



**İĞDIR İLİ ELMA AĞAÇLARINDA ATEŞ YANIKLIĞI  
HASTALIĞINA NEDEN OLAN *Erwinia amylovora*  
(BURR.) WINSLOW et al. ETMENİNİN  
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER (MIS)  
YÖNTEMLERLE TANISI**

**Gökçe GÖK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mesude Figen DÖNMEZ**

**Ortak Danışman: Doç. Dr. İrfan ÇORUH**

**2016**

**Her hakkı saklıdır**

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İĞDIR İLİ ELMA AĞAÇLARINDA ATEŞ YANIKLIĞI  
HASTALIĞINA NEDEN OLAN *Erwinia amylovora* (BURR.)  
WINSLOW et al. ETMENİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER  
(MIS) YÖNTEMLERLE TANISI**

**Gökçe GÖK**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**İĞDIR**  
**2016**  
**Her hakkı saklıdır**

Yrd. Doç. Dr. Mesude Figen DÖNMEZ danışmanlığında Gökçe GÖK tarafından hazırlanan bu çalışma 04/10/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile BITKİ KORUMA BÖLÜMÜ, FITOPATOLOJİ Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. İrfan ÇORUH

İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. Mesude Figen DÖNMEZ

İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. Tuba GENÇ KESİMCİ

İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa Kenan GEÇER

İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. Peiman MOLAEİ

İmza:



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulunun 28 / 10 / 2016 tarih ve 2016/ 112 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

(İmza)



Yrd. Doç. Dr. Bahri GÜR

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### IĞDIR İLİ ELMA AĞAÇLARINDA ATEŞ YANIKLIĞI HASTALIĞINA NEDEN OLAN *Erwinia amylovora* (BURR.) WINSLOW et al. ETMENİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER (MIS) YÖNTEMLE TANISI

GÖK, Gökçe

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mesude Figen DÖNMEZ  
Ekim 2016, 72 sayfa

*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.'ın sebep olduğu ateş yanıklığı hastalığı elma, armut ve diğer Rosaceae familyası bitkilerini etkileyen en ciddi ve en tahripkar bakteriyel hastalıklardan biridir. 2013 ve 2015 yıllarında, Iğdır ilinde yanıklık semptom gösteren elma örneklerinden bakteriyel izolasyonlar yapılmıştır, toplam 84 bakteri straini elde edilmiştir. Yapılan morfolojik (hücre ve koloni morfolojisi, hareketlilik testi), biyokimyasal (gram reaksiyon, katalaz, oksidaz, nişasta hidrolizi, levan, ham armut ve 36°C' de gelişim testleri) ve moleküler (MIS) testler sonucunda bakterilerin 51 tanesi *Erwinia amylovora* olarak tanılanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Erwinia amylovora*, Ateş yanıklığı, MIS, Elma

## ABSTRACT

### APPLE TREES IN IĞDIR PROVINCE FIRE BLIGHT DISEASE CAUSED BY *Erwinia amylovora* (BURR.) WINSLOW et al. METHODS OF BIOCHEMICAL AND MOLECULAR (MIS) METHODS OF DIAGNOSIS

GÖK, Gökçe

Master Thesis, Plant Protection Main Discipline

Thesis Adviser: Asst. Prof. Dr. Mesude Figen DÖNMEZ

October 2016, 72 Pages

Fire blight caused by *Erwinia amylovora* ( Burr.) Winslow et al. is the most serious and destructive bacterial disease for apple, pear and other plants belonging to Rosaceae family. In 2013 and 2015, in Iğdır, bacterial isolations were done from diseased apple samples. Bacterial pathogens were identified by morphological (cell and colony morphology, mobility test), biochemical test (catalase, oxidase, growth in 36°C, KOH gram reaction, growth in saccharose nutrient agar) and molecular technique including fatty acid methyl ester profiles. In determining the pathogenicity, raw pear test and hypersensitive reaction on tobacco were done. In this study, according to the results these test, total 51 *Erwinia amylovora* strains were identified.

**Key words:** *Erwinia amylovora*, Fire blight, MIS, Apple

## **TEŐEKKÖR**

Çalıőmamın her aőamasında benden yardımını esirgemeyen Danıőmanım Yrd. Doç. Dr. Mesude Figen DÖNMEZ' e, yağ asit metil ester analizlerinin yapılmasındaki katkıları için Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN' e, istatiksels analizlerin yapılmasında emeği geçen Doç. Dr. Ecevit EYDURAN' a, dönem arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan ve destek olan çok değerli aileme yardımlarından dolayı teşekkür ederim.



**Gökçe GÖK**

**Ekim, 2016**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Elmanın Önemi ve Yetiştiriciliği .....	1
1.2. Ateş Yanıklığı Hastalığı ( <i>Erwinia amylovora</i> ) .....	3
1.2.1. Hastalık etmeni .....	4
1.2.2. Hastalığın belirtileri .....	5
1.2.3. Mücadele .....	9
1.2.3.1. Kültürel mücadele .....	10
1.2.3.2. Kimyasal mücadele .....	10
1.2.3.3. Biyolojik mücadele .....	11
1.2.3.4. Hastalıklara dayanıklı bitki kullanımı .....	12
1.3. Bitki Patojeni Bakterilerin Tanısı .....	13
1.3.1. Klasik yöntemler .....	13
1.3.2. Moleküler yöntemler .....	14
1.3.2.1. Mikrobiyal identifikasyon sistem .....	14
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>22</b>
3.1. Materyal .....	22
3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	22
3.1.2. Kullanılan çözelti ve besiyerinin hazırlanışı .....	23
3.1.3. Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması .....	24
3.2. Metot .....	24
3.2.1. <i>Erwinia amylovora</i> 'nın izolasyonu ve muhafazası .....	24
3.2.1.1. Bakteriyel sızıntıdan izolasyon .....	24
3.2.1.2. Yapraktan izolasyon .....	24

3.2.2. Tütünde aşırı duyarlılık (hypersensitive reaction=HR) testi .....	24
3.2.3. Patojenite testi .....	25
3.2.4. Morfolojik ve biyokimyasal testler .....	25
3.2.4.1. Morfolojik testler .....	26
3.2.4.1.a. Hücre morfolojisi .....	26
3.2.4.1.b. Koloni morfolojisi .....	26
3.2.4.1.c. Hareketlilik testi .....	26
3.2.4.2. Biyokimyasal testler .....	26
3.2.4.2.a. Gram reaksiyon testi .....	26
3.2.4.2.b. Katalaz testi .....	27
3.2.4.2.c. Oksidaz testi .....	27
3.2.4.2.d. Nişasta hidrolizi (amilaz) .....	28
3.2.4.2.e. Levan (fructan) testi .....	28
3.2.4.2.f. Ham armut testi .....	28
3.2.4.2.g. 36°C' de gelişim testi .....	28
3.2.5. Moleküler testler .....	29
3.2.5.1. Mikroorganizmaların yağ asitleri profillerine göre tanınması	29
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....</b>	<b>31</b>
4.1. Survey Sonuçları .....	31
4.2. Hastalıklı Elma Bitkilerinden İzole Edilen Bakteriyel Strainlerin Yağ Asit Profillerine Göre Tanı Sonuçları .....	32
4.3. Tütün Bitkisinde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Response=HR) Testi Sonuçları .....	35
4.4. Patojenite Testi Sonuçları .....	35
4.5. Patojenik Bakteriyel Strainlerin Morfolojik Test Sonuçları .....	37
4.6. Patojenik Bakteriyel Strainlerin Biyokimyasal Test Sonuçları .....	39
4.7. Bakteriyel Strainlerin Yağ Asit Analiz Sonuçları .....	45
4.8. Tartışma .....	52
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>58</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>59</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>73</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

%	Yüzde
cm	Santimetre
da	Dekar
dH <sub>2</sub> O	Distile su
g	Gram
H <sub>2</sub> O	Su
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
ha	Hektar
kg	Kilogram
m <sup>2</sup>	Metrekare
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
O <sub>2</sub>	Oksijen
°C	Santigrat derece
sn	Saniye
sa	Saat
sdH <sub>2</sub> O	Steril distile su
sH <sub>2</sub> O	Steril su

### Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E.amylovora</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
FAME	Yağ asidi metil ester
HR	Hypersensitive Response
KB	King's B
KCL	Potasyum klorür
KOH	Potasyum hidroksit
MIS	Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi

<b>NA</b>	Nutrient Agar
<b>NaCL</b>	Sodyum klorür
<b>NAS</b>	Nutrient Agar + Starch
<b>NB</b>	Nutrient Broth
<b>GYCA</b>	Glikoz Yeast Kalsiyum Karbonat Agar
<b>NSA</b>	Nutrient Sukroz Agar
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>TSA</b>	Trypticase Soy Agar
<b>TSB</b>	Trypticase Soy Broth
<b>TSBA</b>	Trypticase Soy Broth Agar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 4.1.</b> Tütünde HR testi .....	35
<b>Şekil 4.2.</b> <i>Erwinia amylovora</i> 'nın yapraklarda oluşturduğu yanıklık simptomu .....	36
<b>Şekil 4.3.</b> <i>Erwinia amylovora</i> strainlerinin sürgünlerde oluşturduğu bakteriyel akıntı ve yanıklık simptomu .....	36
<b>Şekil 4.4.</b> GG-20 straininin NA besiyerinde koloni gelişimi ve rengi .....	37
<b>Şekil 4.5.</b> Amilaz testi sonucunda GG-86, GG-52, GG-25, GG-73 strainlerinin negatif reaksiyonu .....	39
<b>Şekil 4.6.</b> A oksidaz pozitif, B oksidaz negatif olan reaksiyon .....	40
<b>Şekil 4.7.</b> Gram reaksiyon testi sonucunda (gram negatif) <i>Erwinia</i> <i>amylovora</i> strainlerinin oluşturduğu sümüksü yapı .....	40
<b>Şekil 4.8.</b> Katalaz testi sonucunda pozitif olan strainlerde görülen kabarcık oluşumu .....	41
<b>Şekil 4.9.</b> Solda GG-3 straininin NA+Sukroz Agarda levan koloni oluşumu.....	41
<b>Şekil 4.10.</b> <i>Erwinia amylovora</i> strainlerinin levana testi sonucunda oluşturdukları koloni gelişimi .....	42
<b>Şekil 4.11.</b> GG-100, GG-101, GG-99 strainlerinin 36°C' de gelişim testi sonucunda gelişme göstermemesi .....	42
<b>Şekil 4.12.</b> GG-15 straininin ham armut testi sonucunda oluşturduğu bakteriyel ooze .....	43
<b>Şekil 4.13.</b> GG-22 straininin ham armut testi sonucunda oluşturduğu bakteriyel ooze .....	43
<b>Şekil 4.14.</b> <i>Erwinia amylovora</i> strainleri için kümeleme analizi dendogramı ..	51

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Çizelge 4.1.</b> 2013-2015 yılları arasında elma üretim alanlarından izole edilen bakteri türlerinin dağılımı.....	31
<b>Çizelge 4.2.</b> Bakteriyel strainlerin yağ asitlerine göre (MIS) tanı sonuçları.....	33
<b>Çizelge 4.3.</b> Patojen mikroorganizmanın morfolojik test sonuçları .....	37
<b>Çizelge 4.4.</b> Patojen mikroorganizmanın biyokimyasal test sonuçları .....	44
<b>Çizelge 4.5.</b> Patojen bakterinin içerdiği yağ asiti çeşitleri ve oranları .....	46
<b>Çizelge 4.6.</b> <i>Erwinia amylovora</i> strainleri için kümeleme analizi sonuçları .....	49

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Elmanın Önemi ve Yetiştiriciliği

Elma, Rosaceae familyasında yer alan soğuk ılıman iklim meyve türleri içerisinde bulunan ve en fazla üretilen türlerinden birdir. Elma insan beslenmesi bakımından büyük önem taşımakta, herkes tarafından zevkle yenilmektedir. Elde edilen meyvenin bir kısmı taze olarak tüketildiği gibi, bir kısmı da kurutulmuş olarak değerlendirilmektedir. Konserve sanayinde çeşitli ürünler halinde işlenmekte, içki ve şarap endüstrisinde kullanılmaktadır. Ayrıca şurup, marmelat, reçel ve pasta yapımında, meyve suyu ve sirke üretilmesinde oldukça fazla kullanımıyla önem taşımaktadır (Özçağırın ve ark., 2011).

2012 yılı FAO verilerine göre; dünyada yaklaşık 4.8 milyon hektarlık alanda elma üretimi yapılmaktadır. Aynı yılda dünya elma üretimi 76.3 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Çin, 37 milyon tonluk üretim hacmiyle dünya üretiminden % 48.4 pay almaktadır. Bu ülkeyi sırasıyla ABD (4.1 milyon ton, % 5.4 pay), Türkiye (2.9 milyon ton, % 3.8 pay), Polonya (2.9 milyon ton, % 3.8 pay) ve Hindistan (2.2 milyon ton, % 2.9 pay) takip etmektedir (FAOstat, 2012).

Türkiye yaş meyve üretiminde dünyanın önemli üretici ülkelerinden birisi konumundadır. 24 milyon hektarlık tarım alanının yaklaşık % 13'ü (3.2 milyon ha) meyve üretiminde kullanılmaktadır. Ülkemizde elma 2013 yılında 3.1 milyon ton üretim ile en çok üretilen üçüncü meyve durumuna gelmiştir. 2014 yılında 2.4 milyon ton ve 2015 yılında ise 2.5 milyon ton elma üretimi gerçekleşmiştir (Anonim, 2016a).

Yumuşak çekirdekli meyvelerde, biyotik etmenlerin (böcekler, funguslar, bakteriler, virüsler, nematodlar, mikoplazmalar vs.) ve abiyotik faktörlerin (sıcaklık, nem, besin elementleri, toprak şartları, don, dolu, rüzgar, kuraklık vs.) sebep olduğu birçok hastalık ve zarar söz konusudur (Jones and Aldwinckle, 1991; Lamey and Stack, 1993; Anonim, 2014a; Kotan, 2002). Hastalık düzeyi; konukçunun duyarlılığı, patojenin saldırganlığı ve çevre şartlarına bağlı olarak değişmektedir. Ancak, kültürel uygulamalar, genetik tolerans, ağacın yaşı, stres şartları, ekim sıklığı, dormansi periyodu hastalıkların epidemiyolojisinde anahtar rol oynayan diğer faktörlerdir (Goldberg, 2000). Bütün

bu faktörlere bağlı olarak bitkinin kök, kök boğazı, gövde, ana dallar ve yan dallar, sürgün, yaprak, tomurcuk ve meyvelerinde zararlanmalar ve verim kaybı olmaktadır.

Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında görülen ve ülkemizde de armut yetiştiriciliğinde karşılaşılan en önemli hastalıklar; bakteriyel ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et al.), bakteriyel acı benek (*Pseudomonas syringae* pv. *papulans* (Rose) Dhanvantari), bakteriyel tomurcuk yanıklığı ve kabuk kavlaması (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall.), kök kanseri (*Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith & Townsend) Conn), saçak kök (*Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al.)), bakteriyel dal yanıklığı (*Erwinia stewarti*), kara leke (*Venturia inaequalis*), monilya (*Sclerotinia fructigena*), nectria kanserleri (*Nectria galligena*), beyaz kök çürüklüğü (*Rosellinia necatrix*)'dır (Jones and Aldwince, 1991; Hepaksoy ve ark., 1998; Kotan, 2002; Günen ve Mısırlı, 2003).

Dünyada elma üretiminde ülkemizin 3. sırada yer alması ve elmanın ülkemizde en çok üretilen meyve olması hastalık ve zararlılardan korunma bakımından ayrı bir özenin gösterilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu bağlamda ateş yanıklığı hastalığı, yumuşak çekirdekli meyvelerde görülen en tehlikeli bakteriyel hastalıklardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalığın ekonomik önemi çok yüksektir. *E.amylovora*, özellikle duyarlı çeşitlerin kullanıldığı alanlarda, meyve plantasyonlarını ve sonuçta meyve üretim miktarını önemli derecede etkilemektedir. Hastalığın kısa süre içerisinde tüm Türkiye genelinde yayılması ve etkilediği meyve plantasyonlarını yangın yerine çevirmesi, onun epidemik karakterini ve önemini daha iyi açıklamaktadır. Eğer etkili ve kalıcı önlemler alınmazsa, yumuşak çekirdekli meyve ve fidan üretimimizde önemli düşüşler olabilecektir. Bu nedenle ateş yanıklığı hastalığı, hem meyveciliğimiz hem de ülke ekonomimiz açısından acilen ele alınması gereken çok önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır (Hacıoğlu, 1993).

Iğdır ilinde, ekonomi büyük ölçüde tarıma dayalıdır. Aras Nehri'nin suladığı ova, Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki en önemli bitkisel üretim alanlarından birisidir. Iğdır, bahçeden bahçeye geçiş yapan evleri ile ünlüdür ve bu bahçelerde kayısı ve elma ağaçları bulunmaktadır. Ovadaki toplam meyve bahçesi arazisinde ilk sırada kayısı, ikinci sırada elma yetiştiriciliği yapılmaktadır. Gerek tarafımızdan yapılan survey

çalışmaları sonucunda gerekse elma yetiştiriciliği yapan çiftçilerin getirdiği örneklerden oldukça fazla *E.amylovora* ile enfekteli ağaç tespit edilmiştir. Simptomatolojik olarak gözlemediğimiz bu hastalık etmeninin çeşitli yöntemlerle tanınması mücadele yöntemlerinin belirlenmesi için gereklidir. Bu nedenle bu çalışma ile Iğdır ilinde yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında görülen ve çok ciddi verim kayıplarına yol açan *E.amylovora* strainlerinin klasik ve moleküler yöntemle tanısının yapılması ve buna bağlı olarak hastalıkla kontrol stratejilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

## **1.2. Ateş Yanıklığı Hastalığı (*Erwinia amylovora*)**

Elma, armut ve diğer Rosaceae familyasını etkileyen en tahripkar hastalıklardan biri olan ateş yanıklığı dünyada ilk olarak 1780 yılında New York'da Hudson vadisinde tespit edilmiş ve buradan da dünyadaki 3 bölgeye taşınmıştır. 1993 yılına kadar 31 ülkede ortaya çıkmıştır (Van der Zwet, 1992; Öztürk ve ark., 2004 ). Türkiye'de ise ilk olarak Öktem ve Benlioğlu tarafından 1985 yılında Sultandağı/Afyon'da bir armut bahçesinde hastalık tespit edilmiştir (Hacıoğlu, 1993; Günen ve Mısırlı, 2003; Baştaş ve Saygılı, 2008; Yılmaz ve Aysan, 2009; Çetin, 2014).

Hastalığın kısa bir sürede, çok önemli ekonomik kayıplara neden olması, elverişli şartlarda, hastalığın bitkideki ilerleyişinin çok hızlı olmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin, ABD' de Kings Conty' de sayısı 43.700 olan armut ağacının tamamı iki yılda ölmüş, San Joaquin vadisindeki armut ağaçlarının ise % 95' i ateş yanıklığı zararı nedeni ile sökülmüş ve bölgede bir daha armut yetiştiriciliği yapılmamıştır. 1927-1928' de Yeni Zelanda' da elmalardaki şiddetli sürgün enfeksiyonu sonucu kayıp % 100 olarak tespit edilmiştir. ABD'de 1936'da toplam armut üretimi % 14 oranında azalmıştır. 1958-1969 yıllarında İngiltere'deki toplam kayıplar; 20.000 armut, 20.000 *Crataegus*, 15.000 *Cotoneaster* ve 2000 *Pyracantha* olarak belirlenmiştir. 1963' de Kaliforniya'da ateş yanıklığı zararı armutta % 14, elmada % 5 kaydedilmiş ve armutlardaki kaybın 20 milyon dolar olduğu ifade edilmiştir. 1975' de Hollanda'da 2.000.000' dan fazla *Cotoneaster*, 13.000 *Pyracantha*, 8.700 *Stranvaesia* ve 4.500 *Sorbus* tahrip olmuştur. 1976 yılında ise Kaliforniya' da, sadece armutlarda, 47 milyon dolarlık kayıp olduğu bildirilmiştir (Van der Zwet and Keil, 1979; Van der Zwet and Beer, 1991; Baştaş ve Saygılı, 2008).

Hastalığa ateş yanıklığı denilmesinin sebebi, patojen bakterinin enfeksiyonundan sonra ağacın yangından çıkmış gibi bir görünüm almasındandır (Çınar, 1988). Hastalık literatürde çiçek yanıklığı, meyve yanıklığı, dal yanıklığı, elma yanıklığı ve armut yanıklığı olarak da isimlendirilmektedir (Karaca, 1977).

### **1.2.1. Hastalık etmeni**

Ateş yanıklığı hastalığı dünyada yaklaşık iki asırlık geçmişi olan bir hastalıktır. 18. yüzyılında ateş yanıklığının nedeni olarak böcek ve fungus olmak üzere iki teori gelişmiş ancak 1882'de Burrill tarafından patojenin ilk bakteriyel tanımlanması yapılarak *Micrococcus amylovorus* olarak isimlendirilmiştir. Etmene en son 1920'de Winslow ve arkadaşları tarafından *Erwinia* cinsi içinde yer verilerek *E.amylovora* ismi verilmiştir ( Van der Zwet and Keil, 1979).

*E.amylovora*'nın taksonomik pozisyonu aşağıda verilmiştir (Anonim, 2014b).

**Alem:** Bacteria

**Bölüm:** Proteobacteria

**Sınıf:** Gammaproteobacteria

**Familya:** Enterobacteriaceae

**Takım:** Enterobacteriales

**Cins:** *Erwinia*

**Tür:** *E. amylovora*

Ateş yanıklığı hastalığı etmeni *Enterobacteriaceae* familyasında *Erwinia* cinsi içinde yer alan, gram negatif, fakültatif anaerob, 3.0 nm uzunluğunda, 0.5-1.0 nm çapında, kısa çubuk şekilli ve peritrik kamçılı bir bakteridir. İn vitro'da optimum 21-28°C arasında gelişen bakterinin, termal ölüm noktası 45-50°C'dir. Optimum pH gelişimi 6.0-7.5'dir (Schroth and Hilderbran, 1980).

Etmene amylovorin adı verilen toksini sentezlemektedir (Schroth and Hilderbran, 1980; Agrios 1997; Aldwinckle and Jones, 1990; Kado, 2010). Patojen konukçu



bitkilerde sentezleyebildiği amylovorini yapay besiyerinde sentezleyememektedir. *E.amylovora* yapay besiyerinde +4°C’ de uzun süre canlılığını korurken doğal koşullarda 90 gün sonunda canlılığını yitirmektedir. Patojen sürgün, meyve, ağaç kabuğu gibi çeşitli bitki dokularında damlacıklar halinde ‘ooze’ adı verilen bakteriyel akıntılar ve ‘strand’ adı verilen bakteriyel iplikçikler oluşturmaktadır. Ooze içindeki bakteriler genellikle virulent olup 2 yıl veya daha uzun bir süre patojenitelerini sürdürmektedir (Van der Zwet and Keil, 1979; Tokgönül, 1991).

