr. Microbiol.*, 12 (1): 45-52.
- STEFANI, E. and RUDOLPH, K. 1989. Induced resistance in bean leaves pretreated with extracellular polysaccharides from phytopathogenic bacteria. *J. Phytopathol.*, 124 (3): 189-199.
- STEWART, E.L., WENNER, N.G., LONG, L. and OVERTON, B. 2005. Crown gall of grape: understanding the disease, prevention and management. *Pennsylvania State University Extension Fact Sheets*, 1-5.
- STOCKWELL, V.O., MOORE, L.W. and LOPER, J.E. 1993. Fate of *Agrobacterium radiobacter* K84 in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (7): 2112-2120.
- STOVER, E.W. 1993. Resistance to crown gall in vitis: studies directed toward the identification of crown gall resistant rootstocks. Ph.D. Thesis, University of Maryland, 298.
- STOVER, E.W., BURR, T.J. and SWARTZ, H.J. 1996. Transformation of crown gall resistant and susceptible Vitis genotypes by *Agrobacterium vitis*. *Vitis*, 35 (1): 29-33.
- STOVER, E.W., SWARTZ, H.J. and BURR, T.J. 1997. Crown gall formation in a diverse collection of Vitis genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48 (1): 26-32.
- SUDARSHANA, P., McCLEAN, A.E. and KLUEPFEL, D.A. 2006. Effect of temperature and detergents on *Agrobacterium tumefaciens*, the causal pathogen of crown gall disease of walnut. *Phytopathology*, 96 (2): 89.
- SUZAKI, K., YOSHIDA, K. and SAWADA, H. 2004. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *J. Gen. Plant Pathol.*, 70 (6): 342-347.
- SUZUKI, K., HATTORI, Y., URAJI, M., OHTA, N., IWATA, K., MURATA, K., KATO, A. and YOSHIDA, K. 2000. Complete nucleotide sequence of a plant tumorinducing Ti plasmid. *Gene*, 242 (1-2): 331-336.
- SULE, S. 1978. Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. *J. Appl. Microbiol.*, 44 (2): 207-213.
- SULE, S. and 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 Pathol.*, 47 (1): 84-88.
- SULE, S., LEHOCZKY, J., JENSER, G., NAGY, P. and BURR, T.J. 1995. Infection of grapevine roots by *Agrobacterium vitis* and *Meloidogyne hapla*. *J. Phytopathol.*, 143 (3): 169-171.

- SULE, S., MOZSAR, I. and BURR, T.J. 1994. Crown gall resistance of *Vitis* spp. and grapevine rootstocks. *Phytopathology*, 84 (6): 607-611.
- SZEGEDI, E. 1985. Host range and specific L(+) tartrate utilization of biotype 3 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.*, 20: (1-2): 17-20.
- SZEGEDI, E. 2003. Opines in naturally infected grapevine crown gall tumors. *Vitis*, 42 (1): 39-41.
- SZEGEDI, E. and BOTTKA, S. 2002. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis*, 41 (1): 37-42.
- SZEGEDI, E., BOTTKA, S., MIKULAS, J., OTTEN, L. and SULE, S. 2005. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. *Vitis*, 44 (1): 49-54.
- SZEGEDI, E., CZAKO, M. and OTTEN, L. 1996. Further evidence that the vitopine-type pTi's of *Agrobacterium vitis* represent a novel group of Ti plasmids. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 9 (2): 139-143.
- SZEGEDI, E., CZAKO, M., OTTEN, L. and KONCZ, C.S. 1988. Opines in crown gall tumors induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 32 (2): 237-247.
- SZEGEDI, E. and NEMETH, J. 1996. Investigation of grape shoots for *Agrobacterium vitis*. *Novenyvedelem*, 32: 605-609.
- SZEGEDI, E., OTTEN, L. and CZAKO, M. 1992. Diverse types of tartrate plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* biotype III strains. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 5 (5): 435-438.
- SZEGEDI, E., SULE, S. and BURR, T.J. 1999. *Agrobacterium vitis* strain F2/5 contains tartrate and octopine utilization plasmids which do not encode functions for tumor inhibition on grapevine. *J. Phytopathol.*, 147 (11-12): 665-669.
- TANAKA, K., URBANCZYK, H., MATSUI, H., SAWADA, H. and SUZUKI, K. 2006. Construction of physical map and mapping of chromosomal virulence genes of the biovar 3 *Agrobacterium* (*Rhizobium vitis*) strain K-Ag-1. *Genes Genet. Syst.*, 81 (6): 373-380.
- TARBAH, F.A. and GOODMAN, R.N. 1986. Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system. *Plant Dis.*, 70 (6): 566-568.
- TARBAH, F.A. and GOODMAN, R.N. 1987. Systemic spread of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in the vascular system of grapes. *Phytopathology*, 77 (6): 915-920.
- TATE, M.E., MURPHY, P.J., ROBERTS, W.P. and KERR, A. 1979. Adenine N6-substituent of agrocin 84 determines its bacteriocin-like specificity. *Nature*, 280: (5724): 697-699.
- TAWFIK, A.E. 1990. Comparison of biological and chemical soil treatments for controlling crown gall in peach. *Agr. Res. Rev.*, 68 (3): 555-561.
- TEMİZKAN, G., YILMAZER, S., ÖZTÜRK, M., ARI, Ş., ERTAN, H., SARIKAYA, A.T. ve ARDA, N. 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Yayınları, İstanbul, 345 s.
- THIES, K.L., GRIFFIN, D.E., GRAVES, C.H. and HEGWOOD, C.P. 1991. Characterization of *Agrobacterium* isolates from muscadine grape. *Plant Dis.*, 75 (6): 634-637.

