

T1146

I.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

BATI AKDENİZ BÖLGESİNDEKİ ROSACEAE FAMILYASI BİTKİLERİNDE
GÖRÜLEN *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et. al., İZOLATLARININ
PATOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE PCR İLE TANILARININ YAPILMASI

ŞERİFE BİLGE ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T1146/1-1

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2001

**BATI AKDENİZ BÖLGESİNDEKİ ROSACEAE FAMILYASI BİTKİLERİNDE
GÖRÜLEN *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et. al., İZOLATLARININ
PATOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE PCR İLE TANILARININ YAPILMASI**

ŞERİFE BİLGE ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2001

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BATI AKDENİZ BÖLGESİNDEKİ ROSACEAE FAMILİYASI BİTKİLERİNDE
GÖRÜLEN *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et. al., İZOLATLARININ
PATOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE PCR İLE TANILARININ YAPILMASI

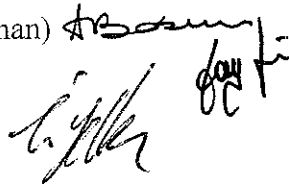
ŞERİFE BİLGE ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez 23.01/2001 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (95) not takdir edilerek
oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman)
Prof. Dr. Oktay YEĞEN
Yrd. Doç. Dr. İbrahim YILDIRIM



ÖZET

BATI AKDENİZ BÖLGESİNDEKİ ROSACEAE FAMILİYASI BİTKİLERİNDE GÖRÜLEN *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et. al., İZOLATLARININ PATOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE PCR İLE TANILARININ YAPILMASI

ŞERİFE BİLGE ÖZTÜRK

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı
Aralık 2000, 53 sayfa

Bu çalışmayla ülkemizde ilk defa ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora*'nın mikrobiyolojik açıdan detaylı olarak tanımlaması yapılmıştır. Bu çalışmada özellikle, yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında yoğun olarak görülen bu hastalık etmeninin tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de henüz kesin çözüm getiren mücadele olanaklarının bulunmaması nedeniyle Batı Akdeniz Bölgesinde *Rosaceae* familyası bitkilerinden izole edilen *E. amylovora* izolatlarının kesin tanımlarının yapılması amaçlanmıştır.

Batı Akdeniz Bölgesinde özellikle *Rosaceae* familyası bitkilerinin yetiştirilmesi açısından büyük potansiyel oluşturan Antalya, Isparta, Burdur ili ve ilçelerinden toplanan hastalıklı bitki örneklerinden izolasyonlar yapıldıktan sonra, yarı selektif besi ortamları olan MS (Miller ve Scroth 1972) ve NSA (Nutrient Sakkaroz Agar) ortamlarına bakterilerin çizimleri yapılmış, 48 saat ve 27°C' de inkübasyona bırakılarak *E. amylovora*'ya ait koloniler elde edilmiştir.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında hastalık etmeninin tanısı ile ilgili olarak patojenisite testleri yapılmış ve bu kapsamda ham armut testi, tütünde hipersensitif reaksiyon testi ve sürgün inokulasyonu testleri yapılmıştır. Ham armut testinde ooze oluşumu, tütünde hipersensitif reaksiyon oluşumu ve sürgünde patojene özel yanıklık şeklinde hastalık belirtileri saptanmıştır. Patojenisite testleri, yarı seçici besi ortamında gelişen bakterilerin patojenik *E. amylovora* olup olmadıklarının tespit edilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Patojenin biyokimyasal olarak tanımlanması aşamasında; katalaz testi, oksidaz testi, nitrattan nitrit üretimi testi, asetoin testi, indol üretimi testi, hidrojen sülfid testi, nişastanın parçalanması testi, sakkarozdan indirgenen maddeler testi, sıcaklığa hassasiyet testi, % 5 NaCl'e tolerans testi, pektinaz aktivitesi testi, King's B testi, KOH testi ve jelatinin hidrolizi testi uygulanmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" ile paralellik göstermiştir.

Hastalığın mücadelesinde genel olarak bakırlı preparatların ve antibiyotiklerin kullanılması nedeniyle bu çalışmada elde edilen her bir izolata bakır sülfatın beş farklı dozu, streptomycine'in üç farklı dozu ve oxytetracycline'in de dört farklı dozu test edilerek izolatların reaksiyonları belirlenmiştir.

Batı Akdeniz Bölgesinde *Rosaceae* familyası bitkilerinden elde edilen *E. amylovora* izolatlarına patolojik ve biyokimyasal testler uygulandıktan sonra tüm izolatların moleküler düzeyde kesin tanımlarının yapılması amacıyla PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği kullanılmıştır. Patojenik bakterinin polisakkarit üretiminden sorumlu olan ve kromozomal DNA üzerinde bulunan *ams* geninin (1.6 kb) çoğaltılması ile *E. amylovora* izolatlarının kesin tanısı yapılmıştır.

Elde edilen ve kesin tanıları tamamlanmış olan *E. amylovora* izolatlarının plazmid profillerinin belirlenmesi aşamasında tüm izolatların yaklaşık 30 kb büyüklüğünde plazmid DNA içerdikleri saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Ateş Yanıklığı, *E. amylovora*, *Rosaceae*, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

JÜRİ: Doç. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman)

Prof. Dr. Oktay YEĞEN

Yrd. Doç. Dr. İbrahim YILDIRIM

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et. al., ISOLATES OBTAINED FROM ROSACEOUS PLANTS IN WEST MEDITERRANEAN REGION BY PATHOLOGICAL, BIOCHEMICAL TESTS and PCR (Polymerase Chain Reaction) TECHNIQUE

ŞERİFE BİLGE ÖZTÜRK

M. S. in Plant Protection
December, 2000, 53 Pages

In this study, isolates of *Erwinia amylovora*, a causal agent of fire blight, was identified in detailed and in microbiological respect in Turkey. The aim of this study is to identify isolates of *Erwinia amylovora* isolated from *Rosaceous* plants grown in the West Mediterranean Region of Turkey, since there is no successful control measure alone of the disease in Turkey and in other countries.

The bacterial isolations were made from diseased plant samples obtained from Antalya, Burdur and Isparta provinces which have potential in terms of growing areas of *Rosaceae* plants. The colonies of *E. amylovora* were obtained on semi-selective media, MS (Miller and Scroth, 1972) and NSA (Nutrient Saccharose Agar) incubated at 27°C for 48 h.

In pathological tests, immature pear test, hypersensitive reaction test on tobacco and shoot inoculation test on young pear shoots were performed for the *E. amylovora* isolates. Ooze formation, hypersensitive reaction and shoot blight symptoms were determined for all the bacterial test isolates. These tests were important whether the isolated bacteria are pathogenic or not.

In the biochemical identification of the *E. amylovora* isolates catalase, activity test, oxidase activity test, nitrite production test from nitrate, acetoin test, indole production test, hydrogen sulfide test, hydrolysis of starch test, temperature sensitivity test, NaCl (%5) tolerance test, pectinase activity test and hydrolysis of gelatin test were

performed for all isolate. All the results obtained from biochemical tests were supported by 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'.

Since the antibiotics and copper mixtures were commonly used for the control of fire blight disease, in this study five different doses of oxytetracycline were tested and determined the reaction of the tested isolates.

PCR (Polymerase Chain Reaction) technique was used for certain identification of *E. amylovora* isolates by amplification of chromosomal 1.6-kb *ams* gene, after pathological and biochemical tests were completed.

E. amylovora isolates identified in detailed in this study had 30-kb plasmid.

KEY WORDS: Fire Blight, *E. amylovora*, *Rosaceae*, PCR

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Adviser)

Prof. Dr. Oktay YEĞEN

Asst. Prof. Dr. İbrahim YILDIRIM

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, Antalya, Burdur ve Isparta ili ve ilçelerinde *Rosaceae* familyası bitkilerinde zararlı olan ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora*'nın değişik lokasyonlardaki izolatları toplanarak patolojik, biyokimyasal ve PCR çalışması ile kesin tanıları yapılmış ve tüm izolatların plazmid profilleri çıkarılmıştır.

Yapılan çalışmaların tümü Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma konusunun belirlenmesinde, tüm laboratuvar tekniklerini öğrenmemde ve çalışmaların yürütülmesinde her türlü desteği sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Hüseyin BASIM'a ilgi ve gayretinden dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu'na, çalışma imkanları sunan Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma bölümü başkanlığına, bölüm başkanı hocam Prof. Dr. Oktay YEĞEN'e, çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Zir. Yük. Müh. Abdullah ÜNLÜ'ye (Ant. Nar. ve Ser. Enst.), bütün bölüm arkadaşlarıma ve benim çalışmalarında her türlü desteği sağlayan değerli aileme yaptıkları fedakarlıklardan dolayı teşekkür etmeyi bir borç biliyorum

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| ÖNSÖZ | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI | 3 |
| 3. MATERYAL ve METOT | 15 |
| 3.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi | 15 |
| 3.2. Patojenin İzolasyonu ve Tanısı | 15 |
| 3.3. Patojenin Tanısı | 15 |
| 3.3.1. MS testi | 15 |
| 3.3.2. NSA testi | 16 |
| 3.3.3. Ham armut testi | 16 |
| 3.3.4. Gövde inokulasyonu testi | 16 |
| 3.3.5. Hipersensitif reaksiyon testi | 16 |
| 3.3.6. Biyokimyasal testler | 16 |
| 3.3.6.1. Katalaz testi | 17 |
| 3.3.6.2. Oksidaz testi | 17 |
| 3.3.6.3. Nitrattan nitrit üretimi testi | 17 |
| 3.3.6.4. Aseton testi | 18 |
| 3.3.6.5. İndol üretimi testi | 18 |
| 3.3.6.6. Hidrojen sülfid testi | 19 |
| 3.3.6.7. Nişastanın parçalanması testi | 19 |
| 3.3.6.8. Sakkarozdan indirgenen maddeler testi | 19 |
| 3.3.6.9. Sıcaklığa hassasiyet testi | 20 |
| 3.3.6.10. % 5 NaCl'e tolerans testi | 20 |
| 3.3.6.11. Pektinaz aktivitesi testi | 20 |

| | |
|--|----|
| 3.3.6.12. King's B testi | 20 |
| 3.3.6.13. KOH testi | 21 |
| 3.3.6.14. Jelatinin hidrolizi testi | 21 |
| 3.3.7. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) | 21 |
| 3.3.8. PCR İçin Agaroz Jelin Hazırlanması | 24 |
| 3.3.9. Dayanıklılık Testleri | 24 |
| 3.3.9.1. Streptomycine'e ve oxytetracycline'e dayanıklılık testi | 24 |
| 3.3.9.2. Bakır sülfata dayanıklılık testi | 25 |
| 3.3.10. Plazmid Ekstraksiyonu | 25 |
| 3.3.11. Plazmid Ekstraksiyonu İçin Agaroz Jelin Hazırlanması | 26 |
| 4. BULGULAR | 27 |
| 4.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi | 27 |
| 4.2. Patojenin İzolasyonu ve Tanısı | 27 |
| 4.3. Patojenisite Testleri | 28 |
| 4.3.1. Ham armut testi | 28 |
| 4.3.2. Sürgün inokülasyonu testi | 28 |
| 4.3.3. Hipersensitif reaksiyon testi | 28 |
| 4.4. Biyokimyasal Testler | 29 |
| 4.4.1. Katalaz testi | 29 |
| 4.4.2. Oksidaz testi | 29 |
| 4.4.3. Nitratтан nitrit üretimi testi | 29 |
| 4.4.4. Aseton testi | 29 |
| 4.4.5. İndol üretimi testi | 30 |
| 4.4.6. Hidrojen sülfid testi | 30 |
| 4.4.7. Sakkarozdan indirgenen maddeler testi | 30 |
| 4.4.8. Sıcaklığa hassasiyet testi | 30 |
| 4.4.9. Pektinaz aktivitesi testi | 31 |
| 4.4.10. King's B testi | 31 |
| 4.4.11. KOH testi | 32 |
| 4.4.12. Jelatinin hidrolizi testi | 32 |
| 4.5. Dayanıklılık Testleri | 32 |

| | |
|---|----|
| 4.5.1. Streptomycine'e dayanıklılık testi | 32 |
| 4.5.2. Oxytetracycline'e dayanıklılık testi | 32 |
| 4.5.3. Bakır sülfata dayanıklılık testi | 35 |
| 4.6. Plazmid Ekstraksiyonu | 36 |
| 4.7. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) | 38 |
| 5. TARTIŞMA | 40 |
| 6. SONUÇ | 45 |
| 7. KAYNAKLAR | 48 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|--------------|--|
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| HR | Hipersensitif Reaksiyon |
| μ l | Mikro litre |
| mM | Mili molar |
| $^{\circ}$ C | Santigrad derece |
| Kb | Kilo baz (1000 baz çifti) |
| Dal | Dalton |
| cfu/ml | Mililitredeki canlı hücre sayısı |
| nm | Nanometre |
| UV | Ultraviyole ışığı |
| dNTPs | Adenin, Guanin, Sitozin ve Timinden oluşan nükleotid çözeltisi |
| TAE | Tris-asetat tampon çözeltisi |

Kisaltmalar

SDS

Sodyum Dodesil Sülfat

F/K/I

Fenol/Kloroform/İzoamil alkol

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 4.1. Batı Akdeniz Bölgesi <i>Erwinia amylovora</i> izolatlarının plazmid profilleri | 36 |
| Şekil 4.2. Batı Akdeniz Bölgesi <i>Erwinia amylovora</i> izolatlarının plazmid profilleri. ... | 37 |
| Şekil 4.3. <i>ams</i> gen'inin PCR ile amplifikasyonu | 38 |
| Şekil 4.4. <i>ams</i> gen'inin PCR ile amplifikasyonu | 39 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 3 1. <i>ams</i> geninin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı..... | 23 |
| Çizelge 4 1. Batı Akdeniz Bölgesi'nden elde edilen <i>Erwinia amylovora</i> izolatları..... | 27 |
| Çizelge 4 2. Biyokimyasal testler..... | 31 |
| Çizelge 4 3. <i>Erwinia amylovora</i> izolatlarının streptomycine'e karşı reaksiyonları..... | 33 |
| Çizelge 4 4. <i>Erwinia amylovora</i> izolatlarının oxytetracycline'e karşı reaksiyonları..... | 34 |
| Çizelge 4 5. <i>Erwinia amylovora</i> izolatlarının bakır sülfata dayanıklılık testi..... | 35 |

1. GİRİŞ

Ülkemiz tarım sektörünün önemli bir bölümünü meyvecilik oluşturmaktadır. Ülkemizdeki yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının sayısı 56 392.000 adet olup yapılan üretim miktarı 2 717 900 tondur. Bu miktar, genel meyve üretiminin $\frac{1}{4}$ 'ünü oluşturmaktadır. Batı Akdeniz Bölgesi Antalya ilinde yumuşak çekirdekli meyve üretiminin, 31.967 tonu armut, 4.554 tonu ayva, 133.875 tonu elma, 5.967 tonu yenidoğru'dan oluşmaktadır. Isparta'da ise 6.863 ton armut, 998 ton ayva, 253.018 ton elma üretilmektedir. Burdur ilinde ise, 12.844 ton armut, 838 ton ayva, 28 738 ton elma üretimi yapılmaktadır (Anon. 1996).

Ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al., yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının bulunduğu *Rosacea* familyasına dahil pek çok bitkide zararlanmalar oluşturmaktadır (Van der Zwet ve Keil 1979). Hastalık Mayıs ayında çiçek ve sürgünlerde nekroz ve yaprakların siyahlaşması şeklinde görülür. Nekroz ve siyahlaşmalar çiçek enfeksiyonu ile tüm bitkiye yayılır. Önce, orta damar boyunca olan kahverengileşme daha sonra siyah yanıklıklara dönüşür, yapraklar aşağı doğru kıvrılır ve genelde yanmış bir görüntü alırlar. Uç sürgün ve filizler hastalıktan direk etkilenirken, kahverengi olan kabuklar siyah yanmış görünüm alır. Uç sürgün ve meyvedeki belirtiler dallara ve gövdeye doğru ilerler. Yumuşak çekirdekli meyvelerde çiçek ve sürgünden başka meyve enfeksiyonu da görülebilir. Meyve enfeksiyonu genelde meyve sapı ile olur. Küçük ham meyveler önce sulu, daha sonra da kahverengileşip mumyalaşan bir yapı alırlar. Enfeksiyonun ilerlemiş safhasında ise siyahlaşan meyveler ağaçta asılı olarak kalır. Aşırı nemli havalarda bakteriyel akıntılar (ooze) bitkinin vejetatif ve generatif aksamı üzerinde görülebilir (Agrios 1997).