*E.amylovora*, sakkaroz içeren besiyerlerinde mukoid koloniler oluşturan, birçok şeker, organik asit ve şeker alkoloidlerini karbon kaynağı olarak kullanabilen ama, büyüme faktörü olarak nitrojen ve nikotinic asidin amino kaynaklarına ihtiyaç duyan bir bakteridir (Agrios, 1997).

### **1.2.2. Hastalığın belirtileri**

Hastalık etmeni yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının çiçek, yaprak, dal ve meyvelerinde önemli belirtiler oluşturmaktadır. Bahar başlarında ılık nemli havalar esnasında, ilk belirtiler genellikle çiçeklerde görülmektedir (Fahy and Persley, 1983). Çiçekler önce sulanmış gibi bir görünüm almakta sonra hızla pörsüyerek, önce kahverengi sonra siyah renge dönüşmekte ve genellikle ağaçta asılı kalmaktadır (Baştaş ve Saygılı, 2008). Çiçekte görülen belirtiler yakın dallardaki yapraklara sıçramaktadır. Yapraklarda ana damar boyunca ve yaprak kenarlarında kahverengi-siyah lekeler oluşmaktadır. Siyahlaşma ilerlerken, yapraklar kıvrılmakta, aşağı doğru asılı kalmaktadır (Maden, 1989). Bu yapraklar yazın koyu yeşil yapraklı sıhhatli sürgünlerde, zıt bir görünüm oluşturmaktadır (Baştaş ve Saygılı, 2008).

Hastalıktan etkilenen sürgünler uçtan geriye doğru solmaktadır. Bu sürgünlerin kabuğu kahverengi-siyaha dönmekte sonra çökerek sertleşmektedir. Yanık sürgünlerde en karakteristik simptom, sürgün uçlarının çobandeğneği ya da kanca gibi bir forma dönüşmesidir. Simptomlar meyve mahmuzları ve uç dallardan aşağı doğru ilerlemekte ve yan dallara geçerek yanıklıklar oluşturmaktadır (Van der Zwet and Keil, 1979; Baştaş ve Saygılı, 2008).

Meyve enfeksiyonları ise genellikle sapdan olmaktadır. Küçük olmayan meyveler sulu bir hal almakta, sonra kahverengine dönerek mumyalaşmakta ve sonunda

kararmaktadır. Ölü meyveler enfeksiyondan bir kaç ay sonra dahi ağaca asılı kalmaktadır (Maden, 1989; Fahy and Persley, 1983). Nemli koşullar altında, meyve üzerinde süt rengi yapışkan akıntı görülmektedir. Akıntı rengi hava ile temas eder etmez kahverengileşmektedir. Bakteriyel akıntıyı oluşturan damlalar birleşip daha büyük damlaları oluşturmakta ve akarak bitki yüzeyine yayılmaktadır. Sonunda köke kadar yayılan bakteriler tüm ağacın kurumasına yol açmaktadır (Baştaş ve Saygılı, 2008). Ateş yanıklığında kuruyan taze yapraklar ve küçük meyveler sert çekirdekli meyvelerde görülen Monilya hastalığını andırmaktadır (Karaca, 1977). Gövde, kök boğazı ve köklerde meydana gelen bu enfeksiyon, ağaçların kısa sürede ölümüne yol açmakta ve ticari meyve bahçelerinde, önemli ölçüde kayıplara neden olmaktadır (Van Der Zwet and Beer, 1991; Evrenosoğlu ve ark., 2014).

Hastalığın kısa sürede çok hızlı yayılmasının ve ciddi zararlar oluşturmasının nedeni patojenin yaşam döngüsü ve epidemiyolojisi ile ilgilidir. Bakteri bir önceki mevsim sırasında oluşan yanıklıkların kenarlarında, diğer konukçulardaki yanıklıklarda, tomurcuklarda ve belirgin şekilde sağlam görülen odun dokularında kışlamaktadır. Çoğunlukla büyük dallarda canlılığını sürdürür ve 1 cm çaptan daha küçük filizlerde nadiren kışlayabilir. Patojen ilkbaharda, canlı kaldığı bu yanıklıklarda aktif hale gelir, çoğalır ve bitişik sağlam kabuğa yayılır. Nemli veya ıslak havalarda bu bakteriyel kümelerin bir kısmı lentiseller ve doku üzerindeki yarıklardan dışarı çıkar. Bakteriyel akıntı veya salgı olarak adlandırılan bu öz suyu, milyonlarca bakteri ve bakteriyel yan ürünlerden meydana gelmektedir. Arı, sinek, karınca gibi değişik böcekler bu tatlı ve yapışkan akıntı tarafından cezbedilir ve bu vektörler aracılığıyla etmen yayılır. Bazı durumlarda patojen yanıklıklardaki akıntıdan sıçratıcı yağmur damlaları ile de taşınabilir. Akıntılar kuruduğu zaman bakteriyel strand adı verilen havai iplikçiler oluşturur, bunlar da rüzgarla taşınarak bir inokulum görevi üstlenirler (Van der Zwet and Keil, 1979; Baştaş ve Saygılı, 2008).

Hastalık etmeni nektarda hızlı bir şekilde çoğalır, nektartodlara ulaşır ve çiçek dokuları içine penetrasyon yapar. Enfeksiyonlu bir çiçeği ziyaret eden arılar nektardaki patojeni sonra ziyaret ettiği tüm çiçeklere taşırlar. Bir defa çiçeğe giren bakteri hızla çoğalır. Salgıladığı maddelerle orta lamelin ve hücre duvarının bazı yapı maddelerini parçalar. Etmen esas olarak hücreler arası boşluklarda olmak üzere, aynı zamanda

parçalanmış orta lamelden de içeri doğru hareket eder. Patojen çiçeklerden aşağı doğru çiçek sapına oradan da meyve mahmuzunun kabuğu içine doğru ilerler. Mahmuzun enfeksiyonu onun üzerindeki tüm çiçeklerin, yaprakların ve meyvelerin ölümüne neden olur (Van der Zwet and Keil, 1979).

Yapraklardaki stoma ve hidatodlar patojene giriş kapısı olarak yardımcı olmasına rağmen yaprak enfeksiyonlarının çoğu böcek, dolu gibi nedenlerle açılan yaralardan olmaktadır. Etmen palisad parankimasından çok süngerimsi mezofilde daha iyi ve daha hızlı gelişmekte, damar parankimasından petiole geçmekte ve petiol yoluyla gövdeye ulaşabilmektedir (Baştas ve Saygılı, 2008).

Taze filizler ve filizlerdeki lentiseller, değişik etkenlerce açılan yaralar ve böcekler yoluyla enfekte edilebilir. Aynı zamanda çiçek ve yaprak enfeksiyonları yoluyla da, filizler enfekte edilebilirler. Filizler içinde bakteriler hücreler arasında yaşarlar ve kısa zamanda kortikal hücrelerde çökme ve parçalanmaya sebep olurlar. Genç filizlerde bakteriler floeme ulaşabilirler ve buradan yukarı doğru filiz ucuna ve yapraklara taşınırlar. Enfeksiyonun ilerlemesi, dokunun sulu oluşuna, sıcaklık ve rutubete bağlıdır (Baştas ve Saygılı, 2008).

Hastalığın yayılmasında, genel olarak böcekler en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda 77 böcek cinsinin patojeni yayabildiği saptanmıştır. Bunlardan bazıları: *Aphis pomi* (Elma afidi), *Aphis mellifera* (Balarısı), *Bombus terrestris* (Yaban arısı), *Byrobia rubrioculus*, *Drosophila* spp. (Sirkesineği), *Edwardsiana rosae*, *Eriosoma lanigerum* (Elma pamuklu biti), *Formica* spp. (Karıncalar), *Haplocampa testudinea* (Avrupa elma testereli arısı), *Lygus pratensis*, *Musca domestica* (Karasinek), *Panonychus ulmi* (Avrupa kırmızı akar), *Pegomya* spp., *Psylla pyricola* (Armut pisillası), *Scolytus* spp. (Yazıcı böcekler), *Tetranychus* spp. (Kırmızı örümcek), *Vespula* spp. (Eşek arısı)'dır (Van der Zwet and Keil, 1979; Thomson, 2000; Baştas ve Saygılı, 2008).

Yağmur, patojenin yayılmasında önemli bir faktördür. Bakteriler ağacın üst kısımlarından yağmur damlaları ile alt kısımlarına yayılmaktadır. Yağmurun dolaylı bir etkisi de çiçeklerdeki nektarla ilişkilidir. Kuru hava şartlarında çiçekler içindeki nektar, bakteri gelişimi için çok fazla konsantredir. Ancak yağmurun etkisiyle konsantre

haldeki nektar seyreltik hale gelerek bakterinin çoğalmasını ve enfeksiyonunu kolaylaştırmaktadır. Rüzgarla yayılmada bakteri genellikle sis tanecikleri veya yağmur damlalarıyla taşınmaktadır. *E.amylovora*'nın ürettiği bakteriyel iplikçiklerin rüzgarın etkisiyle çok uzaklara kadar ulaşip yağmur damlalarıyla konukçusuna bulaştığı saptanmıştır (Van der Zwet and Keil, 1979; Baştaş ve Saygılı, 2008).

Ateş yanıklığı hastalığının yayılımında kuşların rolü olduğu ve *Sturnus vulgaris* (sığırcık), *Phylloscopus trochilus* (bülbul) gibi göçmen kuşların bakteriyi ülkeler arasında taşıdıkları düşünülmektedir (Van der Zwet and Keil, 1979). Türkiye'de ateş yanıklığının ilk görüldüğü Afyon Sultandağı ilçesinin yakınlarında bulunan göllerinde güneyden gelen göçmen kuşların barınma ve dinlenme yeri olduğu belirlenmiş ve özellikle Mısır ve Kıbrıs'tan gelen göçmen kuşların hastalığı ilk kez bu bölgeden ülkemize bulaştırdıkları kanısına varılmıştır (Öktem ve Benlioğlu, 1988; Baştaş ve Saygılı, 2008).

Ateş yanıklığı insanlar, bahçe aletleri, meyve ya da aşı gözüyle de yayılabilir. Budama makasları ve testereler, hastalıklı dallar ve gövdenin budanmasından sonra dezenfekte edilmezlerse, bakterinin kolayca diğer dallara ve ağaçlara bulaşmasına neden olabilirler. İnokulumla temas eden eller, elbiseler, ayakkabılar ve hatta bahçe aletlerinin tekerlekleri de yayılmada rol oynayabilir (Van der Zwet and Keil, 1979; Baştaş ve Saygılı, 2008).

Hastalık gelişimini etkileyen diğer faktörler ise konukçular, meteorolojik faktörler ve toprak faktörleridir. Elma ve armut ağaçlarının değişik organları duyarlılık açısından değişik reaksiyonlar gösterebilmektedir. Konukçu bitkilerin taze sürgünleri içerdiği karbonhidrat seviyesinin düşük olması nedeniyle hastalığın çıkışı süresince genellikle çok duyarlıdır. Kalın ve koyu yeşil yapraklı ağaçların sürgünlerinde ise daha fazla karbonhidrat olduğu ve ateş yanıklığı hastalığına daha dayanıklı olduğu bildirilmektedir. Yaşlı yaprakların pH değerlerinin yüksek olması nedeniyle genç yapraklara göre hastalığa daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Oransal nem, hastalık çıkışında ve şiddetinde etkilidir. Atmosfer neminin yüksek olduğu anda hücreler arası neminde yüksek olduğu saptanmış ve ateş yanıklığı hastalığına karşı armut ve elmaların çok duyarlı hale geldiği belirlenmiştir. Hücreler arası nem % 97-98.5 olduğunda bitkiler

patojene az duyarlı veya dayanıklı, % 99.5 olduğunda ise çok duyarlı olmaktadır. Elma ağaçlarında yapılan bir çalışmada, % 50 oransal nemde yetişen ağaçların, % 80 ve % 90 oransal nemde yetişenlerden daha dayanıklı olduğu saptanmıştır. Ayrıca yüksek oransal nem, nektardaki şeker konsantrasyonunu düşürerek bakterinin girişine olanak sağlar. Ateş yanıklığı enfeksiyonunun gelişimi için gerekli sıcaklıklar minimum 18.5°C, optimum 21-27°C ve maximum 32-35°C olarak kabul edilmektedir. Mekanik yaralar oluşturması nedeniyle dolu, hastalık çıkışında etkili olabilmektedir. Genel olarak ateş yanıklığı hastalığı, zengin topraklarda bulunan ağaçlarda, fakir topraklarda bulunan ağaçlardan, daha fazla görülmektedir. Özellikle gübrelenen zengin topraklardaki ağaçların dalları daha körpe olmakta bu da hastalığa karşı duyarlılığı arttırmaktadır. Hastalık gelişiminde önemli olan bir diğer etken de toprak nemi ve sıcaklığıdır. Toprak neminin düşük olduğu yerlerdeki elma sürgünlerinde daha az yanıklık görüldüğü bildirilmiştir. 12°C ve 32°C' lik toprak sıcaklıkları ateş yanıklığı gelişimi için daha az uygundur. Etmen şu ana kadar topraktan izole edilememiştir. Ancak laboratuvar koşullarında sterilize toprakta 54 gün, steril olmayan toprakta ise 38 gün yaşayabildiği saptanmıştır. Ayrıca fidanlık toprağında 8 ay canlı kalabildiği gözlenmiştir (Van der Zwet and Keil, 1979; Baştaş ve Saygılı, 2008).

### 1.2.3. Mücadele

Hastalıklar bitkisel ürünlerin verim ve kaliteleri üzerinde büyük kayıplara neden olmakta ve bu kayıplar depolama süresince devam etmektedir (Çıtır ve Özer, 1997; Döken ve ark., 2000). Zamanın öngördüğü tarımsal metodlarla daha fazla ürün elde etme çabası gösterilirken, hastalık ve zararlılardan oluşan kayıpların da daha düşük seviyede tutulması amaçlanmaktadır (Toros ve Maden, 1991). Bitki hastalıklarının oluşturduğu kayıplar bitki, ürün, patojen, bölge, çevre ve kontrol yöntemlerine bağlı olarak değişiklik göstermekte ve uygulanan kontrol yöntemleri kültürel, kimyasal ve biyolojik mücadele ve dayanıklı bitki kullanımı olmak üzere 4 kısımda toplanmaktadır (Bora ve Özaktan, 1998; Döken ve ark., 2000).

Bakteriyel patojen *E.amylovora*, sadece o yılın ürününü etkilemekle kalmayıp, ağaçlarda sürgün, ana dal ve gövdeyi de hastalandırarak gelecek yıllardaki ürüne de etki edip ağacı kurutabilmektedir. Ateş Yanıklığı hastalığı tüm dünyada karantinaya tabi

olup, mücadelesi pahalı ve insan sağlığına zararlıdır. Bu nedenle, dayanıklı çeşit, ana ve ara anaçların kullanımı, hastalığın kontrolünde birinci derecede önem kazanmaktadır.

### **1.2.3.1. Kültürel mücadele**

Bitki yetiştirilen bölgelere patojenlerin girişini engellemek veya inokulum miktarını ya da hastalık şiddetini ekonomik zarar eşiğinin altına düşürmek için alınan tedbirlerin tamamı kültürel mücadele olarak tanımlanmaktadır. Kültürel mücadele, bitkilerin hastalık etmenleri için uygun olmayan, fakat kendileri için en sağlıklı olan ortamda yetiştirilmesi amacıyla alınan önlemleri içermektedir. Bitkilerin sağlıklı olarak yetiştirilmesi için iklim ve toprak yönünden alınması gereken tedbirler, rotasyon, bitkilerin vejetasyon döneminin ayarlanması, patojenden arı üretim materyali kullanımı, hastalık etmenlerinin yayılmasını önleyici uygulamalar (sanitasyon ve eradikasyon) bu mücadele programı içerisinde yer almaktadır (Dken ve ark., 2000). Budama makasları, bakterinin yayılışını önlemek amacıyla, her kesimden sonra dezenfektan bir maddeye batırılmalıdır. Yaygın olarak evlerde kullanılan sodyum hipoklorid budama aletleriyle bulaşmayı önlemede başarıyla kullanılmaktadır. Budama makasları, sodyum hipoklorid %10'luk solüsyonuna 2 sn kadar batırıldığında bakteri ölmektedir. Tek başına budama uygulamasının % 67.42 oranında etkili olduğu (Tokgönül ve Başpınar, 1995) dikkate alındığında, hastalıklı iek demetleri ve sürgünlerin gözle görülür lezyonlarını 15-30 cm aşağıdan kesmek, inokulum kaynağını ve sekonder enfeksiyonları önlemektedir.

### **1.2.3.2. Kimyasal mücadele**

Kimyasal mücadele koruyucu, eradikant veya sistemik etkili pestisitlerin üretim materyali, yaprak gibi bitki kısımlarına ya da toprak ve depoya uygulanmasıyla patojenlerin çoğalmasını inhibe eden veya onları öldüren, inokulum kaynaklarının yok edilmesini hedefleyen tekniklerden oluşmaktadır. Bakteriyel hastalıkların kontrolünde antibiyotik ve bakırlı kimyasal formülasyonların kullanılması yoluna gidilmiş, ancak kimyasal mücadelenin fitopatojen bakterilere karşı çok başarılı olmadığı tespit edilmiştir (Atthowe et al., 1992). Kimyasal mücadele kullanımının kolay ve etkisinin kısa sürede görülmesi nedeniyle üretici tarafından kolaylıkla kabul edilmiş ve yaygın olarak kullanılmıştır (Sigee, 1993; şahin and Miller, 1996). Bunun sonucunda tarımsal savaşta kimyasalların kullanımı oldukça artmış ve bu durum mikroorganizmalarda

dayanıklı ırkların gelişimi, bilinçsiz kullanım sonucunda ortaya çıkan ekonomik kayıplar, insanlarda akut ve kronik zehirlenmeler, çevre kirliliği, mikrobiyal flora içerisindeki interaksiyonların negatif etkilenmesi ve doğal dengenin bozulması gibi birçok olumsuz etkiyi de beraberinde getirmiştir (Bora ve Özaktan, 1998; Singh et al., 1998). Fosetyl-Al, flumequin, oxolinic asit ve CGA 73089, *E.amylovora* mücadelesinde önemli ölçüde başarılar elde edilen kimyasallar olurken (Vanneste, 2000), bakır oksiklorür ve maneb karışımının özellikle çiçek enfeksiyonları için memnun edici sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Momol and Yeğen, 1993).

### **1.2.3.3. Biyolojik mücadele**

Son yıllarda dezavantajları iyice anlaşılan kimyasal mücadele yerine alternatif yöntemler aranmış ve daha çok biyolojik mücadele çalışmalarına ağırlık verilmiştir (Singh et al., 1998). Biyolojik mücadele; doğal veya genetik yapısı değiştirilmiş mikroorganizmalar veya onların ürettikleri metabolitler kullanılarak istenmeyen zararlı mikroorganizmaların etkisini azaltmayı, faydalı böcek veya mikroorganizmaların etkinliğini arttırmayı hedefleyen mücadele yöntemidir (Baker and Cook, 1974, Chet et al., 1993).

Biyolojik mücadele ile ilgili çalışmalar 1965 yılında başlamış ve hızla gelişmiştir. Birçok ülkede kültür bitkisindeki hastalık ve zararlılara karşı etkili olan mikroorganizmalar veya bunların ürünleri ticari olarak üretilmiş ve biyopreparat olarak kullanıma hazır duruma getirilmiştir. Patojene karşı daha spesifik etkiye sahip olması ve bir bütün olarak çevreye etkisinin çok daha sınırlı oluşu bu kontrol metodunun zirai mücadelede kullanılma potansiyelini arttırmıştır (Sigeo, 1993).

Bitki hastalıkları ile mücadelede, biyolojik savaşın başarıya ulaşabilmesi için biyokontrol organizmalar ile çevresindeki mikrobiyal flora arasındaki etkileşimlerin iyi bilinmesi gereklidir. Bu etkileşimlerin temelinde ise antibiyosis, rekabet, hiperparazitizm ve teşvik edilmiş sistemik dayanıklılık (SAR) olmak üzere 4 biyolojik savaş mekanizması yer almaktadır (Özaktan, 1990; Bora ve Özaktan, 1998). Bitki hastalıklarıyla mücadelede bu mekanizmaların kullanılmasına yönelik birçok çalışma mevcuttur (Erkan, 1983; Colin, 1988; Fravel, 1988; Podile et al., 1988; Howell and Stipanovic, 1993; Ryals et al., 1994; Hoitink and Fahy, 1986; Milner et al., 1996).

*E.amylovora*'nın biyolojik mücadelesi için yapılan denemeler sonucunda özellikle *Pantoea agglomerans* (syn, *Erwinia herbicola*) ve *Pseudomonas fluorescens* isimli bakteriyel etmenler diğerlerine oranla daha başarılı bulunmuştur. Bazı araştırmacı, *Pantoea agglomerans*'ın ABD ve Fransa'daki elma bahçelerindeki ateş yanıklığının kontrolünde streptomisin kadar iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Alay, 1997).

#### **1.2.3.4. Hastalıklara dayanıklı bitki kullanımı**

Hastalıklara dayanıklı bitki kullanımı uzun vadede en etkili, en ekonomik ve sağlıklı mücadele stratejisidir (Schuster and Smith, 1983; Silva et al., 1989; Zaiter et al., 1989; Arnaud-Santana et al., 1993,1994; Opio et al., 1996; Park et al., 1998). Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki yeni gelişmeler ile bitkilerde hastalık, zararlı ve kötü çevre koşullarına karşı saptanan dayanıklılık genlerinin kolayca ve kısa zamanda çok sayıda kültür bitkisine aktarılma imkanı veren bir teknoloji geliştirilmiştir (transgenik bitki üretimi). Bu nedenle, zirai mücadele çalışmalarında da bakteriyel patojenlere karşı dayanıklılık geni bulunduran kültür veya yabancı bitki türlerinin belirlenmesi üzerine yapılan araştırmalar artmıştır (Schuster and Smith, 1983; Silva et al., 1989; Zaiter et al., 1989; Arnaud-Santana et al., 1993,1994; Steadman, 1994; Mabagala, 1997; Mohan et al., 1998; Park et al., 1998). Dayanıklılık çalışmaları bitki genotiplerinde var olan ve bir veya birden fazla gen tarafından kontrol edilen dayanıklılığın tespit edilmesi, bu dayanıklılığı veren genlerin klonlanması ve agronomik özellikleri çok iyi olan bitkilere klonlanan genlerin transferini içermektedir (Agrios, 1997). Ülkemizde genelde yaygın olan armut çeşitleri hastalığa karşı duyarlıdır. Elmalardan en çok duyarlı olanlar Jonathan, Rhode Island Greening, Yellow Transparent, Idared, Rome Beauty, klon anaçlarından ise; M9, M26 ve M27' dir. Yapay inokulasyon denemelerinde Türkiye'de üretimi yapılan elma çeşitlerinin *E. amylovora* 'ya karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalarda testlenen 15 elma çeşidi içinde en duyarlı çeşidin "Spur Golden" çeşidi olduğu ortaya konmuştur. Testlenen 22 armut çeşidinin ise etmene farklı düzeylerde reaksiyon gösterdiği ancak "Abbefetel" armut çeşidinin en duyarlı çeşit olduğu saptanmıştır (Demir ve Gündoğdu, 1991).



