

Bitki büyümesini teşvik eden kök bakterilerini kullanılarak asma uru hastalığı etmeni *Agrobacterium vitis*'in biyolojik mücadelesi¹

Mustafa KÜSEK², Özden ÇINAR³

Biological control of grapewine crown gall disease agent *Agrobacterium vitis* by using plant growth promoting rhizobacteria

Abstract: Crown gall, caused by the bacterium *Agrobacterium vitis*, is a common and devastating grape disease in many vineyards of the world, including in Turkey. In this study, possibility of biological control of grapewine crown gall disease was investigated. Totally 464 putative Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) were isolated from 39 soil samples which were collected from vineyards of Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep and Kahramanmaraş provinces. Sixty-three bacterial strains solubilized phosphorus on solid NBRIP medium. Ten PGPR strains which have solubilized phosphorus with the highest ratio were used in pot experiments. PGPR strains, Ga7/3-6 (45%), Ga10/2-5 (97%), Os1/3-1 (80%), OsD1/3-1 (98%) ve HaD6/3-1 (75%), significantly reduced galls weight on grape plants in pot experiments. This is the first study on biological control of *Agrobacterium vitis* in Turkey.

Key words: Biological control, grapevine, gall, *Agrobacterium vitis*, PGPR

Özet: *Agrobacterium vitis*'in neden olduğu ur hastalığı, Türkiye'yi de içine alan dünyanın asma yetiştirilen pek çok yerinde yaygın ve yıkıcı bir hastalıktır. Bu çalışmada asma uru hastalığının biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep ve Kahramanmaraş illerinde bulunan bağ alanlarından bitki büyümesini teşvik eden aday kökbakterisi (PGPR) izolatları elde etmek için 39 toprak örneği alınmış olup toprak örneklerinden 464 adet bakteri izole edilmiştir. Katı NBRIP besi yeri kullanılarak bu bakteri izolatlarından 63'ünün fosforu çözdüğü belirlenmiştir. En yüksek fosfor çözen 10 izolat seçilerek saksı çalışmalarında kullanılmıştır. Saksı çalışmasında PGPR izolatları olan Ga7/3-6 (% 45), Ga10/2-5 (% 97), Os1/3-1 (% 80), OsD1/3-1 (% 98) ve HaD6/3-1 (% 75)'nin asmada ur ağırlığını önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışma, Türkiye'de *Agrobacterium vitis*'in PGPR ile biyolojik mücadelesi üzerine ilk çalışma niteliğindedir.

Anahtar sözcükler: Biyolojik mücadele, asma, ur, *Agrobacterium vitis*, PGPR

¹Bu çalışma; birinci yazarın Doktora tezinin bir bölümüdür.

²Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 46100, Kahramanmaraş

³Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 01330, Sarıçam, Adana

Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: mkusek@ksu.edu.tr

Alınış (Received): 12.01.2012

Kabul ediliş (Accepted): 30.04.2012

Giriş

Ülkemiz, coğrafi durumu, iklim ve toprak yapısından dolayı asma yetiştiriciliği için dünyada en uygun yerlerden birisi olmanın yanısıra asmanın ana vatanı olması nedeniyle de önemli bir gen merkezidir. Bağın ana ürünü olan üzüm tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sadece sofralık olarak kullanılmamakta, bununla birlikte şarap, kuru üzüm, pekmez, sirke, pestil, sucuk ve şıra olarak da kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra budama sonucu elde edilen çubukların yakacak olarak kullanılması ve yapraklarının salamura olarak değerlendirilmesi de diğer yararları arasında belirtilebilir (Ağaoğlu 1986).

Günümüzde asma yetiştiriciliğini tehdit eden pek çok hastalık ve zararlı vardır. Bunlar arasında en önemlilerinden biri de asma uru hastalığıdır. Asmalarda genel olarak ura neden olan bakteriyel hastalık etmeni *Agrobacterium vitis* Ophel and Kerr olsa da, bu hastalık nadiren de *Agrobacterium tumefaciens* adlı bakteri tarafından da oluşturulur. Bu hastalık etmenlerine karşı etkili bir mücadele yönteminin olmamasından dolayı, iklim koşullarının hastalık gelişimi için uygun olduğu bölgelerde, önemli verim ve gelişme kayıpları ortaya çıkmaktadır (Çelik et al. 2000).

