

Bağ Üretim Materyalinde Kök Uru Etmeni *Agrobacterium tumefaciens*'in Saptanması

Kemal BENLİOĞLU

Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın-TÜRKİYE

Meriç ÖZAKMAN

Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, P.K. 49, Yenimahalle, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi:05.03.1996

Özet: *A. tumefaciens* biovar 3'e karşı üretilen poliklonal antiserum immunofluoresan testte Orta Anadolu bölgesinde bağ kanseri etmeni *A. tumefaciens* biovar 3 izolatlarıyla pozitif reaksiyon verdi. Antiserum *A. tumefaciens* biovar 1 (1/200 seyreltmenin dışında), biovar 2, diğer bitki patojeni ve simbiyotik bakterilerle reaksiyon oluşturmadı. Dormant dönemdeki 1 yaşlı bağ çubuklarının iletim demetlerinde *A. tumefaciens*'in varlığını saptamak amacıyla vakum ekstraksiyon işlemi uygulandı. Bakterilerin tesbitinde IFAS ve seçici besiyerinden yararlanıldı. Orta Anadolu bölgesinde sağlıklı görünen 150 asmadan 7 sinin, 8 bulaşık asmasının da 6 tanesinin sürgünlerinden *A. tumefaciens* (biovar 3) izole edildi. IFAS ve seçici besiyerinin etkinliği ve vakum ekstraksiyonunun duyarlılık eşiği deneysel olarak araştırıldı. Aynı zamanda 27 çeşite ait 1 yaşlı aşılı bağ fidanı köklerinde *A. tumefaciens*'in varlığı incelendi. Bu çeşitlerden 6 tanesinin tümör oluşturan biovar 3, 7 tanesinin de tümör oluşturmayan biovar 3 veya 1 ile bulaşık olduğu belirlendi. Elde edilen 28 *A. tumefaciens* izolatından, fizyolojik karakteristiklerine göre 25 tanesi Biovar 3, 3 tanesi de biovar 1 olarak tanılandı.

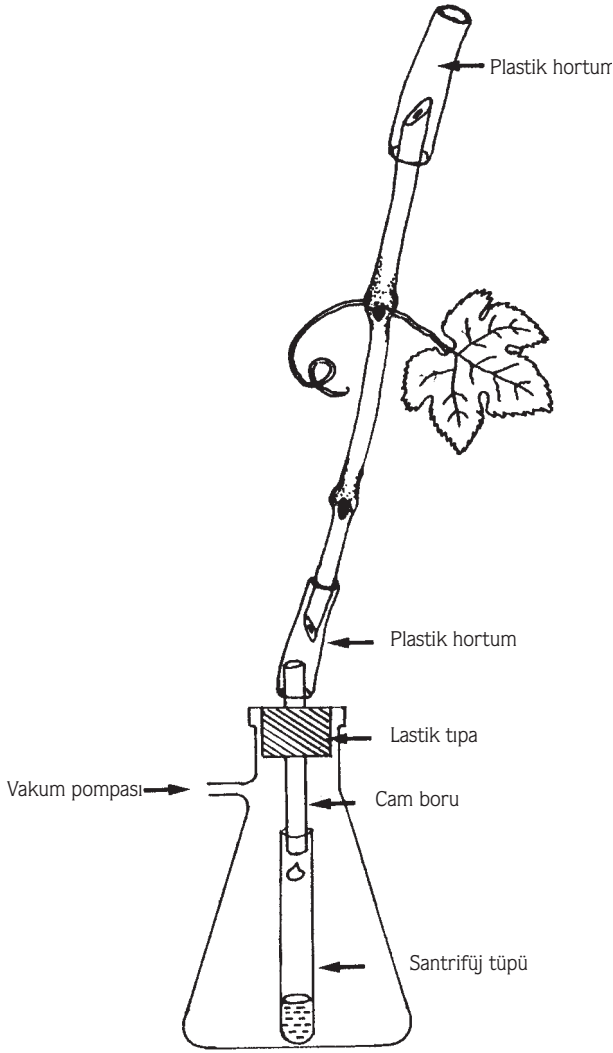
Detection of Crown Gal Agent (*Agrobacterium tumefaciens*) in Grapevine Propagating Material

Abstract: Polyclonal antiserum produced against *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 3) reacted in immunofluorescent test with biovar 3 strains of *A. tumefaciens*, causal agent of crown gal, from Central Anatolia. The antiserum did not react with *A. tumefaciens* biovar 1 (except for 1/200 dilution), biovar 2, other plant pathogens and symbionts. Vacuum extraction procedure were applied to recover *A. tumefaciens* from xylem vessels of one year old dormant grape cuttings. IFAS and selective media were used to detect bacteria. *A. tumefaciens* (biovar 3) was recovered from six cuttings of 8 infected vines and seven of 150 apparently healthy vines in Central Anatolia. The sensitivity threshold of the vacuum extraction method and the effectiveness of the IFAS and selective media were experimentally evaluated. Roots of 1 year old grafted vines of 27 cultivars were also examined for the presence of *A. tumefaciens*. Six of these cultivars were contaminated with tumorigenic biovar 3 and seven of these with nontumorigenic biovar 3 or 1. Of 28 strains of *A. tumefaciens* isolated, 25 were identified as biovar 3, and 3 as biovar 1 according to their physiological characteristics.