- THOMASHOW, M.F., NUTTER, R., POSTLE, K., CHILTON, M.D., BLATTNER, F.R., POWELL, A., GORDON, M.P. and NESTER, E.W. 1980. Recombination between higher plant DNA and the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (11): 6448-6452.
- THOMSON, J.A. 1986. The potential for biological control of crown gall disease on grapevines. *Trends Biotechnol.*, 4 (8): 219-224.
- TIAN, C.F., WANG, E.T., WU, L.J., HAN, T.X., CHEN, W.F., GU, C.T., GU, J.G. and CHEN, W.X. 2008. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58 (12): 2871-2875.
- TIGHE, S.W., De LAJUDIE, P., DIPIETRO, K., LINDSTROM, K., NICK, G. and JARVIS, B.D.W. 2000. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50 (2): 787-801.
- TOLBA, I.H. and SOLIMAN, M.A. 2013. Efficacy of native antagonistic bacterial isolates in biological control of crown gall disease in Egypt. *Ann. Agric. Sci.*, 58 (1): 43-49.
- TOLBA, I.H. and ZAKI, M.F. 2011. Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. *Ann. Agric. Sci.*, 56 (2): 113-119.
- TORO, N., DATTA, A., CARMI, O.A., YOUNG, C., PRUSTI, R. K. and NESTER, E.W. 1989. The *Agrobacterium tumefaciens virC1* gene products binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *J. Bacteriol.*, 171 (12): 6845-6849.
- TOUMEY, J.W. 1900. An inquiry into the cause and nature of crown gall, *Bull. Univ. Ariz. Agric. Exp. Stn.*, 33: 7-64.
- TREMBLAY, G., GAGLIARDO, R., CHILTON, W.S. and DION, P. 1987-a. Diversity among opine-utilizing bacteria: identification of coryneform isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (7): 1519-1524.
- TREMBLAY, G., LAMBERT, R., LEBEUF, H. and DION, P. 1987-b. Isolation of bacteria from soil and crown-gall tumors on the basis of their capacity for opine utilization. *Phytoprotection*, 68 (1): 35-42.
- TURK, S.C.H.J., NESTER, E.W. and HOOYKAAS, P.J.J. 1993. The *virA* promoter is a host-range determinant in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.*, 7 (5): 719-724.
- TÜRKMENOĞLU, Z., KAYA, S. ve GÜNDOĞDU, M. 1974. Ege Bölgesi bağlarında zarar yapan bağ kanseri (*Agrobacterium tumefaciens* Smith et Townsend Conn).’ne karşı uygun mücadele metodunun tesbiti. *Bitki Koruma Bülteni*, 14 (4): 235-248.
- TZFIRA, T. and CITOVSKEY, V. 2002 Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.*, 12 (3): 121-129.
- UNGER, L., ZIEGLER, S.F., HUFFMAN, G.A., KNAUF, V.C., PEET, R., MOORE, L.W., GORDON, M.P. and NESTER, E.W. 1985. New class of limited-host-range-*Agrobacterium* mega-tumor-inducing plasmid lacking homology to the transferred DNA of a wide-host-range, tumor-inducing plasmid. *J. Bacteriol.*, 164 (2): 723-730.
- URBANCZYK, H., SUZUKI, K., YOSHIDA, K. and KONDO, K. 2003. Physical and gene maps of *Agrobacterium* biovar 2 strains and their relationship to biovar 1 chromosomes. *Microbiology*, 149 (10): 3035-3042.