Ateş yanıklığı'nın kontrolü ile ilgili olarak hastalıklı dokunun budanması ve uzaklaştırılması bakterisitlerle yapılacak ilaçlamalar geliştirilen stratejilerdir. Ateş yanıklığı ile mücadelede en etkin yöntem dayanıklı çeşit kullanımıdır. Dayanıklı çeşit patojenin konukçu bitki içinde çoğalmasına göre seçilir (Crepel vd 1997).

Hastalığın kontrolünde streptomycine ve bakır bileşikleri kullanılmaktadır. Streptomycine'nin yoğun kullanımı Amerika ve Kanada gibi ülkelerde dayanıklı strainlerin gelişimini sağladığından bu antibiyotiğin etkisini azaltmıştır. Bakır bileşikleri ise özellikle çiçeklenme döneminde fitotoksisiteden dolayı tercih edilmemektedir (Psallidas vd 1993).

Hastalıkla mücadelede mevcut yöntemlerin yetersiz kalışı, uygun baktersistlerin yokluğu, antibiyotik kullanımının dezavantajları, alternatif mücadele yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora* ile konukçu bitki arasındaki ilişkilerin belirlenmesi moleküler düzeyde yapılacak çalışmalar ile mümkün olabilecektir. Bu araştırma ile Batı Akdeniz Bölgesinin Antalya, Burdur, Isparta illeri ve ilçelerindeki *Rosacea* familyası bitkilerinde görülen ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora* izolatlarının patolojik, biyokimyasal ve PCR testlerini içeren, farklı tekniklerle kesin tanıların yapılması ve plazmid profillerinin belirlenmesi ile patojen bakterinin moleküler düzeyde karakterizasyonu kısmen sağlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ülkemizde ateş yanıklığı hastalığı ile daha sonra yapılacak detaylı çalışmalara ışık tutması bakımından önem taşımaktadır.

KURAMSAL BİLGİLER

Ateş yanıklığına neden olan *Erwinia amylovora* yumuşak çekirdekli bitkilerde önemli zararlanmalar oluşturan bakteriyel bir etmendur. Hastalık etmeni *Rosaceae* familyasında 200 bitki türünden 40 cinste önemli zararlanmalara sebep olmaktadır. Özellikle, *Cotoneaster*, *Pyrus*, *Pyracanta*, *Sorbus*, *Stranvaesia*, *Crateagus*, *Cydonia* ve *Malus*'unda içinde bulunduğu sekiz cinste hastalığın önemli kayıplara neden olduğu görölür (Van der Zwet ve Beer 1995).

Erwinia amylovora ile ilgili olarak ilk tanımlama, 1794'de New York State'de ortaya çıkarılmıştır. Hastalık buradan kuzey, güney ve batıya yayılmıştır. 1880'e kadar hastalığın asıl nedeni bilinmemesine rağmen, 1817 yılında Birleşik Devletlerin doğusunda meyve üretilen alanlarda önemli bir problem olarak farkına varılmıştır. Illinois'de 1880'de ateş yanıklığı hastalık etmeni *Micrococcus amylovorus* olarak isimlendirilmiştir. 1889'da bu isim *Bacillus amylovorus* olarak değiştirilmiştir. Son olarak 1920'de *Erwinia amylovora* olarak adlandırılmıştır. 1800'lü yılların ortasına doğru hastalık etmeni Kanada'ya doğru yayılmıştır. 1938'de ateş yanıklığı Bermuda adalarında *Eriobotrya japonica*'da, 1984 yılında da *Cotoneaster* spp 'de ve diğer *Rosaceae* süs bitkilerinde ortaya çıkarılmıştır. Hastalık 1903 yılında Kuzey Amerika dışında Japonya'nın birkaç adasında da görölmüştür. Hastalık etmenine 1919 yılında Yeni Zelenda'nın kuzeyinde *Rosaceae* familyasına dahil bitkilerde rastlanmıştır. Etmen İngiltere'de 1958'de, Mısır'da 1964'de saptanırken, Ortadođu ve Avrupa'da 31 ülkede yaygınlık gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Roberts vd 1998).

Enterobacteriaceae familyasına dahil, çubuk şeklindeki bakteri 0,6 µm'den 2,5 µm'ye kadar değişen uzunlukta ve 0,5 µm'den 1,2 µm'ye kadar değişen genişlikte bulunmaktadır. Gram (-) olan bakteri, peritrik kamçılı özelliğe sahiptir (Van der Zwet ve Keil 1979). Bakteri tarafından oluşturulan bakteriyel akıntı (ooze), infeksiyondan sonra çiçek, sürgün, filiz ve meyvede oluşmaktadır. Ooze beyazdan koyu kırmızıya kadar değişen renklindedir. Bakteriyel akıntı içindeki *E. amylovora* 25-40° C' de 400 gün yaşamını sürdürebilmektedir. Ooze içinde bulunan bakteri virülettir. Bakteriler tarafından oluşturulan bakteriyel iplikçikler sıkı bağlarla bağlı olup ancak % 20'si bakteriyel hücrelerden oluşmaktadır. Bakteriyel iplikçiklere elma, armut ve alıç'ın

meyve ve sürgünleri üzerinde rastlanılmıştır. Ateş yanıklığı etmeni epifitik olarak elma ve armut çiçeklerinde stigmalarda, meyve ve yapraklarda bulunurken, endofitik olarak da ksilem ve floemde taşınmaktadır (Van der Zwet 1994). Yapılan bir çalışmada *Vibrio fischeri*'den lux operonu *Sal* enzimiyle kesilmiş, operon pfdC1Z plazmidine insert edildikten sonra elektroporasyonla *E. amylovora* bakterisine aktarılmıştır. Lux operonundaki genlerin salgıladığı lusiferaz ve redüktaz enzimi sayesinde bakterinin bitki içindeki hareketi gözlenmiştir. Bu çalışmayla bakterinin ksilemde ve floemde kolonize olduğu saptanmıştır (Bogs vd 1998).

Ateş yanıklığı, etkilediği bitki kısımlarına göre çiçek, sürgün, filiz, yaprak, meyve, dal ve gövde yanıklığı olarak adlandırılır. Enfeksiyon çiçeklerden başlayıp ilerleme safhasına göre ilk önce sulu ıslaklık şeklinde belirti gösterirken daha sonra çiçek sapına doğru ilerler. Meyve siyaha döner, kurur ve genellikle ağaçta asılı olarak kalır. Armutlarda koyu kahverengiden siyaha dönen renk oluşumu gözlenirken elmalarda ise koyu kahverengiye dönüşüm görülür. Hassas konukçularda enfeksiyon çiçek, sürgün ve meyvelerde meydana gelirken, yaşlı dallardan gövdeye de yayılır. Patojen 0-5000 m yada 5 km'den daha fazla uzaklıklara yayılabilir (Van der Zwet 1994). *Formica* sp., *Aphis pomi*, *Musca domestica*, *Cacopsylla pyricola*, *Eriosoma lanigerum* vb hastalığın epidemiyolojisinde rol oynayan en önemli böceklerdir (Van der Zwet ve Beer 1995). Meteorolojik koşullar özellikle arazi içinde inokulumdan çiçeklere ve genç filizlere patojenin yayılmasında önemli bir faktördür. Amber rengine dönen bakteriyel akıntılar, bitkinin değişik aksamlarından dışarı çıkarak hastalığın epidemiyolojisinde önemli rol oynarlar (Agrios 1997).

Ateş yanıklığının tanısında farklı metotlar kullanılmaktadır. Hastalık etmeninin izolasyonu yapıldıktan sonra biyokimyasal testler, patojenisite testleri, serolojik teknikler, fatty asit profilleri ve PCR'a dayanan moleküler tekniklerle patojenin karakterizasyonu sağlanmaktadır (Gorris vd 1996).

Patojenisite testlerinden ham armut testi ateş yanıklığının tanısında önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Mısır'da değişik lokasyonlardan alınan izolatların Barlett armutları üzerinde yapılan ham armut testiyle patojenisite ve virülenslikleri

değerlendirilmiştir. Yüze sterilizasyonu yapılan örnekler 10 mm kalınlığında kesildikten sonra bir öze dolusu bakteri ile bulaştırılmıştır. Kontrol olarak *P. syringae* kullanılmıştır. Armut dilimlerinde 26°C'de 1-2 hafta sonucunda bakteriyel akıntı oluştuğu saptanmıştır (Van der Zwet 1986).

Psallidas ve Dimova (1986) elde ettikleri tüm *E. amylovora* izolatlarının ham armut dilimleri üzerinde ilk önce nekrotik lezyon daha sonra da bakteriyel akıntı oluşturduğunu saptamışlardır

Çiçekler kadar taze sürgünlerde ateş yanıklığına karşı hassastırlar. Sürgün inokulasyonu değişik şekillerde yapılmaktadır. Crepel ve Maes (1996) farklı elma kültürvarları filizlerinden örnekler almışlardır. Kesilen yapraklara 10 µl 10⁸ cfu/ml'lik bakteriyel süspansiyon bulaştırılmıştır. Örnekler 24 saat nemli torbalarda tutulmuştur. Farklı varyetelerde dayanıklılığın farklı olmasından dolayı bakterinin oluşturduğu lezyon büyüklüklerinin de farklı olduğu saptanmıştır.

Van der Zwet (1970) değişik armut varyetelerinde ateş yanıklığına dayanıklılığı değerlendirmiş, enjeksiyonla yapılan inokulasyonun, spreyleme ile yapılan inokulasyondan daha başarılı olduğunu saptamıştır.

Fitopatojen bakterilerden *Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., ve *Xanthomonas* spp. hipersensitif reaksiyonu teşvik eden *hrp* genine sahiptir. Yapılan bir çalışmada Ea321 izolatındaki *hrp* geni izole edildikten sonra *E. herbicola* ve *P. syringae* bakterileriyle bu gen açısından benzerlikleri araştırılmıştır. DNA hibridizasyon teknikleriyle Ea321 ve diğer *E. amylovora* izolatlarıyla *E. herbicola*'da bulunan *wts* geni ve *P. syringae* bakterisindeki *hrp* geninin benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Laby ve Beer 1992).

HR ile ilgili olarak elma sürgünleri ile yapılan bir çalışmada, *Erwinia amylovora*'nın virulent strainlerinin ateş yanıklığı simptomu oluşturduğu, avirulent strainlerinin ise, inokulasyon bölgelerinde küçük kahverengi lekeler oluşturduğu saptanmıştır. Her iki tip bakteri de doku içinde çoğalmıştır. Ancak avirulent strainlerin inokulasyondan 24 saat sonra çoğalması dururken diğerlerinin çoğalmaya devam ettiği

görülmüştür. Virü lent ve avirü lent olan *Erwinia amylovara* HR' i teşvik etmektedir. Elektron mikroskobu ile tütün yaprakları incelendiğinde sitozom, mitokondri, kloroplast membranlarında yıkımların oluştuğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada, sağlıklı yapraklar amonyum gazı ile karşı karşıya getirildiğinde, *Erwinia amylovara*'nın oluşturduğu nekroz ile amonyum gazı yapraklar üzerinde aynı simptomu oluşturmuştur. Bu bakteriler tarafından nekro toksin olarak amonyumun üretelebileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır. *Erwinia amylovara*'dan izole edilen, bitki savunma reaksiyonunun elicitorü olan harpin, 44 kilo dalton ağırlığında olup, tütün yaprak laminasında çökmeye neden olmaktadır. Nitekim kromozomal bölgede bulunan bu gen *Tn5tacl* ile mutasyona uğratıldığında armutta ve tütünde HR oluşmadığı gözlenmiştir (Wei vd 1992).

Erwinia amylovara'nın I izolatının genomik kütüphanesi PLAFR3 plazmid vektörü kullanılarak *E. coli*'de oluşturulmuştur. Daha sonra bu klonlar patojenik olmayan *E. amylovara* P66 izolatına aktarılmıştır. HR kabiliyeti ve patojenisitenin mutasyona uğratılması için, *Tn5-lac* transpozonu kullanılmıştır. Genel DNA' da *hrp* geninin bu 2.1 kb'lik *HindIII/BamHI* fragmentinde lokalize olduğu saptanmıştır (Walters vd 1990).

Ea321'deki *hrp* geni salkımı prob olarak kullanıldığında değişik lokasyonlardan alınan *Erwinia amylovara* strainlerinin, Ea321 ile tanımlanabilir örnekler oluşturdukları görülürken, *Rubus* türlerinde de benzer hibridizasyon örnekleri saptanmıştır (Walters vd 1990).

Ateş yanıklığı hastalığının dünya üzerinde görülmeye başlamasından beri değişik mücadele olanakları geliştirilmiştir. Hastalıkla mücadelede kullanılan tekniklerden biri de değişik ülkelerde uygulanmış ve uygulanmakta olan, önceden tahmin ve uyarı sistemleridir. Klimatolojik faktörlerden özellikle yağmur ve sıcaklık, hastalığın epidemiy oluşturmasında önemlidir. Önceden tahmin ve uyarı sistemleri, geçmişte olan epidemileri açıklama ve hastalığın arazide yayılımı için potansiyel oluşturan faktörleri değerlendirmede önemlidir (Psallidas vd 1989). Bilinen meteorolojik faktörler üzerinde araştırmalar hastalığı baskı altına alma ve hastalık

gelişimi ve enfeksiyon seyirinin bitki gelişimini nasıl engellediğini belirlemede önem kazanmaktadır (Jones 1992).

Billing's sistemi 1982-1986 yılları arasında Mısır'da ateş yanıklığı hastalığının epidemisini tahmin etmede yerleştirilmeye çalışılmış olan bir sistemdir. Günlük sıcaklık ve yağış miktarına göre yapılandırılmıştır. Bu sistem meteorolojik verilerin analizine dayanır. Mısır'da ve bazı Avrupa ülkelerinde başarı ile uygulanmış olup belirtiler ortaya çıkmadan önce yapılacak bir veya daha fazla ilaçlama ile yeni enfeksiyonları önlemede önem kazanmıştır (Abo-El-Dahab vd 1990).

Fransızlar tarafından oluşturulan Firescreens uyarı sistemi Yunanistan' da elma ve armutlarda ateş yanıklığının kontrolünde kullanılmıştır. Denemeler sisteme uygun olarak, 1994-1995 yılları arasında hastalığın endemik olduğu üç bölgede yürütülmüştür. Üç gruba ayrılan lokasyonlardan birinci grupta, belli periyodlarla kimyasal uygulaması yapılırken, ikinci grupta fenolojik bitki gelişimine göre ilaçlama yapılmış, üçüncü grupta ise hiçbir uygulama yapılmamıştır. Kimyasal uygulamalarda 100 ppm'lik streptomycine kullanılmıştır. Deneyler sonucunda hastalık belirtisi görülmediği sürece kimyasal ilaçlamanın yapılmaması uygun görülmüştür. Bu sistemde hiç uygulama yapılmaması yada sadece bir uygulama yapılması tavsiye edilen kriter olmuştur (Tsiantos ve Psallidas 1996).

Maryblight, iklimolojik verilere bağlı olarak, ateş yanıklığının çiçek enfeksiyonlarını tahmin etmede kullanılan diğer bir modeldir. Model, bilgisayar programında küçük değişikliklerle modifiye edilebilir. Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, 1991 yılı Maryblight modeline göre çiçek enfeksiyonları olabileceği tahmin edilmişken, 1984 de ise 4 enfeksiyon periyodu tahmin edilmiştir (Jones 1992).

