



Araştırma Makalesi

www.ziraat.selcuk.edu.tr/ojs
Selçuk Üniversitesi
Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi
25 (1): (2011) 115-124
ISSN:1309-0550



Konya İlinde Yaygın Olarak Yetiştirilen Asma Çeşitlerinde Bakteriyel Taç Uru (*Agrobacterium vitis*) 'nun Tanınması Üzerine Araştırmalar¹

Sebahat ALTINPARMAK², Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ^{2,3}

²Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, Konya/Türkiye

(Geliş Tarihi: 15.08.2009, Kabul Tarihi:07.10.2009)

ÖZET

İç Anadolu bölgesinde, farklı çeşitlerle asma yetiştiriciliği giderek önem kazanmaktadır. Konya iline bağlı 24 ilçede ve 14 adet farklı asma çeşidinde bakteriyel hastalıkların belirlenmesi amacıyla 2007–2008 yıllarında çalışmalar yürütülmüştür. Bakteriyel ur hastalığı, *Agrobacterium vitis*'in tanınmasında, Roy ve Sasser, King B, PDA besi yerlerinde gelişim, 37 °C' de gelişim, 3-ketolaktöz oluşumu, % 2' lik NaCl' de gelişim, L- tartarik asitten ve malonik asitten alkali oluşumu, sitrat kullanımı, pH=4,5' da pektolitik aktivite, pH=7' de hareketlilik, litmus milk testi, erytritol ve melezitöz'dan asit oluşumu, demir amonyum sitrat, PDA+CaCO₃'da asit temizleme testleri esas alınmıştır. Patojenisite testlerinde, Sultani Çekirdeksiz çeşidi asma fidanları, domates ve ayçiçeği bitkilerine yapılan 10⁸ hücre/ml bakteriyel inokulasyon sonucu tipik ur oluşumu gözlemlenmiştir. Moleküler tanı, *pehA* ve *virA* genlerinin PCR amplifikasyonu ile yapılmıştır. Toplam 309 asma örneğinden 280' inde *A. vitis* belirlenirken, izolatların çoğunluğunun tümörojenik karakterde olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, il genelinde asmalaradaki etmenle bulaşıklığın %90.61' lik oranla büyük önem taşıdığı, patojenin mevcut çeşitler içerisinde en fazla Sultani Çekirdeksiz, Cardinal, Hafızalı ve en az Ekşi Kara çeşitlerinde görüldüğü tespit edilmiştir.

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

Researches on Identification of Bacterial Crown Gall (*Agrobacterium vitis*) Disease on Grapevine Cultivars Grown as Widespread in Konya Province

Abstract

Grapevine has an importance gradually increasing with various cultivars of grapevine in Central Anatolia Region. With the aim of determining of bacterial diseases, the researches were carried on 14 various cultivars of grapevine and in 24 district of Konya Province in 2007–2008. In the identification of bacterial gall disease, *Agrobacterium vitis*, growth on Roy and Sasser, King's B, PDA mediums, growth at 37 °C, 3-ketolactose production, growth on 2% NaCl, production of alkaline from L- tartaric acid and malonic acid, using of citrate, at pH=4,5 pectolytic activity, at pH=7 motility, litmus milk test, acid from erythritol and melesitose, ferric ammonium citrate, acid cleaning on PDA+CaCO₃ tests were based. In the pathogenicity tests, it was observed formation of gall typically in the result of bacterial inoculation with 10⁸ cfu/ml concentrations on seedlings of grapevine cultivar Sultani Seedless, tomato and sunflower plants. It was made amplification of *pehA* and *virA* genes by PCR for molecular identification. While *A. vitis* was determined on 280 plants from totally 309 plant samples, the most of isolates had been observed tumorigenic character. Obtaining the results, rate of incidence has been as 90.61% has big importance and within all of the cultivars, pathogen was shown the most on cv. Sultani Seedless, cv. Cardinal, cv. Hafızalı and at the least on cv. Sour Black in the province.

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

Giriş

Dünyanın en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, asmanın (*Vitis vinifera* L.) gen merkezi olmasının yanısıra, son derece eski ve köklü bir bağcılık geleneğine sahiptir (Çelik ve ark., 2000).

Ülkemizde 2007 yılı toplam bağcılık alanı, 26.951.000 ha ve bunun tarım alanı içerisindeki payı ise %2 dir (Anonim, 2008). Türkiye, 2006 yılı verilerine göre üretim alanı bakımından İspanya, Fransa ve İtalya'dan sonra dünyada dördüncü, 3.500.000 ton üzüm üretim ile İtalya, Fransa, İspanya, ABD ve Çin'den sonra

dünyada altıncı sırada yer almaktadır (Anonymous, 2006; Anonim, 2006).

Yirmi birinci yüzyılda günümüz bağcılığını tehdit eden pek çok unsur bulunmaktadır. Bu unsurlar üretici hatalarından, hastalıklara kadar çok çeşitlilik göstermektedir. Asma bakteriyel etmenleri, *Agrobacterium vitis*, *A. tumefaciens* ve *Xylophilus ampelinus*' un birçok ülkede ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Cavara, 1897; Anderson ve ark., 1979; Burr ve Katz, 1984; Staphorst ve ark., 1985; Değın ve ark., 1987; Bishop ve ark., 1988; Stefani, 1989; Brisset ve ark., 1991; Canfield ve Moore, 1991; Sawada ve Ieki,

¹ Bu Makale Sebahat ALTINPARMAK'ın Yüksek Lisans tezinden hazırlanmıştır.

³Sorumlu Yazar: kbastas@selcuk.edu.tr

1992; Eastwell ve ark., 1995; Benlioğlu ve Özakman, 1998; Burr ve ark., 1998; Bazzi ve ark., 1999; Alexandrova ve ark., 2000; Cubero ve Lopez, 2001; Khlaif, 2003; Kawaguchi ve ark., 2005; Grall ve ark., 2005).

Türkiye'nin farklı bölgelerindeki (İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu, Ege ve Akdeniz Bölgeleri) asma hastalıklarını belirlemek için çeşitli çalışmalar yürütülmüş ve asma bitkisinde *A. vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*'in patojen oldukları saptanmıştır (Benlioğlu ve Özakman, 1998; Argun, 2001; Demir ark., 2002; Küsek, 2007).