Asmada ur oluşumu uzun yıllardır bilinmekle birlikte ilk defa 1897'de bir bakterinin (*Bacillus ampelopsaræ*) ura neden olduğu bildirilmiştir (Cavara 1897). Kerr & Panagopoulos (1977) asmadan izole edilen tümörügenik bakterileri *A. tumefaciens* biovar 3 olarak sınıflandırmışlardır. Sonraki yıllarda dünyanın birçok yerinde araştırmacılar asmada biovar 3 izolatlarını belirlemişlerdir. Ophel & Kerr (1990) yaptıkları taksonomik çalışmalar (biyokimyasal, monoklonal antibody ve DNA bağlanma seviyeleri) sonucunda biovar 3'ü *A. vitis* olarak isimlendirmişlerdir. Günümüzde *A. vitis* asmada ur oluşturan en baskın tür olarak bilinmekle birlikte *A. tumefaciens* de nadir olarak asmalardan izole edilmektedir (Knauf et al. 1983; Salomone et al. 1996; Ride et al. 2000; Argun et al. 2002).

Agrobacterium vitis asmada sistemik olarak yayılmakta ve simptom oluşturmada yıllarca canlı kalabilmektedir. Bu nedenle kolaylıkla vejetatif üretim materyali ile yayılmakta, hastalık etmeninin varlığı ancak ur oluşumu gözlenince fark edilmektedir. Bulaşık dallarda *A. vitis* dondan veya başka bir nedenden dolayı meydana gelen yaralanmadan sonra bitkide ur oluşturabilmektedir. *Agrobacterium* cinsi bakteriler genelde toprak kökenlidir. Ancak topraktan izole edilen *Agrobacterium*'ların büyük çoğunluğu ur oluşturma özelliğinde değildir (Bouzar & Moore 1987). Bununla birlikte *A. vitis* asma kalıntılarında en az iki yıl ur oluşturma yeteneğini kaybetmeden yaşayabilmektedir (Burr et al. 1995).

Bu bakteri asma gövdesinin % 50'si ural çevrelendiğinde bitki gelişiminde ve veriminde önemli azalmalara neden olmaktadır (Schroth et al. 1988). Bu hastalık etmenine karşı etkili bir kimyasal mücadele bulunmamakla birlikte, çiftçiler tarafından bilinçsizce ilaç kullanılmaktadır. Son yıllarda hastalık etmenine karşı Nogall isimli ticari biyolojik bir preperat kullanılmaya başlamasına rağmen, *A. vitis* tarafından oluşturulan hastalık oluşumunu yeterince engelleyemediği bildirilmiştir

(Burr et al. 1998). Hastalık etmenine karşı etkili bir mücadele yönteminin bulunmaması, bilinçsizce tarımsal ilaçların kullanılması, bu ilaçların çevreye ve insan sağlığına olan olumsuz etkilemesi ve son yıllarda bilinçlenen tüketicilerin organik tarıma olan ilgileri nedeniyle araştırmacılar hastalık etmenine karşı ilaçlı mücadeleye alternatif mücadele yöntemlerinin araştırılmasına yöneltmiştir.

Kökboğazı uruna karşı ticari olarak kullanılan *Agrobacterium rhizogenes* K84 izolatı 1980'den itibaren kullanılmaktadır (Kerr 1980). Bununla birlikte K84 izolatı asmada ura neden olan *A. vitis*'e karşı etkili değildir (Staphorst et al. 1985; Burr et al. 1998; Kawaguchi et al. 2005). Bunun yanında biyolojik mücadelede kullanılacak antagonist birçok izolatlar elde edilmiştir (Liang et al. 1990; Bell et al. 1995; Kawaguchi et al. 2005; Chen et al. 2007). Asma kök bölgesinden izole edilen *Rahnella aquatilis* HX2 izolatı *A. vitis*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *A. rhizogenes* izolatlarını laboratuvar koşullarında gelişmesini engellemektedir (Chen et al. 2007).

Bu hastalıkla mücadelede biyolojik mücadele yöntemleri hakkında oldukça çok araştırma yapılmış olmasına rağmen, Bitki Büyümesini Teşvik Eden Kökbakterilerini (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) kullanarak bitkilerde sistemik teşvik edilmiş dayanıklılık çalışmaları oldukça sınırlıdır. PGPR'lar birçok bitkide birçok bitki hastalığına karşı dayanıklılığı teşvik etmekte ve bunun yanında topraktaki fosfor ve azotu bitkinin alabileceği forma getirerek verimde de önemli artışlar sağlamaktadır (Weller 1988).

Bu çalışmada; Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde yetiştiriciliği yapılan sağlıklı asmaların kök bölgesindeki topraklardan izole edilen ve bitki gelişimini teşvik eden kök bakteri izolatlarının *A. vitis*'e karşı biyolojik mücadelede kullanım olanakları araştırılmıştır.