- UZUN, H.İ. 1996. Bağcılık. Akdeniz Üniversitesi Yayınları. Antalya 74 s.
- ÜZÜMERİ, E. 1938. Türkeli Bağcılığının Vatanı. Vilayet Matbaası, Niğde. 78 s.
- VALENTINE, L. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: the David and Goliath of modern genetics. *Plant Physiol.*, 133 (3): 948-955.
- Van BECKHOVEN, J.R.C.M., STEAD, D.E. and Van Der WOLF, J.M. 2002. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. *J. Appl. Microbiol.*, 93 (5): 840-849.
- Van HAAREN, M.J.J., PRONK, J.T., SCHILPEROORT, R.A. and HOOYKAAS, P.J.J. 1987. Functional analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti-plasmid left and right T-Region border fragments. *Plant Mol. Biol.*, 8 (1): 95-104.
- Van LAREBEKE, N., GENETELLO, C., SCHELL, J., SCHILPEROORT, R.A., HERMANS, A.K., Van MONTAGU, M. and HERNALSTEENS, J.P. 1975. Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature*, 255 (5511): 742-743.
- Van NUENEN, M., De RUFFRAY, P. and OTTEN, L. 1993. Rapid divergence of *Agrobacterium vitis* octopine-cucumopine Ti plasmid from a recent common ancestor. *Mol. Gen. Genet.*, 240 (1): 49-57.
- VANDROEMME, J., BAEYEN, S., Van VAERENBERGH, J., De VOS, P. and MAES, M. 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathol.*, 57 (3): 438-444.
- VAUDEQUIN-DRANSART, V., PETIT, A., PONCET, C., PONSONNET, C., NESME, X., JONES, J.B., BOUZAR, H., CHILTON, W.S. and DESSAUX, Y. 1995. Novel Ti plasmids in *Agrobacterium* strains isolated from fig tree and chrysanthemum tumors and their opinelike molecules. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8 (2): 311-321.
- VAVILOV, N.I. 1926. Studies on the origin of cultivated plants. *Bull. Appl. Bot. Genet. Pl. Breed.*, 16 (2): 1-248.
- VERGUNST, A.C., SCHRAMMEIJER, B., Den DULK-RAS, A., De VLAAM, C.M., REGENSBURG-TUINK, T.J. and HOOYKAAS, P.J.J. 2000. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*, 290 (5493): 979-982.
- VICEDO, B., PENALVER, R., ASINS, M.J. and LOPEZ, M.M. 1993. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra⁻ mutant strain K1026. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (1): 309-315.
- VILLEMONT, E., DUBOIS, F., SANGWAN, R.S., VASSEUR, G., BOURGEOIS, Y. and SANGWAN-NORREEL, B.S. 1997. Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta*, 201 (2): 160-172.
- VIZITIU, D. and DEJEU, L. 2011. Crown gall (*Agrobacterium* spp.) and grapevine. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, 15 (1): 130-138.
- VIZITIU, D., DEJEU, L., RADULESCU, I. and POPESCU, C.F. 2012. Preventing and limiting the spread of crown gall in vineyards. *Scientific Papers, Series B, Horticulture*, 56: 203-210.
- VOUILLAMOZ, J.F., GRANDO, M.S., ERGUL, A., AGAOGLU, Y.S., TEVZADZE, G., MEREDITH, C.P. and McGOVERN, P. 2003. Is Transcaucasia the cradle of viticulture? DNA might provide an answer. 3rd Symposium of the International