A. vitis, asmalarda taç uruna neden olan (Burr ve Katz, 1983), asmalarda belirti vermeksizin bulunabilen bakteriyel bir etmendirdir. Bu nedenle çoğaltma materyali ile çok rahatlıkla taşınabilmekte ve ancak ur oluşumu görüldükten sonra fark edilebilmektedir. Bu şekilde özellikle ülke içinde hızlı ve yoğun bir şekilde dağılım göstermektedir. Tüm dünyada asmalarda ekonomik kayıplara neden olan hastalıkların başlıcalarından sayılan etmen, asmanın dışında ayçiçeği, tütün, domates, gül, krizantem, *Datura* sp., *Bryophyllum* sp.' de ur oluşturabilmektedir (Ophel ve Kerr, 1990). *A. vitis*, toprak kökenli bir patojen olmasının yanısıra ur oluşturan ve oluşturmeyen izolatlar asmanın iletim demetlerinde uzun yıllar kalabilmektedir (Lehoczky, 1968).

Bu çalışmada Konya ilinde, farklı asma çeşitlerinde, ekonomik zararlara neden olan bakteriyel patojen *A. vitis*' in, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanısının yapılarak, il genelinde hastalıkla bulaşıklılığın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Bitki Materyali

Çalışmanın ana bitkisel materyalini Konya ilinde, yoğun asma yetiştiriciliği yapılan 24 ilçe (Cihanbeyli, Güneysınır, Meram, Hüyük, Seydişehir, Hadim, Beyşehir, Akören, Ahırılı, Yalılıyüyük, Derebucak, Bozkır, Selçuklu, Ilgın, Derbent, Doğanhisar, Yunak, Çayırbağı, Karadığın, Akşehir, Tuzlukçu, Çumra, Kadınhanı ve Taşkent) ve mevkilerindeki bağ alanlarından toplanan semptomlu ve semptomsuz asma örnekleri oluşturulmuştur. Patojenisite çalışmalarında asma (*Vitis vinifera* cv. Sultani Çekirdeksiz), domates (*Lycopersicon esculentum* cv. Heinz 2274) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus* cv. Ekiz1) bitkileri kullanılmıştır.

Referans bakteri kültürleri

Etmenin tanısı için yapılan tüm testlerde, pozitif kontroller *Agrobacterium vitis* Av8 (Ank. Zir. Müc. Araş. Enst, Ankara), NCPPB2611 ve negatif kontrol olarak *Agrobacterium tumefaciens* (Atk18) (Selçuk Üniv. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü) isimli referans kültürler kullanılmıştır.

Metot

Örneklerin toplanması

Asma örneklerini toplamak amacıyla, bağ alanlarına ilkbahar yaz ve sonbahar aylarında gidilerek taze ur oluşturmuş bitkilerin ve semptomsuz bitkilerin dal ve omcalarından örnekler alınmış ve polietilen torbalarda ve buzluk içerisinde laboratuara getirilmiştir. Örnekleme yapılan ilçe ve mevkilerinden toplam 309 adet örnek toplanmıştır. Örnekler toplanırken özel bir örnekleme metodu kullanılmamış, örnekleme sayısı bağ alanı büyüklüğüne göre değil bağdaki hasta asma sayısına göre değişmiştir (Burr ve Katz, 1984; Tarbah ve Goodman, 1986; Argun, 2001).

Agrobacterium vitis izolasyonu

Laboratuara getirilen taze urlu dokular %1'lik sodyum hipoklorit ile 3 dakika yüzeysel dezenfekte edildikten sonra 3 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra bir bistüri yardımıyla urun üst tarafı hafifçe soyularak alttaki taze canlı dokudan küçük parçalar alınmıştır. Bu parçalar daha sonra bir havanda steril fizyolojik tuzlu su (%8,5 NaCl) içerisinde homojenize edilmiştir. Bir saat bekledikten sonra bu süspansiyondan bir öze alınarak King B (KB) ve Patates Dekstroz Agar+CaCO₃ (PDA+CaCO₃), NA, YDC, Kado 523 besiyerleri üzerine çizilerek ekim yapılmış ve petriyeler 25±1°C'de 2 gün inkübatörde inkübe edilmiştir (Schaad, 2001; Küsek, 2007). Alternatif bir yöntem olarak iletim demetlerinden izolasyon yöntemi de kullanılmıştır. Buna göre özellikle ilkbaharda eğer bitkide *A. vitis* mevcut ise iletim demetlerindeki sızıntıdan direkt seçici besiyeri (Roy ve Sasser; Mg₂SO₄ 7H₂O: 0,2gr, KH₂PO₄: 0,7gr, Adonitol: 0,4gr, Yeast ekstrakt: 0,14gr, K₂HPO₄: 0,9gr, NaCl: 0,2 gr, H₃BO₃: 1 gr, Agar: 15 gr, Chlorothalonil %4 sıvı: 0,5 ml saf su: 1000ml, pH:7,2. Otoklavdan sonra Trimethoprim: 20 mg, Tripheniltetrazolium klorid: 80 mg, D-cycloserine: 20 mg) üzerine çizim yapılarak bakterinin gelişimi izlenmiştir (Schaad, 2001).

Tüm izolasyonlardan sonra çizgi ekimle saflaştırılan ve Roy ve Sasser besiyerinde *A. vitis* olarak tanılanan kültürler %25' lik gliserol stok çözeltisiyle -30 °C' lik derin dondurucuda saklanmışlardır (Schaad, 2001; Lelliott ve Stead, 1987).

Etmenin tanısı

Biyokimyasal testler

Etmenin tanısı için, PDA+CaCO₃ besi yerinde asit temizleme, laktozdan 3-ketolaktöz üretimi, demir amonyum sitrat kullanımı, %2 NaCl içeren besi yerinde gelişme, erythritol, melesitoz ve sakkarozdan asit oluşturma, oksidaz testi, sitrat kullanımı, litmus milk'de reaksiyon, malonik asit, L-tartarik asit ve mucic asitten alkali oluşturma ve 35°C'de gelişme testleri Moore ve ark. (2001)'na göre yapılmıştır. Etmenin teşhisinde kullanılan biyokimyasal testler,

her bir izolat için en az 3'er tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Tütünde hipersensitif reaksiyon testi (HR)

Elde edilen *A. vitis* izolatlarının hipersensitif reaksiyon oluşturma durumları incelenmiştir (Nadolny ve Sequeira, 1980; Burr ve Katz, 1983). Denemelerde *Nicotiana tobaccum* var. White Burley tütün çeşidi kullanılmış ve bitkiler iklim odası koşullarında (%70–80 nispi nem, 23–25 °C sıcaklık 16 saat ışıklı ve 8 saat karanlıkta) yetiştirilmiştir.