Bitkilerin çeşidine bağlı olarak dayanıklılığın değişmesi, mücadele alternatifleri geliştirmeyi sağlamış ve buna bağlı olarak, Norelli vd (1999) transgenik attasın sentezleyen "Malling 29" adı altında dayanıklı elma çeşitleri elde etmişlerdir. Örneğin magnens armudunda dallardan gövdeye enfeksiyon birkaç ay içinde ilerleyerek ağacı öldürmektedir. Süs bitkilerinden özellikle *Cotonaster* spp., *Pyracantha* spp. ve *Sorbus*

spp. hastalık etmenine karşı hassastır. Hastalığın A.B.D'nin çeşitli bölgelerinde kırmızı böğürtlende de zarar meydana getirdiği saptanmıştır. Etmen, genç bitki dokularını yaşlı olanlara göre daha fazla etkilemektedir. Çevre koşulları ateş yanıklığı etmeninin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Yüksek nem, yağmur ve çevre koşulları etmenin konukçudaki gelişimi ve konukçunun hassasiyeti açısından da önem taşımaktadır (Van der Zwet ve Beer 1995). Hastalığın gelişim seyrini belirlemede dengeli gübreleme de önem kazanmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Prohexadion-kalsiyum ile uygulama yapılan elma bahçesinde, ağaçların giberellin sentezi durmuş ve *E. amylovora* tarafından enfeksiyon riski azalmıştır. Prohexadion-kalsiyum ile uygulama yapılan ağaçlarda ikincil filizlerde belirgin olarak hastalığın meydana geliş derecesinin azaldığı saptanmıştır (Jones vd 1999).

Ateş yanıklığı hastalığının kontrolü çok zor olup, etkili olan bakterisitlerden streptomycine ve bakır bileşikleri ilaçlama programlarında rutin olarak kullanılmaktadır. Streptomycine'in Kanada ve A.B.D gibi ülkelerde kullanımı giderek artarken çiçek enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır. Ancak antibiyotiklere karşı dayanıklı mutant oluşumu söz konusudur. A.B.D'nin Washington eyaletinde yapılan yoğun antibiyotikli ilaçlamalar dayanıklı strainlerin oluşumu gibi sorunları da yanında getirmiştir. Bu bölgelerden elde edilen bakteriyel izolatların izolasyonundan sonra streptomycine'in 10, 100 ve 1000 µg/ml'lik dozlarına dayanıklılığı değerlendirildiğinde, elde edilen 138 izolattan 98'inin 1000 µg/ml dozlarına dayanıklı olduğu saptanmıştır. Kontrol olarak *Pseudomonas syringae* kullanılmıştır. Antibiyotik dozlarının artan miktarlarına bağlı olarak diskler etrafında zon oluşumunun arttığı saptanmıştır (Loper vd 1991)

1988'de Mısır'da yapılan bir çalışmada, elde edilen lokasyonlardaki bakteriyel strainlerin hassas olanları streptomycine'in 1-2 µg/ml'lik dozlarına bile dayanamazken, dayanıklı strainlerin ise 1000-3000 µg/ml'lik dozlarına dayanıklılık gösterdikleri saptanmıştır. Tüm izolatlar ham armut testinden de geçirilerek virülenslikleri değerlendirilmiştir (El-Goorani vd 1989).

Moleküler düzeyde streptomycine'e dayanıklılık, farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *Erwinia amylovora* strainlerinde PCR ile ortaya çıkarılmıştır (Chiou ve Jones 1991).

Sobiczewski ve Millikan (1985) yaptıkları çalışmada hassas strainler ile inokule edilen çiçeklerde populasyon azalmasının streptomycine'de oxytetracycline'e göre daha fazla olduğunu saptamışlardır.

A.B.D'de streptomycine'nin yoğun olarak kullanımından kaynaklanan problemlerin görüldüğü lokasyonlarda oxytetracycline kullanılmaktadır. Bu antibiyotiğe dayanıklı mikroorganizmaların tespiti amacıyla PCR ve Southern analizi yapılmıştır. Bakterilerde oxytetracycline dayanıklılık mega plazmidlerle taşınmaktadır. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda hiçbir *E. amylovora* straininde *Tc* genine rastlanmamıştır (Schnabel and Jones 1999).

Yapılan bir çalışmada, A.B.D'nin Washington eyaletinde 44 meyve bahçesinden alınan örneklerden elde edilen izolatların oxytetracycline'e dayanıklılıkları 10, 25, 50, 100 µg/ml' lik dozlarda incelenmiştir. Kontrol olarak da oxytetracycline'e dayanıklılıkları bilinen, *Pseudomonas fluorescens* A506 ve *Pseudomonas syringae* strain Cit7 strainleri kullanılmıştır. Sonuçta, elde edilen 138 izolatın, 25 µg/ml'de bu antibiyotiğe karşı dayanıklılığı saptanmışken diğer dozlarda ise değişen miktarlarda zon meydana geldiği saptanmıştır. Bu da tüm strainlerin oxytetracycline'e karşı hassas olduklarını göstermektedir (McManus ve Jones 1994).

Son 40 yıldır streptomycine'in tarım alanlarında yoğun olarak kullanımı bu antibiyotiğe karşı dayanıklı izolatların oluşumunu da sağlamıştır. Dayanıklılık, Tn5393'te lokalize olan *strA* ve *strB* genleri yada *rpsL* geninde oluşan nokta mutasyonu ile meydana gelmektedir. Bitki yüzeyinden elde edilen fitopatojen bakterilerin çoğunda, Tn5393 ve *strA* ve *strB* sekansları bulunmuştur. A.B.D'nin Michigan ve Kaliforniya eyaletlerinden elde edilen izolatların streptomycine'e dayanıklı olup, küçük bir *strA* probu ile hibridize oldukları ortaya çıkarılmıştır. Sadece Michigan eyaletinden elde

elde edilen *E amylovora* izolatında *strA* ve *strB* ile bağlantılı olan küçük bir plazmide de rastlanmıştır (Palmer vd 1997).

Manulis vd (1998) İsrail'de 1994-1997 yılları arasında streptomycine'e dayanıklı ırkları saptamak üzere survey çalışması yapmışlardır. 18 farklı lokasyondan, elma, armut, ayva ve yenedünya'dan streptomycine'e dayanıklı 109 strain elde etmişlerdir. Dayanıklı olan 100 *Erwinia amylovora* straininde hibridizasyon olmazken, pozitif kontrol olarak kullanılan *E. coli*'de hibridizasyon olduğu saptanmıştır.

Bakır bileşikleri ise, çiçeklenme periyodu boyunca fitotoksisiteden dolayı kullanılmamaktadır. Yapılan bir çalışmada, Washington'da yetiştiriciliğin yoğun olarak yapıldığı lokasyonlarda, 138 izolatın bakıra hassasiyeti değerlendirilmiştir. Sonuçta, uygulanan 0.02 mM, 0.04 mM, 0.08 mM, 0.16 mM ve 1.10 mM'lık dozlarından sadece 0,16 ve 1,10'luk dozlarda bakteriyel gelişmenin olmadığı saptanmıştır (McManus ve Jones 1994).

Erwinia amylovora'ya karşı antagonist mikroorganizmalarla yapılan biyolojik mücadele diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında en ideal alternatif olarak bulunmuştur (Psallidas vd 1993).

Psallidas vd (1993) farklı konukçulardan elde ettiği 87 farklı antagonistin, 6 tanesinin *Erwinia amylovora*'ya karşı ENA (Emerson Nutrient Agar), ham armut, *Pyrus amygdali* çiçekleri ve *Cotonoaster salicifolius*'un filizlerinde etkili olduklarını saptamıştır.

Stockwell vd (1996) arazi denemelerinde ateş yanıklığına engel olan 2 antagonist *Pseudomonas fluorescens* A506 ve *Erwinia herbicola*'nın streptomycine'e dayanıklı ırkı olan C9-1 ırkını kullanmışlardır. Antibiyotik uygulamalarından önce ve sonra seyreltme ile ekim yapıp mikroorganizma yoğunluklarına bakıldığında, streptomycine uygulamasının populasyon dinamiği üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanırken, oxyteracycline uygulamasının ise populasyon yoğunluğunu

azalttığı saptanmıştır. Ateş yanıklığını engelleyen biyolojik ve kimyasal metodların integrasyonu *Erwinia amylovora* hastalık etmenini azaltabilir

Wilson vd (1990) *Erwinia amylovora* ile aynı stigmatik yüzeyde kolonize olan *Erwinia herbicola*'nın kolonizasyonunu elektron mikroskopta incelemişler ve her iki bakterinin buldukları yüzeyde antibiyosis yoluyla etkileşime geçtiklerini ve bununda *Erwinia herbicola* tarafından üretilen antibiyotik tarafından gerçekleştirildiğini açıklamışlardır. Bu bakterilerdeki antibiyotik üretimi, plazmid kökenli olup, elde edilen değişik strainlerde 12 kb'lik sabit bir plazmidin varlığı saptanırken, bazı izolatlarda ise bundan farklı olarak 16 kb' den büyük plazmidlere de rastlanmıştır. Değişik *Erwinia herbicola* izolatları *Crateagus monogyna*'nın çiçek ve yapraklarından izole edilmiştir. Yapılan ham armut denemeleri, filiz inokulasyonu denemelerinden elde edilen izolatlardan, WL9' nun %80 oranında kontrol sağlamada başarılı olduğu saptanmıştır

Bakteriyel antagonistlerden, *Erwinia herbicola* EhC9-1 ve *Pseudomonas fluorescens* PfA506 izolatlarının başarısında bu antagonistlerin, çiçeklerdeki kolonizasyonu ile mücadeledeki başarının korelasyon halinde olduğu açıklanmıştır (Stockwell vd 1998).

Abo-El Dahab ve El-Goorani (1964) elma ve armutlarda görülen ateş yanıklığı hastalık etmenine antagonistik etkide bulunan diğer bir bakterinin *Bacillus subtilis* olduğunu bildirmişlerdir. Filtratı elde edilen *Bacillus subtilis* bakterisi, penicillin, streptomycine ve oxytetracycline ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu çözeltilerle muamele edilen diskler NSA ortamına ekilen *Erwinia amylovora* bakterisi üzerine yerleştirilmiştir. Özellikle 4-10 günlük kültürlerden elde edilen filtratın streptomycine, oxytetracycline ve penicillin'den daha fazla etkiye sahip oldukları görülmüştür.

Plazmidler fitopatojenik bakterilerde ekstra kromozomal olarak bulunan konukçu patojen ilişkilerini düzenleyen DNA parçalarıdır. Plazmidler bir takım kritik özelliklerin bakterilere kazandırılmasında önemli rol oynamaktadır. Örneğin

Xanthomonas campestris pv. *tomato*'da metal iyonlarına karşı dayanıklılığı sağlarken *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*' ta streptomycin'e dayanıklılığın plazmidler yoluyla konjugatif olarak kodlandığı ortaya çıkmıştır. Bitki bakterisi interaksyonlarında plazmidlerin konukçu bitkinin parazitizmi ve simbiyosis olaylarında da rol aldıkları saptanmıştır. *Rhizobium* spp.' lerin sahip olduğu mega plazmidlerle *Leguminosae* bitkilerde nodülasyon ve nitrojen fiksasyonu meydana gelmektedir (Steinberger vd 1990).

Tüm patojenik *Erwinia amylovora* strainlerinin şimdiye kadar 30 kb' lik plazmid kapsadıkları ortaya çıkarılmıştır (Falkenstein vd 1988). Bu plazmid, patojenisiteye sahip olmayıp, diğer doğal fonksiyonları kodlayan genleri taşımaktadır (Laurent vd 1989). Bazı strainlerde ise büyüklüğü, 60 kb olan Pcpp60 adında 2. bir plazmid ortaya çıkarılmıştır (Kado ve Lui 1981).

1988 yılında, Mısır'da test edilen izolatların % 94' ünde 25 mega dal' luk, 3 izolatta 25 ve 43.3 mega dal' luk plazmide rastlanırken, mini preparasyon yöntemine bağlı olarak da, 2 izolatta hiç plazmid tespit edilmemiştir. Ancak bu çalışmayla streptomycin'e dayanıklılık ve koloni morfolojisinin test edilen izolatlarda plazmidlerle bağlantılı olup olmadığına karar verilememiştir (Abo El Dahab vd 1988).

Erwinia amylovora ile yapılan çalışmalarda, Pea29 plazmidinin PCR ile çoğaltılan fragmentinin RFLP'si ortaya çıkarılmıştır. *Erwinia amylovora*'nın CA11 strainin PCR fragmentinin 8 bp' lik tandemli tekrarlar içerdiği saptanmıştır ki bununda RFLP' ye neden olduğu tahmin edilmektedir. 93 ırk üzerinde yapılan çalışmalarda Pea29' da GATTACA (GAATACA) NGAATTATCA şeklinde, 3-14 arasında tekrarlı sekans olduğu ortaya çıkarılmıştır (Schnabel ve Jones 1998).

Erwinia amylovora'nın tanımlanmasında değişik primerlerle yapılan PCR çalışmaları büyük kolaylık sağlamıştır. *Cotonoaster*'in yaprak ve filizlerinden elde edilen ateş yanıklığı patojeni ile spesifik PCR ve DNA hibridizasyon metotları kullanılarak, kalix ve yüzeydeki *Erwinia amylovora*'nın taranması için metotlar geliştirilmiştir (Guilford vd 1996).

Taylor ve Hale (1998) Avusturalya'dan elde ettikleri *Cotoneaster* spp. izolatlarıyla İngiltere ve Yeni Zelanda'dan elde ettikleri, *Pyrus communis*, *Malus* spp., *Crateagus monogyna* ve *Cotoneaster melanocarpus* izolatlarını moleküler düzeyde incelemişlerdir. PCR'da Ea71 primerleri ile 187 bp'lik bant oluşumu gözlenmiştir. *Ams* primerleri kullanılarak da 1.6 kb'lik bant oluşumu gözlenmiştir. Fakat kontrollerde spesifik bant oluşumu gözlenmemiştir. AP-PCR ve RAPD ile *Cotonoaster*'den elde edilen DNA'ların *Erwinia amylovora*'ya has bantlar oluşturduğu saptanmıştır.

Bereswill vd (1992) yapılan PCR çalışmalarıyla 6 saatten az sürede tanımlamanın gerçekleştirilebileceğini saptamışlardır. Tüm *Erwinia amylovora* hücrelerinde bulunan 29 kb'lik plazmidten elde edilen iki oligomerle, 0,9 kb'lik fragment kullanıldığında 100'ün üzerinde *Erwinia amylovora* hücresinde gözlenebilir bant ortaya çıkmıştır.

Bereswill vd (1995) yaptıkları çalışmayla *P. syringae* pv. *syringae*, *E. herbicola*, *E. caratovora* subsp. *atroceptica* izolatlarıyla beraber *E. amylovora* patojenini kullanmışlardır. Yapılan PCR' da plazmid Pea29' dan elde edilen 0.9 kb'lik *PstI* fragmenti, kromozomal DNA' dan elde edilen *ams* genine ait 1.6 kb'lik kromozomal DNA, 16S rRNA'ya ait 1.5 kb'lik DNA, transpozon *Tn5*'den üretilen RPT1 primerleri ile PCR çalışmaları yapıldığında *ams* geni ve *PstI* fragmentine ait *Erwinia amylovora* strainlerinde amplifikasyon görülürken 16S rRNA ve RPT1 primerlerinde ise PCR sonucunda amplifikasyon olmamıştır.

Erwinia amylovora elma ve armutlarda ham armut, sürgün, yaprak ve çiçeklerde simptomsuz uzun süre epifitik olarak yaşamaktadır. Klasik olarak kullanılan metotlar *Erwinia amylovora*'nın küçük popülasyonlarını tarayamaz. Bu yüzden hassas PCR üzerine yapılandırılmış metotlar geliştirilmiştir. 5 ülkeden 10 konukçu türünden 69 *Erwinia amylovora* izolatı 29 tane diğer *Erwinia* spp. ve 4 farklı cinsten 9 bakteri izolatı bu çalışmalarda kullanılmıştır. Bakteri koleksiyonu, primerler kullanılarak moleküler düzeyde tanımlanmıştır. Bu sistem özellikle bitki dokusundaki *Erwinia amylovora*'nın taranmasında oldukça etkilidir (Guilford vd 1996).