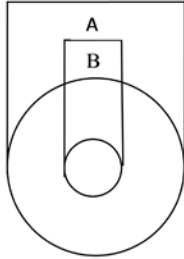
Materyal ve yöntem

PGPR'ların izolasyonu

Bitkilerde dayanıklılığı teşvik edici PGPR bakterilerinin izolasyonu amacıyla Adana, Mersin, Hatay, Osmaniye, Gaziantep ve Kahramanmaraş illerindeki bağ alanlarından diğerlerine göre daha iyi gelişmiş ve sağlıklı asmaların kök bölgesinden toprak örnekleri toplanmıştır. Laboratuara getirilen topraklar serilerek iki gün kuruması için bekletilmiştir. Kuruyan topraklar 1 mm çaplı eleklerden elenmiştir. Elenen topraktan 10 g toprak alınarak 90 ml fosfat buffer-tuz tamponu (PBS) (1 lt: 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,1 g Na₂HPO₄ ve 0,2 g KCl, pH: 7,4) içerisinde iki saat 100 dev./dak.'da çalışan çalkalayıcılarda çalkalanmıştır. Süspansiyondan 1 ml alınıp içinde 9 ml fizyolojik su (% 0,85 NaCl) bulunan tüpe ilave edilerek 10 kat sulandırma serileri hazırlanmıştır. Bu 10 katlık seriler halinde hazırlanan süspansiyonlardan ikinci, üçüncü ve dördüncü sulandırma serilerinden 100 µl alınarak King B (KB) besi yerine ekim yapılmış ve 25±1 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besi yerinde gelişen koloniler incelenmiş

ve farklı morfolojik gelişim gösteren koloniler seçilerek saf kültür elde edinceye kadar KB besi yerine ekimi yapılmıştır.

Topraktan saf olarak izole edilen bakterilerin fosforu çözebilme yeteneklerini belirlemek için steril kürdan ile katı NBRIP besi yeri içeren her bir petriye 9 izolat olacak şekilde ekim yapılmıştır. Deneme 3 tekrarlı olarak kurulmuştur. Bir hafta sonra besi yerinde bakteri kolonisinin etrafındaki şeffaf zonun çapı ve bakteri kolonisinin çapı ölçülerek Şekil 1'deki formüle göre fosfor çözme indeksi belirlenmiştir. Fosfor çözme indeksi yüksek olan bakteriler seçilmiştir (Johri et al. 1999).



Çözülebilir fosfor indeksi= A/B

A: Şeffaf zon çapı

B: Bakteri kolonisinin çapı

Şekil 1. Çözülebilir fosfor indeksinin hesaplanması.

Figure 1. Calculation of index of the soluble phosphorus.

Bu izolatlardan fosfor çözme indeksi en yüksek olan 29 izolat seçilerek NBRIP sıvı besi yerinde çözebildiği fosfor miktarlarını belirlemek için kullanılmıştır. Seçilen 29 izolat sıvı NBRIP besi yerinde çalkalayıcı üzerinde bir hafta kültüre alınmıştır (Nautiyal et al. 2000). Daha sonra bakterileri ve suda çözülmeyen katı maddeleri $[Ca_3(PO_4)_2]$ çöktürmek için 10.000 dev./dak.'da 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Tüpün üst kısmında biriken sıvı kısım alınarak içinde çözülen fosfor miktarı Barton (1948) yöntemine göre belirlenmiştir. Sıvı besi yerinde en fazla fosfor çözen 9 izolat (Ga1/2-1, Ga3/3-1, Ga4/3-1, Ga10/2-5, Ga16/2-1, OsD1/3-1, Os1/3-1, OsD3/3-1 ve HaD6/3-1) ve fosfor çözme indeksi en yüksek olan 1 izolat (Ga7/3-6) seçilerek toplam 10 izolat saksı çalışmalarında kullanılmıştır. Seçilen bu PGPR izolatların karakterizasyonu için KB besi yerinde gelişme özelliği, gram reaksiyonu ve oksidaz testi yapılmıştır.

Saksı çalışması

Seçilen 10 PGPR izolatlarının *A. vitis*'e karşı etkinliğini belirlemek için 6 tekrarlı olarak saksı denemesi kurulmuştur. KB besi yerinde $25 \pm 1^\circ C$ 'de 24-48 saat geliştirilmiş olan PGPR izolatlarının yoğunluğu steril su ile 600 nm dalga boyunda 0,3 absorbans değerine ayarlanmıştır. Daha sonra soğuk odada bekletilen asma çubukları üç göz içerecek şekilde kesilerek dip kısımları PGPR bakteri izolatları süspansiyonu için daldırılarak 15-20 dakika bekletilmiştir. Bu çubuklar her saksıya 2 çubuk olacak şekilde dikilmiştir. Bir hafta sonra bu çubukların gövdesine 3 mm çaplı matkap ucu ile 3 çukur açılmıştır. Daha önce KB besi yerinde $25 \pm 1^\circ C$ 'de 24-48 saat geliştirilmiş olan *A. vitis* izolatı 600 nm dalga boyunda 0,1 absorbans