Bakteriyel inokulum hazırlamak amacıyla *A. vitis* izolatları, PDA besi yerinde geliştirilmişlerdir. PDA besi yerinde 28 °C' de 24 saat geliştirilen kültürlerden steril saf su ile, spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda 0.15 OD'de 10⁸ hücre/ml lik süspansiyonlar hazırlanmıştır.

Çiçeklenme döneminden önceki tütün bitkilerinin inokulasyona uygun yaprakların (çok fazla ince damar içermeyen düzgün hatlı yapraklar) damar aralarındaki alanlara 0.46 çapındaki hipodermik enjektör yardımıyla bakteriyel süspansiyon enjekte edilmiştir. Bitki ya da yaprak yapısından kaynaklanan farklılıkları engelleyebilmek amacıyla, izolatlar farklı bitkilerin farklı yapraklarına ayrı ayrı inokule edilmiştir. Her bir yaprağa ortalama 3 farklı izolat inokule edilirken, bir izolat en az 3 farklı yaprağa inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonraki 48 saat içerisinde doku nekrozuna sebep olan izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir.

Patojenisite testleri

Elde edilen izolatların patojenisite testleri için, asmanın (*Vitis vinifera* cv. Sultani Çekirdeksiz) yanı sıra domates (*Lycopersicon esculentum* cv. Heinz 2274) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus* cv. Ekiz1) bitkileri kullanılmıştır. İzole edilen bakteriler PDA besi yerinde 25±1°C'de 2 gün geliştirildikten sonra 3 haftalık domates ve ayçiçeği bitkilerine 10⁸ hücre/ml yoğunlukta *A. vitis* süspansiyonu steril bir kürdan yardımı ile inokule edilmiştir. İnokule edilmiş bitkiler iklim odasında (16 saat ışık, 8 saat karanlık, %70-80 nispi nem ve 23-25°C sıcaklık) 3 hafta süreyle bekletilmişler ve ur oluşturup oluşturmamasına göre değerlendirilmiştir (Siddigui ve Shaikat, 2002; Yan ve ark., 2002).

Moleküler tanı

DNA izolasyonu

Urlu dokulardan elde edilen *A. vitis* izolatları, Nutrient Broth sıvı besi yerinde ve çalkalayıcıda (200 dev./dk.) gece boyu 27±1°C'de geliştirilmiştir. Bakteri DNA'sı, De Boer ve Ward (1995)'a göre izole edilmiştir. Buna göre; nutrient broth sıvı besi yerinde gelişen bakterilerden 1 ml steril ependorf tüplere alınmış ve 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Pellet alınarak hücreleri parçalamak için üzerine %1'lik SDS+TAE bufferdan 100 µl eklenmiş ve tüp karıştırıcıda iyice

karıştırılmıştır. Ependorf tüpler 50°C'de su banyosunda 3 saat bekletildikten sonra üzerine 50 µl 7,5 M amonyum asetat ilave edilmiş ve 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek amonyum asetat artıklarının altta toplanması sağlanmıştır. Ependorf tüpün üst kısmında toplanan DNA kesik bir pipet ucu ile alınmıştır (yaklaşık 130 µl). Eşit miktarda (yaklaşık 130 µl) soğutulmuş isopropanol ilave edilmiş ve -20°C'de 45 dk bekletilmiştir. Daha sonra ependorf tüpler 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve pellet alınarak üzerine soğuk %70'lik alkolden 100 µl ilave edilmiştir. Ependorf tüpler 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra ependorf tüpler ters çevrilerek alkol uzaklaştırılmış ve 1 sa steril kabin içerisinde kurutulmaya bırakılmıştır. Daha sonra ependorf tüpler içerisine 50 µl didistile su (ddH2O) ilave edilerek DNA iyice eritilmiştir. İzole edilen DNA'lar -20°C'de daha sonra PCR çalışmalarında kullanmak için muhafaza edilmiştir.

***A. vitis*'in *virA* ve *pehA* genlerinin amplifikasyonu**

PCR çalışmalarında *A. vitis*' in,

virA geninin amplifikasyonu için;

F5'TTCAGTCGCGCAAGCAGTT3'

R5'CGGCAATTCGTATCACGGA3'primerleri,

pehA gen bölgesi için;

F-5'CGATGGCGGCGAGGATTT-3'

R-5'ATCGGGCGTGAAACAAGT3'

spesifik primerleri kullanılmıştır (Eastwell ve ark., 1995).

Toplam 25 µl hacimde hazırlanan PCR solusyonunun içeriği; bakteri DNA' sı 2 µl, PCR Master Mix (0.05 ünite/ µl *Taq* DNA, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP ve 0.4 mM dTTP (Fermantas K0171)) 12.5 µl, Forward primer 2 µl, Revers primer 2 µl, di distile saf su 6.5 µl şeklinde olmuştur.

A. vitis'in tanısında kullanılan *virA* ve *pehA* genlerinin PCR protokolü; 96°C'de 2 dk inkübasyon adımıyla başlatılmış ve 94°C'de 1 dk denaturasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlama ve 72°C'de 30 sn ampikon sentezi olacak şekilde toplam 40 döngüye tamamlanmış ve 72°C'de 5 dk inkübasyon ile tamamlanmıştır. Termal cycler (Eppendorph mastercycler personal)' da programlanarak uygulanmıştır. Amplifiye edilen *virA* gen bölgesi için 480 bp' de ve *pehA* gen bölgesi için 200 bp'de bant oluşturması beklenilmiştir (Eastwell ve ark., 1995).

Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jelde elektroporasyona tabi tutulmuş, agaroz jelde oluşan DNA bantlarının (Sambrook ve Russell, 2001), transilluminatörde (Vilber Lourmat) ve Biolab, Quantity One Imaging and Analysis PDQest 2-D Gel Analysis Software, User Guide for Version 4.1 Windows ile analiz edilmiştir.

Patojenin il genelinde bulaşıklık oranının belirlenmesi

İldeki etmenle yüzde bulaşıklık oranı (IB), ildeki etmenle bulaşık örnek sayısının (\sum ibt), ilden toplanan toplam örnek sayısına (\sum its) yüzde oranlanması,

$$IB (\%) = \frac{\sum ibt}{\sum its} \times 100$$

olarak hesaplanmıştır.