Giriş

Agrobacterium tumefaciens (Smith & Townsend) Conn. (At)'in neden olduğu bağ kanseri, tüm dünyada bağlarda (*Vitis L.*) görülen en önemli hastalıklardan biridir. Avrupa'da; Yunanistan (1), İtalya (2), İspanya (3), Fransa'da (4) ve Macaristan'da (5); Amerika'da; A.B.D. (6, 7) ve Kanada'da (8), Güney Afrika'da (9) bağ alanlarında önemli zararlar yaptığı bildirilmiştir. Ülkemizde de Öktem ve Bora (10) hastalığının Orta Anadolu bağlarında mevcut olduğunu ve önemli kayıplara yol açtığını saptamışlardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, bağlarda kansere neden olan *Agrobacterium tumefaciens*'in "Biovar-3" adlı altında bağa özgü bir streyn olarak diğer patojen *Agrobacterium*'lardan farklılaştığını göstermiştir (1, 5, 7, 11, 12). Asma köklerinde ve daha çok da asmanın üst kısımlarında galler meydana getiren toprak karakterli patojenin, asmada odun boruları ile üst aksamlara taşındığı ayrıca hastalık belirtisi göstermeyen omcalardan alınan sürgünlerin iletim demetlerinde de etmenin bulunabildiği kesin olarak ortaya konmuştur (13, 14). Bu noktadan hareket ederek Burr and Katz (15) ve Tarbah



Şekil 1. Bağ sürgünleri iletim demetlerinden bakteri ekstraksiyonu için kullanılan düzenek

and Goodman (16) A.B.D. de bağ üretim materyalinde *A.tumefaciens*'in varlığını saptamak için bir indeksleme sistemi geliştirmiş, İtalya'da Bazzi et al. (2) da bu yöntemin geniş çapta bağ sürgünlerinde uygulanabilmesi üzerinde denemeler yapmışlardır.

Dünya'da bağlarda kök uru hastalığına karşı ne biyolojik ne de kimyasal etkin bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır (12). Bu nedenle patojenden arı üretim materyali bu problemin şiddetini azaltacak etkin bir çare olarak görünmektedir. Bağ üreticileri genel olarak bağ kanserinin olmadığını gözledikleri omcalardan aldıkları çeliklerle üretim yapmaktadırlar. Ancak bağ kanseri üzerinde yapılan çalışmalar pratikte bunun hatalı sonuçlar doğurabileceğini, bulaşık materyalin seçilme şansı

olduğunu ve ilerde daha büyük problemlere yol açacağını göstermiştir.

Bu çalışma; ülkemiz koşullarında üretim materyali olarak kullanılan bağ çeliklerinde bağ kanseri etmeni *Agrobacterium tumefaciens*'in varlığını saptamak, bağ fidanı üretiminde, indeksleme çalışmaları ve sertifikasyon işlemlerinde pratik ve güvenilir bir yöntemi uygulamaya verebilmek amacıyla ele alınmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bakteri kültürleri: Çalışmalarda yurt dışında çeşitli kaynaklardan temin edilen ve Türkiye'de izole edilmiş At izolatları ve diğer bakteri kültürleri kullanıldı. Aksine bir durum olmadığı sürece bakteriler PDA (Patates Dekstroz Agır-Merck) besiyerinde 28°C de geliştirildi ve saf kültürler Nutrient Agar (Merck) eğik besiyerinde +4°C de saklandı. Çalışmada kullanılan bakteriyel patojenlerle ilgili bilgiler sonuçlar bölümünde Tablo 1'de verilmiştir.

Antiserum üretimi: PDA da geliştirilen 3 günlük At izolatu (CG-49 biovar 3) içeren petriler 3-5 ml PBS (0.01 M potasyum fosfat tamponu+0.15 M NaCl pH=7.2) ile yıkanarak ayrı ayrı tüplere alındı ve bakteriler santrifüjde 12 000 g de 20 dakika süreyle 3 kez PBS le yıkandı. Yıkanan bakteriler aynı tampon çözelti içinde süspansiyon edildi ve bakteri konsantrasyonu 10^9 - 10^{10} hücre/ml olacak şekilde süspansiyonun optik geçirgenliği 630 nanometrede $OD_{630}=1.2$ (Bio-Tek microplate reader)' e ayarlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları immunizasyondan önce 80°C de 10 dakika (17) tutuldu.

Antiserum üretimi için 1 yaşlı beyaz Yeni Zelanda tavşanları ısı uygulaması yapılmış antijen kullanılarak Benlioğlu and Özakman (18)'da belirtilen immunizasyon yöntemine göre enjekte edildi. Preimmune serum ve antiserum -20°C'de saklandı. Antiserum titrelerinin saptanmasında ve bakteri izolatlarının serolojik yöntemle tesbit çalışmalarında Indirect Fluorescent Antibody Staining (IFAS) testinden yararlanıldı (18).