### **1.3. Bitki Patojeni Bakterilerin Tanısı**

Dünya nüfusuna yetecek gıda maddelerinin üretimi, kültür bitkilerinin ekim alanlarının genişletilmesi ve birim alandan alınacak verim miktarını artırıcı uygulamalarla gerçekleştirilebilir. Bu uygulamalar içerisinde en önemlilerinden birisi modern bitki koruma yöntemlerinin kullanılmasıdır. Bunun sonucunda uygun olmayan çevre koşullarının, hastalık, zararlı ve yabancı otların oluşturacağı kayıplar en az düzeye indirilebilecektir (Döken ve ark., 2000; Dönmez, 2004). Bitkilerde verim ve kalitede düşümlere neden olan etmenlere karşı kontrol stratejilerini ortaya koyabilmek ise herşeyden önce bu etmenlerin tanılanmasına bağılıdır. Patojenlerin tanılanmasının doğru olarak yapılması, patojen populasyonları içerisindeki varyasyonların tespit edilmesi, patojenlerin inokulum kaynaklarının saptanması, yayılma şekli ve yollarının belirlenmesi ve bunlara bağılı olarak da mücadele stratejilerinin oluşturulması için mikrobiyal tanı yöntemlerinin kullanılması gereklidir. Mikroorganizmaların tanısında klasik ve/veya moleküler yöntemler kullanılmaktadır (Dönmez, 2004).

#### **1.3.1. Klasik yöntemler**

Mikroorganizmaların tanısı, modern moleküler biyoloji tekniklerinin gündeme gelişine kadar klasik metotlara göre yapılmıştır. Bu yöntemler ile mikroorganizmaların tanısında onların morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve patolojik karakterlerinden faydalanılmıştır. Ancak bu testler ile az sayıdaki fenotipik özellik tespit edilmekte, bu da mikroorganizmalar arasındaki farklılıkları ortaya koymada ve özellikle tür ve tür altı taksonomik grupları belirlemede yetersiz kalmaktadır (Chase et al., 1992). Klasik tanı yöntemleri genellikle birbirlerinden bağımsız olarak kullanılamamakta ve her birisi kendisinden başka alternatif sistemlere ihtiyaç duymaktadır. Uzun süreli deneylere, fazla iş gücüne, yetişmiş araştırmacılara ihtiyaç oluşturması ve alınan sonuçların farklı yorumlara açık oluşu klasik testlerin dezavantajları arasındadır (Miller and Joaquim, 1993). Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki ilerlemeler, yeni mikrobiyal tanı tekniklerinin geliştirilmesini hızlandırmış, buna bağılı olarak da moleküler yöntemler geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur.

### 1.3.2. Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemler, mikroorganizmaları meydana getiren makromoleküllerin içeriklerine, çeşitliliklerine ve oranlarına bağlı olarak elde edilen farklılıklardan hareket edilerek oluşturulmuştur. Moleküler yöntemler karbonhidratları, lipidleri, proteinleri ve genetik materyalleri (DNA ve RNA) çalışma materyali olarak kabul etmekte ve bunlardan birinin veya kombinasyonlarının kullanımı ile mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonunun yapılmasını sağlamaktadır (Manceau and Horvais, 1997). Metabolik enzim profillerinin belirlenmesi (Biolog), yağ asit analizleri (Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi), serolojik teknikler (Aglütinasyon, Immunofluorescence, Dot Immunobinding Assay, Immunoblot, Radioimmunoassay, Enzim-Linked Immunosorbent Assay), gen amplifikasyonu ve genetik profiller (Randomly Amplified Polimorphic Detection = RAPD, Restriction Fragment Length Polymorphism = RFLP, Repetitive Extragenic Palindromic = Rep-PCR, Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus = Eric-PCR, rDNA-PCR, Box -PCR, Spesifik PCR) gibi elektroforetik yöntemler son yıllarda sık olarak kullanılan moleküler metotlar olmuştur. Bu yöntemlerin her birisi tek başına, alternatifsiz olarak kullanılabilen, kısa zamanda çok sayıda örnek tür altı seviyede tanılabilmektedir. Elde edilen sonuçlar oldukça hassas ve güvenilirdir. Sistemlerin pahalı oluşu ve çalışmaların yetişmiş elemanlarca yapılmasının gerekliliği moleküler yöntemlerin dezavantajını oluşturmaktadır. Biolog, Mikrobiyal İdentifikasyon, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Seroloji testleri son yıllarda yaygın olarak kullanılan moleküler tanı yöntemleri olarak bilinmektedir (Dönmez, 2004).

#### 1.3.2.1. Mikrobiyal identifikasyon sistem

Yağ asitleri, hidrokarbon [ $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ ] yapısında olan, tek veya dallanmış zincire sahip makromoleküllerdir. Mikroorganizmaların yağ asitleri çeşitliliği, karbon atomlarının sayısına, bu atomlar arasındaki çift bağ miktarına, çift bağın hangi karbon atomları arasında olduğuna ve karbonların hidrojen atomları tarafından doyurulup doyurulmamalarına bağlıdır (Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Yağ asidi profillerindeki farklılıklar ise dolaylı olarak mikroorganizmalar arasındaki genetik farklılığı ifade etmektedir (Şahin ve ark., 2000; Fang et al., 2001).

Yağ asidi profillerindeki farklılıklar genetiksel akrabalıkların dolaylı bir göstergesi olup; bu profiller kullanılarak bakterilerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar 40 yılı aşkın bir süredir yürütülmektedir (Miller and Berger, 1985; Stead, 1992; Paisley, 1995). Ancak, ilk defa 1980'li yıllarda MIDI firması tarafından ABD'de geliştirilerek hizmete sunulan bilgisayar kontrollü bir gaz kromatografi sistemi yardımı ile kültüre alınabilen her türlü mikroorganizmanın tanısında kullanılabilen Mikrobiyal Tanı Sistemi (Microbial Identification System, MIDI Sherlock Delaware, USA) geliştirilmiştir.

Sistem mikroorganizmaların hücre yapılarında (sitoplazma ve membranda) fosfolipid, glikolipid veya lipopolisakkarit olarak bulunan yağ asitlerini, sayısına, çeşitliliğine ve % miktarlarına göre tanı sonucu vermektedir (Miller and Berger, 1985). Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIS), bilgisayar kontrolünde çalışmakta olup, gaz kromatografisi, bu kromatografiyi besleyen gaz tankları (hidrojen, azot ve hava), bilgisayar ünitesi, bilgisayar ünitesi ile uyumlu çalışan kütüphaneler ve yazıcı olmak üzere 5 kısımdan meydana gelmektedir (Lelliott and Stead, 1987). Anaerobik ve aerobik bakteriler, actinomycetes, maya ve gelişmiş funguslar bu sistem sayesinde kolaylıkla ve çok kısa sürede tanımlanabilmektedir (Miller and Berger, 1985).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.'ın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı armut, elma, ayva, hurma ve yenedünya gibi yumuşak çekirdekli meyve türlerinin en eski, en ciddi ve en tahripkar hastalığıdır. Türkiye'nin farklı bölgelerinde (Ege, Akdeniz, Doğu Anadolu, İç Anadolu, Orta Karadeniz ve Marmara) ve dünyada yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ateş yanıklığı hastalığını belirlemek amacıyla çeşitli çalışmalar yürütülmüş *E.amylovora*'nın farklı oranlarda varlığı tespit edilmiştir (Öktem ve Benlioğlu, 1988; Çıtır 1989; Bereswill and ark., 1992; Demir ve Gündoğdu, 1992; Momol et al., 1992; Bereswill et al., 1995; Guilford et al., 1996; Lecomte et al., 1997; Zhang and Geider, 1997; Baştaş ve Katırcıoğlu, 1998; Benlioğlu ve Özakman, 1998; Crepel et al., 1998; Hepaksoy ve ark., 1998; Merighi et al., 1998; Taylor ve Hale, 1998; Yücel 1998; Llop et al., 2000; Merighi et al., 2000; Mirik 2000; Taylor ve ark., 2001; Basım ve ark., 2004; Barionovi et al., 2006; Hristova et al., 2006; Saygılı ve ark., 2006; Stöger et al., 2006; Bellis et al., 2007; Pırc et al., 2008; Mohammadi et al., 2009; Pırc et al., 2009; Gottsberger, 2010; Voegele et al., 2010; Bozan, 2011; Çetin, 2014).

Tunalı (2013), 2011 yılında, Bursa ve Yalova illerinde Rosaceae familyasına ait farklı konukçulardan (elma, armut, ayva) ve bu konukçuların farklı çeşitlerinden bakteriyel izolasyonlar yapmıştır. Patojenin tanısında, NSA (nutrient sukroz agar), MS (Miller and Scroth), King B besiyerlerinde gelişim, hastalığın patojenisitesinin belirlenmesi için ham armut testi; biyokimyasal testlerden katalaz, oksidaz, KOH ile gram reaksiyon, jelatinin hidrolize, 36°C' de gelişim, indol üretimi, sistinden H<sub>2</sub>O oluşumu, oksidatif-fermentatif testlerini kullanmıştır. Çalışmada 406 adet bitki örneği toplamış, yapılan biyokimyasal ve patojenisite testleri sonucunda toplanan örneklerden 136 adet *Erwinia amylovora* izolatu elde etmiştir.

Ivanović et al (2011), Karadağ ve Sırbistan'da, 13 lokasyonda yetiştirilen 8 bitki türünden elde edilen 41 *E.amylovora* strainini tanılamak için yağ asit analizini çalışmışlardır. Bütün strainlerin amylovora grup için karakteristik olan 14:0 3OH yağ asitini ihtiva ettiğini tespit etmişlerdir. 39 straini yağ asit kompozisyonuna göre veri tabanında ilk seçenek olarak *E.amylovora* şeklinde tanımlamışlardır. Spesifik yağ asit kompozisyonundan dolayı 2 bakteri strainini ikinci seçenek olarak tanımlamışlardır.

Çalıştıkları yağ asit analizi Sırbistan'dan elde edilen *E.amylovora* popülasyonunun  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olarak belirtilen üç gruba ayrıldığını göstermiştir.

Atasağun (2009), 2006 ve 2007 yıllarında, Konya ilinde Rosaceae familyasına ait farklı konukçulardan ve bu konukçuların farklı çeşitlerinden bakteriyel izolasyonlar yapmıştır. *E.amylovora*'nın teşhisinde, 5 % NSA, King B besiyerlerinde gelişim, oksidatif/fermentatif test, 36°C' de gelişim, levan üretimi, sakkarozdan indirgenen bileşikler, asetoin üretimi, jelatinin sıvılaştırılması, nişasta, maltoz, inulin, gliserol ve mannitol, sorbitol 'den asit üretimi, ureaz aktivitesi, indol oluşumu, esculinin hidrolizi ve tütünde hipersensitif reaksiyon testlerini uygulamıştır. Patojenisite testlerinde, her izolat, elde edildiği konukçusunun fidanlarına ve ham armut meyvelerine 10<sup>8</sup> hücre/ml yoğunlukta bakteriyel süspansiyonun inokulasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 213 adet bitki örneği toplamış olup bunlardan 148 adet bakteri izole etmiştir. Yapılan biyokimyasal, moleküler ve patojenisite testleri sonucunda 84 adet teşhisi *E.amylovora* olarak tanımlanmıştır.

Konya'nın Ereğli ve Halkapınar ilçelerinde, M9 anacı üzerine aşılınmış olan Gala, Fuji, Summerret, Breaburn ve Granny Smith elma ağaçlarında *E.amylovora* adlı bakterinin neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı tespit edilmiş ve 2007 yılında bu hastalığın yörede elmalarda bir endemi yaptığı saptanmıştır (Yılmaz ve Aysan, 2009).

Casano et al (2008), *E.amylovora*'nın 20 strainini TSA'da 3 gün 27°C' de ve 3 strainini NA, KB, GYCA ve TSA'da 1, 3 ve 6 gün geliştirmişlerdir. Bu bakterilere ait total hücre yağ asitlerini gaz kromatografisi ile analiz etmişlerdir. Yağ asit kompozisyonunun besiyerinde geliştirilen hücrelerin fizyolojik dönemi ve kromatografi cihazının hassasiyetine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. TSA ve NA'da 3 E.a straininin doymuş tek karbonlu ve cyclic asitleri, KB ve GYCA üzerinde gelişenlerden daha yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir.

Kotan (2002), tarafından yapılan bir çalışmada da; *E.amylovora* tanı ve karakterizasyonunda bu sistemin güvenilir bir şekilde kullanılabilceği belirtilmiştir.

Ünlü (2002), Türkiye' de ilk defa ateş yanıklığı etmeni *E.amylovora*'nın moleküler açıdan detaylı olarak tanısını ve karakterizasyonunu yapmıştır. Armut, elma,

ayva, muşmula, yenedünya ve Rosaceae familyasına ait diğer bitki plantasyonlarının yoğun olduğu Türkiye' nin farklı coğrafik bölgelerinden tespit edilen illerdeki ve çevre ilçelerindeki bitkilerden ateş yanıklığı simptomu taşıyan bitki örneklerinden izolasyon yapmıştır. Çalışmasında yarı selektif besi ortamları olan MS (Miller and Scroth, 1972) ve NSA (Nutrient Sakkaroz Agar) ortamlarını kullanmış çizgi ekim yaptığı petripleri, 21°C' de 48 saat inkübasyona bırakılarak *E.amylovora*' ya özel koloniler elde etmiştir. Hastalık etmeninin tanısı ile ilgili olarak ham armut, tütünde hipersensitif reaksiyon ve sürgün inokulasyonları testlerini içeren patojenisite testlerini yapmıştır. Patojenisite testlerinden ham armut testinde ooze oluşumu, tütün yaprağında hipersensitif reaksiyon oluşumu ve taze armut bitkisi sürgünlerinde patojene özel yanıklık şeklinde hastalık belirtilerini saptamıştır. Patojenin biyokimyasal olarak tanılanmasında; katalaz testi, oksidaz testi, nitrattan nitrit üretimi testi, asetoin oluşumu testi, indol üretimi testi, hidrojen sülfid testi, nişastanın parçalanması testi, sakkarozdan indirgenen maddeler testi, sıcaklığa hassasiyet testi, % 5 NaCl' ye tolerans testi, pektinaz aktivitesi testi, King's B besi ortamının kullanımı, KOH testi ve jelatinin hidrolizi testlerini uygulamıştır.

Mirik (2000), Amasya ve Tokat illerinde yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında görülen ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et al.) hastalığının etmeninin tanılanması, yaygınlık durumu ve dayanıklı çeşitlerin saptanması amacıyla yapmıştır. Bölgede yetiştirilen yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ateş yanıklığı hastalığının karakteristik belirtilerini gözlemlemiş ve bu alanlardan örnekler alarak, laboratuvar koşullarında hastalık etmeninin izolasyonunu yapmıştır. Elde edilen patojen bakteri izolatlarının tanılama çalışmalarını yaparak bunlar içerisinde 14 *E.amylovora* türüne ait izolatın ayrımını yapmıştır.

Benlioğlu ve Özakman (1998), tarafından yapılan Ateş Yanıklığı hastalığı ile ilgili survey çalışmalarında hastalığın armut, ayva ve muşmula ağaçlarında şiddetli düzeyde olduğu, fakat elma ve yenedünyada düşük seviyede olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar tarafından surveyler boyunca Türkiye' nin yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan 27 değişik alanında yetişen hastalıklı elma, ayva, armut, muşmula ve yenedünya' dan *E.amylovora*' ya ait 56 patojenik ırk izole edilmiştir. Bu 56 Türkiye izolatının NSA' da ve selektif ortamlar (CCI, TTN ve MMS)' da koloni morfolojisi ve

bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiş, bakır ve streptomycine hassasiyetleri tespit edilmiştir.

Bobev et al (1998), tarafından, Bulgaristan' ın Plovdiv bölgesindeki ayva ağaçlarından elde edilen bitki materyallerinde *E.amylovora* patojeninin tespiti ve tanısı yapılmıştır. Aynı zamanda ortak bakteriyolojik metotlar olan morfolojik, kültürel ve fizyolojik testler de kullanılarak; armut, elma, muşmula ve ayva ağaçlarından elde edilen bitki materyallerinden izole ettikleri *E.amylovora'* nın karakterizasyonunu yapmışlardır.

Manulis et al (1998), tarafından, İsrail' de yetişen elma, armut, ayva ve yenedünyadan izole edilen 205 farklı *E.amylovora* straininin karakterizasyonu için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın yürütülmesinde bu farklı strainlerin farklı konukçular üzerindeki virülenslik derecesi incelenmiş, bunun yanında serolojik testler yapılmış ve moleküler karakterleri ortaya konmuştur.

Yahyağoğlu (1998), öncelikle Bursa ili Osmangazi, Yıldırım, Gürsu, İnegöl, İznik, Kestel, Orhangazi ve Yenişehir ilçelerindeki armut ve ayva bahçelerinde survey çalışması yapmıştır. Surveyleri 1996 yılı Mayıs-Eylül aylarında 65 armut ve 38 ayva bahçesinde gerçekleştirmiştir. Çalışma sonunda hastalığın *E.amylovora* (Burr.) Winslow et al. olduğu yaygınlık oranı armut ve ayvalarda ortalama olarak % 16.13 ve % 55.61 olduğu belirlenmiştir. Bu yaygınlığın ilçeler itibariyle dağılımı ise armut çeşitlerinde ortalama olarak Kestel, İnegöl, Yıldırım, Yenişehir, Osmangazi ve Yıldırım, Gürsu, Orhangazi ve İznik'te sırasıyla % 26.99, % 21.64, %20.31, % 16.62, % 12.20, % 10.63, % 7.17 ve % 2.78 olarak, ayva çeşitlerinde ise (İnegöl hariç) %69.72, %68.86, % 26.88, % 67.29, % 72.88, % 50.21 ve % 33.01 olarak belirlemiştir. Bahçelerdeki armut çeşitleri arasında da hastalığın yaygınlık oranının farklı olduğunu belirlemiş ve buna göre Santa Maria, Williams, Akçaarmut, Deveci ve Margaritte çeşitlerinde hastalığın yaygınlık oranı sırasıyla % 17.59, % 15.82, % 9.34, % 5.24 ve % 4.55 olarak tespit etmiştir. Hastalıklı bitki kısımlarından elde edilen 29 bakteri izolatu ile laboratuvar koşullarında yapılan tanılama çalışmaları sonucunda etmenin *E.amylovora* olduğunu saptamıştır.

Zwet and Wells (1993), Kıbrıs, Bulgaristan ve Yugoslavya' dan elde edilen *E.amylovora* izolatlarının kesin tanısında yağ asit analizinin başarılı bir şekilde kullanıldığını tespit etmişlerdir. *E.amylovora* için yağ asit profil kütüphanesi 143 bakteri strainine bağlı olarak oluşturulmuştur. Analiz için *E.amylovora* 3 strainini 4 farklı besiyerinde (GYCA, KB, NA ve TSA) 1, 3 ve 6 gün süreyle 27°C' de inkübe etmişlerdir. Bakterilerin yağ asit profiline göre tanısında TSA besiyerinde 3 günlük inkübasyonun en uygun ortam olduğunu belirlemişlerdir.

Tanı ve patojenisite testlerini kullanarak Türkiye' de armut ağaçlarında Ateş Yanıklığına sebep olan iki *E.amylovora*' nın izolatıyla bilinen diğer izolatları karşılaştırılmıştır. Çalışmada E1/81, C6/6, TREa90, TREa91 izolatları kullanılmıştır. Bu izolatların ilk olarak MS ortamındaki kolonileri incelenmiş hepsinde sarı kolonilerin oluştuğu gözlenmiştir. King's B ortamında geliştirilen izolatlar, UV ışık altında floresan ışımaya vermemiştir. Tüm izolatlar Ateş Yanıklığı hastalık semptomu ve armut meyvelerinde ooze oluşturmuştur. Bu tanı ve patojenisite testlerinin sonuçları tüm *E.amylovora* strainlerinde aynı sonucu verirken, kontrol amaçlı kullanılmış King's B ortamında floresan özellik gösteren *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*' de sonuç negatif vermiştir (Momol and Zeller, 1992).

Zwet et al (1987), 10 ülke ve 5 eyalette farklı rosaceous bitkilerinden 143 *E.amylovora* straini elde etmişlerdir. İzolatları agar ilave edilen TSB'de geliştirmişler, bakterinin hücre yağ asitlerini gaz sıvı kromatografisi ile tespit etmişlerdir. Bakterilerin yağ asit pikleri tanımlandığında 12:0, 14:0 ve 16:0 düz zincirli yağ asiti, 16:1 ve 18:1 doymamış yağ asitleri ve 14:0 3OH ve 17:0 cyclopropane yağ asitleri en yüksek oranda bulunmuştur. Daha düşük oranlarda ise 15:0, 17:0 ve 18:0 düz zincirli yağ asitleri belirlenmiştir. Total yağ asitlerinin % 1' inin doymuş tek karbonlu yağ asitleri, % 9' unu hidroksisubstituted zincirli yağ asitleri, % 10' unun cyclic asitler, % 28' inin doymamış yağ asitleri ve yaklaşık % 49' unu doymuş çift karbonlu zincirli asitler olduğunu tespit etmişlerdir.

Psallidas and Dimova (1986), tarafından, armut, elma ve alıçtan elde edilen 10 tane izolatın morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve serolojik testlerle karakterizasyonu yapılmıştır.



2014 yılında Iğdır ilinde elma bahçelerinde tarafımızdan yapılan survey çalışmalarında, bakteriyel hastalıkların var olduğu ve önemli derecede verim kaybına neden olduğu gözlenmiştir. Hastalığın yaygın görüldüğü bahçelerden alınan hastalıklı bitki örneklerinden laboratuvar koşullarında *E.amylovora* izole edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar, Iğdır’ da yetiştirilen elma ağaçlarında verim ve kalitede ekonomik zarara sebep olan bakteriyel patojenin tanısının yapılmasına ve mücadele metotlarının belirlenmesine gereksinim olduğunu göstermiştir.



### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmada; Steril Kabin (ESCO, Class II Type A2), Otoklav (HIRAYAMA, HV- 50 L), İnkübatör (MEMMERT, INB 500), Mikroskop (LEICA, DM 500), Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (AGILENT, 7890A), Test Tüpü Çalkalayıcısı (STUART, SB3), Su Banyosu (MEMMERT, WNB-14), Otomatik Pipetler (EPPENDORF), Magnetik Karıştırıcı (WISESTIR, MSH-20A), pH Metre (METTLER TOLADO), Derin Dondurucu -20 (VESTEL, FT 280), Derin Dondurucu -80 (ESCO, UUS-439B-1-SS), Hassas Terazî (SHIMADZU, ATX224), Buzdolabı (BEKO, D9463NMS), Saf Su Cihazı (MILLIPORE, DIRECT-Q-3UV), Mini Karıştırıcı (WISEMIX, VM-10) kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin ve besiyerlerinin hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

1. **%70' lik Etil Alkol:** 70 ml etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır. -20°C' de muhafaza edilmiştir.
2. **%30' luk Gliserol:** 70 ml steril distile su içerisine 30 ml gliserol eklendikten sonra otoklavda 121°C' de 15 dk steril edilerek hazırlanmıştır.
3. **Lugol solüsyonu:** 1 g iyot ve 2 g KCl tartılmıştır, toplam hacim steril distile su ile 100 ml' ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
4. **Nutrient Agar:** 1 L distile su içerisine 28 g nutrient agar karışımı (Oxoid) ilave edilmiştir. Besiyeri otoklavda 121°C' de 15 dk steril edildi. 45°C' ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır.
5. **Nutrient Broth:** 13 g nutrient broth içeriği (Oxoid) 1 L distile su içerisine eklenmiştir. Karışım otoklavda 121°C' de 15 dk steril edilmiştir.
6. **Trypticase Soy Broth Agar (TSBA) Besiyeri:** 30 g Trypticase soy broth (BBL # 11768), 15 g granüle agar (BBL # 11849) 2 L' lik bir erlenmayer içerisindeki

1 L dH<sub>2</sub>O içerisine ilave edilmiş, ısıtmalı magnetik karıştırıcı üzerinde agar eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 121°C' de 15 psi basınç altında 15 dk süreyle otoklav edilmiştir. Steril edilen ortam 60°C' ye ayarlı su banyosunda soğutulduktan sonra steril kabinde petrilere (100x15 mm) 20-25 ml' lik kısımlar halinde dökülerek, oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

- 7. Nutrient Strach Agar (NAS):** 23 g nutrient agar (Difco) ve 10 g %1' lik nişasta 1 L saf su içerisine konularak otoklavda 121°C' de 15 dk. steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 45°C' ye kadar soğutulan besi yeri steril petrilere dökülerek katılaşması sağlanmıştır.
- 8. Nutrient Sukroz Agar (NSA):** 23 g nutrient agar (Difco) ve 50 g sukroz tartıldı, toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121°C' de 15 dk. steril edildikten sonra 45°C' ye kadar soğutuldu ve steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır.
- 9. %3' lük KOH Çözeltisi:** 3 g KOH 100 ml steril distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
- 10. %7' lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Çözeltisi:** 7 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' in hacmi steril saf su ile 100 ml' ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 11. Hücre Parçalama (Saponification) Çözeltisi:** 150 ml metil alkol (HPLC Grade) ve 150 ml sdH<sub>2</sub>O 1 L' lik renkli çözelti şişesine ilave edilmiştir. Daha sonra katı formdaki 45 g sodyum hidroksit (ACS Grade) eklenerek iyice çözülünceye kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 12. Metilleştirme (Methylation) Çözeltisi:** 325 ml hidroklorik asit (6 N) ve 275 ml metil alkol (HPLC Grade) 1 L' lik renkli çözelti şişesi içerisinde iyice çözülünceye kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 13. Saflaştırma (Extraction) Çözeltisi:** 200 ml metil-tert-butil-eter (HPLC Grade) 200 ml hexan (HPLC Grade) üzerine ilave edilerek 1 L'lik renkli çözelti şişesine katılmıştır, iyice çözülünceye kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 14. Bazık yıkama (Base Wash) Çözeltisi:** 10.8 g katı formdaki sodyum hidroksit (ACS Grade) 900 ml sdH<sub>2</sub>O içerisinde iyice çözülünceye kadar karıştırıldıktan sonra 1 L' lik renkli çözelti şişesine aktarılmıştır.

### **3.1.3. Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması**

Iğdır merkeze bağlı Yaycı, Oba, Kasımcı, Melekli, Akyumak, Küllük, Bayraktutan, Alikamerli köyleri ve Tuzluca ilçesine bağlı Gaziler köyü elma bahçelerinden, basit tesadüfi örnekleme metoduna göre hastalıklı bitki örnekleri alındı. Surveyler, bitkilerin yaprak ve meyve dönemleri olmak üzere 2 kez yapılmıştır, alınan örnekler, polietilen torbalara konularak, buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilerek izolasyon işlemine kadar, + 4°C' de saklanmıştır.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. *Erwinia amylovora*'nın izolasyonu ve muhafazası**

#### **3.2.1.1. Bakteriyel sızıntıdan izolasyon**

Bakteriyel sızıntıdan, steril bir bistüri ile kesit alınıp içerisinde; 2-3 ml steril su bulunan tüplere bırakılarak örnek tipine bağlı olarak 30-60 dakika arasında tutulmuştur. Böylece, örnek içerisinde bulunan bakterilerin sıvı ortama yayılması sağlanmıştır. Bakterilerin yayıldığı bu süspansiyondan öze ile alınarak petrideki nutrient agar besi yerine çizgi ekim yapılmıştır (Saygılı ve ark., 2006).

#### **3.2.1.2. Yapraktan izolasyon**

Hastalıklı yaprağın dış yüzeyi %70' lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Yaprakta, hastalıklı ve hastaliksız kısmı birlikte içecek şekilde, steril bir bistüri ile bir parça kesilmiştir. Bu kesilen parça steril bir bistüri ile daha küçük kısımlara bölünmüş ve üzerine steril su eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir. Tüm bu işlemlerde gaye, doku içerisinde bulunan bakterilerin sıvı ortama geçmesini sağlamaktır. Bu süspansiyonlardan öze ile alınarak, nutrient agar besiyerine çizgi ekim yapılmıştır (Saygılı ve ark., 2006).

### **3.2.2. Tütünde aşırı duyarlılık (hypersensitive reaction=HR) testi**

Elde edilen bütün bakteriyel suş NA besiyerine ekilmiş, 24-48 sa 27°C' ye ayarlı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Gelişen kültürlerden sH<sub>2</sub>O ile konsantrasyonu 10<sup>8</sup> hücre/ml olan solüsyonlar hazırlandı. Solüsyonlar 3cc' lik plastik enjektörlerle tütün

(*Nicotiana tabacum* L. Samsun) yapraklarının alt kısmından damar aralarına enjekte edilmiştir. İnokule edilen bitkiler en az 8 sa, ışıklı bir ortamda muhafaza edilerek inokulasyonun yapıldığı kısımda nekroz oluşup oluşmadığı tespit edilmiştir. Ölü doku oluşumu HR pozitif, oluşmaması ise HR negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement et al., 1966; Lelliot and Stead, 1987). Pozitif kontrol olarak *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 110c straini kullanılmıştır.

### 3.2.3. Patojenite testi

Bu çalışmada, izole edilen bakterilerin patojen olup olmadıklarını belirlemek için Deveci armut çeşidi kullanılmıştır. Deveci armut çeşidinin sürgünleri içerisinde steril dH<sub>2</sub>O bulunan steril erlen mayer içerisine bırakılmıştır. Test edilen bakteriler sukroz içeren nutrient agar besiyerine ekilerek 27°C’ de 24 sa inkübe edilmiştir. Konsantrasyonu 10<sup>8</sup> hücre/ml olacak şekilde, gelişen bakteri kültürlerinden solüsyonlar hazırlanmış ve bitkilerin yapraklarına püskürtülmüştür. Negatif kontrol olarak ise sdH<sub>2</sub>O kullanıldı. İnokulasyon sonrası bitkiler üzerine polietilen torbalar geçirilmiş ve oda sıcaklığında 3 gün bu şekilde bırakılmıştır. Süre sonunda torbalar çıkartılmış, 7-10 gün boyunca hastalık simptomlarının oluşumu gözlemlenmiştir. Yapraklarda yanıklık oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Simptom sergileyen yapraklardan tekrar patojen bakteri izolasyonu yapılmıştır. Gelişen bakteriler saflaştırılarak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucu ortamında muhafaza edilmiştir. Yapılan test 2 tekerrürlü olarak aynı şartlarda 2 kez tekrarlanmıştır (Taylor, 1970; Lelliot and Stead, 1987).

### 3.2.4. Morfolojik ve biyokimyasal testler

Elde edilen fitopatojen bakterilerin morfolojik (hücre ve koloni morfolojisi, hareketlilik testi) ve biyokimyasal (gram reaksiyon testi, katalaz, oksidaz, nişasta hidrolizi, levan, ham armut ve 36°C’ de gelişim testi) özellikleri belirlenmiştir. Her bir test aynı şartlarda 2 kez tekrarlanmıştır.

### **3.2.4.1. Morfolojik testler**

#### **3.2.4.1.a. Hücre morfolojisi**

Saflaştırılmış olan bakteri strainleri NA besiyerine ekilmiş, 24 sa süreyle 27°C’ de inkübe edilmiştir. Lam üzerine 1 damla sH<sub>2</sub>O damlatıldıktan sonra steril bir öze ile gelişen kültürlerden bakteri alınmış, öze ile su içerisinde iyice karıştırıldıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. Bakterilerin tespiti için kuruyan preparat alevden geçirilmiştir. Sonra preparat üzerine kristal viyoleto boyası damlatılarak 1-2 dk bu şekilde bekletilmiştir. Süre sonunda lamın üzerindeki boya akıtılmış, sH<sub>2</sub>O ile yıkama yapıldıktan sonra kurutma kağıdı ile nem alınmıştır. Mikroskopta inceleme için sedir yağı kullanılmış, immersiyon objektifinde hücre şekli belirlenmiştir (Saygılı, 1995).

#### **3.2.4.1.b. Koloni morfolojisi**

Mikroorganizmalar NA üzerine nokta veya çizgi ekim şeklinde kontamine edilmiştir. Bakteriler 48-72 sa 27°C’ de inkübe edildikten sonra koloni meydana getirmeleri beklenmiş ve besi yerinde gelişen kolonilerin rengi tespit edilmiştir (Saygılı, 1995).

#### **3.2.4.1.c. Hareketlilik testi**

Litrede 10 g tryptone, 5 g NaCl ve 5 g agar (pH: 6.8-7.2) içeren yarı katı formulu besi yeri tüplere 5’er ml konulmuş ve 121°C’ de 15 dakika otoklav edilmiştir. Tüp içerisindeki besi yerine *E.amylovora* strainleri kültür delme şeklinde aşılandıktan sonra 25°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 8, 24 ve 48 saat sonra değerlendirme yapılmıştır. İnkübasyon bölgesinden çevreye doğru yayılmış bir koloni gelişimi gözlenmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schaad et al., 2001). Pozitif kontrol olarak MFD-120 *Xanthomonas campestris pv. phaseoli* straini kullanılmıştır.

### **3.2.4.2. Biyokimyasal testler**

#### **3.2.4.2.a. Gram reaksiyon testi**

Bakteri strainlerinin hücre duvarlarındaki farklılığı belirleyebilmek için bir lam üzerine, %3’ lük KOH çözeltisinden bir iki damla damlatılmıştır. Ardından NA

üzerinde geliştirilen 24-48 sa' lik bakteri kültüründen öze ile alınarak KOH çözeltisi ile 5-10 sn karıştırıldıktan sonra öze yukarıya doğru kaldırılmıştır. Gram negatif özellikte olan mikroorganizmalarda hücre duvarındaki peptidoglycan tabakası tek katlı olup, takoik asit içermediğinden KOH ile kolayca parçalanmış, sitoplazma sıvısı serbest hale geçmiştir. Bunun sonucunda da viskoz bir uzama görülmüştür. Hücre duvarı özelliği gram pozitif olan bakterilerde ise KOH + bakteri karışımı sulu bir sıvı halinde kalmış ve öze yukarı doğru kaldırıldığında uzama gözlenmemiştir (Saygılı, 1995). Pozitif kontrol olarak MFD-351 *Curtebacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* (Gr+) ve MFD-75 *Agrocaterium tumefaciens* (Gr-) kullanılmıştır.

#### **3.2.4.2.b. Katalaz testi**

Katalaz, elektron transfer zincirinin sonunda açığa çıkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'in parçalanarak O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya dönüşümünü sağlayan bir enzimdir. Katalaz enzimin varlık veya yokluğunu belirlemek için bakteri strainleri NA ortamında geliştirilmiştir. 24-48 sa'lik bakteri kültüründen bir öze alınmış ve üzerine 1 damla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilmiştir. Kabarcık oluşumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Klement et al., 1990). MFD-230 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* kullanılmıştır.

#### **3.2.4.2.c. Oksidaz testi**

Elektron transferinde bakterilerin cytochrome c proteinine sahip olup olmadıkları bu testle saptandı. Solunum prosesinde cytochrome c proteini (oksidaz c) görev almakta ve elektron transfer sisteminde maddeleri birinden diğerine indirgeyerek hücresel enerji (ATP) oluşumuna neden olmaktadır. Test için % 1 tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride içeren diskler kullanılmıştır. Bu diskler 1 damla sdH<sub>2</sub>O ile doyurulmuş ve sonra üzerleri 24-48 sa'lik bakteri ile kaplanmıştır. Gözlemlenen mavimsi-mor renk, diskte kodlu olan kimyasal ile enzimin reaksiyona girdiğini ve bakteride citocrome c proteininin olduğunu göstermiştir. Bu renk değişiminin oluşması pozitif, oluşmaması ise negatif sonuç olarak kabul edilmiştir (Kovaks, 1956; Klement et al., 1990; Saygılı, 1995; Narayanasamy, 1997).

#### **3.2.4.2.d. Nişasta hidrolizi (amilaz)**

Nişasta molekülünü parçalayarak biyolojik enerjiye dönüştürmede görev yapan amilaz enziminin var olup olmadığı bu testle belirlenmiştir. NAS (NA+Starch) besiyerine bakteriler çizgi ekimle kontamine edilmiştir. 2-7 günlük bir inkübasyon sonrasında bakteri kolonisinin etrafında görülen renk açıklığı veya hale amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç çıplak gözle fark edilemediğinde lugol solüsyonundan 5 ml petrilere döküldü ve mavi renk verenler negatif, mavi renk vermeyip ekim çizgileri etrafında açık renk hale verenler pozitif olarak tespit edilmiştir (Klement et al., 1990; Saygılı, 1995; Narayanasamy, 1997). Pozitif kontrol olarak MFD-265 *Xanthomonas campestris phaseoli fuscans* kullanılmıştır.

#### **3.2.4.2.e. Levan (fructan) testi**

Bu teste nutrient sukroz agar besi yeri kullanılmıştır. Kültürler çizgi ekim şeklinde ekilerek 27°C' de 5 gün inkübe edilmiştir. Levan sucrase enziminin sukrozu kullanması sonucu oluşan konveks, mukoid koloniler levam pozitif, konveks ve mukoid yapıda olmayan koloniler ise levam negatif olarak belirlenmiştir (Klement et al., 1990; Lelliot and Stead, 1987). Pozitif Kontrol olarak MFD-228 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* straini kullanılmıştır.

#### **3.2.4.2.f. Ham armut testi**

Ham armutlar % 10' luk sodyum hipoklorit ile 4 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Steril kabinde 7-8 mm kalınlıkta dilimler halinde kesilen ham armutlar steril nemli petri kaplarına yerleştirilmiştir. Bu dilimlerin üzerine NSA' da geliştirilen 10<sup>8</sup> hücre/ml yoğunluğundaki bakteri strainleri steril iğne ile bulaştırılarak 27°C' de inkübe edilmiştir. Ooze (bakteriyel eksudat) oluşturan strainler kaydedilmiştir (Van der Zwet, 1986).

#### **3.2.4.2.g. 36°C' de gelişim testi**

Bakteri NA besiyerine çizgi ekim yapılmış ve 36°C' ye ayarlı inkübatörde 3 gün inkübe edilmiştir. Besiyeri üzerinde bakteri gelişimi oluşmuşsa pozitif, oluşmaması negatif olarak değerlendirilmiştir (Atasağun, 2009).



### **3.2.5. Moleküler testler**

#### **3.2.5.1. Mikroorganizmaların yağ asitleri profillerine göre tanınması**

Saf kültür olarak – 80°C’ de muhafaza edilen bakteri strainlerinden yağ asit metil ester ekstraksiyonu (FAME), izolasyonu, saflaştırılması ve analizi yapılmıştır. Bilgisayar kontrollü gaz kromatografi sistemi olan Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIDI, Inc., Newark, DE) kullanılarak kültüre alınan strainlerin tür ve alt tür seviyesinde tanısı yapılmıştır.

#### **Aerobik bakteri strainlerinin trypticase soy broth agar (TSBA) besiyerinde geliştirilmesi**

Test edilen mikroorganizmalar steril platin bir öze ile depo kültürden alınmış, TSBA katı besiyerine 4 fazlı çizgi ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler, 24-48 sa süreyle 27°C’ ye ayarlı bir inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

#### **Yağ asit metil esterlerinin saflaştırılması**

Mikroorganizmaların yağ asitlerini saf olarak izole edebilmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır. Hazırlanan 4 çözelti ile aerobik bakterilerden yağ asit metil esterlerinin saflaştırılması aşağıdaki metod takip edilerek yapılmıştır.

- 1.** TSBA üzerinde geliştirilen bakterilerin inkübasyon periyodunu takiben, 4 fazlı çizim yapılmış petriyerlerin 3 ve 4 numaralı fazlarından canlı bakteri hücreleri steril bir özeyle toplanarak (~ 40mg) steril teflon kapaklı cam test tüplerine (5 ml) aktarılmış ve tüpler etiketlenerek ağızları kapatılmıştır.
- 2.** Her bir test tüpüne 1 ml hücre parçalayıcı çözelti ilave edilmiş ve 5-10 sn çalkalandıktan sonra test tüpler 5 dk süreyle 100°C’ lik su banyosunda bekletilmiştir. Ardından tekrar 5-10 sn çalkalanan test tüpler 25 dk süreyle 100°C’ lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Bu muamele ile canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.
- 3.** Test tüplerine 2 ml metilleştirme çözeltilerinden eklendikten sonra 5-10 sn’ lik bir çalkalamadan sonra 80°C’ de 10 dk süreyle su banyosunda bekletilmiş ve hemen takiben 2 dk süreyle buz veya soğuk su içerisinde soğutulmuştur. Bu uygulama ile

serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmiş ve yağ asitlerinden yağ asit metil esterleri elde edilmiştir. Böylece yağ asitlerine yüksek sıcaklıklarda uçuculuk özelliği kazandırılmıştır.

4. Soğutulmuş tüplere 1.25 ml saflaştırma çözeltilisinden eklenerek 10 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısında çalkalanmıştır. Tüplerin alt kısmında asidik (inorganik), üst kısmında da organik sıvı faz olmak üzere 2 ayrı faz oluştuğu gözlenmiştir. Yağ asit metil esterleri asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplandığından pastör pipeti kullanarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılmış ve organik faz muhafaza edilmiştir.

5. En son aşamada her tüpe 3 ml bazik yıkama çözeltilisinden ilave edilmiştir. Tüpler 5 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısında karıştırıldıktan sonra 10 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kullanılan çözelti bazik özellikte olduğundan, serbest yağ asit metil esterleri daha saf olarak elde edilmiştir. Bu aşamada da tüp içerisinde yine iki ayrı faz oluştuğu gözlenmiştir. Üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml gaz kromatografisi tüplerine transfer edildikten sonra ağızları sıkıca kapatılmış, MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirilmiştir.

### **Örneklerin mikrobiyal identification sistemi ile analiz edilmesi**

Örnekler MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılmış, sistem klavuzunda belirtildiği gibi tek tek analiz edilerek tanı sonuçları alınmıştır. Her bir bakteri straini için elde edilen yağ asitlerinin türleri ve yüzde oranlarının ortalamaları belirlenmiştir. Farklı bakteri strainlerinin yağ asit profilleri Minitab (Versiyon 14) Kümeleme Analizi ile test edilmiştir. Tür ve strainler arası akrabalık oranları dendogram olarak ifade edilmiştir.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Survey Sonuçları

İğdır Merkez ve bu merkeze bağlı Yaycı, Oba, Kasımcın, Melekli, Akyumak, Küllük, Bayraktutan, Alikamerli köyleri ve Tuzluca ilçesine bağlı Gaziler köyü elma bahçeleri ziyaret edilmiş, 21 -70 meyve ağacı olan bahçede 21 - 30 ağaç kontrol edilmiştir. Dallarda ve yapraklarda yanıklık semptomu gösteren bitkiler ve meyve dönemindeki surveylerde üzerinde süt rengi yapışkan akıntı olan meyveler tespit edilmiştir. Tipik hastalık semptomları sergileyen bu bitki aksamlarından bakteri izolasyonu ve saflaştırması yapılmış ve toplam 84 strain elde edilmiştir. Bakteriye strainlerin lokasyonlarda bulunuş sayıları Çizelge 4.1' de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** 2013-2015 yılları arasında elma üretim alanlarından izole edilen bakteri türlerinin dağılımı

<b>İzole Edilen Bakteri Türleri</b>	<b>Toplam</b>
<i>Erwinia amylovora</i>	51
<i>Yersinia aldovae</i>	7
<i>Enterobacter intermedius</i>	1
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	1
<i>Bacillus megaterium GC subgroup A</i>	1
<i>Yersinia fredriksenii</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
<i>Kluyvera cryocrescens-GC subgroup B</i>	1
<i>Citrobacter amalonaticus GC subgroup B (Levinea amalonatica)</i>	3
<i>Pantoea agglomerans GC subgroup C (Enterobacter)</i>	3
<i>Yersinia bercovieri</i>	3
<i>Serratia fonticola</i>	6
<i>Salmonella typhimurium GC subgroup B</i>	2
<b>Toplam</b>	<b>84</b>

#### 4.2. Hastalıklı Elma Bitkilerinden İzole Edilen Bakteriyel Strainlerin Yağ Asit Profillerine Göre Tanı Sonuçları

Bakteriyel strainlerin yağ asitleri saflaştırılarak mikrobiyal identifikasyon sistemi (MIS) ile yapılan tanı sonuçları Çizelge 4.2' de verilmiştir. Çizelgede belirtilen sonuçlara göre 51 adet *Erwinia amylovora*, 7 adet *Yersinia aldovae*, 1 adet *Enterobacter intermedius*, 1 adet *Bacillus thuringiensis israelensis*, 1 adet *Bacillus megaterium GC subgroup A*, 3 adet *Yersinia fredriksenii*, 2 adet *Pseudomonas aeruginosa*, 1 adet *Kluyvera cryocrescens-GC subgroup B*, 3 adet *Citrobacter amalonaticus GC subgroup B (Levinea amalonatica)*, 3 adet *Pantoea agglomerans GC subgroup C (Enterobacter)*, 3 adet *Yersinia bercovieri*, 6 adet *Serratia fonticola*, 2 adet *Salmonella typhimurium GC subgroup B* olmak üzere 13 farklı bakteri tanılanmıştır.