Araştırma Bulguları

Konya ilinde asmalarda *A. vitis*' in varlığını belirlemek amacıyla Cihanbeyli, Güneysınır, Meram, Hüyük, Seydişehir, Hadim, Beyşehir, Akören, Ahırlı, Yahhüyük, Derebucak, Bozkır, Selçuklu, Ilgın, Derbent, Karadığın, Çayırbağı, Doğanhisar, Yunak, Akşehir, Tuzlukçu, Çumra, Kadınhanı ve Taşkent ilçeleri ve mevkilerindeki bağ alanları ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında gezilmiş semptomlu ve semptomsuz bitkilerden örnekler alınarak incelenmiştir.

Yapılan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, moleküler ve patojenisite testleri sonucunda toplam 309 bitki örneğinden toplam 280 *A. vitis* izolatu elde edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, il genelindeki asmalarda etmenle bulaşıklık oranı %90,61' lik oranla büyük önem taşıdığı patojenin, toplanan 14 farklı çeşit (Sultani Çekirdeksiz, Pembe Çekirdeksiz, Kalecik Karası, Kardinal, Kadın Parmağı, Hafızali, Emir, Karagevrek, Alphonse Laval, Hasan Dede, Razakı, Italia, Gülüzümü, Eksikara) içerisinde en fazla Sultani çekirdeksiz, Cardinal, Hafızali ve en az Eksikara çeşitlerinde bulunduğu tesbit edilmiştir (Tablo 2). Ayrıca hastalıkla bulaşıklık durumu ilçeler düzeyinde incelendiğinde en yüksek % 100 ile Hadim, Beyşehir, Ahırlı,

Yahhüyük, Derebucak, Yunak, Karadığın de ve en düşük %33,33 ile Akşehir ve Kadınhanı ilçelerinde tesbit edilmiştir.

A. vitis'in tanısı

Toplanan asma örneklerinden bazılarında ur oluşumu gözlenirken bazı semptomsuz örneklerden de *A. vitis* izole edilebilmiştir. Ayrıca örnek alınan 14 farklı asma çeşidinin tümünde ur oluşumu belirlenmiştir. Etmenin tanısında biyokimyasal, moleküler ve patojenisite testleri esas alınmıştır (Anderson ve Moore, 1979; Roy ve Sasser, 1983; Ophel ve Kerr, 1990; Schaad ve ark., 2001; Moore ve ark., 2001)

Morfolojik tanı

Bitki dokusundan farklı besi yerleri üzerine yapılan izolasyonlarda, NA, Roy ve Sasser (RS) ve PDA+CaCO₃ besi ortamları kullanılmış, 48 saat ve 26-27 °C'deki inkübasyondan sonra *A. vitis* izolatları, NA besiyerinde; konveks (kabarık), parlak, düz kenarlı, renk ise beyaz krem renkte, Roy ve Sasser besiyerinde; merkezleri koyu kırmızı kenarları ise beyaz renkte, Kado 523 besiyerinde; konveks (kabarık), parlak, düz kenarlı, renk ise beyaz krem renkte, PDA+CaCO₃ besiyerinde; genelde kubbemsi, parlak, düz kenarlı, krem renkte koloniler oluşturmuşlardır.

Biyokimyasal ve fizyolojik tanı

İzole edilen 280 bakteriyel izolatu biyokimyasal olarak tanılanmasında Moore ve ark. (2001)' in önerdiği yöntemler kullanılmıştır. Elde edilen izolatların büyük çoğunluğunun, *A. tumefaciens* ve 2 adet *A. vitis* referans kültürüyle karşılaştırmalı olarak yapılan testlere verdikleri reaksiyonlar Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Agrobacterium vitis*' in tanısında kullanılan biyokimyasal ve fizyolojik testler

TESTLER	<i>Agrobacterium vitis</i> Referans İzolatlar (pozitif kültürler)		Elde edilen <i>A. vitis</i> izolatları*	<i>A. tumefaciens</i> (negatif kültür) ATK18
	NCPPB2611	AV8		
3-Ketolactose oluşumu	-	D	-	+
%2'lik NaCl' de gelişme	+	+	+	+
37°C' de gelişme	-	D	-	+
Litmus milk'de gelişim	alkali	alkali	alkali	alkali
Asit oluşumu				
Erythritol	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	+
Alkali oluşumu				
Malonic asit	+	+	+	-
L- tartarik asit	+	+	+	-
Demir amonyum sitrat	-	-	-	+
Oksidaz	-	D	D	+
Sitrat kullanımı	+	+	+	D
PDA+CaCO ₃ 'da asit temizleme	-	-	-	-
pH:7.0'de hareketlilik	-	-	-	+
pH:4.5 de pektolitik aktivite	+	+	+	-

* Elde edilen *A. vitis* izolatlarının %90' dan fazlasının gösterdiği reaksiyonlar

Patojenisite testi

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

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

Tütünde hipersensitif reaksiyon testi (HR)

Elde edilen *A. vitis* izolatlarının tütün (*Nicotina tobaccum* cv. White Burley) bitkisinde hipersensitif reaksiyon oluşturma durumları incelenmiştir. İnokulasyondan sonraki 2 gün içerisinde doku nekrozuna sebep olan izolatlar pozitif olarak kabul edilmiştir. 280 *A.vitis* izolatının tamamı tütün bitkilerinde doku nekrozuna sebep olmuştur.

A. vitis izolatlarının PCR ile tanılanması

A. vitis'in moleküler tanısında spesifik *virA* ve *pehA* primer setleri kullanılmıştır. Farklı çeşitlerdeki asmalardan elde edilen tüm izolatların, *virA* gen bölgesi amplifikasyonunda 480 bp büyüklüğünde, *pehA* gen bölgesi amplifikasyonda ise 200 bp büyüklüğünde bantlar oluşturdukları belirlenmiştir (Şekil 1). Elde edilen sonuçlara göre, 280 izolatın tamamı PCR yöntemiyle *A. vitis* olarak tanılanmış ve bazı izolatlar Şekil 1' de örneklendirilmiştir.