E. amylovora' ya has olan 187 bp'lik Ea71 primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. 13 konukçu ve 21 ülkeden gelen *Erwinia amylovora* örneklerinin, genetik olarak Pea29 plazmidinden elde edilen primerlerle tanımlamaları yapılmıştır (Brown vd 1996)

Erwinia amylovora'da EPS (ekstrasellüler polisakkarit) virülenslik için önemli bir faktördür. Konukçu hücrenin savunma mekanizmasına karşı koruyucu özellik taşır. EPS yönünden mutant olan bireylerin patojenik olmadığı görülür. Bazı bakteriyofajların taşıdığı manto proteinleri bakteriyel polisakkaritleri parçalar. Bakteriyofaja ait depolimeraz enzimi kapsüler EPS'ye bağlanarak bakteriyofaj konukçu hücre yüzeyine tutununcaya kadar parçalar. Dış membran reseptörüne bağlanan bakteriyofaj litik döneme kadar hücre nükleik asidini injekte eder. Viral DNA genomunun kesimiyle EPS-depolimeraz sentezleyen DNA fragmenti *E. coli*'de taranmıştır. Bu çalışmada 3.3 kb'lik viral fragmentin nükleotid sekans analizi yapılmıştır. ORF (Open Reading Frame)'nin EPS-depolimeraz aktivitesini kodladığı ortaya çıkarılmıştır. Bu gen başka vektörlere aktararak kodladığı enzimin biyokimyasal yapısı incelenmiştir (Geider ve Kim 2000).

İleri bir moleküler teknik olan Pulsed-Field Jel Elektroferezis *Pseudomonas syringae* ve *Xanthomonas compestris*'in patovarları arasındaki farklılığı ortaya koymak için kullanılmıştır. Bu teknik *E. amylovora* için modifiye edilmiştir. *Xba*I enzimi ile kesilip oluşturulan bantlar arasında farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Kuzey Amerika'dan elde edilen E9 ve Ea-Rb strainin diğer izolatlardan farklılık gösterdiği saptanırken, Fransa'dan elde edilen strainlerin de Avrupa ve İngiltere'den elde edilen strainlerden farklı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Avrupa ve Yeni Zelanda'dan elde edilen strainlerle Mısır, Yunanistan ve Türkiye'den elde edilen strainlerin benzer özellik gösterdikleri saptanmıştır (Zhang ve Geider 1997).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi

Antalya, Isparta ve Burdur illeri ve ilçelerinde yoğun olarak bulunan *Rosaceae* familyasına dahil olan elma, ayva, armut ve yenedünya plantasyonlarından elde edilmiş hastalıklı bitki örnekleri Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Laboratuvarına getirilmiştir.

3.2. Patojenin İzolasyonu ve Tanısı

Rosaceae familyası bitkilerinden elde edilen ve laboratuvara getirilen örneklerin izolasyonunda, 30 cm uzunluğunda ve 5 cm çapında silindir şeklindeki doku kültürü tüpleri kullanılmıştır. Bu tüpler, içlerine 20 ml' lik çeşme suyu konularak 30 dakika steril edilmiştir. Hastalıklı bitki örneklerinin, %10' luk sodyum hipoklorit ile 4 dakika yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Sıvı içerisine geçirilen *Erwinia amylovora* hücrelerinin tespiti ve tanıları için yarı seçici selektif besi ortamı, patojenisite testi, biyokimyasal test ve moleküler teknikler kullanılmıştır.

3.3. Patojenin Tanısı

3.3.1. MS testi

Sıvıya geçirilen bakteriler öze yardımı ile tek koloni düşecek şekilde yarı seçici besi ortamı olan MS (Miller ve Scroth 1972) ortamına çizilmiştir. *Erwinia amylovora*'nın tespiti için 27°C' de 48 saat inkübasyondan sonra, kubbemsi ve turuncu renkte kolonilerin oluşması gözlenmiştir (Miller ve Scroth 1972)

3.3.2. NSA testi

Erwinia amylovora'nın tespiti için ikinci bir besi ortamı olan NSA (Nütrient Sakkaroz Agar) kullanılmıştır. 27°C' de 48 saat inkübasyondan sonra düz, konveks ve süt beyazı koloni oluşumu gözlenmiştir.

3.3.3. Ham Armut Testi

% 10' luk sodyum hipoklorit ile 4 dakika yüzey sterilizasyonu yapılan ham armutlar, 1 cm büyüklüğünde küp şeklinde kesilmiş ve nemli petri kaplarına yerleştirilmiştir. Ham armut dilimlerinin üzerine NSA' da geliştirilen bakteri izolatları öze ile bulaştırılarak 27°C de inkübe edilmiştir. Ooze (bakteriyel exudat) oluşumu gösteren izolatlar kaydedilmiştir (Van der Zwet 1986).

3.3.4. Sürgün İnokulasyonu Testi

İçinde 5 ml çeşme suyu bulunan tüplerde, NSA' da geliştirilen *Erwinia amylovora* kolonilerinden 10^8 cfu/ml bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Armut sürgününde koyu kahverengi, sonra siyah renkte, simptom oluşturan izolatlar değerlendirilmiştir (Aldwinckle ve Preczewski 1976).

3.3.5. Hipersensitif Reaksiyon Testi

Elde edilen *E amylovora* izolatlarının tütün yapraklarında hipersensitif reaksiyonu teşvik edip etmediği test edilmiştir (Klement 1990). Bunun için 27 gauge'lik enjektör kullanılmıştır 10^8 cfu/ml'lik *E amylovora* süspansiyonu, 10 cm boyutundaki tütün yaprağına enjekte edilerek tütün bitkileri 27°C'de 48 saat tutulmuştur

3.3.6. Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal testler "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" de ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora* için tespit edilmiş olan testlere göre yapılmıştır. Bu

testler katalaz testi, oksidaz testi, nitrattan nitrit üretimi testi, aseton testi, indol üretimi testi, hidrojen sülfid testi, nişastanın parçalanması testi, sakkarozdan indirgenen maddeler testi, sıcaklığa hassasiyeti testi, % NaCl'ye tolerans testi, pektinaz aktivitesi testi, King's B testi, KOH testi ve jelatinin hidrolizi testidir.

3.3.6.1. Katalaz testi

30 µl %3'lük H₂O₂ çözeltisi lam üzerine damlatılmıştır. Öze ile bakteri izolatları bu çözelti ile karıştırılmış ve gaz çıkışı olup olmadığına bakılmıştır. Gaz çıkışının olması pozitif reaksiyon, tersi ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Klement vd 1990).

3.3.6.2. Oksidaz testi

% 1 Glikoz +Nütrient Agar besiyerine aşılana izolatları, %1'lik Tetramethyl-p-phenylenylenediamine dihydrochloride solusyonu damlatılmış, kurutma kağıtları üzerine sürülmüştür. Sonuçlar 10 saniye sonra bakteri kitlesi mavime dönüşmüşse pozitif, dönüşüm 60 saniye sonra olmuşsa geç pozitif, 60 saniye sonra mavi renk oluşumu gözlenmezse negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovacs 1956)

3.3.6.3. Nitrattan nitrit üretimi testi

Test için önerilen besiyerinin (10 g pepton+ 5 g NaCl +2 g KNO₃ + 3 g agar 1 litre su içinde çözülmüştür) pH'sı 7'ye ayarlandıktan sonra 5'er ml tüplere konularak otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra izolatlar tüplere aşılansın, üzerine 1 ml eriyik haldeki steril sulu agar (%3) eklenmiş ve 27 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar, ortamda yumuşama varsa pozitif reaksiyon ve ortamda yumuşama yoksa negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Fahy ve Hayward 1983).

3.3.6.4. Aseton testi

5 g glikoz, 0.5 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g NaCl, 5 g Yeast Ekstrak 1 litre suda çözüldükten sonra deney tüplerine konularak, aşılana bakterilerle, 27 °C'de 2-5 gün süreyle inkübe edilmiştir. Burada gelişen bakteriler Voges-Prokauer ve Methyl red testlerinde kullanılmaktadır.

Voges-Prokauer testi, bakteri kültüründen alınan 1 ml örnek bir tüpe konularak 0.6 ml naphтол ve 0.2 ml %40'lık KOH çözeltisi ile 2 saat karıştırılıp renk oluşumu gözlenmiştir. *Erwinia amylovora* için pembe renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Methyl kırmızısı testinde ise, 0.1 g methyl kırmızısı 300 ml % 95'lik etil alkolde çözüldükten sonra üzerine 200 ml saf su eklenmiştir. Bu karışımdan birkaç damla, 5 günlük bakteri kültürüne ilave edilmiştir. pH değeri 4.2 veya daha düşük ise kırmızı renk oluşmuştur. Bu sonuçta methyl red pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Klement vd 1990).

3.3.6.5. İndol üretimi testi

10 g tryptone ve 5 g Yeast Ekstrak 1lt saf su içinde çözümlenerek hazırlanan besi yerinden 5'er ml deney tüplerine konularak, 120° C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Steril edilen besi yerine bakteri aşılana ve 27°C' de çalkalayıcıya konulmuştur. Aşılama yapıldıktan 2-5 gün sonra, 1 ml' lik bakteri örnekleri üzerine kovacs ayıracı (5 g dimethyl amine-benzaldehyde 75 ml amil alkolde 50-55 °C'ye ayarlı su banyosuna konularak yavaş yavaş eritilmiştir. Soğuduktan sonra üzerine 25 ml HCl ilave edilmiştir) ilave edilerek testlenir. İndol (Aerobik şartlar altında bazı bakteriyel enzimlerin yardımıyla şeker olmadan tryptophan'ın bozulması sonucu elde edilir) ayıracında bulunan amil alkol ile ekstrakte edilmiş ve ayıraçla reaksiyona girerek 15 dakikada kiraz kırmızısı bir renk alırsa, reaksiyon (+), kırmızı renk almazsa reaksiyon (-) olarak değerlendirilmiştir (Dickey ve Kelman 1988).

3.3.6.6. Hidrojen sülfid testi

Hazırlanan 7 ml besiyeri (0.5 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0.5 g K_2HPO_4 + 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.2 g Yeast Ekstrak + 0.1 g cystein hydrochloride 1 litre su içinde çözülerek hazırlanmıştır) tüplere konularak steril edilmiştir. % 5'lik kurşun asetatla batırılmış kurutma kağıtları da steril edilmiştir. Steril tüpler içindeki ortama bakteri aşılandıktan sonra kurşun asetatlı kağıtlarda renk değişimi olup olmadığı 14 gün boyunca gözlenmiştir. Eğer renk siyahlaşıyorsa reaksiyon pozitif, siyahlaşmıyorsa negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement vd 1990).

3.3.6.7. Nişastanın parçalanması testi

Bu testte besiyeri (A) pH'sı 6.5'a ayarlandıktan sonra otoklav edilerek petri kaplarına dökülmüştür. Ortamların üzerine bakteri izolatları çizilerek 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda petrinin içine yüzeyi kaplayacak şekilde lugol solusyonu (B) eklenmiştir. Kolonilerin altında ve çevresinde siyaha boyanmış besiyerinin renginin açılması, pozitif olarak değerlendirilmiştir. Besi yerinin siyah olarak kalması ise negatif olarak kabul edilmiştir (Klement vd 1990).

(A): 5 g Yeast Ekstrak, 5 g pepton, 5 g Beef Ekstrak, 15 g agar, 2 g çözünür nişasta 1 litre saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

(B): 1 g lugol + 2 g KI 300 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.3.6.8. Sakkarozdan indirgenen maddeler testi

Sakkarozdan indirgenen maddeler, önce 40 g sakkaroz, 10 g pepton, 5 g Beef ekstrakt, 1 litre suda çözülerek 5'er ml tüplere konulduktan sonra steril edilmiştir. Daha sonra tüplere bakteriler aşılanmış ve tüplerin üzerine 5'er ml Benedict ayıracı konularak hafifçe çalkaladıktan sonra kaynar su içerisinde 10 dakika tutulmuştur. Tüp içinde sarımsı renk oluşturan bakteriler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Klement vd 1990)

3.3.6.9. Sıcaklığa hassasiyet testi

NSA besisi yerine aşılana bakteri izolatları, 4°C, 27°C, 30°C, 37°C, 41°C sıcaklıktaki ortamlara konularak 14 gün inkübasyona bırakılmış bakterilerin gelişip gelişmemesine bağlı olarak, pozitif ya da negatif olarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Klement vd 1990)

3.3.6.10. % 5 NaCl'e tolerans testi

Nutrient broth besisi yerine, % 5 NaCl eklendikten sonra, otoklavda steril edilerek petri kaplarına dökülmüştür. Bakteri izolatları bu ortamlara çizilerek 5 günlük inkübasyonda bırakıldıktan sonra gelişip gelişmemelerine bağlı olarak değerlendirilmiştir (Klement vd 1990).

3.3.6.11. Pektinaz aktivitesi testi

Pektolitik *Erwinia* spp. ve *Pseudomonas* spp. bakterilerin ayırımında, bu testten yararlanılır. % 10'luk sodyum hipokloritte, 5 dakika steril edilen bütün patatesler, steril edilmiş bıçakla 7-8 mm kalınlığında kesilerek içinde kurutma kağıdı bulunan nemlendirilmiş petri kaplarına yerleştirilir. Patates dilimlerine NSA ortamında geliştirilmiş *Erwinia amylovora* izolatları öze yardımı ile bulaştırılır. 72 saatlik inkübasyon süresinden sonra, patates dilimlerinde yumuşama yoksa negatif, yumuşama varsa pozitif olarak değerlendirilir (Dickey ve Kelman 1988)

3.3.6.12. King's B testi

NSA ortamında 24 saat geliştirilen bakteri izolatları King B besisi ortamına (20 g Proteose peptone + 1.5 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ + 1.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 15 g Agar + 10 ml Gliserol 1 litre saf su içinde çözüldükten sonra pH'sı 7.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır) çizildikten sonra inkübatörde 27 °C'de iki gün bekletilerek, 365 nm de UV' de ultraviyole lamba altında karanlık odada kontrol

edilmiştir. Yeşil floresan pigment verenler pozitif, diğerleri ise negatif olarak değerlendirilmiştir (King vd 1954).

3.3.6.13. KOH testi

Bir lam üzerine %3'lük KOH çözeltisinden 1 veya 2 damla konulup bakteri izolatlarının her biri öze ile alınarak KOH damlası içinde 5-10 saniye karıştırıldıktan sonra, öze damladan yükseltilmiştir. Eğer KOH viskoz bir hal almış ve uzamışsa bu sonuç pozitif bir reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Gram (-) bakterilerde bu özellik görülürken gram (+) bakterilerde ise, bunun tersi durum söz konusudur (Fahy ve Hayward 1983).

3.3.6.14. Jelatinin hidrolizi testi

Jelatinin hidrolizi için 5 g peptone 3 g Beef ekstrakt, 120 g jelatin 1 lt su içinde 50°C' de su banyosunda eritilmiştir. Daha sonra bu çözeltiden, 5-10 ml tüplere konulmuş ve otoklav edilmiştir. Bu tüplere bakteri aşlandıktan sonra 20°C' de 7-14 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Kontroller yapılmadan önce tüpler 30 dakika süreyle +4°C' de buzdolabında bekletildikten sonra ortamda yumuşama olmuşsa bu pozitif reaksiyon, yumuşama olmamışsa negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Klement vd 1990).

3.3.7. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Bakterilerin moleküler tanımlamasında yapılmasında PCR yöntemi kullanılmaktadır. Bakteriler için direkt hücre ile çalışılabildiği gibi bakterilerin total DNA'sı izole edilerek PCR yapılabilir. Bu çalışmada *E. amylovora* izolatlarının total DNA'sı DNA izolasyon kit'i (Genomic DNA Purification Kit, Cat No: A1125, Promega) kullanılarak elde edilmiştir. Total DNA aşağıda belirtilen yönteme göre elde edilmiştir. Kullanılan kit yöntemi şöyledir.