değerine ayarlanmış ve çubuktaki her bir çukura 100 µl ilave edilmiştir. Bakteri süspansiyonunun doku içine difuze olması için 20-30 dakika bekledikten sonra nem sağlamak amacıyla bu çukurların üzeri ıslak pamuk ve parafilm ile kapatılmıştır. 3 gün sonra parafilm ve pamuklar çıkartılmıştır. Yaklaşık 3,5 ay sonra saksılardan asmalar sökülerek kök uzunluğu, kök kuru ve yaş ağırlığı, sürgün uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlığı, çubuğun ve yeni sürmüş sürgünün birinci boğumunun çapı ölçülerek bitki büyümesine etkisi belirlenmiştir. Ayrıca oluşan ur sayısı, ur çapı (en, boy, yükseklik) ve ur ağırlığı ölçülerek PGPR izolatlarının *A. vitis*'in neden olduğu hastalığı baskılama oranı Abbott formülüne göre değerlendirilmiştir. Uygulamalar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testine ($p \leq 0.05$) göre yapılmıştır.

Bulgular ve tartışma

PGPR'ların izolasyonu

Mersin, Kahramanmaraş, Gaziantep, Hatay, Osmaniye ve Adana illerindeki bağ alanları içerisinde diğerlerine göre daha iyi gelişmiş bitkilerin kök bölgesinden alınan 39 adet toprak örneğinden yapılan izolasyonda farklı morfolojik gelişim gösteren 464 bakteri kolonisi seçilerek saflaştırılmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Toprakтан izole edilen aday PGPR'lerin King B besi yerinde geliştirdikleri koloniler.

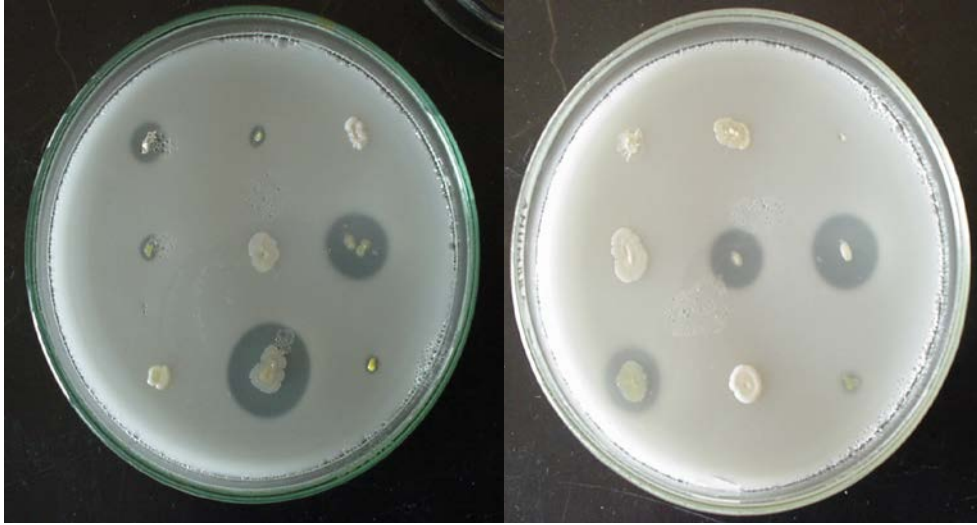
Figure 2. Putative PGPR bacterial colonies isolated from soil samples and development of PGPR colonies on King B medium.

PGRP'lerin seçimi

Bitki gelişimini sağlamak için ilk akla gelen yöntem toprakların uygun gübrelerle gübrenmesidir. Bitkilerin en fazla ihtiyaç duyduğu besin maddesi azot (N), potasyum (K) ve fosfor (P) olduğundan gübrelemede en fazla bu kimyasallar kullanılmaktadır. Toprakta fazla miktarda fosfor bulunmasından çok alınabilir formdaki fosfor miktarı çok önemlidir.

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

Katı NBRIB besi yeri kullanıldığında fosfor çözen bakterilerin etrafında bir zon oluşmaktadır. Bu yöntemde her bir petriye 9 bakteri izolatu ekilmekte ve kısa sürede P çözebilen bakteri kolonilerinin etrafında açık bir zon oluşmaktadır (Şekil 3). Bakteri gelişimi sonunda oluşan zon çapının bakteri kolonisine oranlayarak fosfor çözme indeksi belirlenmektedir. Toprakta izole ettiğimiz 464 bakteri izolatından 63'ünün zon oluşturduğu belirlenmiştir (Çizelge 1).



Şekil 3. Toprakta izole edilen bakterilerin katı NBRIB besi yerinde oluşturduğu açık zon.
Figure 3. Formation of pale inhibition zone caused by bacterial colony on solid NBRIB medium.