Tartışma

Konya iline bağlı 24 ilçede (Cihanbeyli, Güneysınır, Meram, Hüyük, Seydişehir, Hadim, Beyşehir, Akören, Ahırlı, Yalınhüyük, Derebucak, Bozkır, Selçuklu, Ilgın, Derbent, Doğanhisar, Yunak, Çayırbağı, Karadığın, Akşehir, Tuzlukçu, Çumra, Kadınhanı ve Taşkent) 2006–2007 yıllarında yapılan surveylerde, 14 farklı çeşitten (Sultani Çekirdeksiz, Pembe Çekirdeksiz, Kalecik Karası, Kardinal, Kadın Parmağı, Hafızali, Emir, Karagevrek, Alphonse Lavalle, Hasan Dede, Razakı, Italia, Gül Üzümlü, Ekşikara) 309 adet asma örneği toplanılmıştır. Referans *A. vitis* izolatları ile karşılaştırmalı olarak yapılan biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik, moleküler ve patojenisite testleri sonucunda il genelinde asmaların *A. vitis* ' le %90.61 oranında bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda geç ilkbahar ve yaz aylarında yapılan izolasyonlardan en iyi sonuçlar alınmıştır. Burr ve ark. (1987) da urlu dokulardan izolasyon için ilkbahar ve yaz aylarının çok uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Genç urlara, geç ilkbahar ve yaz aylarında rastlanmış ve urlar ne kadar taze olursa izolasyon da o kadar kolay olmuştur. Yaşlı kurumuş urlardan izolasyon gerçekleştirilememiştir.

Araştırmamızda elde edilen *A. vitis* izolatlarından bazıları yapılan biyokimyasal testlere beklenenin tersine farklı sonuç göstermişlerdir. Bunlar içerisinde; 273, 284, 259, 267, 229, 218 ve 135 nolu izolatlar laktozdan 3-ketolaktöz üretiminde, 273, 284, 229, 218, 199 ve 135 nolu izolatlar demir amonyum sitrat kullanımında, 273, 284, 259, 267, 229, 218, 135, 117, 104 ve 114 nolu izolatlar %2 NaCl içeren besi yerinde gelişme testinde, 273, 284, 259, 267, 244, 229 ve 237 nolu izolatlar sakkaroz ve eritritolden asit üretimi testinde, 273, 284, 259, 267, 251, 224, 237, 218, 192, 180, 163, 172, 135 ve 117 nolu izolatlar oksidaz testinde, 309 ve 273 nolu izolatlar sitrat kullanımı testinde, 273, 309 ve 284 nolu izolatlar litmus milkte reaksiyon testinde, 273, 259 ve 267 nolu izolatlar malonik asitten alkali oluşumu testinde, 273, 284, 309, 259, 267, 251, 224, 237, 218, 192 ve 180 nolu izolatlar PDA+CaCO₃ besi yerinde asit temizleme testinde değişken sonuçlar vermişlerdir. Özellikle 273 no'lu izolat Italia asma çeşidinden, 284 no'lu izolat Emir asma çeşidinden izole edilmişlerdir. Benzer sonuçlara referans kültürlerden elde edilen bulgular da dahil olmak üzere Argun (2001) ve Küsek (2007)' in çalışmalarında da rastlanılmıştır. Bu durum, biyokimyasal ve fizyolojik testlere karşı farklı izolatların doğal reaksiyonunu ve çeşit patojen interaksiyonuna bağlı olabilecek farklılıkları düşündürmektedir. Bu tür farklılaşmalardan doğabilecek tanı hatalarını en aza indirebilmek için test sayısı ve çeşidi fazla yapılmış ve adı geçen izolatların da *A. vitis* olduğuna karar verilmiştir.

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

Çalışmamızda, öncelikle arazi koşullarında belirlenen simptomatolojik ve daha sonrada laboratuar bulguları ile patojenin mevcut çeşitler içerisinde en fazla Sultani Çekirdeksiz, Kardinal, Hafızali ve en az Ekşi Kara çeşitlerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Demir ve ark. (2002), Alphonse Lavelle, Kadın Parmağı, Italia, Sultani Çekirdeksiz çeşitlerini *A. vitis*'e karşı en hassas çeşitler, Kardinal çeşidini ise en dayanıklı çeşit olarak belirlemişlerdir. Argun (2001), çalışmasında Hafızali ve Kardinal üzüm çeşitleri dayanıklı, Kadınparmağı'nı en duyarlı çeşit olarak belirlemiştir. Szegedi ve ark. (1989) ise Pembe Çekirdeksiz ve Sultani Çekirdeksiz' i en hassas çeşitler olarak belir-

lerken, Kardinal'in ise hastalıktan en az etkilenen çeşit olduğunu belirtmiştir. Araştırmacıların bulguları çeşit reaksiyon denemeleri olmakla beraber bizim bu konudaki bulgularımız arazi gözlemlerine dayanmaktadır. Ancak yinede ve özellikle Kardinal asma çeşidinin farklı durum göstermesi incelenmesi gereken bir durum olarak belirlenmiştir.

Deqin ve ark. (1987)'nin yaptıkları bir çalışmada, Kuzey Çin'de asma urlarından 13 adet *A. tumefaciens*, 19 adet *A. vitis* izolatu elde etmişler ve asma türleri arasında farklılıklar olmasına rağmen izole edilen izolatların hepsinin ayçiçeğinde ur oluşturduğunu gözlemişlerdir. Demir ve ark., (2002), fidan üretim merkezlerinden toplam 118 *Agrobacterium* spp. izolatu elde etmişler ve bu izolatlardan 82 tanesinin patojen olduğu belirlenmiştir. Tanılanmış *A. vitis* izolatlarının asma ve bazı bitki türlerinde de ur oluşturduklarını belirlenmiştir. Benlioğlu ve Özakman (1998), Orta Anadolu bölgesinde sağlıklı görünen 150 asma örneği toplanmış ve 7 örnekte *A. vitis* tesbit etmişlerdir. Çalışmamızda asma örnekleri alınan 24 ilçeden elde edilen izolatlardan, tesadüfi olarak seçilen ve her ilçe için 3'er adet olmak üzere toplam 72 adet *A. vitis* izolatu ile patojenite testleri yürütülmüştür. Bu izolatlar ve referans izolatlar ile yapılan testler sonucunda oluşan semptomlar arasında farklılık gözlenmemiş ve tipik *A. vitis* urları oluşmuştur. Ancak izolatların virülenslik derecelerine göre semptom gelişim hızı ve şekillerinde bazı farklılıklar belirlenmiştir. Bu farklılıklar oluşan urun büyüklüğü ve oluşma süresi olarak tespit edilmiştir.

Lehoczky (1968), *A. vitis* ile enfekteli asmalarda, urun 15 ve 80 cm altından kesilen çubuklardan akan öz sudan *A. vitis*'i izole etmiştir. Budamayla ve diğer yaralanmalarla asma çubuklarında yeni urların oluştuğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile ilk defa bağ urunun iletim demetleri yoluyla taşındığını ve bitkinin üst kısmında ikincil urlara neden olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız patojenite testlerinde kesilen asma çubuklarından izolasyon yapılmış ve başarılı bir şekilde bakteri elde edilebilmiştir.