1. 15 ml' lik mikrofuj tüpüne 1 ml sıvı nütrient broth'da 27°C' de 24 saat çalkalanmış bakteri kültürü konulur

2. 13 000-16.000 devir/dakika'da 2 dakika santrifüj yapılarak, pellet oluşturulur. Daha sonra sıvı kısım boşaltılır.
3. 600 µl hücre parçalayıcı (lisin) solusyon eklenir. Hücreler süspansiyon içinde çözülünceye kadar yavaşça pipetlenir.
4. Parçalanan hücreler 80 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına alınır.
5. Parçalanan hücrelerin üzerine 3 µl RNase solusyonu eklendikten sonra 25 kez tüp ters yüz edilerek karıştırılır.
6. Örnekler 37 °C'de 15-60 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına alınır.
7. RNase ile muamele edilen tüplerin üzerine 200 µl, protein çöktürme solusyonu eklenir. Parçalanan hücreler ile protein çöktürme sıvısının tamamen karışması için yüksek hızda 20 defa vortekslenir.
8. Örnekler, 5 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
9. Buzdan alınan örnekler, 3 dakika süreyle, 13 000-16.000 devir/dakika'da santrifüj edilir.
10. İçinde DNA bulunan üst faz temizlemek için 600µl izopropanol alkol ile karıştırılır.
11. DNA iplikçığı yığın halinde görününceye kadar tüpler yavaş yavaş karıştırılır.
12. Karıştırılan örnekler 2 dakika 13.000-16.000 devir/dakika da santrifüj edilir.
13. Tüp içindeki üst faz, boşaltıldıktan sonra geriye kalan DNA yı temizlemek için %70'lik etil alkol ile yıkanır.
14. İki dakika 13 000-16 000 devir/dakika da santrifüj edilen örneklerden etilalkol uzaklaştırılır.
15. Tüpler kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek 10-15 dakika bekletilerek pelletin kuruması sağlanır.
16. DNA'nın üzerine 100 µl sulandırıcı DNA Rehidrasyon solusyon eklenerek, 65°C' de 1 saat süreyle inkübe edilir. Periyodik olarak tüpler karıştırılır.
17. Hazır hale gelen DNA kullanılmıncaya kadar 4°C' de saklanır.

Elde edilen DNA'lar +4°C'de buzdolabında, DNA'nın uçmasını engellemek için polietilen torbaların içinde saklanmıştır. PCR işleminde gerekli olan karışım sıvı oda sıcaklığı koşullarında hazırlanmıştır. Tek bir mikrofij tüpünde, 1 örnek için (27.8 µl bidestile saf su, 5 µl 10X buffer, 3 µl MgCl₂, 8 µl dNTPs, 1 µl primer 1 (AMSbL=GCTACCAGCAGGGTGAG), 1 µl primer 2 (AMSbR=TCATCACGAIGGTGTAG)), baz alınarak oluşturulan 25 örneklilik karışım homojen bir dağılım sağlayıncaya kadar karıştırılmıştır. PCR programı Bereswill vd (1995)'e göre modifiye edilmiştir. Buna göre annealing sıcaklığı 52°C olarak belirlenmiş ve Çizelge 3.1'de verilmiştir.

E. amylovora izolatlarına ait DNA'lardan herbir mikrofij tüpüne 4'er µl konulmuştur. PCR'a yerleştirilmeden önce, üzerlerine tek örnek için 6.25 µl *Taq polimeraz* eklenip iyice karıştırılan master-mix'den, 46'şar µl eklenmiştir. Herbir tüp iyice pipetlendikten sonra, 50'şer µl mineral yağ eklenmiştir. PCR reaksiyonu için mikrofij tüp içinde bulunan DNA'ların uçmasını engellemek için mineral yağ konulmuştur. 95°C'lik blok sıcaklığına ulaşan PCR'a tüpler yerleştirilmiştir. Tüm bu işlemler sırasında *Taq polimeraz*, DNA, MgCl₂, 10X buffer, dNTPs, Primer 1, Primer 2'nin oda sıcaklığından etkilenmesini önlemek için buz içinde muhafaza edilmesine dikkat edilmiştir.

Çizelge 3.1. *Ams* geninin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı

| Sıcaklık (°C) | Süre (Dakika) | Döngü Sayısı |
|---------------|---------------|--------------|
| 95 | 3 | 1 |
| 94 | 1 | 35 |
| 52 | 1 | |
| 72 | 1 | |
| 72 | 10 | 1 |
| 4 | - | - |

PCR'dan çıkan ürünleri temizlemek için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

1. Örnekler buz içine alınır.
2. 25µl chloroform +izoamilalkol (24:1) karışımı eklenir.
3. Karışım iki defa vorteks yapılır ve 5 dakika santrifüj edilir.
4. Oluşan üst fazdan 30 µl yeni mikrofij tüpüne konulur.

3.3.8. PCR İçin Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR ürünleri % 1'lik agaroz'da yürütülmüştür. PCR ürünlerinin büyüklüklerinin saptaması için 1 kb'lik DNA marker kullanılmıştır. 1 µl DNA ladder, 9 µl TAE ve 1 µl Dye kullanılarak jelin baştaki ve sondaki kuyucuğuna yüklenmiştir. PCR ürününden ise, 9'ar µl alınıp, 1 µl dye eklenerek yükleme yapılmıştır. PCR ürünleri 77 voltta, 2.5 saat yürütülmüştür. DNA ladder'daki bant oluşumlarıyla kıyaslanarak PCR ürünlerinin büyüklüğü saptanmıştır. Agaroz jel daha sonra, 0.5 µl/ml olan Etidyum Bromür'de 15 dakika boyanmış ve polaroid filmde (Polaroid Black and White Print Films type 554x5 inch (Sigma)) görüntülemesi yapılmıştır.

3.3.9. Dayanıklılık Testleri

3.3.9.1. Streptomycine ve oxytetracycline dayanıklılık testi

Bu test için standart bakteri geliştirme ortamı olan LB (Luria Broth) ortamı (10 g NaCl + 5 g Yeast Ekstrak + 10 g tryptone + 15 g agar 1 litre suda çözülerek pH 7.5'a ayarlanarak hazırlanmıştır) otoklavda steril edilerek petri kaplarına dökülmüştür. NSA besi ortamında geliştirilen bakteri izolatları, 10^8 cfu/ml yoğunluğunda hazırlanmıştır. 50 µl'lik bakteri süspansiyonu petri kabına cam baget vasıtasıyla yayılmıştır. Bakteriyel süspansiyon, besi ortamı tarafından emilip kuruduktan sonra 10, 100, 500 ve 1000 µg/ml streptomycine çözeltisi steril edilmiş kurutma kağıdı (Whatman kağıdı tip: MN751/75/20,40) disklerine, 4'er µl damlatılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan zon büyüklüğü ölçülmüştür. Oxytetracycline içinde, aynı deneme yapılmış,

ancak antibiyotik dozu olarak 10, 25, 50,100 µg/ml' lik dozlar baz alınarak zon büyüklükleri ölçülmüştür.

3.3.9.2. Bakır sülfata dayanıklılık testi

E. amylovora izolatlarının CuSO_4 'a karşı olan reaksiyonlarının belirlenmesinde Cu^{+2} ' nin besi ortamınca tutunmasını engellemek amacıyla spesifik CYE ortamı (1.7 g casitone + 0.35 g Yeast Ekstrak + 2 g glukoz + 15 g agar 1 litre saf suda çözülmüştür) kullanılmıştır. Otaklavda 121°C'de 15 dakika steril edilen 50°C'ye soğutulan bu ortam içerisine, 1 M CuSO_4 stoğundan 0.02, 0.04, 0.08, 0.16 ve 1.10 µM'lik olacak şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra öze ile bakteri izolatları ortama çizilerek, 28°C' de 72 saat inkübasyona bırakılmış ve bakteri gelişiminin olup olmadığına bakılmıştır (Steinberger vd 1990)

3.3.10. Plazmid Ekstraksiyonu

Bakterilerde ekstra kromozom olarak bulunan plazmidler kritik özellikler taşırlar. Plazmidler toksik metal iyonlarına ve antibiyotiklere karşı dayanıklılığı sağlayan genlere sahiptirler. *Pseudomonas syringe* pv. *papulans*'da streptomycine dayanıklılığın konjugatif plazmidlerle kodlandığını ortaya çıkarılmıştır (Burr vd 1988).

Bu çalışmada elde edilen *E. amylovora* izolatlarının plazmid içerikleri şu şekilde saptanmıştır

1. Bakteri izolatları sıvı LB besi ortamında 48 saat ve 27 °C'de inkübe edilerek geliştirilmiştir.
2. 10^8 cfu/ml konsantrasyonda bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.
3. Mikrofüj tüpleri iki dakika 14.000 devir/dakika da santrifüj edilmiştir.

- 4 Üst faz boşaltıldıktan sonra 1 ml steril saf su ilave edildikten sonra vortekslenmiş ve tekrar iki dakika 14 000 devir/dakika da santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2. bir kez tekrar edilmiştir.
- 5 Üst faz boşaltıldıktan sonra 50 µl 10X TAE pellete eklenerek hücreler vortekslenerek çözülmüş hale getirilmiştir
6. Bu karışımın üzerine 350 µl hücre duvarlarını eriten (lisin) solusyon (0.151 g trisbase + 0.750 g SDS + 0.830 g NaCl, 25 ml kaynamış suda sırasıyla çözülmüş ve üzerine 1 N NaOH eklenmiştir) eklenerek 30 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir.
7. Elde edilen karışımın üzerine 800 µl fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklenerek mikrofüj tüpünde el ile kuvvetlice çalkalama yapılmıştır.
- 8 Süt beyazı renge dönen örnekler 7.5 dakika santrifüj edilmiştir
- 9 Santrifüj sonrasında her bir tüpün üzerindeki üst fazdan 50 µl mikropipet ile vasıtası ile alınmıştır
10. Bakteriyel izolatlara ait olan plazmid örnekleri 4°C'de saklanmıştır (Kado ve Lui 1981).

3.3.11. Plazmid Ekstraksiyonu İçin Jelin Hazırlanması

Erwinia stewartii plazmidleri standart markör olarak kullanılmıştır (Coplin vd 1981). *E. amylovora* izolatlarına ait plazmidler, 9 µl plazmid ve 1 µl dye olmak üzere % 0.7'lik agarozaya yüklenmiştir. Örnekler 75 Volt'ta 3 saat yürütülmüştür. Standart markör *Erwinia stewartii*'ye bağlı olarak plazmid büyüklükleri saptanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hastalıklı Bitki Materyalinin Elde Edilmesi

Nisan-Temmuz aylarında Batı Akdeniz Bölgesinde Antalya, Burdur, Isparta ili ve ilçelerini kapsayan lokasyonlarda bulunan meyve bahçelerinden *Rosacea* familyasına dahil olan elma, armut, ayva, yenedünya ve diğer bitkilerden hastalık etmeninin izolasyonu yapılmıştır (Çizelge 4.1).

4.2. Patojenin İzolasyonu ve Tanısı

Hastalıklı bitki örneklerinin homojenizatörle parçalanarak musluk suyuna geçirilerek elde edilen bakteriyel süspansiyonu MS (Miller ve Scroth, 1972) ve NSA ortamına inokule edilmiştir. 48 saat inkübasyon sonrasında tüm izolatlarda

Çizelge 4.1: Batı Akdeniz Bölgesinden elde edilen *Erwinia amylovora* izolatları

| İzolat No | Bitki | Alındığı Yer |
|-----------|--------------|------------------------|
| 1 | Armut | Bucak Giriş |
| 2 | Yabani Armut | Bucak Giriş |
| 3 | Ayva | Bucak Giriş |
| 4 | Armut | Uğurlu/Bucak |
| 5 | Ateş Dikeni | Karpınar/Bucak |
| 6 | Armut | Kızılkaya/Bucak |
| 7 | Ayva | Yazır Girişi/Korkuteli |
| 8 | Armut | Gölova/ Korkuteli |
| 9 | Armut | Gökpınar/Elmalı |
| 10 | Yeni Dünya | Finike/Merkez |
| 11 | Ayva | Elmalı/Merkez |
| 12 | Ayva | Bademağacı/Bucak |
| 13 | Armut | Bademağacı/Bucak |
| 14 | Ayva | Alıköy/Isparta |
| 15 | Ayva | Büyükgökçeli/ Isparta |
| 16 | Ayva | Ağlıköy/ Isparta |
| 17 | Ayva | Eğirdir/Isparta |

MS ortamında turuncu renkte, kubbemsi koloni özelliği ve NSA ortamında levan oluşumu görülmüştür (Psallidas ve Dimova 1986, Van der Zwet 1986). Elde edilen bu sonuçlar patojenin tanısında pozitif olarak değerlendirilmiştir

4.3. Patojenisite Testleri

4.3.1. Ham armut testi

Steril petri kabına yerleştirilip 27°C'de 48 saatlik inkübasyona bırakılmış ham armut dilimlerinin tamamında ooze (bakteriyel exudat) oluşumu görülmüştür (Vantomme vd 1982, Van der Zwet 1986)

4.3.2. Sürgün inokülasyonu testi

Genç armut sürgünlerine, 27 gauge'lik enjektörle inokulasyon yapılmıştır. İkinci gün sonunda inokulasyon bölgeleri etrafında, yedinci gün sonunda ise sürgünün tamamında siyah nekrotik lezyonlar görülmüştür. Aşılannmış sürgünler 27°C' de klima odalarında tutulmuştur (Aldwinckle ve Preczewski 1976, Van der Zwet 1970, Van der Zwet, 1986).

4.3.3. Hipersensitif reaksiyon testi

NSA ortamında geliştirilen 48 saatlik bakteri kültürleri 10^8 cfu/ml'lik süspansiyon şeklinde büyüklüğü 10 cm olan *Nicotiana tabacum* yapraklarına enjekte edildiğinde, ilk 24 saatte yaprakta hafif deformasyonlar ve renk değişimleri başlamış ve 48 saat sonucunda da tüm bakteriyel izolatlar nekrotik çöküntü şeklinde kahverengi lezyon oluşumu ortaya çıkarmıştır (Psallidas ve Dimova 1986, Crepel ve Maes 1996, Vantomme vd 1982)

4.4. Biyokimyasal Testler

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology uygun olarak yapılan biyokimyasal testlere göre elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 de verilmiştir.

4.4.1. Katalaz aktivitesi

Katalaz H_2O_2 su ve oksijen gazını dekompoze eden bir enzimdir. Tüm bitki patojeni bakteriler katalaz aktivitesi açısından pozitif özellik gösterirler. Tüm *Erwinia amylovora* izolatları, 50 µl %3 lük H_2O_2 çözeltisi ile karıştırıldığında gaz çıkışı gözlenmiştir.

4.4.2. Oksidaz aktivitesi

Hazırlanan Nutrient agar +%1 lik glikoz içeren besi ortamına bakteriler çizilip 24-48 saat inkübe edilmiştir. Bakterilerin üzerine % 1 lik tetrametil-p-phenylendiamine damlatıldığında 60 saniye sonra renk dönüşümü mavi olmadığı için reaksiyon negatif olarak değerlendirilmiştir.

4.4.3. Nitrattan nitrit üretimi testi

Hazırlanan besi ortamı içerisine, bakteriler aşı iğnesi ile aşılanmış ve her bir tüp üzerine, 1ml %3'lük sulu agar ilave edilmiştir. Yedi günlük inkübasyon periyodu sonunda, tüm *Erwinia amylovora* izolatlarının beklendiği gibi agarlı ortamda herhangi bir yumuşamaya neden olmadığı saptanmıştır.

4.4.4. Aseton testi

Bu testi içeren Voges-prokauer testinde hazırlanan 1 ml bakteri kültürü içine 0.6 ml naphtol (%5 lik tam doymuş alkolde çözülerek hazırlanmıştır) ve 0.2 ml %40 lik KOH çözeltisi eklendiğinde tüm *Erwinia amylovora* izolatlarının pembe renk oluşturduğu görülmüş buda pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Metil kırmızısı

testinde ise, 3 ml'lik bakteri kültürü üzerine 0.1 g 300 ml alkolde çözünen ve 200 ml saf su eklenen çözelti bakteri kültürü üzerine eklendiğinde, kırmızı renk oluşumu gözlenmemiştir. Buda negatif sonuç olarak kabul edilmiştir.