Çizelge 1. İzole edilen aday PGPR'ın katı NBRIP besi yerinde oluşturduğu zon çapı, koloni çapı ve fosfor çözme indeksi

Table 1. Formation of inhibition zone, colony diameter and phosphorus solubility index caused by different PGPR isolates on solid NBRIP medium

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

Çizelge 1'in devamı

Table 1 continued

Ga4/2-6	3,33	3,00	1,11
Ga13/4-2	3,50	3,17	1,10
Ga11/3-4	6,67	6,17	1,09
T2/2-1	3,00	2,83	1,07
Ga2/2-3	5,67	5,33	1,06
T1/4-10	6,67	6,33	1,06
Os3/4-2	4,17	4,00	1,04
Ga1/3-6	7,33	7,33	1,00
Ga12/3-5	6,33	6,33	1,00
MB3/3-5	3,67	3,67	1,00
Os3/4-5	5,33	5,33	1,00
Ga20/2-3	3,33	3,33	1,00
Ga14/4-2	7,00	7,00	1,00
Ga6/4-1	4,33	4,33	1,00
Ga5/3-7	3,67	3,67	1,00
Ga14/4-1	3,67	3,67	1,00
Ha6/4-5	3,33	3,33	1,00
T6/3-2	3,33	3,33	1,00
T1/3-6	6,67	6,67	1,00
OsD1/4-2	6,33	6,33	1,00
Ha6/3-6	2,67	2,67	1,00
Os3/4-4	4,67	4,67	1,00
Ga8/3-2	3,00	3,00	1,00
T3/2-2	6,33	6,33	1,00
T1/4-3	5,33	5,33	1,00
T3/2-1	1,67	1,67	1,00
T2/3-4	3,00	3,00	1,00

Fosfor çözen bakterilerin seçiminde sadece fosfor çözme indeksi göz önüne alındığında yeterli olmadığı, bununla birlikte bakterinin koloni çapı da önemli olmaktadır. Bunun için bu bakterilerin sıvı besi yerinde çözdüğü fosfor miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Fosfor çözme indeksi en yüksek 10,33 ile Ga7/3-6 izolatında elde edilmiştir. Fosfor çözdüğü belirlenen 63 izolattan fosfor çözme indeksi en yüksek (10,33 ile 1,26 arası) olan 29 izolat seçilerek sıvı besi yerindeki fosfor çözme miktarı belirlenmiştir (Çizelge 2).

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

Fosfor çözme indeksi ile çözülen fosfor miktarı arasında bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. İzole edilen bakterilerin seçiminde fosfor çözme indeksinin çok önemli olmadığı fakat ön seçim için yararlı olmaktadır. Bakterilerin seçiminde sıvı besi yerinde çözülen fosfor miktarına göre yapılması gerektiği görülmüştür.

Çizelge 2. Farklı PGPR izolatların katı ve sıvı NBRIP besi yerindeki fosfor çözme indeksi, bakterinin koloni çapı ve çözülen fosfor miktarları

Table 2. Formation of phosphorus solubility index, colony diameter and the amount of soluble phosphorus caused by different PGPR isolates on solid and liquid NBRIP medium

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

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

Çizelge 3. Seçilen PGPR izolatların King B besiyerinde oluşturduğu karakteristik koloni yapıları

Table 3. Characteristic appearance of colonies of selected PGPR isolates on King B medium

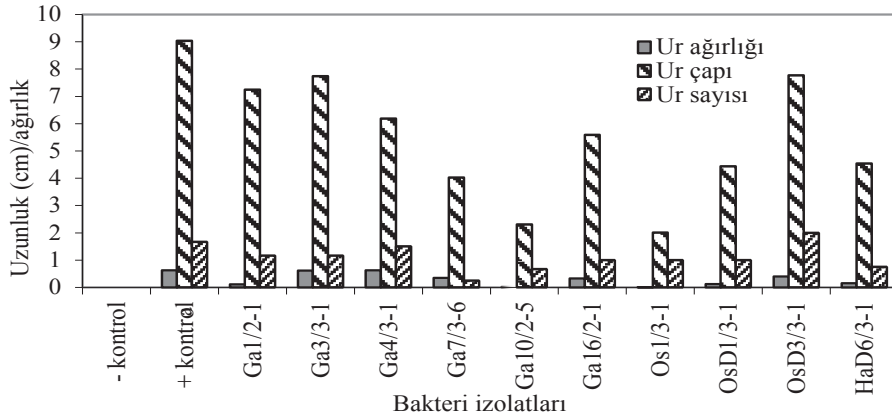
İzolatlar	Toplandığı yer	Koloni rengi	Gram reaksiyon	Oksidaz Testi
Ga1/2-1	G.Antep	Sarı	-	-
Ga3/3-1	G.Antep	Floresan	-	+
Ga4/3-1	G.Antep	Floresan	-	+
Ga7/3-6	G.Antep	Krem	-	+
Ga10/2-5	G.Antep	Floresan	-	+
Ga16/2-1	G.Antep	Sarı	-	-
OsD1/3-1	Osmaniye	Sarı	-	-
Os1/3-1	Osmaniye	Kırmızı	-	-
OsD3/3-1	Osmaniye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