İletim demetlerinden bakteri ekstraksiyonu: Bağ çubuklarında odun borularında bulunan *A.tumefaciens* bakterilerinin tesbiti için Bazzi et al., (2) de belirtilen yöntemden yararlanıldı. Bu amaçla Orta Anadolu'da, Kırşehir ve Nevşehir yöresindeki bağlardan dormant dönemde 1 yaşlı bağ sürgünleri (yaklaşık 40-50 cm uzunlukta üzerinde 3-4 göz bulunan) toplandı. Bağ sürgünlerinden özsu ekstraksiyonu için çubukların her iki ucuna 5-6 cm uzunlukta plastik hortum takılarak sürgünün büyüme ucu vakum erlenine bağlanacak şekilde Şekil-1'de belirtilen bir düzenekle vakum pompasına bağlandı. Sürgünün köke yakın olan ucundaki plastik

hortuma 3 ml steril damıtık su kondu ve 500mm Hg lık bir vakum uygulanarak bu suyun sürgünün iletim demetlerinden geçirilip erlen içindeki tüpte toplanması sağlandı. Tüpteki bu sıvı 5000 g de 10 dakika santrifüjlenip pellet 0.3 ml steril su içinde süspansiyon edildi. Bu şekilde hazırlanan ekstraktlardan hem serolojik yöntemle (IFAS) hemde aşağıda içeriği verilen seçici besiyerine ekim yapılarak *A.tumefaciens*'in varlığı araştırıldı.

Roy and Sasser seçici besiyeri (RS) (19): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g; K_2HPO_4 , 0.9g; KH_2PO_4 , 0.7g; Adonitol, 4.0g; Yeast extract, 0.14g; NaCl, 0.2g; H_3BO_3 , 1.0g; Agar 15.0g; Cycloheximide 100mg; damıtık su 1000 ml pH=7.2'e ayarlandıktan sonra besiyeri otoklav edildi, daha sonra yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulan 1 l besiyerine antibiyotiklerin sulu çözeltileri filtre ile sterilize edilerek Triphenyltetrazolium Chloride 80 mg; D-cycloserine 20 mg; Trimethoprin 20 mg olacak şekilde aseptik koşullarda ilave edildi. RS besiyerinde 3-4 gün sonunda tipik kırmızı renk veren kolonilerden 5 tane seçildi ve PDA besiyerlerine transfer edilerek saflaştırılıp diğer testleri yapmak üzere stoklandı.

Bağ fidanlarından izolasyon: Orta Anadolu Bölgesinde Karaman, Çankırı ve Ankara illerinde bağ tesisi amacıyla getirilen aşılı köklü bağ çubukları testlendi. Her çeşitten yaklaşık 25-30 bağ fidanının kökleri önce musluk suyunda yıkandı. Daha sonra yan kökler steril bir bağ makası ile (3-4 cm uzunlukta) doğrandı ve her örnekten

toplam 500 g kesilmiş kök içinden tesadüfen 10 g tartıldı ve kök parçaları 200 ml steril damıtık su içinde blender da 1 dakika süreyle parçalandı. Hazırlanan bu süspansiyonlardan sulandırma serileri hazırlanarak IFAS yöntemi ve RS besiyerine ekim yapılarak bakterilerin varlığı daha önce belirtildiği şekilde araştırıldı.

Patojenisite testleri ve biovarların belirlenmesi: Patojenisite testleri için saksıda geliştirilmiş 2-3 haftalık *Datura* sp.bitkileri kullanıldı. Bitkileri inokule etmek için PDA da 24-48 saat geliştirilen referans izolatları (Tablo 1) ve saf kültürlerden steril bir kürdanla bir miktar inokulum alındı ve bitkilerin gövdesi, köke yakın kısımdan hafifçe delinerek inokulasyon yapıldı. Her izolat için 2 bitki inokule edildi ve bitkiler 3-4 hafta süreyle ur oluşumu için incelendi. Tipik ur meydana getiren izolatlar patojen At olarak belirlendi. Çalışmalarda elde edilen *Agrobacterium* izolatlarında biovarların ayırımı için: Seçici D1M (20) besiyerinde gelişme, %2 NaCl de gelişme, Litmus milk, Eryhritol'dan asit oluşumu ve 3-keto laktöz testleri uygulandı (21).