**Çizelge 4.2.** Bakteriyel strainlerin yağ asitlerine göre (MIS) tanı sonuçları

<b>T. No</b>	<b>MIS Tanı Sonucu</b>	<b>MIS %</b>	<b>Bitki Aksamı</b>	<b>Yer</b>	<b>Yıl</b>	<b>S.No</b>
1	<i>Erwinia amylovora</i>	58	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Küllük	2013	GG-3
2	<i>Erwinia amylovora</i>	71	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Gaziler	2013	GG-6
3	<i>Erwinia amylovora</i>	48	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Yayı	2013	GG-7
4	<i>Erwinia amylovora</i>	42	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Yayı	2013	GG-8
5	<i>Erwinia amylovora</i>	77	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Oba	2013	GG-10
6	<i>Erwinia amylovora</i>	82	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Oba	2013	GG-11
7	<i>Erwinia amylovora</i>	69	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Yayı	2013	GG-15
8	<i>Erwinia amylovora</i>	61	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Yayı	2013	GG-17
9	<i>Erwinia amylovora</i>	74	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Yayı	2013	GG-19
10	<i>Erwinia amylovora</i>	57	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Melekli	2013	GG-20
11	<i>Erwinia amylovora</i>	73	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Melekli	2013	GG-21
12	<i>Erwinia amylovora</i>	78	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Küllük	2013	GG-22
13	<i>Erwinia amylovora</i>	56	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Gaziler	2013	GG-23
14	<i>Erwinia amylovora</i>	60	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Gaziler	2013	GG-24
15	<i>Erwinia amylovora</i>	60	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Bayraktutan	2013	GG-25
16	<i>Erwinia amylovora</i>	44	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Bayraktutan	2013	GG-26
17	<i>Erwinia amylovora</i>	21	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Akyumak	2013	GG-27
18	<i>Erwinia amylovora</i>	78	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Akyumak	2013	GG-28
19	<i>Erwinia amylovora</i>	59	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Yayı	2013	GG-29
20	<i>Erwinia amylovora</i>	69	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Yayı	2013	GG-30
21	<i>Erwinia amylovora</i>	73	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Yayı	2013	GG-31
22	<i>Erwinia amylovora</i>	78	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Bayraktutan	2013	GG-35
23	<i>Erwinia amylovora</i>	49	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Akyumak	2013	GG-37
24	<i>Erwinia amylovora</i>	65	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Kasımcan	2013	GG-38
25	<i>Erwinia amylovora</i>	69	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Kasımcan	2013	GG-39
26	<i>Erwinia amylovora</i>	52	Bakteriyel Akıntı (Meyve)	İğdır- Kasımcan	2013	GG-41

Çizelge 4.2' in devamı

27	<i>Erwinia amylovora</i>	68	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-52
28	<i>Erwinia amylovora</i>	73	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-53
29	<i>Erwinia amylovora</i>	77	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-54
30	<i>Erwinia amylovora</i>	75	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-55
31	<i>Erwinia amylovora</i>	44	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-56
32	<i>Erwinia amylovora</i>	72	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-57
33	<i>Erwinia amylovora</i>	55	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-58
34	<i>Erwinia amylovora</i>	63	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-59
35	<i>Erwinia amylovora</i>	75	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-60
36	<i>Erwinia amylovora</i>	67	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-64
37	<i>Erwinia amylovora</i>	66	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-67
38	<i>Erwinia amylovora</i>	48	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-68
39	<i>Erwinia amylovora</i>	48	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-69
40	<i>Erwinia amylovora</i>	74	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-70
41	<i>Erwinia amylovora</i>	58	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-73
42	<i>Erwinia amylovora</i>	64	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-81
43	<i>Erwinia amylovora</i>	43	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-82
44	<i>Erwinia amylovora</i>	68	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-83
45	<i>Erwinia amylovora</i>	74	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-84
46	<i>Erwinia amylovora</i>	77	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-85
47	<i>Erwinia amylovora</i>	69	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-86
48	<i>Erwinia amylovora</i>	72	Meyve	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-91
49	<i>Erwinia amylovora</i>	73	Yaprak	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-99
50	<i>Erwinia amylovora</i>	78	Yaprak	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-100
51	<i>Erwinia amylovora</i>	77	Yaprak	Alikamerli-Iğdır	2014	GG-101

#### 4.3. Tütün Bitkisinde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Response=HR) Testi Sonuçları

İzolasyon sonucu elde edilen saf bakteri strainlerinin bitki patojeni mi, saprofit mi olduğunu ayırt etmek için aşırı duyarlılık testi (HR) yapılmıştır. Gelişmiş tütün (*Nicotiana tabacum* L. Samsun) yapraklarının interselüler alanlarına bakteriyel süspansiyonların şırınga edilmesi sonucunda nekrotik doku oluşumuna neden olanlar HR pozitif, diğerleri ise HR negatif olarak değerlendirilmiştir. Toplam 84 strain için yapılan HR testi sonucunda 51 strainin HR pozitif sonuç verdiği, geri kalan 33 strainin ise HR negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



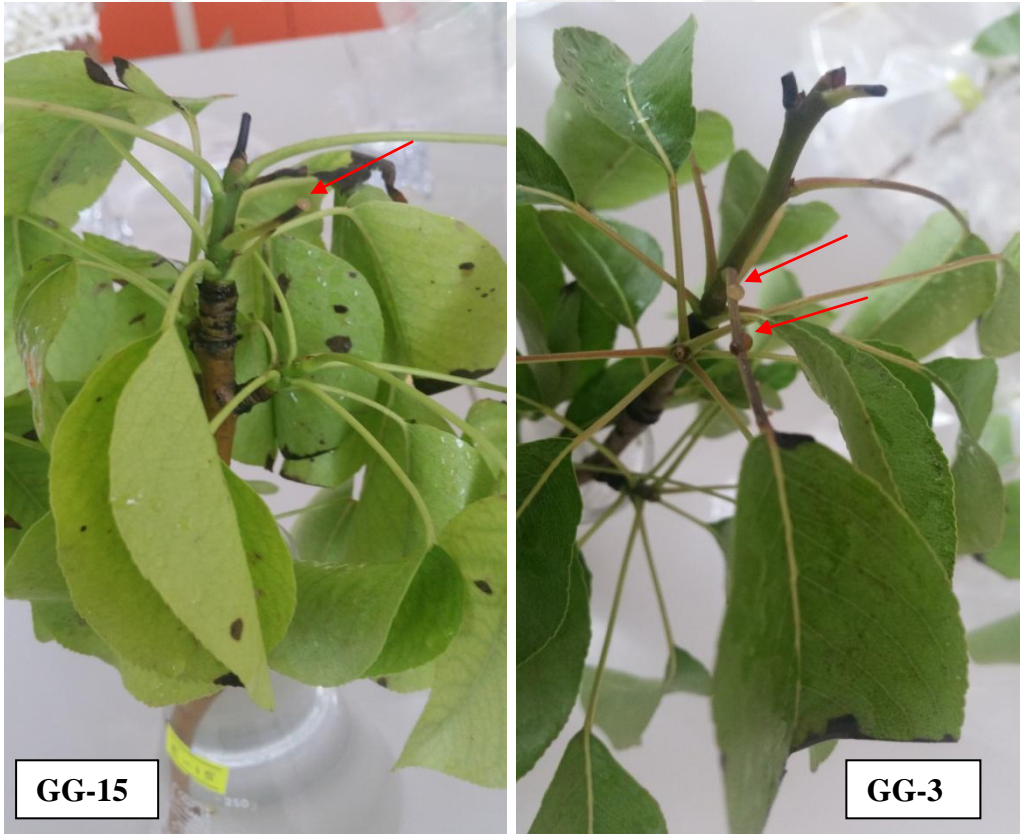
Şekil 4.1. Tütünde HR testi

#### 4.4. Patojenite Testi Sonuçları

Patojenite testi *E.amylovora*' ya hassas olan Deveci Armut çeşidinin sürgünleri kullanılarak yapılmıştır. Yapılan patojenite testi sonucunda yapraklarda ve sürgünlerde yanıklık semptomu ve sürgünlerde bakteriyel akıntı gözlenmiştir (Şekil 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.2. *Erwinia amylovora*' nın yapraklarda oluşturduğu yanıklık simptomsu

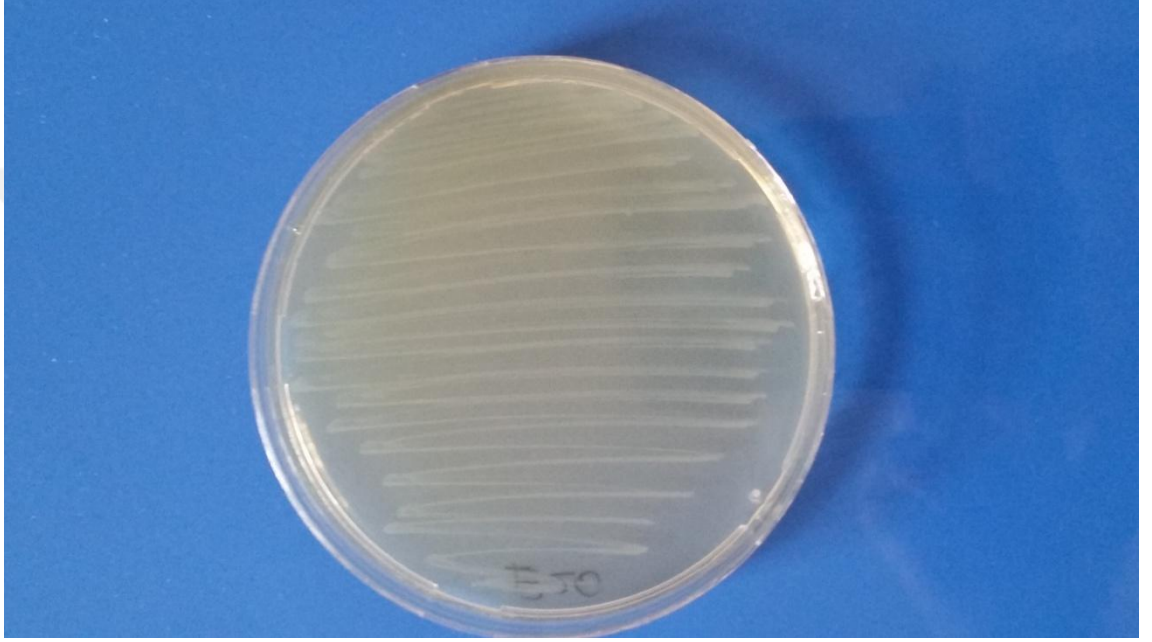


Şekil 4.3. *Erwinia amylovora* strainlerinin sürgünlerde oluşturduğu bakteriyel akıntı ve yanıklık simptomsu



#### 4.5. Patojenik Bakteriye Strainlerin Morfolojik Test Sonuçları

Morfolojik karakterlerden hareket özelliği, hücre Şekli ve NA zerindeki koloni rengi belirlenmiş ve strainlere ait sonuçlar izelge 4.3' de verilmiştir. Hareketlilik testi sonucunda *E.amylovora* strainlerinin hareketli olduğu tespit edilmiştir. NA besi yerinde *E.amylovora* strainlerinin krem renkli kolonilere sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. GG-20 straininin NA besiyerinde koloni gelişimi ve rengi

Çizelge 4.3. Patojen mikroorganizmanın morfolojik test sonuçları

Strain No	MIS Tanı Sonuçları	Hareket zelliği	Hücre Şekli	NA' da Koloni Rengi
GG-3	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-6	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-7	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-8	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-10	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-11	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-15	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-17	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-19	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem
GG-20	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	ubuk	Krem

Çizelge 4.3' in devamı

GG-21	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-22	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-23	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-24	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-25	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-26	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-27	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-28	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-29	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-30	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-31	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-35	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-37	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-38	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-39	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-41	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-52	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-53	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-54	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-55	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-56	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-57	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-58	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-59	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-60	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-64	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-67	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-68	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-69	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-70	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-73	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-81	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-82	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-83	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-84	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-85	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-86	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-91	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-99	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-100	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem
GG-101	<i>Erwinia amylovora</i>	Hareketli	Çubuk	Krem

#### 4.6. Patojenik Bakteriye Strainlerin Biyokimyasal Test Sonuçları

Mikroorganizmaların biyokimyasal test (gram reaksiyon, katalaz, oksidaz, levan, amilaz, ham armut, 36°C' de gelişim testi) sonuçları Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 ve Çizelge 4.4'de özetlenmiştir.

Amilaz test sonuçları ve oksidaz test sonuçları değerlendirildiğinde *E.amylovora* strainlerinin negatif reaksiyon verdikleri tespit edilmiştir.

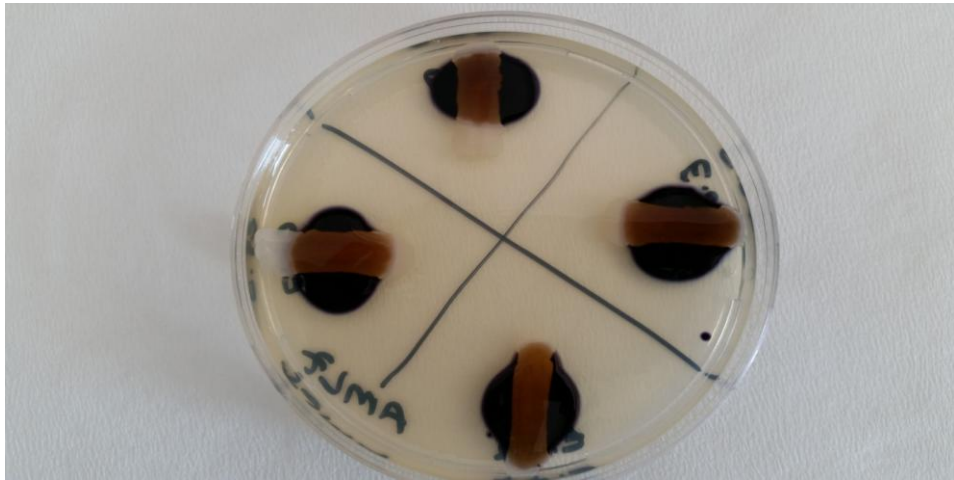
Gram reaksiyon testi sonucunda bakterilerin hücre duvarlarındaki farklılık belirlenmiş, *E.amylovora* strainlerinin gram negatif özellikte olduğu saptanmıştır.

Katalaz testi sonucunda *E.amylovora* strainlerinin kuvvetli pozitif reaksiyon verdikleri belirlenmiştir.

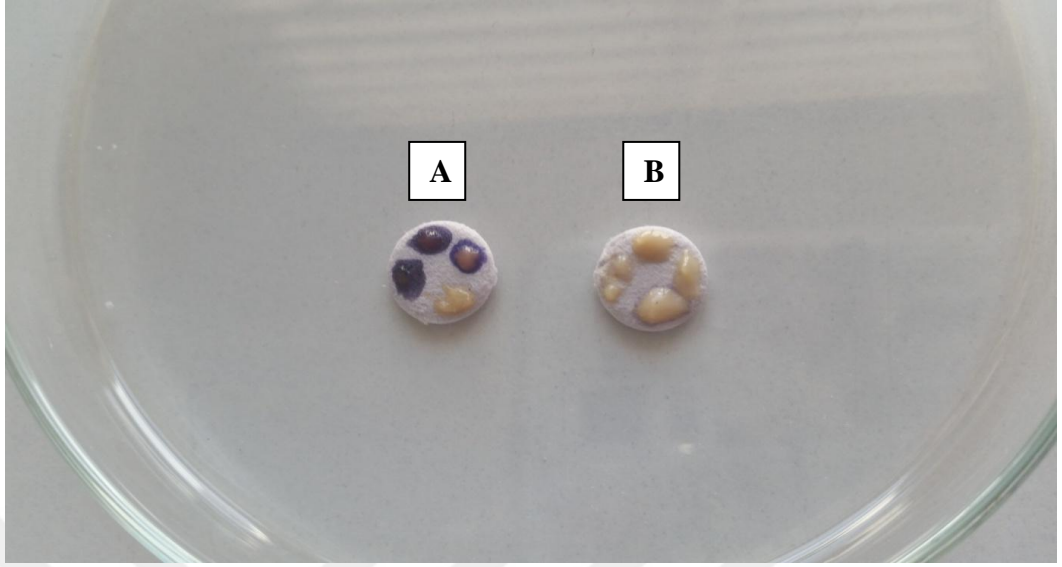
Levan testi sonucunda *E.amylovora* strainlerinin pozitif ve kuvvetli pozitif reaksiyon verdikleri belirlenmiştir.

36°C' de gelişim testi sonucunda *E.amylovora* strainlerinin negatif sonuç verdiği gözlenmiştir.

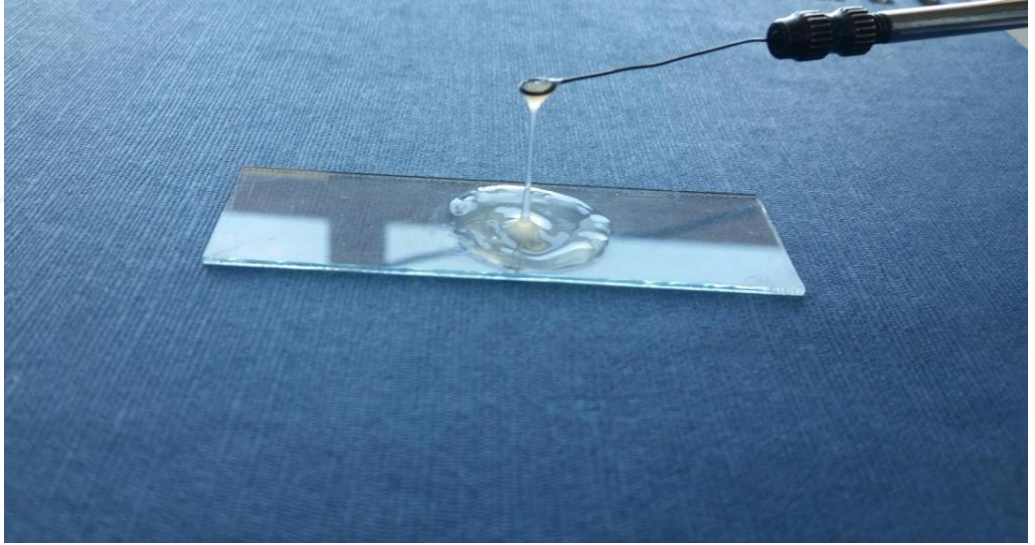
Ham armut testi sonucunda ise armut meyvesine bulaştırılan bakteri strainlerinin bakteriyel akıntı (ooze) oluşturduğu saptanmıştır.



**Şekil 4.5.** Amilaz testi sonucunda GG-86, GG-52, GG-25, GG-73 strainlerinin negatif reaksiyonu



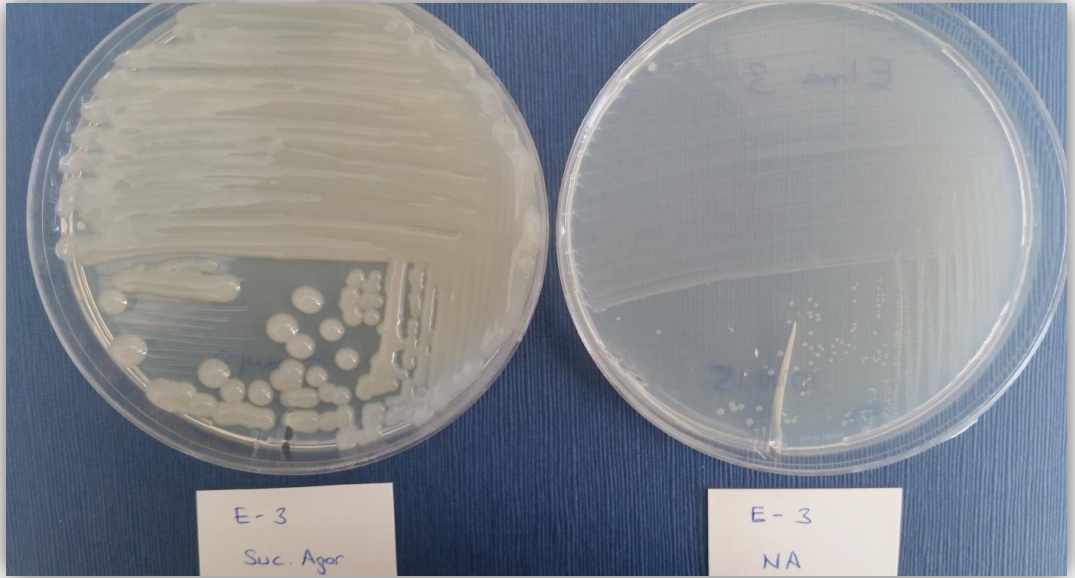
Şekil 4.6. A oksidaz pozitif, B oksidaz negatif olan reaksiyon



Şekil 4.7. Gram reaksiyon testi sonucunda (gram negatif) *Erwinia amylovora* strainlerinin oluşturduğu sümüksü yapı



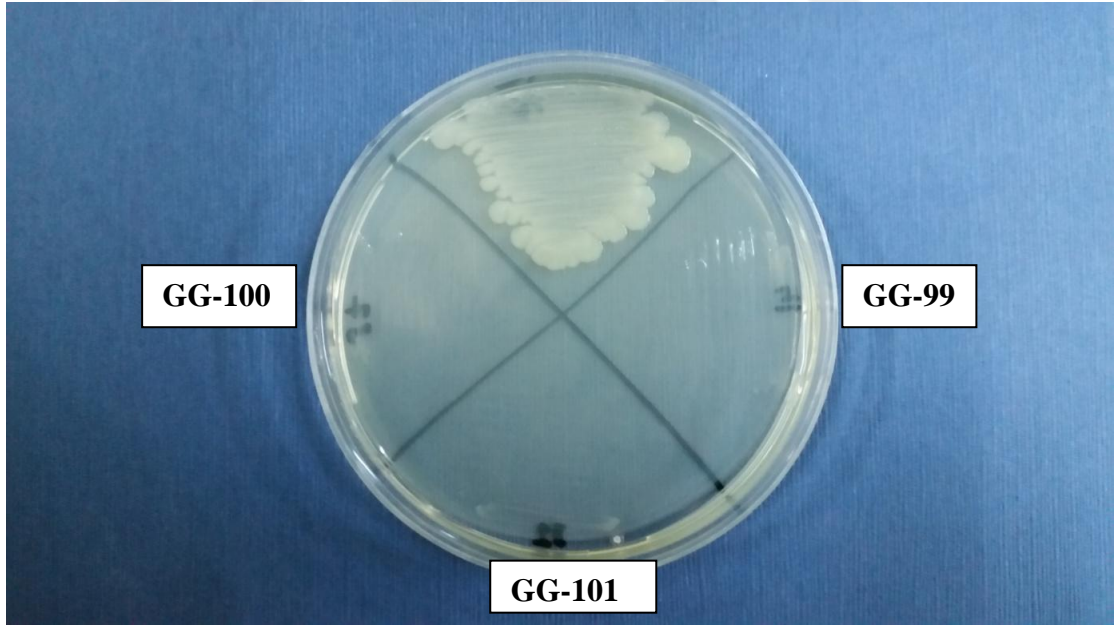
**Şekil 4.8.** Katalaz testi sonucunda pozitif olan strainlerde görülen kabarcık oluşumu