Asma örneklerinden bakteriyel patojenlerin izolasyonu için, Tarbah ve Goodman (1986), Lehoczky (1968), Burr ve Katz (1984), Küsek (2007), Argun (2001), Demir ve ark. (2002), bitki özsuğu vakumlama ile ve urlu dokuları ise %1'lik sodyum hipoklorit ile 3 dakika yüzeysel dezenfekte edildikten sonra 3 kez steril saf su ile yıkanmışlardır. Bir bistüri yardımıyla urun üst tarafı hafifçe soyularak alttaki taze canlı dokudan küçük parçalar alınmıştır. Bu parçalar daha sonra bir havanda steril fizyolojik tuzlu su (%8,5 NaCl) içerisinde homojenize edilmiştir. Bir saat beledikten sonra bu süspansiyondan bir öze alınarak içinde King B ve PDA+CaCO₃, PDA, RS besiyerlerine aktarmışlardır. Bizim çalışmamızda da aynı metot uygulanmış ve başarılı izolasyonlar yapılmıştır.

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

Birçok araştırmacı *A. vitis* için yapmış oldukları biyokimyasal ve fizyolojik tanılama testlerinde, çalışmamızdaki bulgularımıza paralel sonuçlar elde etmişlerdir. (Lehoczky, 1968; Anderson ve Moore, 1979; Knauf ve ark., 1982; Burr ve Katz, 1983; Burr ve Katz, 1984; Tarbah ve Goodman 1986; Deqin ve ark., 1987; Benlioğlu ve Özakman, 1998; Schaad, 2001; Argun ve ark., 2002; Demir ve ark., 2002; Siddiqui ve Shaukat, 2002; Küsek 2007).

Argun ve ark. (2002), Küsek (2007), Benlioğlu ve Özakman (1998), Demir ve ark. (2002), Goodman (1986), Burr ve Katz (1983), yaptıkları patojenite testlerinde 2- 3 haftalık domates, ayçiçeği ve 1-2 yaşlı asma bitkilerine, *A. vitis* izolatlarını inokule etmişlerdir ve bitkilerin ur oluşturup oluşturumamasına göre değerlendirmişlerdir. Çalışmamızda da aynı materyal ve metotlar uygulanmış ve daha önceki yapılan çalışmaların sonuçlarıyla benzer bulgular elde edilmiştir.

DNA amplifikasyonu (PCR) son yıllarda asma bakteriyel patojenlerinin tanıların yapılmasında tercih edilen bir yöntemdir. (Saiki ve ark., 1985; Tarbah ve Goodman, 1986; Burr ve ark., 1987; Szegedi ve ark., 1988; Eastwell ve ark., 1995; Stover ve ark., 1997; Schaad ve ark., 2001; Kawaguchi ve ark., 2004). Eastwell ve ark., (1995) yaptıkları çalışmalarda *pehA* geninin amplifikasyonu ile 200 bp' de ve *vir A* geninin amplifikasyonu ile 480 bp' de tek bant oluşumunu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da araştırmacıların önerdiği spesifik primerler kullanılarak aynı bulgular elde edilmiştir.

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

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

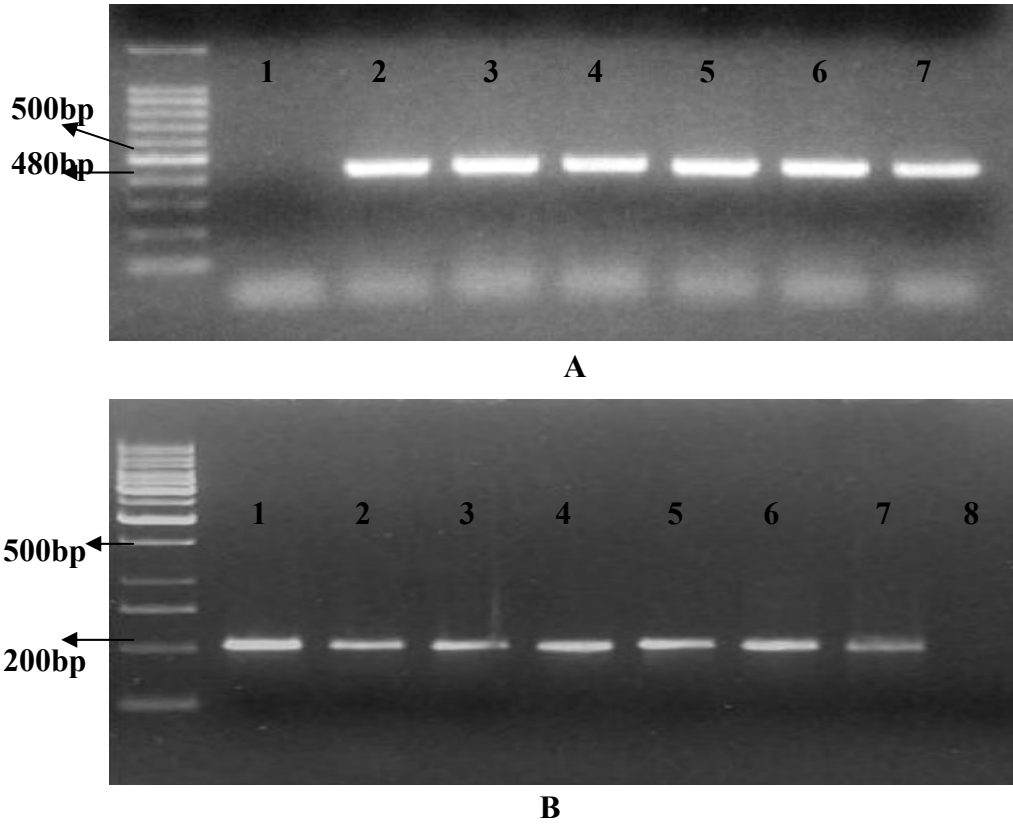
Sonuç ve Öneriler

Konya ilinde, ilçeler tek başlarına, etmenle bulaşıklılık bakımından değerlendirildiğinde en yüksek Hadim,

Beyşehir, Ahırlı, Yalınhüyük, Derebucak, Yunak, Karadığın (%100) ve en düşük Akşehir ve Kadınhanı (%33.33) ilçelerinde tespit edilmiş, il genelinde bu değerler %90.61 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2. Konya İlinde Asma Bakteriyel Taç Uru (*Agrobacterium vitis*) Hastalığının Belirlenmesi Amacıyla Örnek Alınan İlçeler ve Mevkileri, Toplanan Örnek Sayısı, Asma Çeşitlerine Göre Elde Edilen İzolat Sayıları, İl ve İlçeler Genelinde Etmenle Bulaşıklılık Oranları (%)