Yöntemlerin Duyarlılığı: Bu amaçla daha önce hiç bağ kanseri görülmediği bilinen Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme bağından alınan Çavuş çeşiti bağ çubukları kullanıldı. CG-49 nolu At izolatının 24-48 saatlik PDA kültürlerinden steril damıtık su ile bakteri süspansiyonu hazırlandı (1.5×10^6 hücre/ml). Hazırlanan solusyonun mililitresindeki bakteri sayısı PDA besiyerine sulandırma serilerinden ekim yapılarak koloni sayımıyla

Testlenen bakteriler ve orijinleri*	Antiserum sulandırmaları			
	1/200	1/400	1/800	1/1600
<i>A.tumefaciens</i> CG-49 (A.B.D.) biovar 3	+	+	+	+
<i>A.tumefaciens</i> CG-56 (A.B.D.) biovar	+	+	±	-
<i>A.tumefaciens</i> At-Y1 (Yalova) biovar 1	+	-	-	-
<i>A.tumefaciens</i> NCPPB-1651 (İngiltere) biovar 2	-	-	-	-
<i>A.radiobacter</i> K-84 (Avustralya)	±	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (Antalya)	-	-	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> ssp <i>atroseptica</i> (Nevşehir)	-	-	-	-
<i>Erwinia amylovora</i> (Isparta)	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i> (Bartın)	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ankara)	-	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> .pv <i>juglandis</i> (NCPPB-1416 UK)	-	-	-	-
<i>Rhizobium phaseoli</i> (Ankara)	-	-	-	-

Tablo 1. *A.tumefaciens* (Biovar 3)'e karşı üretilen antiserumun farklı sulandırma serilerinde çeşitli bakteri türlerine karşı IFAS testi sonuçları

(+) Pozitif (-) Negatif (±) Zayıf fluorensans

NCPPB- National Collection of Plant Pathogenic Bacteria-İngiltere

* Orijini Türkiye olan izolatlar yazarlar tarafından izole edilmiş ve tanılanmış bakterilerdir.

Bağ kanseri görülen omcalardan alınan sürgünler					
Sürgün sayısı	Alındığı yer	Çeşit	IFAS	RS	Patojenisite
1	At-N1 (Nevşehir)	Razaki	+	+	-
1	At-N2 (Nevşehir)	Razaki	+	+	+
1	At-N3 (Nevşehir)	Razaki	+	+	+
1	At-N4 (Nevşehir)	Sultani çekirdeksiz	+	+	+
1	At-N5 (Nevşehir)	Pembe çekirdeksiz	+	+	-
1	At-N6 (Nevşehir)	Dirmit	+	+	+
1	At-K1 (Kırşehir)	Hafız Ali	+	+	+
1	At-K2 (Kırşehir)	Edincik Karası	+	+	+

Tablo 2. Nevşehir ve Kırşehir illerinde durgun dönemde bağlardan alınan sürgünlerin iletim demetlerinde *A.tumefaciens*'in varlığı

Bağ kanseri görülmeyen omcalardan alınan sürgünler					
75	Nevşehir	Emir	-	-	
5	Nevşehir	Emir	+	+	+
68	Nevşehir	Dirmit	-	-	
2	Nevşehir	Dirmit	+	+	+

İl	İzolat No	Çeşit	IFAS	RS	Patojenisite
Karaman	At-6	Amasya	+	+	+
"	At-12	Hamburg Misketi	+	+	+
"	Ar-1	İtalia	+	+	-
"	Ar-2	Amerikan asma amacı 41B	+	+	-
Çankırı	At-8	Manda Gözü	+	+	-
"	At-15	Erenköy	+	+	+
"	At-10	Muscat	+	+	+
"	At-14 (biovar 1)	Amerikan	-	+	-
Ankara	Ar-4	Hafızali	-	+	-
"	At-9	Çavuş	+	+	+
"	At-9/1 (biovar 1)	Çavuş	-	+	-
"	At-11	Beyaz Kozak	+	+	+
"	At-16(biovar)	Müşküle	-	+	-

Tablo 3. Karaman, Çankırı ve Ankara illerinde *A.tumefaciens* ile bulaşık aşı köklü bağ fidanları

belirlendi. Daha sonra hazırlanan sulandırma serilerinin her birinden 3 ml alınıp, daha önce belirtilen vakum ekstraksiyon yöntemine göre (Şekil 1) bağ çubukları içinden yıkama yapılarak geçirildi. Deneme her tekerrür için ayrı bağ çubuğu kullanılarak 3 tekerrürlü olarak yürütüldü. Tüpte toplanan ekstraktlar santrifüjlenerek 0.3 ml steril damıtık suda süspansiyon edildi. Ekstraksiyon sonrası bu süspansiyonlardaki bakteri sayısı yine sulandırma serileri hazırlanarak IFAS yöntemi ile mikroskopta ve RS besiyerine ekim yapılarak koloni

sayımıyla belirlendi.