**Şekil 4.9.** Solda GG-3 straininin NA+Sukroz Agarda levan koloni oluşumu



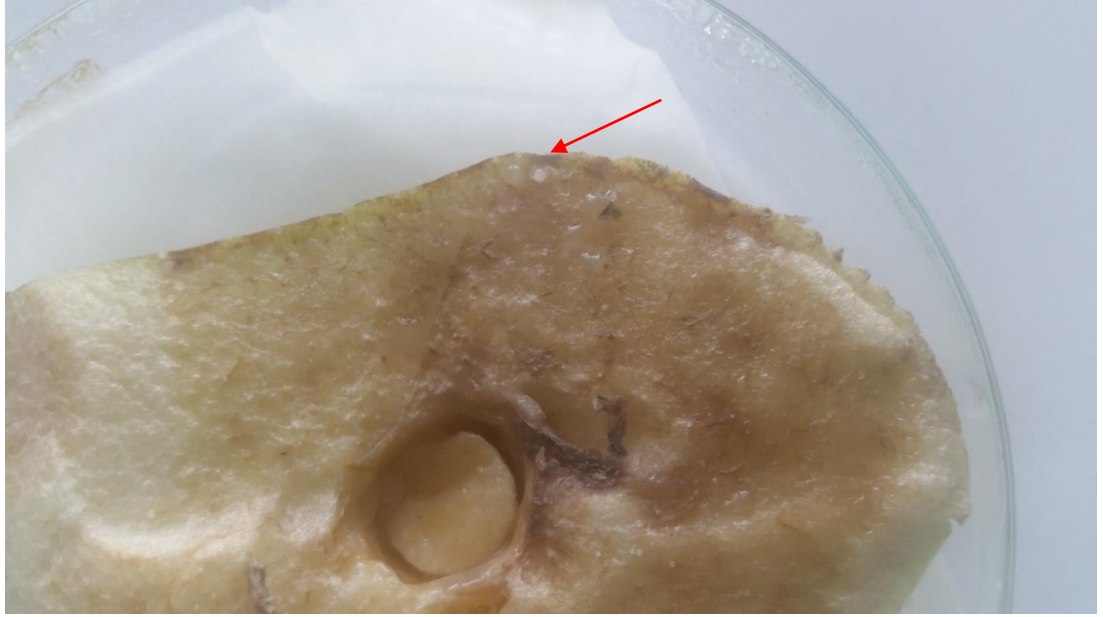
**Şekil 4.10.** *Erwinia amylovora* strainlerinin levan testi sonucunda oluşturdukları koloni gelişimi



**Şekil 4.11.** GG-100, GG-101, GG-99 strainlerinin 36°C' de gelişim testi sonucunda gelişme göstermemesi



**Şekil 4.12.** GG-15 straininin ham armut testi sonucunda oluşturduğu bakteriyel ooze



**Şekil 4.13.** GG-22 straininin ham armut testi sonucunda oluşturduğu bakteriyel ooze

**Çizelge 4.4.** Patojen mikroorganizmanın biyokimyasal test sonuçları

Strain No	MIS Tanı Sonuçları	G*	A	K	L	O	36° C
GG-3	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-6	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-7	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-8	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-10	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-11	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-15	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-17	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-19	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-20	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-21	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-22	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-23	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-24	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-25	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-26	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-27	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-28	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-29	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-30	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-31	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-35	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-37	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-38	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-39	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-41	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-52	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-53	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-54	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-55	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-56	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-57	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-58	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-59	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-60	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-64	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-67	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	+	-	-
GG-68	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-69	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-70	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-73	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-81	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-82	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-



Çizelge 4.4' in devamı

GG-83	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-84	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-85	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-86	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-91	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG-99	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG100	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-
GG101	<i>Erwinia amylovora</i>	-	-	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	-	-

\***G**: Gram reaksiyon testi, **A**: Amilaz testi, **K**: Katalaz testi, **L**: Levan testi, **O**: Oksidaz Testi, **36°C**: 36 °C de Gelişim Testi, **-**: Negatif Sonuç, **+**: Pozitif Sonuç, **K<sup>+</sup>**: Kuvvetli pozitif sonuç

#### 4.7. Bakteriyel Strainlerin Yağ Asit Analiz Sonuçları

Mikroorganizmaların yağ asit profillerinin analizleri sonucunda, izole edilen bakteri strainlerinin tamamı tür seviyesinde tanımlanmıştır. Yağ asit analizlerine göre yapılan tanıma strainler % 45-82 benzerlik oranıyla *E.amylovora* olarak saptanmıştır. Bakteriyel strainlerin yağ asiti çeşitleri ve yüzdeleri bakımından farklılıklara sahip olduğu görülmüştür. Yapılan analizler sonucunda *E.amylovora* strainlerinin 10:0, 11:0, 12:0, 11:0 3OH, 13:0, 12:0 2OH, 12:0 3OH, 14:0, Sum In Feature 1, 13:0 2OH, 15:1 w8c, 15:1 w6c, 15:1 w5c, 15:0 ISO, 15:0 ANTEISO, 15:0, 14:0 2OH, Sum In Feature 2, 16:0 ISO, Sum In Feature 3, 16:1 w5c, 16:0, 15:0 3OH, 17:0 ISO, 17:0 ANTEISO, 17:1 w8c, 17:0 CYCLO, 17:0, Sum In Feature 5, 18:1 w9c, Sum In Feature 8, 18:1 w5c, 18:0, 17:0 3OH, 19:0 ISO, Sum In Feature 7, 19:0 CYCLO w8c, 19:0, 18:1 2OH, olmak üzere 39 farklı yağ asiti içerdikleri saptanmıştır. Strainlerde ortak olarak bulunan yağ asitleri ise 12:0, 13:0, 14:0, 14:0 2OH, 16:1 w5c, 16:0, 17:1 w8c, 17:0 CYCLO, 17:0, 18:1 w5c, 18:0, 19:0, Sum In Feature 3 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Patojen bakterinin içerdiği yağ asiti çeşitleri ve oranları

Strain No	Yağ Asitleri ve Yüzde Miktarları												Sum In Feature 3
	12:0	13:0	14:0	14:0 2OH	16:1 w5c	16:0	17:1 w8c	17:0 cyclo	17:0	18:1 w5c	18:0	19:0	
GG-3	5.14	0.28	4.54	0.33	0.14	33.53	0.15	7.03	1.15	0.06	0.34	----	30.90
GG-6	4.51	0.19	4.09	0.20	0.15	34.12	0.16	4.72	1.20	----	0.44	----	30.94
GG-7	5.32	0.36	4.40	0.41	0.13	31.63	0.20	10.62	1.75	0.08	0.23	----	27.29
GG-8	5.36	0.40	0.80	0.44	0.13	31.08	0.21	10.40	1.92	0.09	0.23	----	27.12
GG-10	4.81	0.30	4.14	0.36	0.13	33.99	0.16	8.33	1.73	0.10	0.32	0.08	27.92
GG-11	4.71	0.30	4.07	0.37	0.12	34.38	0.19	9.10	1.99	0.09	0.39	0.10	26.51
GG-15	4.87	0.28	4.10	0.23	0.13	33.57	0.13	5.94	1.19	----	0.40	----	30.02
GG-17	5.01	0.37	4.62	0.48	0.11	33.82	0.22	11.70	2.33	0.07	0.33	----	25.35
GG-19	4.59	0.33	3.89	0.40	0.13	33.26	0.27	10.19	2.55	----	0.35	0.09	25.23
GG-20	4.77	0.42	3.93	0.43	0.13	32.21	0.27	10.95	2.67	0.09	0.28	0.07	25.08
GG-21	4.76	0.25	3.99	0.34	0.13	33.47	0.19	8.13	1.80	0.08	0.31	0.07	28.13
GG-22	4.75	0.25	4.03	0.34	0.13	33.87	0.19	8.28	1.77	0.09	0.34	0.07	27.59
GG-23	5.01	0.39	4.19	0.46	0.13	32.68	0.24	11.04	2.28	0.09	0.29	----	26.47
GG-24	4.99	0.25	4.15	0.26	0.15	32.95	0.16	6.77	1.26	----	0.29	----	30.56
GG-25	5.28	0.26	4.49	0.39	0.13	32.90	0.22	8.22	1.88	0.09	0.37	0.11	28.37
GG-26	5.37	0.35	4.42	0.46	0.13	31.30	0.20	10.78	1.73	0.07	0.23	----	26.93
GG-27	6.00	0.38	7.37	----	0.16	32.55	----	8.99	0.65	----	----	----	30.55
GG-28	4.64	0.29	3.96	0.31	0.13	34.20	0.19	7.82	1.75	0.09	0.41	0.09	27.78
GG-29	5.10	0.42	4.21	0.43	0.12	32.37	0.21	10.88	1.97	0.07	0.25	----	26.29
GG-30	5.14	0.31	4.00	0.38	0.13	32.93	0.22	8.78	2.01	0.09	0.34	0.12	27.41
GG-31	4.77	0.21	4.48	0.32	0.14	34.10	0.20	7.13	1.66	----	0.46	0.12	28.06
GG-35	4.67	0.23	3.94	0.31	0.13	33.74	0.20	7.63	1.70	0.08	0.37	0.08	27.81
GG-37	5.24	0.42	4.45	0.31	0.12	31.27	0.24	10.63	2.16	----	0.57	----	26.37

Çizelge 4.5' in devamı

GG-38	5.07	0.31	4.37	0.44	0.13	33.79	0.18	11.57	1.77	----	0.26	----	26.13
GG-39	4.98	0.29	4.16	0.37	0.14	33.27	0.22	8.44	1.60	0.07	0.32	0.09	28.34
GG-41	5.24	0.33	4.34	0.41	0.13	31.92	0.19	10.70	1.66	----	0.23	----	26.91
GG-52	4.59	0.36	3.86	0.43	0.11	33.07	0.26	10.55	2.63	0.09	0.31	0.09	24.67
GG-53	4.60	0.37	3.84	0.42	0.11	33.34	0.26	10.50	2.68	0.07	0.34	0.10	24.30
GG-54	4.60	0.32	3.89	0.38	0.13	33.77	0.26	9.45	2.38	0.10	0.42	0.12	25.52
GG-55	4.52	0.32	3.84	0.38	0.12	33.87	0.27	9.11	2.54	0.09	0.41	0.13	26.10
GG-56	4.41	0.30	3.98	0.50	0.15	33.95	0.29	9.72	2.71	----	0.47	----	27.33
GG-57	4.92	0.31	4.45	0.45	0.14	33.11	0.26	8.69	2.14	----	0.37	0.11	27.18
GG-58	5.60	0.20	4.63	0.48	0.11	32.68	0.11	8.40	0.93	0.06	0.30	----	29.46
GG-59	4.76	0.40	3.95	0.43	0.12	32.48	0.26	10.69	2.68	0.07	0.30	0.09	25.34
GG-60	4.63	0.34	3.93	0.38	0.13	33.36	0.23	9.71	2.24	0.10	0.36	0.08	25.66
GG-64	4.20	0.27	3.84	0.47	----	33.81	0.31	7.16	2.32	----	0.50	----	28.50
GG-67	4.78	0.38	3.92	0.48	0.13	33.11	0.25	10.56	2.50	0.09	0.32	0.07	25.91
GG-68	5.18	0.41	4.21	0.44	0.13	31.40	0.22	10.79	2.04	0.08	0.24	0.06	26.10
GG-69	5.07	0.43	4.17	0.45	0.13	31.42	0.24	10.85	2.19	0.07	0.25	0.06	26.04
GG-70	4.73	0.20	4.04	0.24	0.15	33.74	0.16	6.67	1.38	0.09	0.36	----	29.06
GG-73	5.09	0.45	4.21	0.46	0.14	32.15	0.23	10.63	2.08	0.09	0.27	0.06	26.25
GG-81	4.84	0.23	4.13	0.29	0.14	32.78	0.17	7.46	1.47	0.08	0.31	0.06	29.42
GG-82	5.51	0.38	4.46	0.44	0.12	31.32	0.21	10.59	1.76	----	0.22	----	27.35
GG-83	5.19	0.30	4.10	0.37	0.14	32.90	0.28	6.25	1.91	----	0.41	0.20	28.50
GG-84	4.61	0.27	3.92	0.34	0.13	34.08	0.24	7.36	1.90	----	0.42	----	28.11
GG-85	4.72	0.22	3.99	0.30	0.13	33.68	0.23	7.40	1.73	0.09	0.40	0.08	27.94
GG-86	4.62	0.24	4.05	0.29	0.14	33.18	0.16	7.59	1.41	0.09	0.32	----	28.87
GG-91	4.97	0.31	4.12	0.41	0.13	33.29	0.21	10.33	1.88	0.09	0.28	0.06	26.04
GG-99	4.75	0.18	4.08	0.26	0.14	33.68	0.14	6.75	1.31	0.10	0.34	----	29.31
GG-100	4.64	0.33	3.86	0.42	0.13	33.90	0.25	10.44	2.53	0.09	0.37	0.08	24.70
GG-101	4.65	0.20	3.94	0.29	0.14	34.48	0.17	5.79	1.57	----	0.47	0.16	28.71

Çalışmada yağ asitlerinin çeşit ve yüzdeleri bakımından bakteri türleri arası benzerlikleri belirlemek amacıyla kümeleme analizi yapılmıştır. Yapılan kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendogram grafiği ve buna bağlı olarak kümeleme analizi sonuçları Şekil 4.14 ve Çizelge 4.6' da verilmiştir. Şekil 4.14 ve Çizelge 4.6 birlikte incelendiğinde; Toplam 51 bakteri türü için genel benzerlik oranı yaklaşık % 45 olarak bulunmuştur. Diğer bir ifade ile ele alınan özellikler bakımından bakteri türleri arasındaki varyasyon yaklaşık % 55 olarak ifade edilebilir. Çizelge 4.6 incelendiğinde; en yüksek benzerlik oranının % 98.08 ile 38 ve 39 nolu türlerde olduğu bunu yaklaşık % 97.85 ile 12 ve 13 nolu strainlerin % 97.33 ile 40 ve 49 nolu türlerin izlediği görülmektedir. Bu kümelerin haricinde; iki türden oluşan diğer kümeler ise [41, 19], [22, 46], [3, 16], [20, 32], [4, 43], [29, 30] ve [28, 50] dir. Bu kümelerin benzerlik oranı yaklaşık % 96.4 ile % 93.5 arasında değişmiştir. Üç türden oluşan kümelerden ise en yüksek benzerlik oranı % 93.32 ile (18, 22, 46) türlerinden oluşan kümede gözlenirken, bunu % 92.67 ile (4, 26, 43), % 92.57 ile (5, 11, 25) ve (27, 28, 50) kümeleri izlemiştir.

1, 31, 17 ve 2 nolu türler dışındaki diğer türlerden oluşan kümeye 47 bakteri türü dahil olmuş olup, bu kümedeki benzerlik oranı yaklaşık % 83 olarak bulunmuştur. Bu kümeye 1 nolu bakteri türünün katılması ile benzerlik oranı % 80.53' e, 31 nolu bakteri türünün katılması ile % 75.23' e, 17 nolu bakteri türünün katılması ile % 58.11' e ve son olarak 2 nolu bakteri türünün katılması ile % 45.46 ya düşmüştür. 47 türden oluşan küme ile birlikte; 1, 31, 17 ve 2 nolu türler 5 küme oluşturmuştur. Ancak, 1, 31, 17 ve 2 nolu türler dışındaki diğer küme benzerlik oranına göre kendi içerisinde istenilen sayıda alt kümeler olarak değerlendirilebilir. Mesela; 3, 16, 4, 43, 26, 38, 39, 19, 41, 23, 48, 9, 35, 29, 30, 27, 28, 50, 12, 13, 34, 37, 10 ve 6 bir küme; 5, 25, 11, 18, 22, 46, 45, 36, 21 bir küme ve 40, 49, 42, 47, 7, 20, 32, 51, 14, 44, 24, 8, 15 ve 15 te bir küme olarak alındığında 3 alt küme olarak değerlendirilebilir. Bu kümelere tek türden oluşan kümeler de eklendiğinde 7 küme olarak değerlendirilebilir.

**Çizelge 4.6.** *Erwinia amylovora* strainleri için kümeleme analizi sonuçları

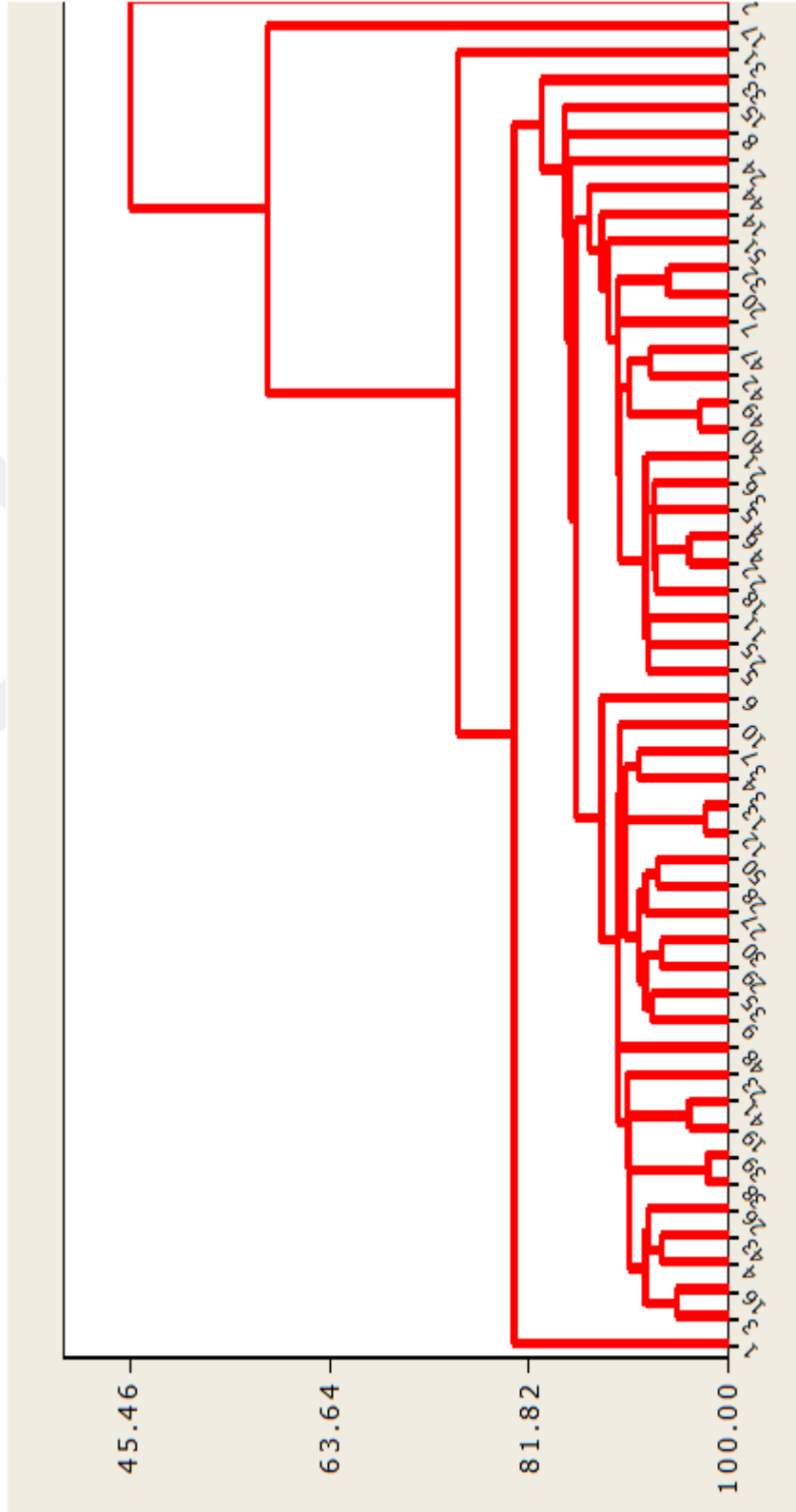
Adım	Küme Sayısı	Benzerlik	Uzaklık	Birleşen	Küme	Yeni Küme	Kümedeki Çeşit Sayısı
1	50	98.0788	0.23259	38	39	38	2
2	49	97.8524	0.26000	12	13	12	2
3	48	97.3388	0.32218	40	49	40	2
4	47	96.3844	0.43772	19	41	19	2
5	46	96.3525	0.44159	22	46	22	2
6	45	95.2149	0.57931	3	16	3	2
7	44	94.5534	0.65939	20	32	20	2
8	43	93.9980	0.72664	4	43	4	2
9	42	93.8731	0.74175	29	30	29	2
10	41	93.5118	0.78549	28	50	28	2
11	40	93.3181	0.80895	18	22	18	3
12	39	93.2485	0.81737	18	45	18	4
13	38	93.2303	0.81957	18	38	18	5
14	37	92.9780	0.85012	9	35	9	2
15	36	92.7561	0.87698	42	47	42	2
16	35	92.6709	0.88730	4	26	4	3
17	34	92.6217	0.89325	5	25	5	2
18	33	92.5747	0.89894	5	11	5	3
19	32	92.4607	0.91274	18	21	18	6
20	31	92.4345	0.91591	27	28	27	3
21	30	92.3520	0.92590	5	18	5	9
22	29	92.3373	0.92769	3	4	3	5
23	28	92.3244	0.92925	9	29	9	4
24	27	91.8218	0.99010	9	27	9	7
25	26	91.8022	0.99247	34	37	34	2
26	25	90.8560	1.10702	3	38	3	7
27	24	90.8065	1.11301	40	42	40	4
28	23	90.8035	1.11337	3	19	3	9
29	22	90.7518	1.11964	3	23	3	10
30	21	90.5327	1.14617	12	34	12	4
31	20	90.4866	1.15174	9	12	9	11
32	19	90.1657	1.19059	9	10	9	12
33	18	90.1201	1.19612	5	40	5	13
34	17	90.0194	1.20830	3	48	3	11
35	16	89.9938	1.21140	3	9	3	23
36	15	89.9809	1.21297	5	7	5	14
37	14	89.8583	1.22780	5	20	5	16
38	13	88.9919	1.33270	5	51	5	17
39	12	88.4874	1.39377	3	6	3	24
40	11	88.3277	1.41312	5	14	5	18
41	10	87.3097	1.53636	5	44	5	19

Çizelge 4.6 'nin devamı

42	9	86.1557	1.67607	3	5	3	43
43	8	85.5059	1.75474	3	24	3	44
44	7	85.1430	1.79867	3	8	3	45
45	6	85.0366	1.81155	3	15	3	46
46	5	82.9954	2.05866	3	33	3	47
47	4	80.5278	2.35741	1	3	1	48
48	3	75.2346	2.99823	1	31	1	49
49	2	58.1080	5.0718	1	17	1	50
50	1	45.4641	6.60241	1	2	1	51

\*; **1.**GG-3, **2.** GG-6, **3.** GG-7, **4.** GG-8, **5.** GG-10, **6.** GG-11, **7.** GG-15, **8.** GG-17, **9.** GG-19, **10.** GG-20, **11.** GG-21, **12.** GG-22, **13.** GG-23, **14.** GG-24, **15.** GG-25, **16.** GG-26, **17.** GG-27, **18.** GG-28, **19.** GG-29, **20.** GG-30, **21.** GG-31, **22.** GG-35, **23.** GG-37, **24.** GG-38, **25.** GG-39, **26.** GG-41, **27.** GG-52, **28.** GG-53, **29.** GG-54, **30.** GG-55, **31.** GG-56, **32.** GG-57, **33.** GG-58, **34.** GG-59, **35.** GG-60, **36.** GG-64, **37.** GG-67, **38.** GG-68, **39.** GG-69, **40.** GG-70, **41.** GG-73, **42.** GG-81, **43.** GG-82, **44.** GG-83, **45.** GG-84, **46.** GG-85, **47.** GG-86, **48.** GG-91, **49.** GG-99, **50.** GG-100, **51.** GG-101

Şekil 4.14. *Erwinia amylovora* strainleri için kümeleme analizi dendogramı



#### 4.8. Tartışma

*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.*'ın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı armut, elma, ayva, hurma ve yenidünya gibi yumuşak çekirdekli meyve türlerinin şüphesiz en eski, en ciddi ve en tahripkar hastalığıdır. Literatür taramalarına göre *E.amylovora*'nın birçok ülkede ekonomik kayıplara neden olan önemli bir patojen olduğu rapor edilmiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinde hastalığı belirlemek için çeşitli çalışmalar yürütülmüş ve elma ile armutta patojen oldukları saptanmıştır (Öktem ve Benlioğlu, 1988; Tokgönül, 1990; Momol et al., 1992; Demir ve ark., 1993; Baştaş ve Katırcıoğlu, 1998; Yahyaoğlu, 1998; Mirik, 2000; Atasağun, 2009). Patojenin, elverişli şartlarda bitkideki ilerleyişi çok hızlıdır. Patojen, konukçu bitkinin çiçek tomurcuklarında, sürgünlerinde, ana dallarında ve gövdesinde yaptığı enfeksiyon ile bitkiyi hastalandırarak kısa sürede, çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Bozan, 2011).