Örnek toplanan İlçeler ve Mevkileri	Toplanan Örnek Sayısı	Asma Çeşitlerinden Elde Edilen <i>Agrobacterium vitis</i> İzolat Sayısı														İl Genelinde <i>A. vitis</i> İle Bulaşıklılık Oranı (%)	
		Kardinal	Sultani Çekirdeksiz	Pembe Çekirdeksiz	Hafızali	Kalecik Karası	Kara Gevrek	Ekşikara	Alphonse Lavallée	Hasan Dede	Razakı	İtalia	Gül Üzümlü	Kadın Parmağı	Emir		TOPLAM
Hadim (Merkez, Gaziler, Yağcılar, Çavuşalan, Aşağı Akpınar, Aladağ, Yerköprü, Kaplanlı, AşağıEşenler, Sarıaltun, Taşbaşı, Halağzı Köprüsü, Yelmez)	84	12	12	8	12	4	5	-	5	10	5	2	1	8	-	84	100.00
Güneysınır (Merkez, Güney bağ, Kızılözü, KonyaYolu, Göynük, Ağcaoba, ObaKoyağı, Alanözü, Karagüney)	45	8	9	5	8	2	3	-	5	-	1	-	-	1	-	42	93.33
Derebucak (Merkez, İç Mevkii)	12	1	1	-	1	-	1	-	1	-	2	-	-	5	-	12	100.00
Bozkır (Merkez, Armutlu, Yeniköy)	17	3	3	-	3	-	3	-	-	-	-	1	-	1	-	14	82.35
Seydişehir (Merkez, İncesu, Kesecik, GökHüyük, GökçeHüyük, Karabulak)	37	5	5	2	3	-	3	-	3	-	5	-	-	4	5	35	94.59
Tuzlukçu (Merkez)	7	1	1	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	6	85.71
Çayırbağı (Merkez)	9	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	6	66.66
Karadığın (Merkez)	6	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	6	100.00
Meram +Hatıp (Merkez, Dikmeli)	20	5	3	1	1	-	2	-	-	3	-	-	-	1	-	18	90.00
Cihanbeyli (Merkez)	7	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	6	85.71
Yalınhüyük (Merkez)	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	3	100.00
Taşkent (Merkez, Aşar)	15	2	1	-	2	1	-	1	-	2	3	1	-	2	-	14	93.33
Doğanhisar (Merkez, Ke-mer)	8	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	5	62.50
Akören (Merkez)	3	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2	66.66
Akşehir (Merkez)	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	33.33
Ahırlı (Merkez)	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100.00
Beyşehir (Merkez)	4	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	100.00
Derbent (Merkez)	4	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	75.00
Çumra (Merkez)	4	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	75.00
Hüyük (Merkez, Hüyük)	5	1	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	4	80.00
Yunak (Merkez)	3	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	100.00
Selçuklu (Merkez)	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	66.66
İlgin (Merkez)	5	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	4	80.00
Kadınhanı (Merkez)	3	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	33.33
Toplam Örnek Sayısı	309	52	47	18	41	7	23	1	15	15	18	8	1	29	6		
Toplam <i>A. vitis</i> İzolatı Sayısı																280	
İl Genelinde Asmaların <i>A. vitis</i> İle Bulaşıklılık Oranı (%)																	90.61



Şekil 1. Farklı asma çeşitlerinden elde edilen *A. vitis* izolatların PCR tanısında agaroz jelde oluşturdukları spesifik bantlar;

A: *virA* gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (1: HdKaCa= *A. tumefaciens* (negatif kontrol), Araştırmada elde edilen *A. vitis* izolatları 2: HdMeSÇ, 3: HdMePÇ, 4: HdMeHa, 5: HdMeKK, 6: HdMeKa, 7: HdMeAlp)

B: *pehA* gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu (Araştırmada elde edilen *A. vitis* izolatları 1: TaAvCa, 2: TaAvRa1, 3: TaAvRa3, 4: TaAvIt, 5: TaAvHa, 6: TaAvKp, 7: TaAvKK, 8: TaAvHd=*A. tumefaciens* (negatif kontrol)

Elde edilen bulgulara göre; Konya ilinde bulunan bağ alanları genellikle *A. vitis* ile endişe verici düzeyde bulaşık durumdadır. Bu nedenle çok fazla zaman kaybı olmadan hastalıkla mücadele ya da korunma yollarının geliştirilmesi ve daha fazla alanlara yayılmasının engellenmesi gerekmektedir. Konya ilinde belirli anaçlar üzerinde ticari anlamda yetiştiriciliği yapılan çok sayıda üzüm çeşidi bulunmaktadır. Bu çeşit ve anaçlardan bazılarının, *A. vitis*' e karşı farklı reaksiyonlar gösterdiği gözlemlenmiştir. Bölge için çeşit hassasiyeti ve çeşit-anaç kombinasyonu çalışmalarının yapılarak üreticiye önerilmesi hastalıktan korunmada etkili olacaktır. Ayrıca hassas olarak belirlenen çeşit ve anaçların yetiştirildiği ilçeler ve köylerde yeni bulaşmalara karşı dikkatli olunması da faydalı bir yaklaşım olacaktır.

Kaynaklar

Alexandrova, M., Bazzi, C., Holst, O., 2000. Protective effect of bacterial lipopolisaccharides in

the grapevine-*Agrobacterium vitis* interaction. *Vitis*, 39, 67-70.

Anderson, A. R., Moore, L. W., 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology*, 69, 320-323.

Anonim, 2006. [http:// www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr)

Anonim, 2008. [http:// www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr)

Anonymous, 2006. [http:// www.fao.org](http://www.fao.org)

Argun, N., 2001. Orta Anadolu bağlarında taç uru' na neden olan *Agrobacterium vitis* 'in bölgesel dağılımı ve bazı biyolojik özellikleri üzerine araştırmalar. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 84s.