4.4.5. İndol üretimi testi

Tripton, yeast ekstrak, ve saf sudan oluşan besi ortamı üzerine bakteriyel izolatlar aşılansmış ve çalkalayıcıya konulmuştur. 5 g dimethylamine-benzaldehyde 75 ml amil alkolde eritildikten sonra üzerine 25 ml HCl ilave edilen çözelti, besi yerinde geliştirilen bakteri kültürlerinin üzerine eklendiğinde, kiraz kırmızısı renk oluşumu görülmediğinden, sonuç negatif olarak kabul edilmiştir.

4.4.6. Hidrojen sülfid testi

Hazırlanan sıvı besi yerine bakteriler aşlandıktan sonra kurşun asetatı batırılmış ve kapaklara yapıştırılan steril edilmiş kurutma kağıtları kapatılmış ve 7-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Literatürde ifade edildiği şekilde, H₂S üretiminden kaynaklanan siyahlaşmaya hiçbir izolatta rastlanmamıştır.

4.4.7. Sakkarozdon indirgenen maddeler testi

Hazırlanan sıvı besi yerine aşılansan bakteri üzerine 5'er ml benedict ayıracı eklenip 10 dakika kaynar suda tutulduğunda *Erwinia amylovora*'ya has sarımsı, turuncu renk oluşumu görülmüş ve bu sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir.

4.4.8. Sıcaklığa hassasiyet testi

NSA besi ortamına aşılansan bakteriler, 4, 27, 30, 37 ve 41 °C de bir haftalık inkübasyona bırakıldığında 37 ve 41 °C de bakteriyel gelişmenin olmadığı saptanmıştır.

4.4.9. Pektinaz aktivitesi testi

Yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra halka şeklinde kesilen patates dilimlerine NSA da geliştirilen bakteriler aşılandığında, 4 günlük inkübasyon periyodu sonucunda patateslerde yumuşama olmadığı görülmüş ve bu durum negatif olarak değerlendirilmiştir.

4.4.10. King's B testi

King's B besi ortamına çizilerek 2 günlük inkübasyon periyodunda tutulan bakteriyel izolatların, UV de floresan pigment oluşturmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.2. *Erwinia amylovora* izolatlarının biyokimyasal testlere karşı reaksiyonları

| İ | K | N | KOH | MR | VP | J | I | O | S |
|----|---|---|-----|----|----|---|---|---|---|
| 1 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 2 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 3 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 4 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 5 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 6 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 7 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 8 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 9 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 10 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 11 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 12 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 13 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 14 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 15 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 16 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |
| 17 | + | - | + | - | + | + | - | - | + |

İ: İzolatlar, K: Katalaz aktivitesi, N: Nitratın indirgenmesi, KOH: Potasyum hidroksit testi
MR: Metil red, VP: Aseton oluşumu, J: Jelatinin hidrolizi, I: İndol oluşumu
O: Oksidaz testi, S: Sakkarozdan indirgenen maddeler

4.4.11. KOH testi

NSA da geliştirilen bakteriler öze ile % 3'lük KOH çözeltisinde yayıldığında gram (-) bakterilere has özellik olan uzama görülmüştür

4.4.12. Jelatinin hidrolizi testi

Tüplere konulan besi ortamına bulaştırılan bakteri izolatları, 7 gün ve 27 °C de inkübasyona bırakıldığında jelatini hidrolize ettiğinden dolayı ortamda yumuşama meydana gelmesi pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir

4.5. Dayanıklılık Testleri

4.5.1. Streptomycine dayanıklılık testi

Yapılan streptomycine'in 100, 500 ve 1000 µg/ml uygulamaları sonucunda Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi antibiyotiğin dozlarına bağlı olarak değişen çaplarda engelleme zonu büyüklükleri saptanmıştır. 100 µg/ml'lik dozda antibiyotiğin az yada hiç engelleme zonu oluşturmadığı görülürken 1000 µg/ml'lik dozda ise bakterilerin bu antibiyotiğe oldukça dayanıksız oldukları görülmüştür (Loper vd 1991).

4.5.2. Oxytetracycline dayanıklılık testi

Streptomycine dayanıklılık testleri ile aynı yöntemle fakat daha farklı dozlar kullanılarak bu deneme yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir. Oxytetracycline'nin 10 µg/ml ve 25 µg/ml dozlarında zon oluşumu saptanmazken, 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarda antibiyotiğin etkinliği artmıştır (Loper vd 1991).

Çizelge 4.3. *Erwinia amylovora* izolatlarının streptomycine karşı reaksiyonları

| İzolatlar | 100µg/ml | 500µg/ml | 1000 µg/ml |
|-----------|----------|----------|------------|
| 1 | 0.1-0.1 | 0.3-0.3 | 0.5-0.5 |
| 2 | 0.1-0.1 | 0.3-0.3 | 0.5-0.5 |
| 3 | 0-0 | 0.4-0.4 | 0.6-0.6 |
| 4 | 0.1-0.1 | 0.3-0.3 | 0.5-0.5 |
| 5 | 0-0 | 0.3-0.3 | 0.7-0.7 |
| 6 | 0.1-0.1 | 0.3-0.3 | 0.5-0.5 |
| 7 | 0-0 | 0.2-0.2 | 0.4-0.4 |
| 8 | 0-0 | 0.4-0.4 | 0.5-0.5 |
| 9 | 0-0 | 0.4-0.4 | 0.6-0.6 |
| 10 | 0-0 | 0.4-0.4 | 0.5-0.5 |
| 11 | 0.1-0.1 | 0.3-0.3 | 0.6-0.6 |
| 12 | 0.1-0.1 | 0.3-0.3 | 0.5-0.5 |
| 13 | 0-0 | 0.5-0.5 | 0.7-0.7 |
| 14 | 0.1-0.1 | 0.3-0.3 | 0.7-0.7 |
| 15 | 0-0 | 0.2-0.2 | 0.5-0.5 |
| 16 | 0.1-0.1 | 0.2-0.2 | 0.7-0.7 |
| 17 | 0.1-0.1 | 0.3-0.3 | 0.5-0.5 |

Yukarıdaki değerler zon çapını (cm) ifade etmektedir.

Çizelge 4.4. *Erwinia amylovora* izolatlarının oxytetracycline karşı reaksiyonları

| İzolatlar | 10µg/ml | 25µg/ml | 50µg/ml | 100 µg/ml |
|-----------|---------|---------|---------|-----------|
| 1 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 5-0 5 |
| 2 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 5-0 5 |
| 3 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 4-0 4 |
| 4 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 4-0 4 |
| 5 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 5-0 5 |
| 6 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 4-0 4 |
| 7 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 4-0 4 |
| 8 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 4-0 4 |
| 9 | 0-0 | 0-0 | 0 3-0 3 | 0 4-0 4 |
| 10 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 4-0 4 |
| 11 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 5-0 5 |
| 12 | 0-0 | 0-0 | 0 3-0 3 | 0 4-0 4 |
| 13 | 0-0 | 0-0 | 0 2-0 2 | 0 4-0 4 |
| 14 | 0-0 | 0-0 | 0 3-0 3 | 0 5-0 5 |
| 15 | 0-0 | 0-0 | 0 3-0 3 | 0 5-0 5 |
| 16 | 0-0 | 0-0 | 0 3-0 3 | 0 4-0 4 |
| 17 | 0-0 | 0-0 | 0 4-0 4 | 0 5-0 5 |

Yukarıdaki değerler zon çapını (cm) ifade etmektedir.

4.5.3. Bakıra sülfata dayanıklılık testi

Kullanılan CYE ortamına aşıl原因 bakterilerin beş günlük inkübasyon periyodu sonucunda Çizelge 4.5'da görüldüğü gibi gelişme farklılıkları gösterdiği saptanmıştır. 0.16 μM ve 1.10 μM 'da bakteriler bakır sülfata dayanıksızken 0.02, 0.04 ve 0.08 μM bakır sülfata dayanıklı oldukları saptanmıştır (Loper vd 1991).

Çizelge 4.5 *Erwinia amylovora* izolatlarının bakır sülfata dayanıklılık testi

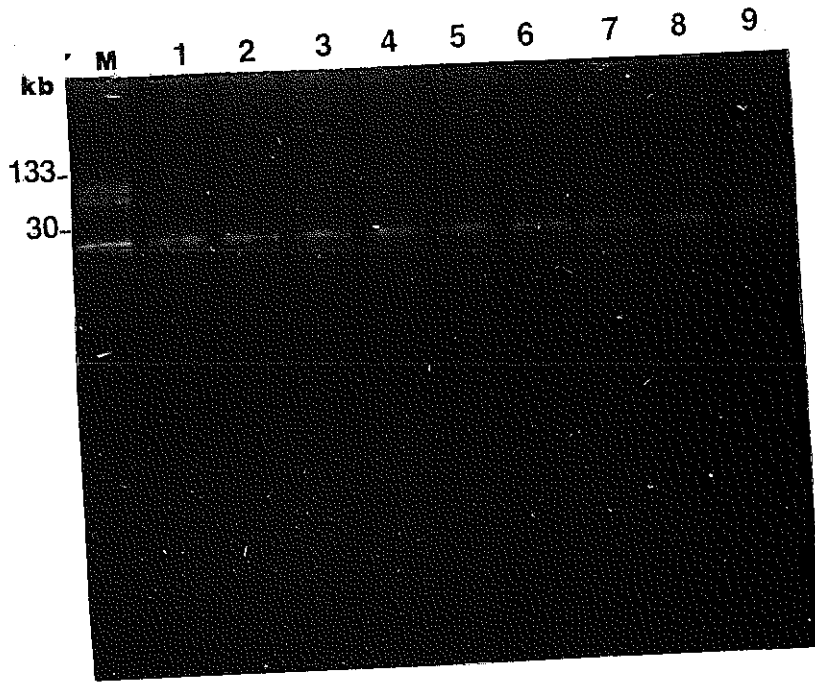
| İzolat No | 0.02 μM | 0.04 μM | 0.08 μM | 0.16 μM | 1.10 μM |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | + | + | + | - | - |
| 2 | + | + | + | - | - |
| 3 | + | + | + | - | - |
| 4 | + | + | + | - | - |
| 5 | + | + | + | - | - |
| 6 | + | + | + | - | - |
| 7 | + | + | + | - | - |
| 8 | + | + | + | - | - |
| 9 | + | + | + | - | - |
| 10 | + | + | + | - | - |
| 11 | + | + | + | - | - |
| 12 | + | + | + | - | - |
| 13 | + | + | + | - | - |
| 14 | + | + | + | - | - |
| 15 | + | + | + | - | - |
| 16 | + | + | + | - | - |
| 17 | + | + | + | - | - |

+: Bakteri gelişmesi var

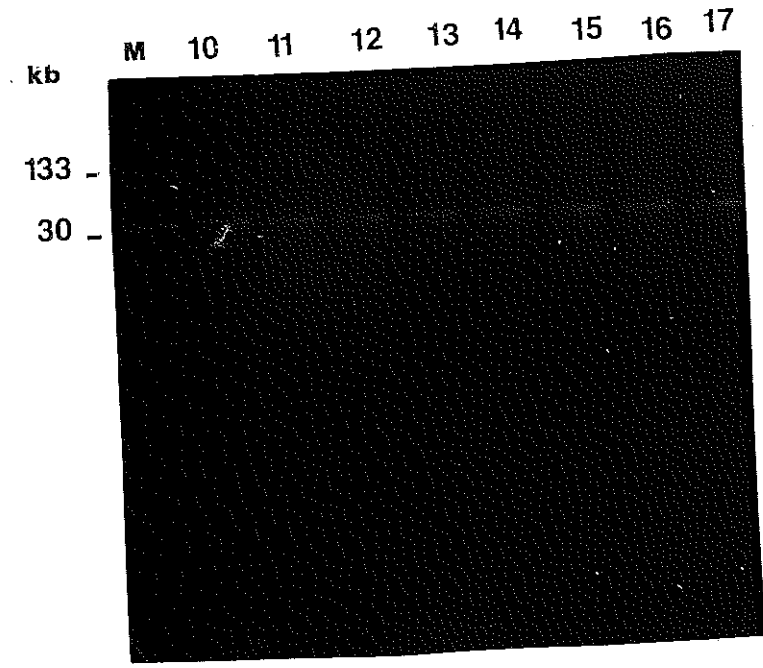
-: Bakteri gelişmesi yok

4.6. Plazmid Ekstraksiyonu

Erwinia stewartii standart markör olarak baz alındığında, yaklaşık olarak 29 kb'lik *Erwinia stewartii* bantıyla eşdeğer büyüklükte, *Erwinia amylovora* izolatlarının tümünün plazmid içerdikleri saptanmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



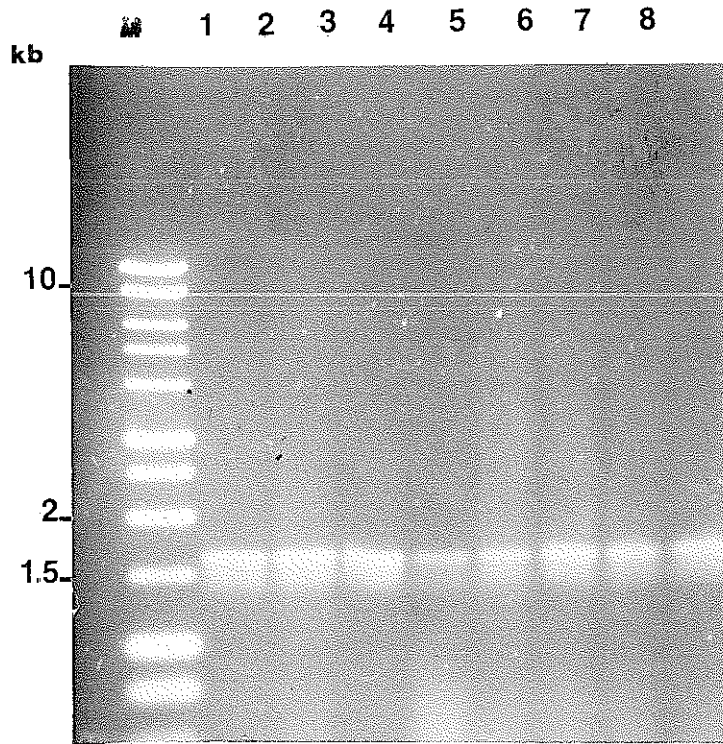
Şekil 4.1 Batı Akdeniz Bölgesi *E. amylovora* izolatlarının plazmid profilleri
M: *E. stewartii*; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9: Batı Akdeniz Bölgesi *E. amylovora* izolatları



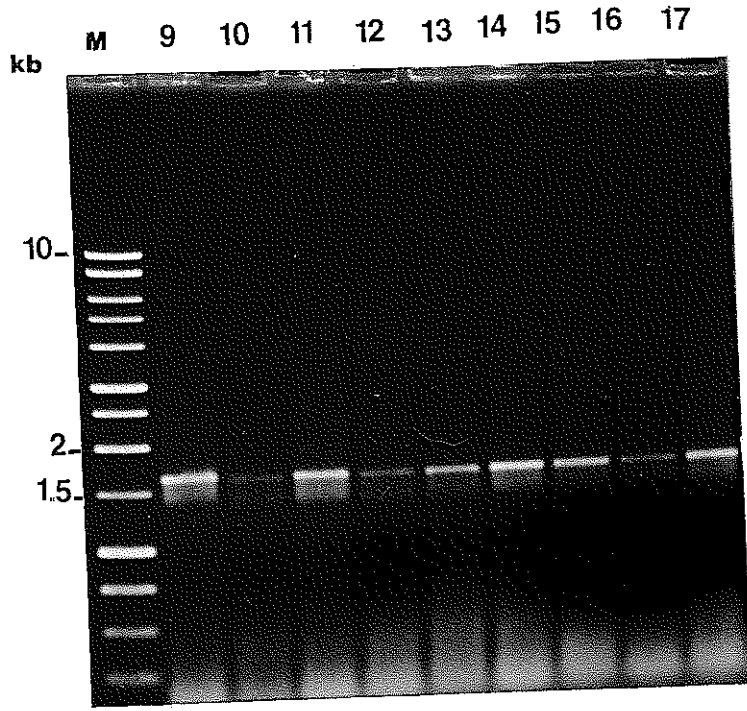
Şekil 4.2. Batı Akdeniz Bölgesi *E. amylovora* izolatlarının plazmid profilleri
M: *E. stewartii*; 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ve 17: Batı Akdeniz Bölgesi *E. amylovora* izolatları

4.7. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

E. amylovora'ya özel 16 kb büyüklüğündeki kromozomal *ams* geninin test edilen tüm izolatlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4)



Şekil 4.3. PCR ile *E. amylovora* izolatlarından *ams* geninin amplifikasyonu
M: 1 kb'lik DNA markör; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8: Batı Akdeniz Bölgesi *E. amylovora* izolatları



Şekil 4.4 PCR ile *E. amylovora* izolatlarından *ams* geninin amplifikasyonu
M: 1 kb'lık DNA markör; 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ve 17: Batı Akdeniz Bölgesi *E. amylovora* izolatları

AKDENİZ BİLİMSEL DERGİSİ
Cilt 1, Sayı 1, 2008

5. TARTIŞMA

Bu çalışma ile Batı Akdeniz Bölgesindeki *Rosaceae* familyası bitkilerinden elde edilen ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora* izolatlarının tanısı ile ilgili olarak patojenisite testleri (ham armut testi, sürgün inokulasyonu testi, tütünde hipersensitif reaksiyon testi), biyokimyasal testler (katalaz aktivitesi, oksidaz aktivitesi, nitrattan nitrit üretimi testi, aseton testi, indol üretimi testi, hidrojen sülfid testi, nişastanın parçalanması testi, sakkarozdan indirgenen maddeler testi, sıcaklığa hassasiyet testi, % 4 NaCl' ye tolerans testi, pektinaz aktivitesi testi, King's B testi, KOH testi, jelatinin hidrolizi testi), dayanıklılık testleri (bakıra dayanıklılık testi, streptomycine ve oxytetracycline dayanıklılık testi), plazmid ekstraksiyonu ve PCR çalışmaları yapılmıştır.

Ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora* özellikle Batı Akdeniz Bölgesi Antalya, Isparta, Burdur il ve ilçelerinde, yoğun olarak armut ve ayvada bulunduğu saptanırken daha az miktarda ise, yabani armut ve yenedünyada görülmüştür. Özellikle yöremizde yoğun olarak yetiştirilen kültür armudu Santa Maria patojenden daha fazla zarar görürken Ankara armutlarında bu şiddette bir zararlanmanın oluşmaması da kayda değer bilgiler arasında bulunmaktadır (Momol vd 1992). Batı Akdeniz Bölgesinde yumuşak çekirdekli bitkilerden elma yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde bu hastalık etmeninden kaynaklanan zararlanmalara rastlanmamıştır. Farklı bitkilerin hastalıktan farklı şiddette etkilenme nedeninin bitkilerin genetik yapısındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yıllara bağlı olarak, hastalığın epidemi haline gelmesinde ve bahçelerin hastalıktan farklı şiddette etkilenmesinde ekolojik koşulların (yağış, sıcaklık, nem vb) değişiklik göstermesi de önemli bir nedendir (Psallidas vd 1989, Jones 1992).

Yarı seçici besi ortamı MS ve standart besi ortamı NSA'ya bakterilerin izolasyonu yapılmıştır. Her iki ortamda da sakkarozun fazla miktarda bulunması bakterilerin gelişimini olumlu ve hızlı olarak etkilerken bu ortamlarda bakterilerde yoğun ekzopolisakkarit üretiminden kaynaklanan levan oluşumu, kubbemsi bakteri morfolojisine rastlanmıştır (Psallidas ve Dimova 1986). Özellikle MS ortamında bazı

bakteri izolatlarında, turuncu renk ve levan oluşumundan kaynaklanan kubbemsi bakteri morfolojisine rastlanırken bu bulgular (Van der Zwet 1986) ile paralellik gösteren sonuçları ihtiva etmektedir. Ancak farklı olarak izole edilen bazı bakteri izolatlarında, oluşan tek kolonilerin merkezinde koyu turuncuya çalan beneklenmenin olduğu saptanmıştır. İzolasyonlar sonucunda meydana gelen bu görüntüden bu bakteri türünün başka bir *Erwinia* spp. olabileceği düşünülmüştür.

Patojenisite testlerinden ham armut testi hastalığın patojenisitesinin saptanması ve hastalığın tanımlanmasında sık kullanılan önemli ve basit bir tekniktir (Psallidas ve Dimova 1986, Vantomme vd 1982, Van der Zwet 1986). Bazı Santa Maria armut türlerinde *Erwinia amylovora* izolatlarının bazılarının, aynı simptomatolojiyi göstermediği, ooze oluşumunun olmadığı saptanmıştır. Bunun nedeninin tamamıyla ham armudun tekstüründen kaynaklandığı düşünülmektedir. Nişasta miktarının artmasının bakteriyel gelişimi sınırlandırdığı bunun da ooze oluşumuna olumsuz etkide bulunduğu düşünülmektedir. Test edilen Ankara armutlarında bakteriyel exudat ya çok geç oluşmuş yada hiç oluşmamıştır. Bunun da armudun genetik olarak dayanıklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Momol vd 1992).

Pek çok konukçu-patojen kombinasyonunda, patojen konukçu hücre ile kontak kurar ve patojene ait sinyaller hücre nükleusuna doğru hareket eder. Patojenin penetrasyon noktası etrafında ve sitoplazmada, resin benzeri granül birikimi olur. Bakterilerin oluşturduğu hipersensitif reaksiyon hücrelerin hücresel membranlarının yıkılmasıyla olur. Bunu bakteriler tarafından zarar gören hücrelerin nekrozisi izler. HR konukçu hücrede patojen gelişimini sınırlandırdığından, konukçu dayanıklı ise HR kısa zamanda (12-18 saat) oluşur (Agrios 1997). Yapılan HR testinde *Nicotiana tabacum* da HR oluşumunun kısa sürede olduğu saptanmıştır.

Sürgün inokülasyonu testlerinde kullanılan filizlerin özellikle genç, sulu ve gevşek dokulu olmasına dikkat edilmiştir. Yaşlı olan filizlerde yapılan çalışmalarda, hastalık etmeninin bitki dokusu içinde yayılımı daha yavaş olduğundan simptom gelişimi de oldukça yavaş seyretmiştir. Ancak genç dokuların sulu ve gevşek dokusu, enfeksiyonun daha kısa sürede oluşması, patojenin bitki dokusu içerisinde yayılımını

daha hızlandırdığından daha kısa sürede simptom oluşumuna neden olmuştur (Van der Zwet 1995).

İnsan patojenleri bitki patojenleri ve böcekler zaman içerisinde kimyasalların çok yaygın kullanımına karşı dayanıklılık geliştirmişlerdir. Funguslara uygulanan thiram, maneb, captan gibi fungusidlere karşı, dayanıklı ırklara rastlanmamıştır. Çünkü funguslar, eukaryotik canlılar oldukları için, fazla sayıda genin değişime uğraması gerekmektedir. 1950'lerden bu yana bakteriyel bir etmen olan ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora*'nın sistemik bir antibiyotik olan streptomycine'e karşı dayanıklılık geliştirdiği saptanmıştır (Agrios 1997).

Yöremizde ateş yanıklığı ile mücadelede rutin ve yoğun olarak bakır içerikli daha az miktarda ise antibiyotik içerikli ilaçların kullanımının yaygın olduğu görülmüştür. Bu tüm mikroorganizma ve canlılarda olduğu gibi patojende de zamanla ve yavaş yavaş gelişen dayanıklılık sorununu ortaya çıkarmıştır. Dayanıklılık oluşumu hastalıkla mücadeleyi olumsuz yönde etkilemektedir. Oluşan dayanıklılıkta, patojene karşı kullanılan değişik bakır preparatların etkisi ya azalmakta yada zamanla ortadan kalkmaktadır. Özellikle kullanılan 0.16 mM ve 1.10 mM'lık dozlarda bakırın dayanıklılığı ortadan kalkmıştır. Daha düşük dozlarda oluşan dayanıklılık ise bakırlı preparatların ekonomik olmasından, dolayısıyla yoğun olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Ancak bakırın yüksek dozlarına karşı dayanıklılığın oluşmaması patojenin bu bölgede henüz sorun teşkil etmediğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, Loper vd (1991) ile paralellik göstermektedir.

Antibiyotikler kompleks formüllü olmayıp bitki içinde belli mesafelere transloke edilirler. Mikroorganizmalardan elde edilen bu maddeler, bitki hastalıklarının kontrolünde kullanıldıklarında başarıya ulaşılmıştır. Ancak ekonomik olmayışı ve mikroorganizmaların dayanıklılık oluşturmamasından kaynaklanan birtakım problemleri de beraberinde getirmektedir. Bitki patojenlerine karşı yoğun, olarak kullanılan antibiotikler arasında streptomycine ve oxytetracycline bulunmaktadır. Özellikle streptomycine ve oxytetracycline patojen mikroorganizmanın ribozomuna bağlanarak protein sentezini engelleme yoluyla etkili olmaktadır. Streptomycine, Streptomyces

bakterisi ve Penicillum grubu funguslardan elde edilir ve mikroorganizmalar üzerinde toksik etkiye sahiptir. Yapılan tüm denemelerde streptomycinin üç farklı dozu olan 100, 500, 1000 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Her bir bakteri için değişen dozlarda, değişen zon oluşumu yani dayanıklılık oluştuğu saptanmıştır. Düşük dozlarda bile bu antibiyotigin bakterilerde dayanıklılık oluşturmaya yoğun olarak kullanımından kaynaklanmaktadır. 1000 µg/ml'lik dozda 0.5-0.7 cm'lik zon oluşumu saptanmışken, 100 µg/ml'lik dozda ise 0-0.1 cm, 500 µg/ml'de ise 0.3-0.5 cm oranında zon oluşumu açısından farklılık olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bariz şekilde ortaya çıkan bu farklılık, değişik lokasyonlardaki bakteriyel izolatların, antibiyotigin değişik dozlarına bağlı olarak dayanıklılıklarının da değiştiğini göstermektedir (Loper vd 1991).

Mikroorganizmalara karşı yoğun olarak kullanılan antibiyotiklerden biride yine streptomyces türü mikroorganizmalardan elde edilen, molicutelerin de dahil olduğu pek çok bakteri üzerine etkili olan oxytetracyclinedir. Bakteriyel izolatların değişik dozlarında oluşan dayanıklılıklarıda farklılık göstermektedir. 10 µg ve 25 µg/ml lik dozlarda etkisi saptanmazken 50 µg/ml'lik doz da 0.2-0.4 cm, 100 µg/ml dozda ise 0.4-0.5 cm arasında değişen zon büyüklüğü saptanmıştır. İlaç dozları düşük olduğunda, bakteriyel patojenlerin bundan etkilenmedikleri görülürken ancak antibiyotigin 50 ve 100 µg/ml lik dozlarında bakteriyel izolatları üzerinde etkinlik göstermeye başlamışlardır. Kullanımının az olmasına rağmen, düşük dozlarda bu antibiyotigin etkin olmamasının nedeni streptomycine karşı bakteriyel izolatların oluşturduğu dayanıklılıktan kaynaklanıyor olabileceğidir. Değişik lokasyonlarda farklı dozlara bağlı olarak, dayanıklılık açısından farklılık olmadığı, ekolojik faktörlerin dayanıklılığın oluşumunda direkt etkisi olmadığını göstermektedir.

E. amylovora izolatlarının plazmid içerikleri incelendiğinde izolatlar arasında plazmidler açısından farklılık göstermedikleri ortaya çıkmıştır. *E. stewartii* markör olarak değerlendirildiğinde tüm izolatların tamamının 30 kb'lik plasmide sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır (Falkeinstein vd 1988). Bakterilerde dayanıklılık, plazmidler üzerinde bulunan genler tarafından idare edilmektedir. Plazmidler açısından farklılık olmaması, antibiyotiğe karşı dayanıklılıkla ilgili olan genler açısından da farklılık olmadığı şeklinde açıklanabilir.

1990'lı yıllarda patojenlerin tüm tiplerinin tanımlanması PCR tekniklerinin kullanımıyla yaygınlaşmıştır. PCR'da hedef DNA'nın amplifikasyonu patojene özel primerler vasıtasıyla olmaktadır. Batı Akdeniz Bölgesinden elde edilen tüm izolatların kesin tanısı, kromozomal DNA'nın *ams* bölgesinden elde edilen iki primerin (AMSbL ve AMSbR) amplifikasyonu ile ortaya çıkarılmıştır. 17 izolattan tamamının amplifike olduğu saptanmıştır. Tüm Batı Akdeniz Bölgesi izolatlarında görülen 1.6 kb'lik bant oluşumu Bereswill vd (1995) ile paralellik göstermektedir.

6. SONUÇ

Ülkemiz yumuşak çekirdekli meyve üretimi açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Bu durumda amaç, üretimin bu kadar fazla olduğu bir sektörün fitopatolojik açıdan en az zararlanmasını sağlayacak, yeni yöntem ve tekniklerin uygulanmasına zemin hazırlayacak çalışmaları yapmaktır. Bu düşünceden hareketle, özellikle *Rosaceae* familyası bitkilerinin yoğun olarak yetiştirildiği Batı Akdeniz Bölgesinde de önemli zararlanmalar yapan ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et. al. hastalığı ile ilgili olarak çalışılmıştır.

Laboratuvara getirilen hastalıklı örnekler standart izolasyon yöntemleri kullanılarak izole edildikten sonra, yarı seçici besi ortamı olan MS (Miller ve Scroth, 1972) ve NSA (Nutrient Sakkaroz Agar)'ya çizilmiştir. Her iki ortamda içerdiği bol sakkaroz yönünden, *Erwinia amylovora* bakterisinin tanımlanmasına olanak tanımaktadır. Nitekim bu patojen sakkarozu kullandığında, ekzopolysakkarit üretmekte, bu da kubbemsi koloni morfolojisi meydana getirmektedir. Her iki besi ortamında da görülen bu özelliğe ek olarak, MS ortamında bariz şekilde bu bakteriye has olan turuncu renk oluşumu da saptanmıştır.

Patojenisite testleri patojenin virülenslik kabiliyetinin ortaya konulması açısından önem taşımaktadır. Tüm izolatlara uygulanan, tütünde hipersensitif reaksiyon testi, ham armut testi ve sürgün inokulasyonu testlerinde patojene has özellikler bulunmuştur. Ham armut dilimleri üzerinde ooze oluşumu görülürken, tütünde kahverengi çökmeler şeklinde hipersensitif reaksiyon ve sürgünde de siyah nekroz ve baston şeklinde hastalık simptomsu oluşmuştur.