Bulgular

CG-49 (Biovar 3)'e karşı üretilen antiserumun IFAS titresi 1/1600 olarak saptandı. Bilinen *A.tumefaciens* izolatları ve farklı bakteri türleri ile yapılan testlerde elde edilen antiserum *Agrobacterium* dışında diğer bitki patojeni ve simbiyotik bakterilerle reaksiyon vermemiştir. Düşük sulandırma serilerinde ise Biovar 2 dışında diğer

Çeliklere uygulana bakteri sayısı* hücre/ml	Ekstraksiyon sonrası			
	Seçici besi yeri RS		IFAS	
	Bakteri sayısı* hücre/ml	%kazanç	Bakteri sayısı* hücre/ml	% kazanç
1.5x10 ⁶	1.6x10 ⁵	10.7	2.1x10 ⁵	14.0
1.5x10 ⁵	1.8x10 ⁴	12.0	3.4x10 ⁴	22.7
1.5x10 ⁴	2.2x10 ³	14.7	3.1x10 ³	20.7
1.5x10 ³	2.0x10 ²	13.3	3.2x10 ²	21.3
1.5x10 ²	0.00	-	0.00	-
		Ort.12.7		Ort.19.7

* 3 tekrerrün ortalamasıdır.

Karakteristikler	Biovarlar ^a			Bağ İzolatları ^b
	1	2	3	
IFAS	-	-	+	24
RS besiyerinde gelişme ^c	+	-	+	28
D1M de gelişme ^d	+	-	-	3
%2 NaCl de gelişme	+	-	+	28
Litmus milk	Alk.	Asit	Alk.	Alk.
Erythritol'dan asit oluşumu	-	+	-	0
3-keto laktöz	+	-	-	3
Datura sp.de ur oluşumu	+	+	+	19

^a biovarların ayırımında özellikleri çizelge 1 de verilen (CG-49, NCPPB-1651 ve At-Y1)

^b *A. tumefaciens* izolatları referans olarak kullanılmıştır.

^c Testlenen 28 izolattan pozitif sonuç veren izolat sayısı

^d Biovar 1 RS besiyerinde biovar 3'e oranla çok yavaş gelişmekte ve küçük kırmızı renkli koloniler oluşturmaktadır.

^e Biovar 2 D1M besiyerinde 1-2 mm geçmiyen çok küçük koloniler oluşturmaktadır.

Agrobacterium izolatları ile pozitif sonuç alırken, 1/400 sulandırmadan itibaren sadece biovar 3 ile pozitif sonuç alınmıştır (Tablo 1).

Nevşehir ve Kırşehir'de bağ alanlarından hastalık belirtisi gösteren ve göstermeyen omcalardan toplam 158 sürgün incelenmiştir. Hastalık belirtisi gösteren omcalardan alınan 8 sürgünün 6 tanesinde, belirtili göstermeyen omcalardan alınan 150 sürgünden 7 tanesinde de patojenik *A. tumefaciens*'in varlığı saptanmıştır (Tablo 2).

Orta Anadolu'da Karaman ilinde bağ tesisi amacıyla kullanılacak olan bağ fidanlarından; Hafızali, Amasya, Razaki, Hamburg Misketi, Amerikan asma anacı 41 B ve 5BB çeşitlerini içeren 7 örnek; Çankırı'da Cardinal,

Mandagözü, Erenköy, Amasya, Hamburg Misketi (3 parti), Kozak, Muscat, Çavuş, Royal, Amerikan olmak üzere toplam 12; Ankara ilinde ise Hafızali, Müşküle, Çavuş (2 parti), Hamburg Misketi, Beyaz Kozak, Muscat, Amasya çeşitlerini kapsayan 8 olmak üzere 3 ilden toplam 27 örnek At'in varlığı yönünden testlenmiştir. Bu örneklerden pozitif sonuç verenler Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3'de görüldüğü gibi toplam 27 çeşit bağ fidanına ait örneklerin incelenmesinden 13 tanesinden At izole edilmiş diğerlerinde ise rastlanmamıştır. İzole edilen At'lerden 6 tanesi Datura bitkisinde ur oluşturmuş, 3 tanesi biovar 1, diğerleri ise biovar 3 olarak tanımlanmıştır.

Vakum ekstraksiyon yöntemiyle sürgünlere uygulanan

Tablo 4. Deneysel olarak bulaştırılan bağ çeliklerinde iletim demetlerinde RS besiyeri ve IFAS testi ile *A. tumefaciens*'in tesbiti

Tablo 5. Bağ fidanları kökleri ve bağ sürgünleri iletim demetlerinden izole edilen 28 *A. tumefaciens* izolatının karakteristikleri.

At bakteri sayısının saptanmasına yönelik etkinlik denemelerinde (Tablo 4); RS seçici besiyerinde sürgüne uygulanan bakterilerin ortalama %12.7 si, IFAS testinde ise daha yüksek olarak ortalama %19.7'i saptanabilmiştir. Her iki yöntemle yapılan tesbit çalışmalarında çeliklerde ml'de yaklaşık 1500 bakteri bulunması durumunda sırasıyla RS de %13.3, IFAS'ta %21.3 oranlarında bakterilerin saptanabileceği görülmüştür.