PGPR İzolatlarının *Agrobacterium vitis*'in neden olduğu ur oluşumuna etkisi

Seçilen 10 PGPR izolatının *A. vitis*'e karşı etkinliğini belirlemek amacıyla 6 tekrarlı olarak kurulan saksı denemesinde *A. vitis* bitkiye inokule edildikten yaklaşık 3,5 ay sonra oluşan ur sayısı, urların çapı (eni, boyu ve yüksekliği) ve urların ağırlıkları ölçülerek değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasında LSD analizine göre % 5 önem seviyesinde önemli farklar olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Ur sayısı bakımından ortalama 0,25 adet ile en az Ga7/3-6 izolatı uygulanan asmalarda gözlenmiştir. Bunu sırasıyla Ga10/2-5 (0,67 adet) ve HaD6/3-1 (0,75 adet) izolatları izlemiştir. En fazla sayıda ur oluşumu ise 2 adet ile OsD3/3-1 ve 1,5 adet ile Ga4/3-1 izolatlarında elde edilmiştir.

PGPR izolatları uygulanan asmalarda oluşan ur ağırlıkları karşılaştırıldığında en hafif ur Os1/3-1 (0,01 g) ve Ga10/2-5 (0,02 g) izolatlarında elde edilmiştir. Ağırlık yönünden en fazla ur oluşumu ise Ga4/3-1 (0,63 g) ve Ga3/3-1 (0,62 g) izolatlarından elde edilmiştir. Ur büyüklüğü yönünden karşılaştırıldığında da Ga10/2-5 (çapı 1,02 mm) izolatı en küçük uru oluşturmuştur. Bunu sırayla Ga7/3-6 (çapı 1,34 mm), OsD1/3-1 (çapı 1,39 mm), Os1/3-1 (çapı 1,9 mm) ve HaD6/3-1 (çapı 2,23 mm) izolatları izlemiştir. En büyük ur oluşumu ise OsD3/3-1 (çapı 6,38

mm) ve Ga4/3-1 (çapı 6,18 mm) izolatları uygulanmış asmalardan elde edilmiştir. Ur sayısı, ur çapı ve ur sayısı dikkate alınarak yapılan genel bir değerlendirmede bağlarda *A. vitis* ile mücadelede Ga7/3-6, Ga10/2-5, Os1/3-1, OsD1/3-1 ve HaD6/3-1 izolatlarının ümit var olduğu görülmektedir. Bu izolatların dayanıklılığı teşvik etme mekanizması özellikle tarla denemeleri ile daha detaylı olarak çalışılmalıdır.



Şekil 4. Farklı PGPR izolatları uygulanmış asmalarda oluşan urların sayısı, ağırlığı ve çapları.

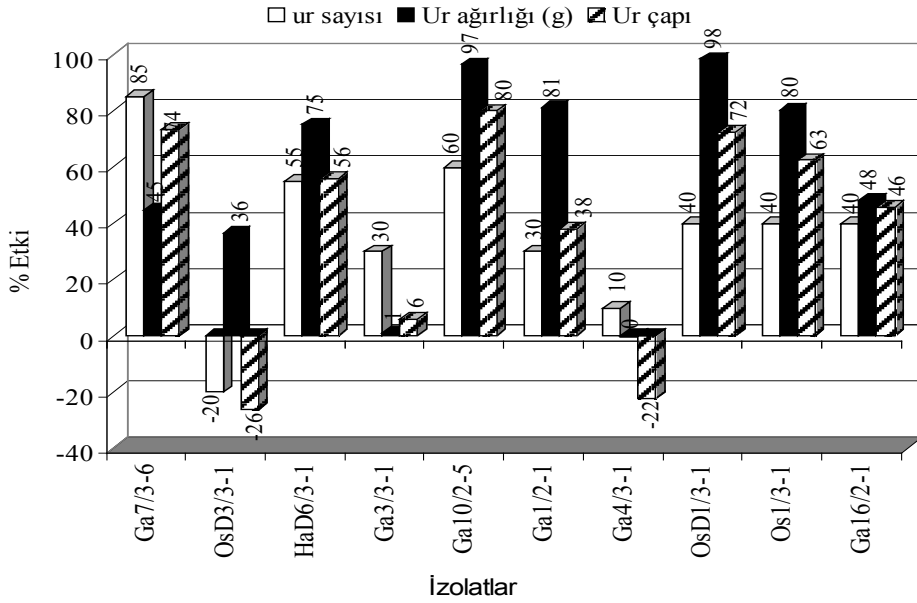
Figure 4. Formation of tumor number, tumor-weight and tumor-size developed on vines treated with different PGPR isolates.