- Association of History and Civilization of the Vine and the Wine, pp. 1-12, 5-8 October, University of Madeira, Funchal.
- WAGNER, P.M. 1976. Grapes into Wine. Knopf Press, New York, 336 p.
- WALCOTT, R.R. and GITAITIS, R.D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.*, 84 (4): 470-474.
- WANG, K., HERRERA-ESTRELLA, L., Van MONTAGU, M. and ZAMBRYSKI, P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell*, 38 (2): 455-462.
- WANG, Y.H., ZHANG, L.Q., LI, J.Y., WANG, J.H. and WANG, H.M. 2008. The quorum-sensing system AvsR-AvsI regulates both long-chain and short-chain acyl-homoserine lactones in *Agrobacterium vitis* E26. *A. Van Leeuw. J. Microb.*, 93 (3): 267-273.
- WASSENEGGER, M. 2001. Advantages and disadvantages of using PCR techniques to characterize transgenic plants. *Mol. Biotechnol.*, 17 (1): 73-82.
- WEBSTER, J., Dos SANTOS, M. and THOMSON, J.A. 1986. Agrocine-producing *Agrobacterium tumefaciens* strains active against grapevine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52 (1): 217-219.
- WEI, Q., LI, J.Y., WANG, J.H. and WANG, H.M. 2009. Strain E26 of *Agrobacterium vitis*, a biological control agent of grapevine crown gall, does not contain *virA* and *virG* pathogenic determinants. *J. Phytopathol.*, 157 (11-12): 657-665.
- WEIBGEN, U., RUSSA, R., YOKOTA, A. and MAYER, H. 1993. Taxonomic significance of the lipopolysaccharide composition of the three biovars of *Agrobacterium tumefaciens*. *System. Appl. Microbiol.*, 16 (2): 177-182.
- WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A. and LANE, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173 (2): 697-703.
- WELLER, S.A., ELPHINSTONE, J.G., SMITH, N.C., BOONHAM, N. and STEAD, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (7): 2853-2858.
- WHATLEY, M.H., BODWIN, J.S., LIPPINCOTT, B.B. and LIPPINCOTT J.A. 1976. Role of *Agrobacterium* cell envelope lipopolysaccharide in infection site attachment. *Infect. Immun.*, 13 (4): 1080-1083.
- WHITE, L.O. 1972. The taxonomy of crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationships to rhizobia and other agrobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 72 (3): 565-574.
- WHITE, P.R. and BRAUN, A.C. 1941. Crown gall production by bacteria free tumor tissues. *Science*, 94 (2436): 239-241.
- WHITE, P.R. and BRAUN, A.C. 1943. A cancerous neoplasm of plants. Autonomous bacteria-free crown gall tissue. *P. Am. Philos. Soc.*, 86 (3): 467-469.
- WHITE, F.F. and NESTER, E.W. 1980. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. *J. Bacteriol.*, 144 (2): 710-720.
- WILLMITZER, L., De BEUCKELEER, M., LEMMERS, M., Van MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1980. DNA from Ti plasmid present in nucleus and absent from plastids of crown gall plant cells. *Nature*, 287 (5780): 359-361.