İzolasyon çalışmalarında elde edilen *Agrobacterium* izolatlarının biovarların ayırımına yönelik testlerde elde edilen bulgular Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5 incelenecek olursa bağ iletim demetleri sıvısı ve köklerinden izole edilen toplam 28 At izolatından 3 tanesi biovar 1, diğerleri ise biovar 3 olarak tanımlanmıştır. *Datura* sp. bitkisinde yapılan patojenisite testlerinde ise 19 biovar 3 izolatı ur oluşturmuş, 6 At (biovar 3) ve 3 At (biovar 1) izolatının da patojen olmadığı görülmüştür. Elde edilen biovar 3 izolatları poliklonal antiserumla IFAS testinde pozitif sonuç vermiş, biovar 1 olarak tanınanlar ise herhangi bir floresans vermemiştir. RS besiyerinde hem biovar 1 hemde biovar 3'ün geliştiği görülmüş, ancak biovar 1 in 3'e nazaran çok daha yavaş geliştiği dikkat çekmiştir.

Tartışma

Bağ izolatı *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 3) e karşı üretilen poliklonal antiserum IFAS testlerinde biovar 3 dışındaki diğer *Agrobacterium* izolatları ile (biovar 1 ve 2) sadece düşük seyreltme serisinde (Tablo 1) reaksiyona girmiş, 1/400 ve üzerindeki seyreltmelerde oldukça spesifik olduğu görülmüştür. Alarcon et al. (22) İspanya'da her 3 biovara karşı ürettiği çeşitli antiserumlarda biovar 3'e karşı üretilen antiserumun düşük titrede (1/10) bazı At (biovar 1) izolatları ile zayıf reaksiyon verdiğini saptamıştır. Çalışmalarımızda elde edilen antiserum yine bir bağ izolatı olan Amerikan orijinli CG-56 ile 1/800 titrede zayıf reaksiyon verdiğini gözlenmiştir (Tablo 1). At (biovar 3) coğrafik orijin itibariyle serolojik test sonuçları yönünden oldukça farklılıklar göstermektedir. Örneğin; Bazzi et al.(2) İtalya'da bir bağ izolatına karşı üretmiş oldukları poliklonal antiserumun İtalya'daki bazı bağ izolatları yanısıra, Amerika, İspanya, Yunanistan orijinli bazı bağ izolatı *Agrobacterium*'larla negatif sonuç verdiğini bildirmiştir. Ancak bu çalışmada üretilen serumun At-biovar 3 izolatlarının çoğunluğunda pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Nitekim A.B.D.'de Bishop et al. (17) At (biovar 3)'e karşı ürettikleri monoklonal serumun Amerika'daki bağ izolatlarına karşı oldukça spesifik olarak kullanılabileceğini, ancak patojen ve patojen olmayan

biovar 3'lerin ayırımının yapılmadığını rapor etmişlerdir. Aynı monoklonal serum kullanılarak yürütülen bir başka çalışmada İtalya'dan elde edilen At (biovar 3) izolatlarına karşı, bu serumun bir kaç izolat dışında reaksiyona girmediği bu nedenle de poliklonal serumun IFAS testi ile birlikte indekslemede kullanılmasının daha yararlı olacağı sonucuna varılmıştır (23). Çalışmalarımızda elde edilen antiserum, ülkemiz Orta Anadolu bölgesi bağlarından elde edilen At (biovar 3) izolatlarına karşı pozitif sonuç vermiş, ancak bazı patojen olmayan At izolatları ile de reaksiyona girdiği (Tablo 2 ve 3) görülmüştür. Bunun ise indeksleme açısından bir sakınca yaratmayacağı, çünkü patojenik olanların yanısıra patojen olmayan biovar 3 izolatlarının da bağ köklerinde çürümelere yol açtığı bilinmektedir (24).

İzolasyon çalışmalarında kullanılan Roy and Sasser (19) besiyeri biovar 3 için oldukça seçici özellikte olup, çalışmalarımızda izole edilen tüm At (biovar 3) izolatları RS besiyerinde tipik kırmızı renkli koloniler oluşturmuştur. Bağ fidanı köklerinden yapılan izolasyonlarda ise bazı At izolatlarının yavaş gelişmeyle birlikte kırmızı renkli koloniler verdiği görülmüş ve bu izolatlar biovar 1 olarak tanımlanmıştır (Tablo 3). Söz konusu seçici besiyeri bağ ve bağ fidanlıkları toprakları ve asma köklerinde At'nin varlığına yönelik çalışmalarda (24), bağ üretim materyali indeksleme çalışmalarında (2, 15, 16) kullanılmış ve biovar 3 için seçiciliği yüksek bir besiyeri olduğu dile getirilmiştir. Burr et al. (24) çalışmalarımızda saptandığı gibi bazı biovar 1 izolatlarının RS besiyerinde kırmızı renkli koloniler oluşturduğunu ancak yavaş geliştiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarımızda toplam 28 At izolatından 19 tanesi *Datura* bitkisinde ur oluşturmuştur. At izolatlarının çeşitli test bitkilerinde (ayçiçeği, domates, asma, *Bryophyllum* sp., *Nicotiana glauca*) yapılan patojenisite testlerinde farklı sonuçlar verebildikleri ve ur oluşturma özelliğinin %78-94 arasında değişen oranlarda bir doğrulukla saptanabileceği araştırmacılarca belirtilmektedir (12, 21).