Agrobacterium rhizogenes K84 ve bundan geliştirilen K1026 izolatlarından elde edilen ticari preparatın (Nogall) tüm dünyada kök boğazı ur hastalığı etmeni *A. tumefaciens*'e karşı başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen (Moore & Warren 1979; Shim et al. 1987; Kawaguchi et al. 2005), bu preparatın *A. vitis* izolatlarına karşı mücadelede etkisiz olması araştırmacıları yeni izolatların elde edilmesine yönlendirmiştir. Bu güne kadar birçok araştırmacı tarafından bağ uruna karşı değişik seviyelerde kontrol edebilen birçok izolat elde edilmiş olmasına rağmen henüz ticari biopreperat geliştirilmemiştir (Burr et al. 1998; Liang et al. 1990; Webster & Thomson 1986; Xianying & Wangnian 1986).

Toprakтан izole edilen farklı PGPR izolatları, ya doğrudan bitki hormonlarının analoglarını üreterek, organik maddeleri mineralize ederek, suda erimeyen kaya fosforunu suda eriyebilir forma dönüştürerek, ya da dolaylı olarak teşvik edilmiş dayanıklılığı uyararak bitki gelişmesini teşvik edebilirler (Elad & Chet 1987; Tomashow & Weller 1988; Sumner 1990; Glick & Bashan 1997). Silva et al. (2004)'nın yaptığı bir çalışmada domateste *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans* ve *Septoria lycopersici*'ye karşı mücadelede kimyasal preparatlarla PGPR

izolatları kombine edilerek kullanıldığında başarının arttığını belirtmişlerdir. PGPR izolat kullanımının kimyasal preparatların kullanımını yarı yarıya azaltacağını vurgulamışlardır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada PGPR izolatlarının biberde *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'ya karşı kullanıldığında hastalık şiddetini % 65 oranında azalttığı vurgulanmaktadır (Mirik 2005).

Bizim yaptığımız bu çalışmada, PGPR izolatlarının ur büyüklüğünü % 80 ve ur ağırlığını ise % 98 oranında azalttığı belirlenmiştir (Şekil 5). Ur sayısında ise % 85 oranında bir azalma tespit edilmiştir.



Şekil 5. Asmada ur oluşumuna PGPR izolatlarının etkisi.

Figure5. Effect of PGPR isolates on tumor formation on vine.

PGPR izolatları uygulanmış asma çubuklarında sürgün sayısı yönünden istatistiksel olarak LSD'ye göre % 5 önem seviyesinde önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4). Ortalama 1,5 adet sürgün ile en yüksek Os1/3-1 izolatı uygulanmış çubuklarda görülmüştür. En az sayıda sürgün ise Ga1/2-1 izolatı uygulanan çubuklarda elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu yönünden ise en uzun sürgün Ga1/2-1 uygulanmış çubuklardan elde edilirken en kısa sürgünler sırasıyla Ga4/3-1, Ga16/2-1 ve Ga3/3-1 uygulanan asma çubuklarında belirlenmiştir.

Sürgün kuru ve yaş ağırlıklarında uygulamalar arasında önemli farklılıklar olmuş ve en fazla sürgün yaş ve kuru ağırlığı OsD1/3-1 uygulanmış asma çubuklarından elde edilmiştir. Kök uzunluğu, kök yaş ve kuru ağırlığına göre de en fazla OsD1/3-1 izolatı uygulanmış asma çubuklarında gözlenmiştir. Bitki gelişimi yönünden genel olarak değerlendirildiğinde en fazla etkili olan OsD1/3-1 izolatı aynı zamanda ur gelişimini de önemli düzeyde azaltmıştır. Bununla birlikte Ga7/3-

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

Çizelge 4. PGPR izolatları uygulanmış asmalarda 3.5 ay sonra oluşan sürgün sayısı, sürgün ve kök uzunluğu, yaş ve kuru ağırlığı

Table 4. Determinations of the number of shoot and root length, fresh and dry weight of shoot and root on vines 3.5 month after treatment by PGPR isolates

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

*Ortalamlar yukardan aşağı doğru izlendiğinde aynı harfi taşıyan ortalamalar farksızdır. (Duncan; $p \leq 0.05$)

Toprakta izole edilen PGPR bakteriler *A. vitis* tarafından neden olan ur oluşumunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu izolatların ikili veya üçlü kombinasyonlarının birlikte uygulandığında *A. vitis* tarafından neden olan ur oluşumu üzerine tekisi belirlenmelidir. Bununla birlikte daha önce dikilmiş olan asmaya etkisinde belirlenerek daha önce kurulmuş bağlarda uygulanıp uygulanmayacağı da ortaya çıkarılmalıdır.

Kaynaklar

- Abd-alla M.H. 1994. Phosphates and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 294-296.
- Ağaoğlu Y.S. 1986. Bağcılık. Türkiye İş Bankası Genel Müdürlük, Halkla İlişkiler Müdürlüğü Yayınları, Ankara, 23 s.