Argun, N., Momol, M. T., Maden, S., Momol, E. A., Reid, C. L., Çelik, H. and Burr, T. J., 2002. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains

- isolated from Turkish grape cultivars in the Central Anatolia region. *Plant Disease*, 86, 162-166.
- Bazzi, C., Alexandrova, M., Stefani, E., Anaclerio, F., Burr, T. J., 1999. Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic *Agrobacterium A. vitis*, 38, 31-35.
- Benlioğlu, K. ve Özakman, M., 1998. Bağ üretim materyalinde kök uru etmeni *Agrobacterium tumefaciens*'in saptanması. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, 167-174.
- Bishop, A. L., Katz, B. H. and Burr, T. J., 1988. Infection of grapevines by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population Dynamics in host and nonhost rhizospheres. *Phytopathology*, 78, 945-948.
- Brisset, M. N., Palenzuela, P. R., Burr, T. J. and Collmer, A. 1991. Attachment, chemotaxis, and multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 and biovar 3 on grapevine and pea. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (11); 3178-3182.
- Burr, T. J., Bazzi, C., Süle, S. and Otten, L., 1998. Crown gall of grape, biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease*, 82, 1288-1297.
- Burr, T. J. and Katz, B. H., 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology*, 73, 163-165.
- Burr, T. J. and Katz, B. H., 1984. Grapevine cuttings as potential of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Disease*, 68, 976-978.
- Burr, T. J., Katz, B. H. and Bishop, A. L., 1987. Population of *Agrobacterium* in vineyard and nonvineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Disease*, 71, 617-620.
- Burr, T. J. and Otten, L., 1999. Crown gall of grape: Biology and disease management. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 53-80.
- Canfield, M. L. and Moore, L. W., 1991. Isolation and characterization of opineutilizing strains of *Agrobacterium tumefaciens* and fluorescent strains of *Pseudomonas* spp. from rootstocks of *Malus*. *Phytopathology*, 81, 440- 443.
- Cavara, F., 1897. Tuberculosis della vite. *Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane*, 30, 483-487.
- Cubero, J. and Lopez, M. M., 2001. An efficient microtiter system to determine *Agrobacterium* biovar. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 757- 760.
- Çelik, H., Marasalı, B., Söylemezoğlu, G., Tangolar, S. ve Gündüz, M., 2000. Bağcılıkta üretim hedefleri. *Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi Bildirileri*, Ankara, (Cilt 2), 645-678.
- De Boer, S. H. and Ward, L. J., 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* 85, 854-858.
- Demir, G., Üstün, N. ve Altın, N., 2002. Bitki Sağlığı Araştırmaları Bitki Hastalıkları Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı Kararları Bornova/İzmir 420-421.
- Deqin, M.A., Martin, F.Y., Milton, P.G. and Eugene, W.N., 1987. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains Isolated from grapevine tumors in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1338-1343.
- 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 Disease*, 79, 822-827.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*.s 8292-8300
- Kawaguchi, A. , Sawada, H., Nasu, H. Kaju, I., 2004. PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains s 54-59.
- Kawaguchi, A., Inoue, K. and Nasu, H., 2005. Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *Journal of General Plant Pathology*, 71, 422-430.
- Khlaif, H., 2003. Effect of soil solarization on total *Agrobacterium* spp. population, inoculated *Agrobacterium tumefaciens*, and on the development of crown gall. *Journal of Plant Pathology*, 85, 117-122.
- Knauf, V. C., Panagopoulos, C. G. and Nester, E. W., 1982. Genetic factors controlling the host range of *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology*, 72, 1545-1549.
- Knauf, V. C., Panagopoulos, C. G. and Nester, E. W., 1983. Comparison of Ti plasmids from three different biotypes of *Agrobacterium* isolated from grapevine. *Journal of Bacteriology*, 153, 1535-1542.
- Küsek, M., 2007. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Ura Neden Olan *Agrobacterium vitis*'in tanılanması ve mücadele olanaklarının araştırılması. *Doktora Tezi. Çukurova Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü*. 81s.

- Lehoczky, J., 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine, after natural infection. *Journal of Phytopathology*, 63, 239-246.
- Lelliott, R. A. and Stead, D. E., 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications, 216s.
- Moore, L. W., Bouzar, H. and Burr, T., 2001. Gram-negative bacteria, *Agrobacterium*. (N. W. Schaad, J. B. Jones, W. Chun editor). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, Third Edition, APS Press. ST. Paul, Minnesota, S 17-35.
- Nadolny, L. and Sequeira, L., 1980. Increases in peroxidase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco. *Physiological Plant Pathology*, 16, 1-8.
- Ophel, K. and Kerr, A., 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 236-241.
- Ride, M., Ride, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y. and Gardan, L., 2000. Characterization of plasmid borne and chromosome encoded trait of *Agrobacterium* biovar 1, 2 and 3 strains from France. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1818-1825.
- Roy, M.A., and Sasser, M.A., 1983. Medium selective *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 (Abstr) *Phytopathology* 73: 810.
- 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, 1350-1354
- 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*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 9, 401-408.
- Sambrook, J. and D. Russell, 2001. *Gel electrophoresis of dna and pulsed-field agarose gel electrophoresis molecular cloning: a laboratory manual* (Third Edition). CSHL Press, 2344p.
- Sawada, H., H. and Ieki, 1992. Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 58, 46-51.
- Sawada, H., Ieki, H. and Matsuda, I., 1995. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 828-831.
- Schaad, N.W., 2001. *Identification Schemes (Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria)*. Third Edition, The American Phytopathological Soc., St. Paul, Minnesota, 1-16 pp.
- Siddiqui, I. A. and Shaukat, S. S., 2002. Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Phytopathology*, 150, 469-473.
- Staphorst, J. L., Van ZYL, F. G. H., Strijdom, W. B. and Groenewold, Z. E. 1985. Agrocin-producing pathogenic and nonpathogenic biotype-3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype-3 pathogens. *Current Microbiology*, 12, 45-52.
- Stefani, E. and Rudolph, K., 1989. Induced resistance in bean leaves pretreated with extracellular polysaccharides from phytopathogenic bacteria. *Journal of Phytopathology*, 124, 189-199.
- Stover, E. W., Swartz, H. J. and Burr, T.J. 1997. Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. *American J. Enol. Vitic.*, 48; 26-32.
- Szegedi, E., Czako, M., Otten, L. and Koncz, C.S., 1988. Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiological and molecular Plant pathology*, 32; 237-247.
- Szegedi, E., Korbuly, J. and Otten, L., 1989. Types of resistance of grapevine varieties to isolates of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *physiological and molecular Plant Pathology*. 35;35- 43.
- 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 Disease*, 70, 566-568.
- Yan, Z., Reddy, M. S., Ryu, Choong-Min, McInroy, R. J., Wilson, M. and Kloepper, J. P., 2002. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting Rhizobacteria. *Phytopathology*, 92, 1329-1333.