Nevşehir ve Kırşehir illerinde durgun dönemde omcalardan alınan sürgünlerin incelenmesi sonucu elde edilen bulgularımız hastalıklı omcalardan alınan sürgünlerin yanısıra sağlıklı görünen omcalardan alınan sürgünlerin iletim demetlerinde de *A.tumefaciens*'in mevcut olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, asma iletim demetlerinde At'nin sistematik olarak hareketini bildiren Lehoczky, (14, 25), Burr and Katz (12)'in raporlarını doğrulamaktadır. Çalışmalarımızda kullanılan vakumlu ekstraksiyon yöntemi özellikle indeksleme çalışmalarında, belirti göstermeyen bağ sürgünlerinde At'in varlığının saptanması açısından önem taşımaktadır. Bu metod özellikle kısa sürede sonuç veren IFAS testi ve seçici

besiyeri ile kombine edilerek uygulanabilir. Nitekim Aynı yöntemin İtalya'da IFAS testi ile birlikte indeksleme ve sertifikasyon işlemlerinde (2), A.B.D. de serolojik testlerle kombine edilerek indeksleme çalışmalarında (17) ve yine aynı ülkede sadece RS besiyeri kullanılarak (16) etkin ve güvenilir bir indeksleme yapılabileceği ortaya konmuştur.

Bilinen konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları kullanılarak bağ sürgünlerinde yürütülen etkinlik denemelerimizde, RS besiyeri ve IFAS'ın ml özsuda 1500 bakteriyi tesbit edilecek duyarlılıkta olduğu saptanmıştır (Tablo 4). Uygulamış olduğumuz yöntemlere göre; IFAS sürgünlerindeki mevcut bakteri sayısının ortalama %19.7 ini, RS ise ortalama %12.7 ini saptayabilecek düzeydedir. Benzeri bir çalışmada her iki yöntemin duyarlılık eşliğinin özsuda 10^3 - 10^4 hücre/ml olduğu bildirilmiştir (2). Aynı çalışmada IFAS testinin, sürgünde mevcut bakteri sayısının %4.2-12.1, RS nin ise %1.8-4.6'ni saptayabilecek duyarlılıkta olduğu rapor edilmiştir.

Ülkemizde üretilen aşılı köklü bağ fidanlarından At'in varlığına yönelik araştırmalarımız bu fidanlardan bazılarının At 1 ve 3 nolu biovarlarının patojen olan ve olmayan streynleri ile bulaşık olduğunu göstermiştir (Tablo 3). A.B.D.'de çeşitli fidanlıklarda yapılan benzeri çalışmalarda aşılı ve aşısız bağ fidanları köklerinde patojen ve patojen olmayan biovar 1 ve 3 ırkları izole edilmiştir (24). Yapılan çalışmalar biovar 3'ün özellikle hastalıklı bağların kök ve kök çevresinde yaşamını sürdürdüğünü, rizosfer toprağı dışında bulunmadığını göstermiştir (24, 26, 27). İndeksleme çalışmaları sonunda (13, 15, 16) bağ üretim materyallerinde geniş çapta bulaşıklılık saptanması eski bağlarda ve fidanlıklardaki kök kalıntılarının bakterinin sistematik olarak çoğalmasında (25) önemli rol oynadığını göstermiştir. Nitekim suni olarak biovar 3 ile bulaştırılan topraklara dikilen, bakteri içermeyen bağ fidanlarının süratle bulaştığı ve hastalık

etmeninin temiz alanlara üretim materyali ile taşındığı saptanmıştır (24).

Sonuç

Bilindiği gibi anavatanı Türkiye olan asmanın ülkemizde çok eski yıllardan beri kültürü yapılmaktadır. Ne yazıkki ülkemiz resmi ve özel fidanlıklarında bağ kanseri *Agrobacterium tumefaciens* yönünden ne bir indeksleme çalışması yapılmakta, ne de fidan kontrollerinde laboratuvar test yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Sertifikasyon işlemleri ve fidan üretiminde kontroller çoğunlukla, fidan kök ve gövdesinde gözleme dayalı incelemelerle sürdürülmektedir. Yapılan bu çalışma ile; Orta Anadolu Bölgesi bağlarında durgun dönemde kanser belirtisi gösteren ve göstermeyen omcalardan alınan sürgünlerde, ayrıca bağ tesisi amacıyla fidanlıklar tarafından dağıtılan aşılı köklü bağ fidanlarında *A.tumefaciens*'in varlığı saptanmıştır. Bu veriler ülkemizde bağ çoğaltma materyali üretiminde mutlaka etkin ve güvenilir yöntemlerle kontrollerin yapılması gerektiğini doğrulamaktadır.