- Argun N., M.T. Momol, S. Maden, E.A. Momol, C.L. Reid, H. Çelik & T.J. Burr 2002. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in the Central Anatolia region. *Plant Disease*, 86: 162-166.
- Barton C.J. 1948. Photometric analysis on phosphate rock. *Analytical Chemistry*, 20: 1068-1073.
- Bell C.R., G.A. Dickie & J.W.Y.F. Chan 1995. Variable response of bacteria isolated from grapevine xylem to control grape crown gall disease in planta. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 499-508.
- Bouzar H. & L.W. Moore 1987. Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass prairie. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 717-721.
- Burr T.J., C. Bazzi, S. Süle & L. Otten 1998. Crown gall of grape, biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease*, 82: 1288-1297.
- Burr T.J., C.L. Rein, C.E. Adams & E.A. Momol 1995. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia*. *Plant Disease*, 79: 102-107.
- Cavara F. 1897. Tuberculosis della vite. Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. *Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane*, 30: 48-487.
- Chen F., Y.B. Guo, J.H. Wang, J.Y. Li & H. M. Wang 2007. Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2. *Plant Disease*, 91: 957-963.
- Çelik H., B. Maraslı, G. Söylemezoğlu, S. Tangolar & M. Gündüz 2000. Bağcılıkta üretim hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği, V. Teknik Kongresi Bildirileri, Ankara, 2: 645-678.
- Elad Y. & I. Chet 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of pythium damping-off by bacteria. *Phytopathology*, 77: 190-195.
- Johri J.K., S. Surange & C.S. Narula 1999. Occurrence of salt, pH and temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39: 89-93.
- Jones D.L. & P.R. Darrah 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil*, 166: 247-257.
- Kawaguchi A., K. Inoue & H. Nasu 2005. Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *Journal of General Plant Pathology*, 71: 422-430.
- Kerr A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Disease*, 64: 25-30.
- Kerr A. & C.G. Panagopoulos 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathologische Zeitschrift*, 90: 172-179.
- Knauf V.C., C.G. Panagopoulos & E.W. Nester 1983. Comparison of Ti plasmids from three different biotypes of *Agrobacterium* isolated from grapevine. *Journal of Bacteriology*, 153: 1535-1542.
- Leyval C. & J. Barthelin 1989. Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: influence on P, K, Mg and Fe mobilization from mineral and plant growth. *Plant and Soil*, 17: 103-110.
- Liang Y., Y. Di, J. Zhao & D. Ma 1990. A biotype 3 strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits crown gall formation on grapevine. *Acta Microbiologica Sinica*, 30: 165-171.
- Mirik M. 2005. Biberde bakteriyel leke etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rhizobakteriler ile biyolojik mücadele olanakları. Doktora Tezi, Ç. Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 162 s.

- Moore L.W. & G. Warren 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Annual Review of Phytopathology*, 17: 163-179.
- Nautiyal C.S., S. Bhaduria, P. Kumar, H. Lal, R. Mondal & D. Verma 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, 182: 291-296.
- Ophel K. & A. Kerr 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40: 236-241.
- Ride M., S. Ride, A. Petit, C. Bollet, Y. Dessaux & L. Gardan 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.
- Salomone J.Y., P. Cruzet, P. De Ruffray & L. Otten 1996. Characterization and distribution of tartarate utilization genes in the grapevine pathogen *Agrobacterium vitis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 9: 401-408.
- Schroth M.N., A.H. Mcchain, J.H. Foott, O.C. Huisman 1988. Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant Disease*, 72: 241-246.
- Shim J.S., S.K. Farrand & A. Kerr 1987. Biological control of crown gall: construction and testing of new biocontrol agents. *Phytopathology*, 77: 463-466.
- Silva H.S.A., R.S. Remeiro, R. Carren, J.L.A. Pereira, E.S.G. Mizubuti & A. Munteer 2004. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of Phytopathology*, 152: 371-375.
- Staphorst J.L., F.G.H. van Zyl, B.W. Strijdom, & Z.E. Groenewold 1985. Agrocine-producing pathogenic and nonpathogenic biotype-3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype-3 pathogens. *Current Microbiology*, 12: 45-52.
- Sumner M.E. 1990. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Advanced Soil Science*, 12: 53-123.
- Tomashow L.S. & D.M. Weller 1988. Role of phenazine antibiotic in suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170: 3499-3508.
- Webster J. & J.A. Thomson 1986. Agrocine producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 217-219.
- Weller D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.
- Xianying C. & X. Wangnian 1986. A strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits growth and gall formation by biotype III strains of *Agrobacterium tumefaciens* from grapevine. *Acta Microbiologica Sinica*, 26: 193-199.