Dünya ülkelerinde, yoğun bir şekilde ve en yeni teknolojik gelişmeler ışığında hastalıkla mücadele olanakları aranmaktadır. Hastalığa karşı kesin çözüm sağlayacak yöntem tespit edilinceye kadar hastalık etmeninin hızlı, güvenilir ve erken dönemde tanı ve tespitlerinin yapılması önemlidir. Etmenin erken ve hızlı tanısının ve tespitinin yapılması sonucunda ise yapılacak erken mücadele ile hastalığın zararı en aza indirilecek, böylece ürün kayıplarında azalmalar olduğu görülecektir.

Günümüze kadar patojenlerin tanısı ve tespiti için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında; seçici ve yarı seçici besi ortamı kullanılarak morfolojik açıdan patojenin karakterizasyonu, çeşitli serolojik testler (ELISA, Aglütinasyon testi vb.), fizyolojik ve biyokimyasal testler, yağ asiti metil ester (FAME) analizi, polimeraz zincir reaksiyonu gibi yöntemler yer almaktadır. Araştırmacılar tarafından bu yöntemler kullanılarak *E.amylovora* patojeninin tanısı yapılmış ve karakterizasyonu sağlanmıştır (Gorris et al., 1996; Aysan ve ark., 2004; Bozan, 2011). Bu tez çalışmasında izole edilen bakteri strainlerinin morfolojik ve biyokimyasal karakterleri belirlenmiştir. Elde edilen *E.amylovora* strainlerine biyokimyasal karakterlerden amilaz, katalaz, oksidaz, 36°C' de gelişim, gram reaksiyon ve levan koloni oluşturma testleri uygulanmıştır. Bakteriyel strainlerin NA üzerinde oluşturduğu koloni rengi ve şekli, hareketlilik



özellikleri tespit edilmiştir. Çalışmada moleküler tekniklerden yağ asiti metil ester (FAME) analizi yapılarak bakterilerin yağ asit profilleri elde edilmiştir. Saf olarak elde edilen strainlerin patojenisiteleri, hassas Deveci armut çeşitinde tamamlanan Koch Postülatları ve tütün üzerinde yapılan HR testleri ile belirlenmiştir. Ayrıca strainlerin patojenisitesinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan metotlardan birisi olan ham armut testi yapılmıştır.

Ivanović et al (2011), Karadağ ve Sırbistan'da, 13 lokasyonda yetiştirilen 8 bitki türünden elde edilen 41 *E.amylovora* strainini tanılamada yağ asit analizini kullanmışlardır. Bütün strainlerin 14:0 3OH yağ asitini ihtiva ettiğini tespit etmişlerdir. 39 straini yağ asit kompozisyonuna göre veri tabanında ilk seçenek olarak *E.amylovora* şeklinde tanımlamışlardır. Çalıştıkları yağ asit analizi Sırbistan'dan elde edilen *E.amylovora* popülasyonunun  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olarak belirtilen üç gruba ayrıldığını göstermiştir. Bu çalışmada yapılan yağ asit analizi sonucunda strainlerde ortak olarak bulunan yağ asitleri ise 12:0, 13:0, 14:0, 14:0 2OH, 16:1 w5c, 16:0, 17:1 w8c, 17:0 CYCLO, 17:0, 18:1 w5c, 18:0, 19:0, Sum In Feature 3 olarak belirlenmiştir. Yağ asit kompozisyonundaki değişikliğin besiyerinde geliştirilen hücrelerin fizyolojik dönemi ve kromatografi cihazının hassasiyetine bağlı olarak farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

Casano et al (2008), bakteri hücrelerindeki yağ asit kompozisyonuna besi yerlerinin etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla *E.amylovora*'nın 20 strainini TSA'da 3 gün 27°C'de ve 3 strainini NA, KB, GYCA ve TSA'da 1, 3 ve 6 gün geliştirmişlerdir. Bu bakterilere ait total hücre yağ asitlerini gaz kromatografisi ile analiz etmişlerdir. TSA ve NA'da 3 *E.amylovora* straininin doymuş tek karbonlu ve cyclic asitleri, KB ve GYCA üzerinde gelişenlerden daha yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmada bakterilerin stok kültürlerinin geliştirilmesinde NA, yağ asit kompozisyonlarının belirlenmesinde ise TSA besiyeri kullanılmış, farklı besi ortamlarının etkisi değerlendirilmemiştir.

Zwet and Wells (1993), Kıbrıs, Bulgaristan ve Yugoslavya'dan elde edilen *E.amylovora* izolatlarının tanısında yağ asit analizinin başarılı bir şekilde kullanıldığını tespit etmişlerdir. *E.amylovora* için yağ asit profil kütüphanesi 143 bakteri strainine bağlı olarak oluşturulmuştur. Analiz için *E.amylovora*'nın 3 strainini 4 farklı

besiyerinde (GYCA, KB, NA ve TSA) 1, 3 ve 6 gün süreyle 27°C' de inkübe etmişlerdir. Bakterilerin yağ asit profiline göre tanısında TSA besiyerinde 3 günlük inkübasyonun en uygun ortam olduğunu belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında farklı inkübasyon sürelerinin bakterilerin yağ asitlerine etkisi araştırılmamıştır. *E.amylovora* strainleri TSA' da 2 gün geliştirildikten sonra yağ asit ekstraksiyonları yapılmıştır ki Zwet and Wells (1993), çalışmasında TSA besiyerinin analiz için en uygun ortam olduğunu belirtmiştir.

Gorris et al (1996), *E.amylovora* izolasyonunu yaptıktan sonra yağ asit profillerine dayanan moleküler teknikle patojenin karakterizasyonunu sağlamışlardır. Zwet et al (1987), 10 ülke ve 5 eyalette farklı Rosaceous bitkilerinden 143 *E.amylovora* straini elde etmişlerdir. İzolatları agar ilave edilen TSB'de geliştirmişler, bakterinin hücre yağ asitlerini gaz sıvı kromatografisi ile tespit etmişlerdir. Bakterilerin yağ asit pikleri tanımlandığında 12:0, 14:0 ve 16:0 düz zincirli yağ asiti, 16:1 ve 18:1 doymamış yağ asitleri ve 14:0 3OH ve 17:0 cyclopropane yağ asitleri en yüksek oranda bulunmuştur. Daha düşük oranlarda ise 15:0, 17:0 ve 18:0 düz zincirli yağ asitleri belirlenmiştir. Total yağ asitlerinin % 1' inin doymuş tek karbonlu yağ asitleri, % 9' unu hidroksisubstituted zincirli yağ asitleri, % 10' unun cyclic asitler, % 28' inin doymamış yağ asitleri ve yaklaşık % 49' unu doymuş çift karbonlu zincirli asitler olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada daha fazla yağ asiti belirlenmiştir, yağ asiti profillerindeki bu farklılığın sıcaklık ve beslenme ortamı gibi farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen strainlerin tamamı yağ asit profillerinin analizleri sonucunda, tür seviyesinde tanımlanmıştır. Yağ asit analizlerine göre yapılan tanıda strainler % 45-82 benzerlik oranıyla *E.amylovora* olarak saptanmıştır. Bakteriyel strainlerin yağ asiti çeşitleri ve yüzdeleri bakımından farklılıklara sahip olduğu görülmüştür. Yapılan analizler sonucunda *E.amylovora* strainlerinin 10:0, 11:0, 12:0, 11:0 3OH, 13:0, 12:0 2OH, 12:0 3OH, 14:0, Sum In Feature 1, 13:0 2OH, 15:1 w8c, 15:1 w6c, 15:1 w5c, 15:0 ISO, 15:0 ANTEISO, 15:0, 14:0 2OH, Sum In Feature 2, 16:0 ISO, Sum In Feature 3, 16:1 w5c, 16:0, 15:0 3OH, 17:0 ISO, 17:0 ANTEISO, 17:1 w8c, 17:0 CYCLO, 17:0, Sum In Feature 5, 18:1 w9c, Sum In Feature 8, 18:1 w5c, 18:0, 17:0 3OH, 19:0 ISO, Sum In Feature 7, 19:0 CYCLO w8c, 19:0, 18:1 2OH, olmak üzere 39 farklı yağ asiti içerdikleri saptanmıştır.

Psallidas ve Dimova (1986), armut elma ve alıçtan elde ettikleri 10 tane *E.amylovora* izolatının morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve serolojik testlerle karakterizasyonunu sağlamışlardır. *E.amylovora* izolatlarının ham armut dilimleri üzerinde ilk önce nekrotik lezyon daha sonra bakteriyel akıntı oluşturduğu saptanmıştır. Van der Zwet (1986), Mısır'da farklı bölgelerden alınan izolatlara ham armut testi yapmıştır. Ham armutların yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra, 10 mm kalınlığında kesmiş ve bir öze dolusu bakteri ile bulaştırmıştır. 26°C' de 1-2 haftalık inkübasyon sonunda ham armut dilimlerinde bakteriyel akıntı gözlemlenmiştir. Ünlü ve Basım (2002), Türkiye' nin farklı coğrafik bölgelerinden elde ettikleri enfekteli bitki materyallerinden izole edilen patojenlerin tanısında ham armut, tütünde hipersensitif reaksiyon ve sürgün inokulasyonları testlerini içeren patojenisite testleri yapmışlardır. Aysan ve ark (2004), ateş yanıklığı hastalığının Ege ve Marmara bölgelerinde dağılımını belirlemek amacıyla, 2003 yılında çeşitli araştırmalar yapmışlardır. Çalışmalarında *E.amylovora* izolatlarının tütünde hipersensitif reaksiyon testi ve ham armut dilimlerinde yapılan patojenisite testlerinin pozitif sonuç verdiğini kaydetmişlerdir. Marutescu et al (2008), *E.amylovora*' nın tütünde hipersensitif reaksiyon testinde pozitif sonuç bulmuşlardır. Tunalı (2013), *E.amylovora* izolatlarının patojenitesi için ham armut testi yapmış ve bakteriyel akıntı oluşumunu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada saf olarak elde edilen strainlerin patojenisiteleri, hassas Deveci armut çeşitinde tamamlanan Koch Postülatları ve tütün üzerinde yapılan HR testleri ile belirlenmiştir. Ayrıca strainlerin patojenisitesinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan metotlardan birisi olan ham armut testi yapılmıştır. Tütünde HR testi pozitif bulunmuş, ham armut testinde ise *E.amylovora* için karakteristik olan bakteriyel eksudat oluşumu gözlenmiştir. Sonuçların diğer araştırmacıların elde ettiği bulgularla paralellik gösterdiği görülmüştür.

Benlioğlu ve Özakman (1998), tarafından yapılan Ateş Yanıklık Hastalığı ile ilgili survey çalışmalarında hastalığın armut, ayva ve muşmula ağaçlarında şiddetli düzeyde olduğu, fakat elma ve yenedünyada düşük seviyede olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar tarafından surveyler boyunca Türkiye' nin yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan 27 değişik alanında yetişen hastalıklı elma, ayva, armut, muşmula ve yenedünya' dan *E.amylovora*' ya ait 56 patojenik ırk izole edilmiştir. Bu 56 Türkiye

izolatının NSA' da ve selektif ortamlarda (CCI, TTN ve MMS) koloni morfolojisi ve bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Geider (2000), NSA besi yerinde meydana gelen mukoid levan koloni oluşumunun *E.amylovora*' nın tanımlanmasına olanak sağladığını Agrios (1997), ise *E.amylovora*' nın sakkaroz içeren besi ortamlarında kubbemsi koloniler oluşturan, birçok şeker, organik asit ve şeker alkollerini karbon kaynağı olarak kullanabilen bir bakteri olduğu belirtmektedir. Marutescu et al (2008), *E.amylovora*' nın izolasyonu ve tanımlanmasında SNA (sakkaroz nutrient agar) ve King's B besi ortamlarını kullanmışlardır. SNA besi yerinde 450 izolatın levan tip koloniye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Aysan ve ark (2004), çalışmalarında elde ettikleri *E.amylovora* izolatlarının gram negatif, non-fluoresent ve sakkaroz nutrient agarda levan tip koloni oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Aktepe (2012), Türkiye' nin farklı yerlerinden izole ettiği *E.amylovora* strainlerinin NSA besi yerinde 3-5 mm çapında kubbemsi, parlak, krem renkte, mukoid, levan tip koloniler şeklinde gelişim gösterdiğini tespit etmiştir. Tunalı (2013), *E.amylovora*' nın izolasyonunda yarı seçici besi ortamı SNA (Sakkaroz Nutrient Agar) kullanılmıştır. Besi ortamında 27°C' de 48 saat inkübasyondan sonra, ortamda fazla miktarda sakkarozun bulunmasının bakterinin gelişimini olumlu yönde etkilediğini belirtmiş, bakterilerde yoğun ekstra polisakkarit üretiminden kaynaklanan levan ve kubbemsi bakteri morfolojisini pozitif olarak değerlendirmiştir. Bu çalışmada elde edilen 51 *E.amylovora* straini NA besi ortamına % 5 oranında sukroz eklenerek hazırlanan besi yerine inoküle edilmiş ve parlak, merkezden kabarık, kubbemsi, krem renkli koloniler meydana getirdiği görülmüştür. Sonuçlar daha önce yapılan çalışmalardaki bulguları destekler nitelikte bulunmuştur.

Ünlü ve Basım (2002), Türkiye' nin farklı coğrafik bölgelerinden elde ettikleri enfekteli bitki materyallerinden izole edilen patojenlerin kimyasal olarak tanımlanmasında katalaz testi, oksidaz testi, nitrattan nitrit üretimi testi, aseton oluşumu testi, indol üretimi testi, hidrojen sülfid testi, nişastanın parçalanması testi, sakkarozdan indirgenen maddeler testi, sıcaklığa hassasiyet testi, % 5 NaCl' ye tolerans testi, pektinaz aktivitesi testi, King's B besi ortamının kullanımı, KOH testi ve jelatinin hidrolizi testini uygulamışlardır. Elde edilen sonuçların da Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ile paralellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Atasağun (2009), 2006 ve 2007 yıllarında Konya ilinde Rosaceae familyasına ait farklı konukçulardan ve bu konukçuların farklı

çeşitlerinden bakteriyel izolasyonlar yapmış, *E.amylovora*'nın teşhisinde, NSA ve King B besi yerlerinde gelişim, oksidatif/fermentatif test, 36°C' de gelişim, levan üretimi, sakkarozdan indirgenen bileşikler, asetoin üretimi, jelatinin sıvılaştırılması, nişasta, maltoz, inulin, gliserol ve mannitol, sorbitol 'den asit üretimi, ureaz aktivitesi, indol oluşumu, esculinin hidrolizi ve tütünde hipersensitif reaksiyon testlerini esas almıştır. Aktepe (2012), Türkiye'nin farklı yerlerinden izole ettiği *E.amylovora* strainlerinin tanısında yaptığı oksidaz testinde ateş yanıklığı izolatlarının Cytochrome C oxydase enzimi aktive etmedikleri için mavi renk oluşturmadıklarını, oksidaz reaksiyonun negatif sonuç verdiğini saptamıştır. Tunalı (2013), 136 adet *E.amylovora* izolatına ait kolonileri 30 µl % 3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ile karıştırmış, gaz çıkışı gözlemlemiş ve izolatların tümünü katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Oksidaz testi için bakteri kültürünü oksidaz test solüsyonu emdirilmiş filtre kâğıdına sürmüş, 136 adet *E.amylovora* straininin renk değişimi oluşturmadığını bundan dolayı oksidaz negatif reaksiyon gösterdiğini tespit etmiştir. KOH İle gram reaksiyon testi için bakteri strainlerinden öze ile alarak bir lam üzerinde % 3'lük KOH çözeltisi ile karıştırmış, strainlerin vizkoz bir uzama gösterdiğini gram negatif özellikte olduğunu saptamıştır. Ayrıca 136 adet *E.amylovora* izolatının 36°C' de gelişim göstermediğini tespit etmiş ve sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasında izole edilen bakteri strainlerinin morfolojik ve biyokimyasal karakterleri belirlenmiştir. Elde edilen *E.amylovora* strainlerine biyokimyasal karakterlerden amilaz, katalaz, oksidaz, 36°C' de gelişim, gram reaksiyon ve levan koloni oluşturma testleri uygulanmıştır. Bakteriyel strainlerin NA üzerinde oluşturduğu koloni rengi ve şekli, hareketlilik özellikleri tespit edilmiştir. Strainlerin biyokimyasal özelliklerinden gram reaksiyon, 36°C' de gelişim, amilaz, oksidaz test sonuçları negatif, katalaz testi ise pozitif bulunmuştur ki daha önce yapılan çalışmalarda da bu testlerde aynı sonuçların alındığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi çalışmamızda elde edilen sonuçlar saptanan bulguları desteklemektedir. Tanıda birden fazla metodun bir arada kullanılmasının sonuçların güvenilirliğini artırdığı ve bir metotla tespit edilemeyen özelliğin diğeriyle belirlenmesini sağladığı görülmüştür.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemiz konumu itibari ile birçok tarım ürününün doğal yetişme alanıdır. Meyvecilikte ikinci sırada yumuşak çekirdekli meyveler yer almaktadır. Bu meyveler içinde en çok yetiştiriciliği yapılan ve tüketilen meyveler ise elma ve armuttur. Türkiye'nin hemen her bölgesinde bu meyvelere ait farklı çeşitlerin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yumuşak çekirdekli meyvelerde verim ve kaliteyi etkileyen unsurlar içerisinde hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır. Ülkemiz ve dünya genelinde yapılan surveyler sonucunda, yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerde çeşitli yaygınlık oranlarında Ateş Yanıklığı tespit edilmiş olup hastalık birçok yerde ciddi boyutlara ulaşmış durumdadır. Yapılan arazi incelemeleri göstermektedir ki; pek çok üretici yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinden vazgeçer duruma gelmiştir. Bu da bizi özellikle bazı yerli armut ve elma çeşitlerimizi kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya bırakmaktadır. Bu nedenle üretim alanında hastalık etmenleri ne kadar kısa sürede tanılanırsa o kadar hızlı bir şekilde hastalık etmeniyle mücadele işlemlerine başlanabilir. Bu şekilde hastalığın vereceği ekonomik kayıp en aza indirilebilir. Bu çalışmada Iğdır ilinde ateş yanıklığı semptomu gösteren elma örneklerinden toplam 84 adet bakteri straini elde edilmiştir. Yapılan biyokimyasal, morfolojik, moleküler ve patojenisite testleri sonucunda bakteriyel strainlerden 51 adedi *E.amylovora* olarak tanılanmıştır.

Tüm bitki hastalıklarıyla mücadelede olduğu gibi ateş yanıklığı hastalığı ile mücadelede de temiz üretim materyali kullanımı alınacak ilk önlemlerden biridir. Özellikle yeni bahçe kurulması esnasında büyük önemi olan bu işlem sayesinde, dışarıdan bulaşmalar oluncaya kadar hastalığın etkili mücadelesi sağlanır. Üretim alanında bitkiyi sağlıklı yetiştirebilmek, dayanıklı anaç ve çeşit seçimi, dengeli gübreleme, böcek mücadelesi, erken uyarı ve tahmin modellerini bölgesel olarak geliştirerek bahar aylarında koruyucu bakır uygulamaları, biyolojik mücadele preparatlarından faydalanma, kuru dalların budanması ve budama esnasında makasların dezenfeksiyonu mücadele açısından önemli uygulamalardır.

Hastalıkla mücadelede, hastalığın bulaşma yolları, sağlıklı bitki yetiştirme yöntemleri, fiziksel, biyolojik ve kimyasal mücadele olanakları dikkate alınarak çok yönlü bir mücadele programı düşünülmelidir.