Ülkemiz de patojene karşı, çevreye ve insan sağlığına zararlı olmayan uygun bakterisidlerin yokluğu, kültürel mücadeleye gereken önemin verilmemesi, çiftçilerin kesin ve kısa sürede sonuca ulaşma yolu olarak gördükleri bakırlı preparatlar ve buna göre ekonomik olmadığından dolayı fazla kullanılmayan antibiyotik uygulamalarını gündeme getirmiştir. Ancak her iki kimyasal ilaç da patojenin dayanıklılık kazanması gibi mücadele açısından çok daha önemli bir sorunu gündeme getirmiştir. Bu yüzden

toplanılan izolatların dayanıklı olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla bakır (bakır oksiklorür), streptomycine ve oxytetracycline'nin izolatlar üzerindeki etkinliğinin saptanması için denemeler kurulmuştur. Bakıra karşı dayanıklılık testinde 0,02, 0,04, 0,08, 0,16 ve 1,10 mM'lık dozlar CYE ortamında denenmiştir. Dayanıklılığın değerlendirilmesinde kolaylık sağlaması açısından pozitif kontrol olarak da *X. axonopodis* pv *vesicatoria* XVP26 straini kullanılmıştır. Tüm izolatların, bakırın sadece 0,16 ve 1,10 mM'lık dozuna hassas oldukları saptanmıştır. Kurulan streptomycine denemesinde 100, 500 ve 1000 µg/ml'lik dozlar denenirken, oxytetracycline denemesinde ise 10, 25, 50 ve 100 µg/ml'lik dozlar kullanılmıştır. Streptomycin denemesinde 100 µg/ml'de 0-0,1 cm zon oluşumu saptanırken 500µg/ml'de 0,3-0,5 cm arasında zon oluşumu ve 1000µg/ml'de 0.5-0.7 cm zon oluşumu saptanmıştır. Oxytetracycline denemesinde ise bu sonuçlar, 10 ve 25µg/ml'de antibiyotiğin etkin olmaması şeklinde ortaya çıkarken, 50 ve 100 µg/ml'de sırasıyla 0.2-0.4 ve 0.4-0.5 cm'lik zon oluşumu şeklinde meydana gelmiştir. Her üç denemede, patojenin Batı Akdeniz Bölgesinde bakıra ve antibiyotiğe dayanıklılık açısından sorun çıkaracak boyutlara erişmediğini göstermektedir.

Patojenin moleküler düzeyde daha iyi tanımlanması, epidemilerin kısa sürede saptanması yanında, patojene karşı kültürel ve kimyasal yeni mücadele olanaklarının geliştirilmesinde önem taşımaktadır. Bu amaçla son yıllarda hızla gelişen PCR tekniklerinden hareketle *Erwinia amylovora*'ya özgü kromozom üzerinde bulunan ekzopolysakkarit üretiminden sorumlu bölgeye ait iki primer kullanılarak (AMSbL ve AMSb) PCR yapılmıştır. 1 kb'lik DNA markörü kullanıldığında tüm bakteri izolatlarında 1.6 kb'lik amplifikasyon görülmüştür.

Tüm *Erwinia amylovora* patojenlerinin plasmid ekstraksiyonları yapılmıştır. *Erwinia stewartii* plazmidleri standart markör olarak kullanılmıştır. Yapılan ekstraksiyon sonucunda tüm izolatların plasmid büyüklüğü açısından homojen bir dağılım gösterdikleri saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda da ortaya konduğu üzere, bakteriyel izolatların tamamında 29 kb'lik tek bir plasmide rastlanmıştır.

Ülkemiz açısından büyük önem teşkil eden ateş yanıklığı hastalık etmeni ile ilgili olarak yapılan bu çalışma, daha sonra ülkemizde yapılacak çalışmalara ışık tutması açısından önem taşımaktadır.

Daha sonra yapılacak detaylandırılmış moleküler düzeydeki çalışmalar sayesinde patojenlerin coğrafi dağılımı ve farklı konukçulara bağlı olarak genetik çeşitlilik gösterip göstermediği incelenebilir. İleri düzeyde yapılacak moleküler çalışmalar RAPD, AFLP, REP-PCR ve Pulsed Field Jel Elektroferezis teknikleri kullanılarak *E. amylovora* strainlerinin daha detaylı tanımlamaları yapılabilir.

Özellikle ülkemizde kimyasal ilaç kullanımını sınırlandırmak için çiftçiyi bilinçlendirecek tarımsal yayım çalışmalarına destek verilmelidir. Zamanında yapılacak kültürel mücadeleye daha fazla önem verilmesi sağlanmalıdır. *E. amylovora*'nın entegre mücadelesinde potansiyel fungus ve bakteri kökenli biyolojik ilaçların ve bitkisel kökenli doğal ilaçların kullanımının yaygınlaştırılması amacıyla çalışmaların yapılması ve bu tür çalışmalara destek verilmesi büyük önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR

- ABO-EL DAHAB, M. K. and EL-GOORANI, M. A. 1964. Antagonistic effect of a *Bacillus subtilis* strain upon *Erwinia amylovora*. *Phytopath.*, 54(10): 1285-1286.
- ABO-EL DAHAB, M. K., EL-GOORANI, M. A., ZELLER, W. and SHOEIB, A. 1988. Plasmid detection in isolates of *Erwinia amylovora* in Egypt. *Alex. J. Agric. Res.*, 33(1): 227-237.
- ABO-EL DAHAB, M. K., EL-GOORANI, M. A., SHOEIB, A. and ZELLER, W. 1990. Prediction of fire blight disease in Egypt. *Acta Horticulturae*, 273: 115-119.
- AGRIOS, G. N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press, Inc. Third Edition, California, 635 pp.
- ALDWINCKLE, H. S. and PRECZEWSKI, J. L. 1976. Reaction of terminal shoots of apple cultivars to invasion by *Erwinia amylovora*. *Phytopath.*, 66: 1439-1444.
- ANONİM 1996. DİE. Tarımsal Yapı ve Üretim. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü.
- BERESWILL, S., PAHL, A., BELLEMANN, P., ZELLER, W. and GEIDER, K. 1992. Sensitive and species specific-detection of *Erwinia amylovora* by Polymerase Chain Reaction. *Appl. and Env. Mic.*, 58(11): 3522-3526.
- BERESWILL, S., BUGERT, P., BRUCHMULLER, I., GEIDER, K. 1995. Identification the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. and Env. Mic.*, 2636-2642.
- BROWN, E. W., JANISIEWICZ, W. and VAN DER ZWEI, T. 1996. Preliminary phenotypic and genetic differentiation of the fire blight bacterium, *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 411: 199-210.
- BOGS, J., BRUCHMULLER, I., ERBAR, C. and GEIDER, K. 1998. Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopath.*, 88: 416-421.
- CHIOU, C. S. and JONES, A. L. 1991. The analysis of plasmid mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopath.*, 81: 710-714.
- COPLIN, J. E., ROWAN, R. G., CHISHOLM, D. A., and CHOIHOLM, D. A. and IIMOYER, R. E. 1981. Characterization of plasmids in *Erwinia stewartii*. *Appl. and Env. Mic.*, 42: 599-604.

- CREPEL, C. and MAES M. 1996. Fire blight susceptibility tests on old apple varieties under controlled climatological conditions. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, 61: 305-310
- CREPEL, C. MOERMANS, R. and MAES, M. 1997. Evaluation of the fire blight susceptibility of host plants under natural conditions. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 62(1): 1717-1719
- DICKEY, R. S., and KELMAN, A. 1988. *Erwinia* the 'carotovora' group Pp 44-49. In: Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria, II edition, Ed N. W. Schaad, APS press, St. Paul, Minnesota.
- EL-GOORANI, M. A., EL-KASHEIR, H. M., SHOEIB, A. A. and HASSANEIN, M. F. 1989. Distribution of streptomycin resistance strains of *Erwinia amylovora* in Egypt during 1988. *J. Phytopath.*, 127: 69-74.
- EL-MASRY, M. H., BROWN, I. A., EPTON, A. S. and SIGEE, D. C. 1997. Transfer from to *Erwinia herbicola* of a plasmid associated with biocontrol of fire blight. *Plant Pathology*, 46: 865-870
- FAHY, P. C. and HAYWARD, A. C. 1983. Media and Methods for isolation and Diagnostic tests, In: Plant Bacterial Diseases A Diagnostic Guide, Academic Press, a subsidiary of harcourt Brace Javanovich, Publishers, Sydney, New York, London, Paris, San Fransisko, San Paolo; Tokyo, Toronto, Australia, 393 p (337-378).
- FALKENSTEIN, H., ZELLER, W. and GEIDER, K. 1988. Identification of *Erwinia amylovora* modulates development of fire blight symptoms. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2643
- FALKENSTEIN, H., BELLEMAN, P., WALTER, S., ZELLER, W. and GEIDER, K. 1988. Identification of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen, by colony hybridisation with DNA from plasmid pEA29. *Appl. and Env. Mic.*, 54(11): 2798-2802.
- GEIDER, K. and KIM, W. 2000. Characterization of a viral EPS-Depolymerase, a potential tool for control of fire blight. *Phytopath.*, 90(11): 1263-1268.
- GUILFORD, P. J., TAYLOR, R. K., CLARK, R. G., HALE, J. N. and FORSTER, R. L. S. 1996. PCR based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 411: 53-56.
- GORRIS, M., CAMBRA, P., LIOP, P., LOPEZ, M. M., LECOMTE, P., CHARTIER, R., and PAULIN, J. P. 1996. A sensitive and spesific detection of *Erwinia amylovora* based on the Elisa-Dasi enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 411: 41-46.

- JONES, A. L. 1992. Evaluation of the computer model Maryblight for predicting fire blight blossom infection on apple in Michigan *Plant Dis.*, 76: 344-347
- JONES, A. L., FERNANDO, D. G. W. and EHREI, G. R. 1999. Controlling secondary spread of fire blight with prohexadione calcium *Phytopath.*, 89: S37.
- KADO, C. I. and LIU, S. T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of small and large plasmids *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373.
- KING, E. O., WARD, M. K., and RANEY, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- KLEMENTI, Z., RUDOLPH, K. and SANDS, D. C. 1990. Methods in Phytobacteriology Academia Kiado, Budapest, 547 pp.
- KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction, *Nature*, 70: 703
- LABY, R. J. and BEER, S. V. 1992. Hybridization and functional complementation of the *hrp* gene cluster from *E. amylovora* Ea321 with DNA of other bacteria. 5(5): 412-419.
- LAURENTI, J., BARNY, M. A., KOTOUJANSKY, A., DUFRICHE, P. and VANNESTE, J. L. 1989. Characterisation of ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2: 160
- LELLIOT, R. A. and STEAD, D. E. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *pseudomonads*, *J. of Appl. Bact.*, 29: 470-489.
- LOPER, J. E., HENKELS, M. D., ROBERTS, R. G., GROVE, G. G., WILLETTI, M. J. and SMITH, J. 1991. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington state. *Plant Dis.*, 75: 287-290.
- MCMANUS, P. S. and JONES, A. L. 1994. Epidemiology and genetic analysis of streptomycin resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of Oxytetracycline for control. *Phytopath.*, 84: 627-633.
- MANULIS, S., ZUTRA, D., KLEITMAN, F., DROR, O., DAVID, I., ZILBERSTEINE, M. and SHABI, E., 1998. Distribution of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in Autumn *Phytoparasitica*, 26(3): 223-230
- MILLER, I. D. and SCROTH, M. N. 1972. Monitoring of the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium *Phytopath.*, 62: 1175-1182.

- MOMOL, M I , YEĞEN, O , BASIM, H , ZACHOWSKI, M A. and RUDOLPH, K .
1991. Observation and identification of fire blight on pear in south west of Turkey. *Phytomedizin*, 21: 24.
- MOMOL, M I , YEĞEN, O , BASIM, H , ZACHOWSKI, M A. and RUDOLPH, K
1992. Identification of *Erwinia amylovora* and occurrence of fire blight of pear in Western Mediterranean region of Turkey. *J. Türk. Phytopath.*, 21(1): 41-47
- NORELLI, J. L., BOREJSZA-WYSOCKA, E E., REYNOIRD, J P and
ALDWINCKLE H S., 1999. Transgenic Gala apple expressing attacin E has increased field resistance to *Erwinia amylovora*. *Phytopath.*, 89: S56
- PALMER, E. L , TEVIOTDALE, B. L and JONES, A. L., 1997 A relative of the broad-host range plasmid RSF1010 detected in *Erwinia amylovora*. *Appl. and Envi Mic.*, 63(11): 4604-4607.
- PSALLIDAS, P G. and DIMOVA, M., 1986. Occurrence of the disease fire blight of *Pomaceaus* trees in Cyprus characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora* *Annls. Inst. Phytopat. Benaki*, (N.S.), 15: 61-70
- PSALLIDAS, P. G, VIAS, A and ISIANOTOS, J 1993 Screening for potential antagonists to *Erwinia amylovora* *in vivo* and *in vitro* among the bacterial microflora of pear and apple. *Acta Horticulturae*, 338: 353-360
- PSALLIDAS, P. G , RETALIS, D A. and ISIANOTOS, J. 1989. Climatic data and fire blight occurrence in Greece. *Proc. 7th Int. Conf. Plant Path.*, 285-289
- ROBERTS, G R., HALE, C N , VAN DER ZWEI, I. and MILLER, C E 1998. The potential for spread of *Erwinia amylovora* and fire blight via commercial apple fruit; a critical review and risk assesment *Crop Protection*, 17(1): 19-28.
- SCHNABEL, E L. and JONES, A. L. 1998. Instability of a pEA29 marker in *Erwinia amylovora* previously used for strain classification *Plant Dis.*, 82(12): 1334-1336.
- SCHNABEL, E L. and JONES, A L. 1999. Gram (-) bacteria from Michigan apple orchards carry several tetracycline resistance transposons. *Phytopath.*, 89:70
- SOBICZEWSKI, P and MILLIKAN, D. F 1985. Efficacy of chemicals for control of fire blight *Fruit Science Reports*, 12(1)
- STEINBERGER, E. M , CHENG, G Y and BEER. S. 1990. Characterisation of a 56 plasmid of *Erwinia amylovora* Ea 322 : its non involvement in pathogenicity *Plasmid*, 24: 12-24

- STOCKWELL, V. O., JOHNSON, K. B and LOPER, J. E 1996. Compatibility of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* with antibiotics used control fire blight *Phytopath.*, 86: 834-840
- STOCKWELL, V. O., JOHNSON, K. B and LOPER, J. E 1998. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation *Phytopath.*, 88: 506-513
- TAYLOR, R. K. and HALE, C. N , 1998. Identification and characterisation of isolates of *Erwinia amylovora* from Cotoneaster in Australia *Australasian Biotechnology*, 8(6): 353-356
- ISIANIOS, J. and PSALLIDAS, P. G 1996. First evaluation of "Firescreens" for predicting fire blight epidemics in Greece. *Acta Horticulturae*, 411: 145-153
- VAN DER ZWET, I. 1970. Evaluation of inoculation techniques for the determination of fire blight resistance in pear seedling. *Plant Dis. Reporter*, 54(2): 96-100
- VAN DER ZWET, I. and KEIL, H. L 1979. Fire blight a bacterial disease of Rosaceus plants. *Agriculturae handbook*. N. 510, U.S. Department of Agriculturae, Washington. 200 p
- VAN DER ZWET, I. 1986. Identification, symptomatology and epidemiology of fier blight Le Conte pear in the Nile Delta of Egypt *Plant Dis*, 72: 230-234
- VAN DER ZWET, I 1994. The various means of dissemination of the fire blight bacterium *Erwinia amylovora* *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 24: 209-214
- VAN DER ZWET, I. and BEER, S. V. 1995. Fire blight—its nature, prevention, control. *Agriculturae Information Bulletin*. N: 631
- VANTOMME, R., SWINGS, J., GOORE, M., KERSTIERS, K. and LEY, J. D 1982. Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoretic characterisation of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. *Phytopath.*, Z., 103: 349-360
- WALTERS, K., MAROOFI, A., HITCHIN, E. and MANSFIELD, J 1990. Gene for pathogenicity ability to cause the HR cloned from *Erwinia amylovora* *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36: 509-521.
- WEI, Z. M., LABY, R. J., ZUMOFF, C. H., BAUER, D. W., HE, S. Y., COLLMER, A. and BEER, S. V. 1992. Harpin, elicitor of hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257: 1-13.
- WILSON, M., EPTON, S. A., and SIGEE, D. C. 1990. Biological control of fire blight of hawthorn with *Erwinia herbicola* under protected conditions *Plant Pathology* 39: 301-308.

ZHANG, Y. ve GEIDER, K. 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis *Appl. and Env. Mic.*, 63(11): 4421-4426

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Muğla'nın Fethiye ilçesinde doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 1993 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Şubat 1998 yılında aynı bölümde yüksek lisans öğrenimine başladı ve Mayıs 1999 yılında bu bölümde açılan araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmalarını yürütmektedir.

AKDENİZ

ÜNİVERSİTESİ
ZİRAAT FAKÜLTESİ
BİTKİ KORUMA BÖLÜMÜ