Bu çalışmada ortaya konmaya çalışılan indeksleme yöntemi çok sayıda sürgünün kısa zamanda ve süratle testlenmesinde kullanılabilir. Çalışmalarımızda kullanılan indirekt Antikor Boyama testi (IFAS) yaklaşık 2-3 saat içinde sonuç vermekte, RS seçici besiyerinde koloni oluşumu ise 3 günde tamamlanmaktadır. *A.tumefaciens* (Biovar 3)'in coğrafik orijinlere bağlı olarak oldukça değişen karakteristikleri de (24) dikkate alınırsa, RS seçici besiyeri ve IFAS'ın birlikte uygulanmasına dayalı olarak yürütülmüş olan bu yöntemin, Türkiye'de bağ indeksleme çalışmalarında, sertifikasyon işlemlerinde, damızlık seçimi ve fidan kontrollerinde pratik bir çözüm olabileceği kanısındayız.

Kaynaklar

1. Panagopoulos, C.G. and Psallidas, P.G. Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith & Townsend) Conn. J. Appl. Bacteriol. 36: 233-240. 1973.
2. Bazzi, C., Piazza, C. and Burr, T.J. Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings. EPPO Bulletin 17: 105-112. 1987.
3. Lopez, M. M., Cambra, M., Aramburu, J.M. and Bolinches, J. Problems of detecting phytopathogenic bacteria by ELISA. EPPO Bulletin, 17: 113-117. 1987.
4. Lopez, M. M. Characteristics of French isolates of *Agrobacterium*. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bact. (Angres, France) 1: 233-237. 1979.
5. Sule, S. Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. J. Appl. Bacteriol. 44: 207-213. 1978.
6. Burr, T.J. Crown gall of grapevine. Vinifera Vine Growers J. 5: 131-133. 1978.
7. Burr, T.J. and Hurwitz, B. Occurrence of *Agrobacterium radiobacter* pv *tumefaciens* (Smith&Townsend) Conn. biotype 3 on grapevines in New York State. (Abstr.) Phytopathology 71: 206. 1981.

8. Dhanvantari, B.N. Etiology of grapevine crown gall in Ontario. Can. J. Bot. 61: 2641-2646. 1983.
9. Loubser, J.T. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 on grapevine in South Africa. Plant Dis., Rep. 62: 730-731. 1978.
10. Öktem, Y.E. ve Bora, T., 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, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, İzmir, 123 s. 1978.
11. Panagopoulos, C.G. and Psallidas, P.G. and Alivizatos, A.S. Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bact. (Angers, France) 1: 221-228. 1978.
12. Burr, T.J. and Katz, B.H. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine glass and sap, and from vineyard soil. Phytopathology, 73: 163-165. 1983.
13. Lehoczky, J. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine, after natural infection. Phytopathol. Z. 63: 239-246. 1968.
14. Lehoczky, J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. Vitis 10: 215-221. 1971.
15. Burr, T.J. and Katz, B.H. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Disease, 68: 976-978. 1984.
16. Tarbah, F.A. and Goodman, R.N. Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system. Plant Dis. 70: 566-568. 1986.
17. Bishop, A.L., Burr, T.J., Mittak, V.L., and Katz, B.H. A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilisation for indexing grapevine propagation material. Phytopathology, 79: 995-998. 1989.
18. Benlioğlu, K. and Özakman, M. Evaluation of two serological methods for the identification of halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* of beans. Journal of Turkish Phytopathology, 22(2-3), 75-84. 1993.
19. Roy, M.A., and Sasser, M.A. medium selective *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 (Abstr) Phytopathology 73: 810. 1983.
20. Moore, L.W., Anderson, A. and Kado, C.I. *Agrobacterium*. Pages 17-25 in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. N.W. Schaad, ed. American Phytopathological Society, St.Paul, MN. 1980.
21. Moore, L.W., Kado, C.I., and Bouzar, H. *Agrobacterium*. Pages 16-36 in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. N.W. Schaad, ed. American Phytopathological Society, St.Paul, MN. 1988.
22. Alarcon, B., Lopez, M.M., Cambra, M. and Ortiz, J. Comparative study of *Agrobacterium* biotypes 1, 2 and 3 by electrophoresis and serological methods. J. Appl. Bacteriology. 62: 295-308. 1987.
23. Bazzi, C., Minardi, P., Burr, T.J. Katz, B.H., Bishop, A.L. and Blanchard L.M. Monoclonal and polyclonal antibodies in a comparative serological study of *Agrobacterium* Conn. biovars. Phytopath. Medit. 27: 51-56. 1988.
24. Burr, T.J., Katz, B.H., and Bishop, A.L. Population of *Agrobacterium* in vineyard and non vineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. Plant Disease, 71: 617-620. 1987.
25. Lehoczky, J. Root system of the grapevine as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bact. (Angers, France) 1: 239-243. 1978.
26. Kerr, A. Soil microbiological studies on *Agrobacterium radiobacter* and biological control of crown gall. Soil. Sci. 118: 168-172. 1974.
27. Spiers, A.G. Isolation and characterisation of *Agrobacterium* species. N.Z.J. Agric Res. 22: 631-636. 1979.