- WILLMITZER, L., DHAESE, P., SCHREIER, P.H., SCHMALENBACH, W., Van MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1983. Size, location and polarity of T-DNA encoded transcripts in nopaline crown gall tumors, common transcripts in octopine and nopaline tumors. *Cell*, 32 (4): 1045-1056.
- WINANS, S.C. 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol. Rev.*, 56 (1): 12-31.
- WINKLER, A.J., COOK, J.A., KLIEWER, W.M. and LIDER, L.A. 1974. General Viticulture. University of California Press, Los Angeles, 710 p.
- WISE, A.A., LIU, Z. and BINNS, A.N. 2006. Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains. In: K. Wang (Editor), *Agrobacterium* Protocols, Humana Press, pp. 7, New Jersey.
- WONG, M.L. and MEDRANO, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 (1): 75-85.
- WOOD, D.W. et al. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294 (5550): 2317-2323.
- XIAOYING, C. and WANGNIAN, X. 1986. A strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits growth and gall formation by biotype III strain of *A. tumefaciens* from grapevine. *Acta Microbiol. Sin.*, 26: 193-199.
- XIE, X.M., YOU, J.F., CHEN, P.M. and GUO, J.M. 1993. On a strain MI 15 of *Agrobacterium radiobacter* for the biological control of grapevine crown gall. *Acta Phytopathol. Sin.*, 23: 137-141.
- YADAV, N.S., POSTLE, K., SAIKI, R.K., THOMASHOW, M.F. and CHILTON, M.D. 1980. T-DNA of a crown gall teratoma is covalently joined to host plant DNA. *Nature*, 287 (5781): 458-461.
- YADAV, N.S., VANDERLEYDEN, J., BENNET, D.R., BARNES, W.M. and CHILTON, M.D. 1982. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 (20): 6322-6326.
- YAJIE, L., JAIYING, Z. and DEQUIN, M. 1990. A biotype 3 strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits crown gall formation on grapevine. *Acta Phytopathol. Sin.*, 30: 165-171.
- YAMAMOTO, S. and HARAYAMA, S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (3): 1104-1109.
- YANOFSKY, M., LOWE, E., MONTROYA, A., RUBIN, R., KRUL, W., GORDON, M. and NESTER, E.W. 1985. Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.*, 201 (2): 237-246.
- YILMAZ, S. and BASIM, H. 2006. Identification and detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* by Multiplex-PCR and Real-Time PCR. *Phytopathology*, 96, S128.
- YOUNG, J.M. 2004. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 (1): 149.
- YOUNG, J.M., KERR, A. and SAWADA, H. 2005. Genus II. *Agrobacterium* Conn 1942. In: G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Staley (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C*, Springer, pp. 340-345, New York.

- YOUNG, J.M., KUYKENDALL, L.D., MARTINEZ-ROMERO, E., KERR, A. and 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51 (1): 89-103.
- YUSIBOV, V.M, STECK, T.R., GUPTA, V. and GELVIN, S.B. 1994. Association of single-stranded transferred DNA from *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 (8): 2994-2998.
- ZAENEN, I., Van LAREBEKE, N., TEUCHY, H., Van MONTAGU, M. and SCHELL, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gallinducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.*, 86 (1): 109-127.
- ZAMBRYSKI, P., HOLSTERS, M., KRUGER, K., DEPICKER, A., SCHELL, J., Van MONTAGU, M. and GOODMAN, H.M. 1980. Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. *Science*, 209 (4463): 1385-1391.
- ZAUNER, S., CREASAP, J.E., BURR, T.J. and ULLRICH, C.I. 2006. Inhibition of crown gall induction by *Agrobacterium vitis* strain F2/5 in grapevine and *Ricinus*. *Vitis*, 45 (3): 131-139.
- ZORREGUIETA, A., GEREMIA, R.A., CAVAGNAC, S., CANGELOSI, G.A., NESTER, E.W. and UGALDE, R.A. 1988. Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1 (3): 121-127.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Ali TURGUT
Doğum Yeri : Serik/Antalya
Doğum Tarihi : 15.02.1983
Medeni Hali : Evli

EĞİTİM DURUMU

Önlisans : Anadolu Üniversitesi Tarım Bölümü (2011)
Lisans : Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2006)
Anadolu Üniversitesi İşletme Bölümü (2009)
Yüksek Lisans: Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Ana Bilim Dalı (2008)
Doktora : Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Ana Bilim Dalı (Devam Ediyor)
Yabancı Dil : İngilizce

İLETİŞİM

E-posta Adresi : aliturgut@akdeniz.edu.tr
Tarih : 2014