## KAYNAKLAR

- Agrios, G, N., 1997. Plant Pathology, Second Edition. *Academic Pres*, New York, London, 703:426-429.
- Aktepe, B.P., 2012. Yenedünya çeşitlerinin ateş yanıklığı hastalığına duyarlılıklarının belirlenmesi. *Bitki Koruma Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.*
- Alay, A., 1997. Ilıman iklim meyveleri ve organik tarım çalışma grubu. *Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Meyveler Sempozyumu Bildirileri, s99-106 2-5 Eylül 1997.Yalova.*
- Aldwinckle, H. S., Jones, A.L., 1990. Compedium of apple and pear diseases. *The American Phytopatological Society*, 33 Ho Pilot Knob Rod St. Paul P:100.
- Anonim.,2014a.<http://www.msstate.edu/Entomology/planthpath/fruit/pome/pomeinfo.html>. (Erişim tarihi: 10.12.2014)
- Anonim.,2014b.Classification of Genera, <http://www.bacterio.net/-classificationdl.html> #Erwinia (Erişim tarihi: 04.11.2014).
- Anonim., 2016a. <http://www.tarim.gov.tr>. (Erişim tarihi: 20.03.2016)
- Arnaud-Santana, E., Coyne D. P., Eskridge K. M., Vidaver A. K., 1994. Inheritance; Low correlations of leaf, pod and seed reactions to common blight disease in common beans; and implification for selection. *Journal of the American Society for Horticultural Science.*, 119 (1), 116-121.
- Arnaud-Santana, E., Mmbaga M. T., Coyne D. P., Steadman J. R., 1993. Source of resistance to common bacterial blight and rust in elite phaseolus vulgaris L. germplasm. *HortScience*, 28 (6), 644-646.
- Arsenijevic, M., Panic, M., 1992. First appearance of fire blight, caused by *erwinia amylovora* on quinces and pear in Yugoslavia. *Plant Disease* Vol:76(12):1283.
- Arsenijevic, M., Panic, M., Antonijeovic, D., 1991. Fire blight of pome fruit trees in Yugoslavia. *Zastita Bilja* Vol:42(2):87-97.

- Atasağun R., 2009. Rosaceae familyasındaki farklı bitki türlerinden elde edilen *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.'nin biyokimyasal ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleriyle tanınması. **Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, s93.**
- Atthowe, H., Gilkeson A. L., Kite L. P., Michalak P. S., Pleasant B., Reich L., Scheider A. F., 1992. **The Organic Gardener's Handbook of Natural Insect and Disease Control.** St. Martin's Press,p187.
- Baker, K. F., Cook R. J., 1974. **Biological control of plant pathogens.** W. H. Freeman and Company, San Francisco, p433.
- Barionovi, D., Giorgi, S., Stoeger, A.R., Ruppitsch, W., Scortichini, M., 2006. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using Repetitive-Sequences PCR analysis, and Restriction Fragment Length Polymorphism and Short-Sequence DNA Repeats of plasmid pEA29. **Journal of Applied Microbiology**, vol.100, p. 1084-1094.
- Basım, H., Basım, E., Yeğen, O., Ünlü, A., Yılmaz, S., 2004. Türkiye'deki *Erwinia amylovora* strainlerinin moleküler karakterizasyonu, **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi**, 8-10 Eylül, 145, Samsun.
- Baştaş, K. K., Saygılı, H., 2008. Ateş yanıklığı hastalığı, fire blight, *Erwinia amylovora*. **Bitki Bakteri Hastalıkları Kitabı S: 61-68** (Editörler: Saygılı, H., Şahin, F., ve Aysan, Y.).
- Baştaş, K. K., Katırcıoğlu, Y. Z., 1998. Studies on fire blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) on pome fruit trees in Konya province in Turkey. Eight International Workshop On Fire Blight. **ISHS Acta Horticulture** 489.
- Bellis, P.D., Schena, L., Cariddi, C., 2007. Real-Time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. **European Journal of Plant Pathology**., 118:11–22.
- Benlioğlu, K., Özakman, M., 1998. Characterization of Turkish isolates of *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. **Eight International Workshop On Fire Blight**. 12-15 October, 127-131 pp., Kuşadası, Turkey.



- Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmuller, I., Geider, K., 1995. Identification of the Fire Blight Pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with Chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.61, no.7, p. 2636- 2642.
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., Geider, K., 1992. Sensitive and species-detection of *Erwinia amylovora* by Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.58, no.11, p.3522-3526.
- Bobev, S., Garbeva, P., Crepel, C., Maes, M., Hauben, L., 1998. Fire blight in Bulgaria- Characteristics of *E. amylovora* isolates. *Eighth International Workshop on Fire Blight*. 12-15 October, 121-126 pp., Kuşadası, Turkey.
- Bora, T., Özaktan H., 1998. *Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş*. Prizma Matbaası, s205.
- Bozan, G., 2011. Ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora'* nın LNA probe kullanılarak kantitatif real-time PCR ile tanısı ve tespiti. *Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Antalya, s110*.
- Buyer, S. J., Drinkwater L. E., 1997. Comparison of substrate utilization assay and fatty acid analysis of soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 30, 3-11.
- Casano, F., Wells, J., Zwet, T. Van. Der., 2008. Fatty Acid Profiles of *Erwinia amylovora* as influenced by growth medium, physiological age and experimental conditions. *Journal of Phytopathology*. 10.1111/j.1439-0434.1988.tb04453.x
- Chase, A. R., Stall R. E., Hodge, N. C., Jones J. B., 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analyses. *Phytopathology*, 82 (7), 754-759.
- Chet, I., Barak Z., Oppenheim A., 1993. Genetic engineering of microorganism for improved biocontrol activity. *Biotechnology in Plant Disease Control (Ed., J. Wiley)*, New York, p397.

- Colin, J. E., 1988. Antagonism between fluorescent pseudomonas species and several pathovars of pseudomonas syringae. application as a method of controlling bacterial speck of tomato. **Bulletion OEPP**, 18 (1), 47-54.
- Crepel,C., Daemen, E., Deckeres, T., Maes, M., 1998. Monitoring of the epiphytic population of the fire blight pathojen *E. amylovora* in pear orchard for preventive control. **Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent.**, 63/4b:1717-1719.
- Çetin Ş., 2014. *Erwinia amylovora* enfeksiyonu sonucu farklı elma, armut ve ayva çeşitlerindeki konukçu protein miktarlarının belirlenmesi. **Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, s71.**
- Çınar, Ö., 1988. Bakteriyoloji. **Çukurova Üniv. Zir. Fak. Ders Kitabı** No: 69, Adana, s184
- Çıtır, A., 1989. Türkiye'deki meyve bahçelerinin davetsiz misafiri yumusak çekirdekli meyve ağaçlarında, *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.'nın neden olduğu ates yanıklığı hastalığı. **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tokat Ziraat Fakültesi Dergisi** Cilt :5 (1) S:251-256.
- Çıtır, A., Özer Z., 1997. Fitopatoloji. **Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ders Notları Serisi**, s186.
- Demir, G., Gündoğdu, M., 1992. Fire blight of pome fruit trees in Turkey. **Sixth International Workshop On Fire Blight**. Ishs P: 37-39.
- Demir, G., Gündoğdu, M., 1991. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında görülen ates yanıklığı (*Erwinia amylovora* (burr.) Winslow et al.) hastalığı üzerinde araştırmalar. **6. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri**, s 299.
- Döken, M. T., Demirci E., Zengin H., 2000. Fitopatoloji. **Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 729, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 314, Ders Kitapları Serisi No: 66**, s256.
- Dönmez, M. F., 2004. Erzurum ve Erzincan illerinde fasulye bitkisinde görülen bakteriyel hastalık etmenlerinin tanılanması ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*' ye karşı çeşitli fasulye

- genotip/varyetelerinin duyarlılıklarının belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, s297.
- Erkan, S., 1983. Bakteriyofajlar ve bitki koruma alanında kullanılmaları. *Ege Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 143-157.
- Evrenosoğlu, Y., Mısırlı, A., Aysan, Y., Saygılı, H., Boztepe, Ö., Horuz, S., Acarsoy, N., Bilen, E., Baykul, A., Yazıcı, İ., 2014. F1 melez armut popülasyonunun ateş yanıklığı hastalığı etmeni *Erwinia amylovora* karşı reaksiyonunun belirlenmesi, *Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2014, 51 (2):185-190 ISSN 1018 – 8851.
- Fahy, P. C., Persley G. J., 1983. Plant bacteria diseases, A diagnostic guide. *Academic Pres, New York*, pp:393.
- Fang, C., Radosevich M., Fuhrmann, J. J., 2001. Characterization of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using fame and biyolog analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol:33, Issues:4-5, 679-682.
- FAOstat, 2012. Food and Agricultural Organization of United Nations: Economic and Social Department: *The Statistical Devision*.
- Fravel, D. R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of the plant disease, *Phytopathology*, 26, 75-91.
- Geider, K., 2000. Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. J.L. Vanneste, *Fire Blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. pp. 117-140. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Goldberg, N. P., 2000. *Apple disease control*. <http://www.cahe.nmsuedu/pubs/h/h-317.html>.
- Gorris, M., Cambra, P., Liop, P., Lopez, M., Lecomte, P., Chartier, R., Paulin, J. P., 1996. A sensitive and spesific detection of *Erwinia amylovora* based on the Elisa-Dasi enrichment method with monoclonol antibodies. *Acta Horticulturae*, 411: 41-46.

- Gottsberger, R. A., 2010. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Applied Microbiology*, 51: 285-292.
- Guilford, P.J., Taylor, R.K., Clark, R.G., Hale, J.N., Forster, R.L.S., 1996. PCR based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 411: 53-56.
- Güven, Y., Mısırlı, A., 2003, Armut ateş yanıklığı ve dayanıklılık ıslahı, *Ege Üniversitesi. Ziraat Fakültesi. Dergisi.*, 2003, 40 (3):25-32 ISSN 1018-8851.
- Hacıoğlu, E., 1993. *Erwinia amylovora'* ya karşı in vitro ve in vivo koşullarda bazı kimyasalların bitki ekstraktlarının ve antagonistlerin etkileri. *Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Antalya, s81.*
- Hepaksoy, S., Ünal, A., Can, H. Z., Saygılı, H., Türküsay, H., 1998. Distribution of Fire blight (*Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al.) diseases in western anatolia region in Turkey. *Eight International Workshop On Fire Blight*. 12-15 October, 193-195 pp., Kuşadası, Turkey.
- Hoitink, H. A. J., Fahy P. C., 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. *Phytopathology*, 24, 93-114.
- Holmes, B., Costas M., Ganner M., On S. L. W., Stevens M., 1994. Evaluation of biolog system for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (8), 1970-1975.
- Howell, C. R., Stipanovic, R. D., 1993. Suppression of pythium ultimum induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* pf-s and its antibiotic. *Phytopathology*, 70, 712-715.
- Hristova, P. K., Atanasova, I., Dousset, X., Moncheva, P., 2006. Multiplex PCR Israel. *Plant Disease* Vol:70 (11):1071-1073.
- Ivanović M., K. Gašić, A. Obradović, E. Dickstein, J.B. Jones, V. Gavrilović, J. Bala., 2011. Identification and differentiation of *Erwinia amylovora* using fatty acid analysis and biolog. DOI: 10.17660/ ActaHortic.2011.896.6. *ISHS Acta Horticulturae 896: XII International Workshop on Fire Blight*.

- Jones, A.L., Aldwinckle, H.S., 1991. Compendium of Apple and Pear Diseases. APS Press, *The American Phytopathological Society*, 61-66.
- Kado, C. I., 2010. Plant Bacteriology. *The American Phytopathological Society. Minnesota U.S.A.*, p336.
- Karaca, İ., 1977. *Fitobakteriyoloji ve Bakteriyel Hastalıklar*. Ege Üniversitesi. Ziraat. Fakültesi. Bornova- İzmir.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu Ö., 1997. *Biyokimya*. S636.
- Klement, Z., Rudolph K., Sands D.C., 1990. *Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest*, pp:547.
- Kotan, R., 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde Yetiştirilen Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarından izole Edilen Patojen ve Saprofitik Bakteriyel Organizmaların Klasik ve Moleküler Metodlar ile Tanısı ve Biyolojik Mücadele İmkânlarının Araştırılması. *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma. Doktora Tezi. 217*.
- Kovaks, N., 1956. Identification of pyocyanea by the oxidase reactions. *Nature*, 70, 703.
- Lamey, H. A., Stack, R. W., 1993. *Disease of apples and other pome fruits*. Nort Dakota State University, *NDSU Extension Service*, 454. USA. <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/hortcrop/pp454w.html>.
- Lecomte, P., Manceau, C., Paulin, J. P., Keck, M., 1997. Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. *European Journal of Plant Pathology* vol. 103, p.91–98.
- Lelliott, R.A., Stead D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Blacwell Scientific Publications*. pp:216.
- Llop, P., Bonaterra, A., Penalver, J., Lopez, M. M., 2000. Development of a highly sensitive Nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 66, p.2071–2078.

- Mabagala, R. B., 1997. The effects of population *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean reproductive tissues on seed infection of resistant and susceptible bean genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 175-181.
- Maden, S., 1989. Bitki Bakteri Hastalıkları. *Ankara Üniversitesi. Ziraat Fakültesi. Yayınları: 1161, Ders Kitabı*: 328, Ankara.
- Manceau, C., Horvais A., 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction fragment length polymorphism. analysis of rRNA operons with special emphasis on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (2), 498-505.
- Manulis, S., Kleitman, F., Dror, O., David, I., Zutra, D., 1998. Characterization of the *Erwinia amylovora* population in Israel. *Phytoparasitica* **26**(1):39-46.
- Merighi, M., Malaguti, S., Bazzi, C., Sandrina, A., Landini, S., Ghini, S., Girotti, S., 1998. Specific detection of *Erwinia amylovora* by Chemiluminescent immunoenzymatic determination of PCR *Eighth International Workshop on Fire Blight*. 12-15 October, 39-42 pp., Kuşadası, Turkey.
- Merighi, M., Sandrini, A., Landini, S., Ghini, S., Girotti, S., Malaguti, S., Bazzi, C., 2000. Chemiluminescent and colorimetric detection of *Erwinia amylovora* by immunoenzymatic determination of PCR amplicons from plasmid pEA29. *The American Phytopathological Society, Plant Disease*. **84**:49-54.
- Miller, I., Berger T., 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. *Hewlett-Packard gas chromatography application note, Hewlett-Packard co., Alto, CA.*, 228-238.
- Miller, S. A., Joaquim, T. R., 1993. Diagnostic techniques for plant pathogens. *Biotechnology in Plant Disease Control*, p321-339.
- Milner, J. L., Silo-Suh, L. A., Lee, J. C., He H., Clardy, J., Handelsman, J., 1996. Production of Kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Microbiology*, **62**, 3061-3065.
- Mirik, M., 2000. Amasya ve Tokat illerinde yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarındaki ateş yanıklığı (*erwinia amylovora* (burrill) winslow et al.) hastalığının

yaygınlık oranı, duyarlı ve dayanıklı çeşitlerin tespiti, *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trakya, s82.*

- Mohammadi, M., Moltmann, E., Zeller, W., Geider, K., 2009. Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 124:293– 302.
- Mohan, N., Aghora T. S., Somkuwar, R. G., 1998. Identification of french bean lines resistant to bacterial blight. *Review of Plant Pathology*, 77, Ref. 4847.
- Mohan, S. K., Bifman V. P., 1999. Susceptibility of prunus species to *Erwinia amylovora*. *8 Th Workshop On Fire Blight Acta Horticulture*. 489, ISHS P : 145-149.
- Momol, M. T., Yeğen, O., 1993, Fire blight in Turkey: 1985-1992. *Acta Horticulture*, No: 338, 37-39. Athens, Greece.
- Momol, M. T., Yeğen, O., Basim, H., Rudolph, K., 1992. Identification of *Erwinia amylovora* and occurrence of fire blight of pear in western mediterranean region of Turkey, *Journal Of Turkish Phytopathology 1992*, 21: 1, 41-47.
- Momol, M.T., Zeller, W., 1992. Identification and spread of *Erwinia amylovora* on pear in Turkey. *Plant Disease* Vol. 76, No. 11, p.1114-1116.
- Narayanasamy, P., 1997. *Plant pathogen detection and disease diagnosis*. p331.
- Opio, A. F., Allen D. J., Teri J. M., 1996. Pathogenic variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight in phaseolus beans. *Plant Pathology*, 45, 1126-1133.
- Öktem, Y., Benlioğlu, K., 1988. Studies on fire blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) of pome fruits. *Journal of Turkish Phytopathology* Vol. 17 No.3, 5th. Turkish Phytopathological Congress. Antalya, Turkey.
- Özaktan, H., 1990. Bitkilerdeki Bakteriyel Hastalıkların Kontrolünde Bakteriyel Antagonistlerden Faydalanma Olanakları. *Ege Üniv, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (3), 245-255.

- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E., İsfendiyaroğlu, M., 2011. *İlman İklim Meyve Türleri*, Cilt 2 Yumuşak Çekirdekli Meyveler.
- Öztürk, G., Basım, E., Basım H., Emre, R., Karamürsel, Ö., Eren, İ., İşçi M., Kaçal, E., 2004. Kontrollü melezleme yoluyla ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora*) hastalığına karşı dayanıklı yeni armut çeşitlerinin geliştirilmesi: *İlk Meyve Gözlemleri, VI. Bahçe Bitkileri Kongresi*, 04-08 Ekim, Şanlıurfa, Türkiye.
- Paisley, R., 1995. *MIS whole cell fatty acid analysis by gas chromatography. MIDI, Inc., Newark, DE*, 5.
- Park, S. O., Coyne D. P., Dursun A., Jung G., 1998. Identifying Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers linked to major genes for common bacterial blight resistance in tepary bean. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123 (2), 278-282.
- Pirc, M., Dreo, T., Ravnikar, M., 2008. Real-Time PCR for testing of symptomless fire blight samples. *Acta Horticulture*, vol. 793, p. 533-538.
- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J., Dreo, T., 2009. Improved fire blight diagnostics using Quantitative Real-Time PCR detection of *Erwinia amylovora* Chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58: 872-881.
- Podile, A. R., Kumar B. S. D., Dube H. C., 1988. Antibiosis of rhizobacteria against some plant pathogens. *Indian Journal of Microbiology*, 28 (1-2), 108-111.
- Psallidas, P.G., Dimova, M., 1986. Occurrence of the disease fire blight of pomaceous trees in Cyprus characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. *Annls. Inst. Phytopathology. Benaki.*, (N.S.), 15: 61-70.
- Psallidas, P. G., 1990. Fire blight of pomeaceous trees in Greece-Evolution of the disease and characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. *Acta- Horticulture* No:273 ISHS P:25-32.
- Ryals, J., Uknes S., Ward E., 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 104, 1109-1112.
- Saygılı, H., Şahin F., Aysan Y., 2006. *Fitobakteriyoloji*. Meta Basım, İzmir.



- Saygılı, H., 1995. *Fitobakteriyoloji*. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bornova- İzmir, s208.
- Schaad, N. W., Jones, J.B., Lacy, G. H., 2001. Gram negative bacteria, *Xanthomonas*. *In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition)* Eds.Schaad, N.W., Jones, J. B., Chun,W. *APS Press, St. Paul Minnesota*, 175-193.
- Schroth, M. H., Hilderbrand, D. C., 1980. *Erwinia* I. *Erwinia amylovora* or true *Erwinia* grup. Pages 26-30 in: *Laboratuary Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. N. W. Schaad, ed. *American Phytopathology Society, St. Paul, MN*. 72 pp.
- Schuster, M. L., Smith C. C., 1983. Variability of *Xanthomonas phaseoli* from dominican republic. *Report of the Bean Improvement Cooperative*. No. 26, March, 37-38.
- Sigee, D. C., 1993. Bacterial plant pathology cell and molecular aspect. *Cambridge University Press*, p325.
- Silva, L. O., Singh S. P., Pastor-Corrales M. A., 1989. Inheritance of resistance to bacterial blight in common bean. *Theoretical and Applied Genetics (TAG)*, 78, 619-624.
- Singh, S. P., Cardona C., Morales F. J., Pastor-Corrales M. A., Voysest O., 1998. Gamete selection for upright carioca bean with resistance to five disease and a leafhopper. *Crop Science*, 38 (3), 666-672.
- Stead, D. E., 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriolog.* 42, 281-295.
- Steadman, J. R., 1994. A gene for resistance to common blight. *HortScience*, 29 (1), 44-45.
- Stoger, A., Schaffer, J., Ruppitsch, W., 2006. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant

- tissues by Polymerase Chain Reaction. *Journal of phytopathology*. vol. 154, p. 469–473.
- Şahin, F., Miller S. A., 1996. Characterization of ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 80 (7), 773-778.
- Şahin, F., Pirim İ., Çiftçi, M., 2000. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) **II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu**, 15-20 Mayıs 2000, Erzurum, p18-27.
- Taylor, J. D., 1970. Bacteriophage and serological methods for the identification of *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson. *Annals of Applied Biology*, 66, 387-397.
- Taylor, R. K., Hale, C. N., 1998. Identification and characterization of isolates of *Erwinia amylovora* from cotoneaster in Australia. *Austral. Biotech*, 8 (6): 353-356.
- Taylor, R.K., Guilford, P.J., Clark, R.G., Hale, C.N., Forster, R.L.S., 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel Polymerase Chain Reaction (PCR) primers. *New Zealand J. Crop Horticultural Sci.*, vol. 29, pp. 35– 43.
- Thomson, S. V., 2000. Epidemiology of fire blight. In J. L. Vanneste (Ed.), *Fire Blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora* (pp. 9-36). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Tokgönül, S., 1991. Doğu Akdeniz Bölgesinde Elma, ayva ve yenedünyalarda ates yanıklığı hastalığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, Cilt 31, No: 1-4,31-38, Mart-Aralık 1991 (Basım 1994 ), Ankara.
- Tokgönül, S., Başpınar, N., 1995. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ateş yanıklığı hastalığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.)'nın mücadelesi üzerinde çalışmalar. **7. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri**, Adana.
- Toros, S., Maden S., 1991. Tarımsal savaşım yöntem ve ilaçları. *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları: 1222, Ders Kitabı*: 352. Ankara, s332.

- Tunalı, N., 2013. Bursa ve yalova illerinde yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ateş yanıklığı hastalığına neden olan *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al., izolatlarının bakır sülfat ve streptomisine olan duyarlılık düzeylerinin araştırılması, **Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, s97.**
- Ünlü, A., Basım, H., 2002. Türkiye’deki *Erwinia amylovora* izolatlarının elde edilmesi ve bu izolatların, patolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu. **Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Antalya, s98.**
- Van Der Zwet T., 1993. Worldwide spread and present distribution of fire blight-an update. **Acta Horticulturae**, 338, pp: 29-31.
- Van Der Zwet, T., Beer, S. V., 1991. Fireblight Its Nature, Prevention And Control, A Practical Guide To Integrated Disease Management. U.S. Department Of Agriculture, **Agriculture Informaiton Bulletin** No :631,83.
- Van Der Zwet T., Keil, H.L., 1979. Fire blight a bacterial disease of rosaceus plants. **Agriculture Handbook**, 510, U.S. Department of Agriculture, Washington, pp.200.
- Vanneste, J. L., 2000. Fire blight, the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, 370p, **CAB Publishing, UK.**
- Yahyaoğlu, M., 1998. Bursa yöresinde ateş yanıklığı (*erwinia amylovora* (burr) Winslow et al.) üzerinde çalışmalar, **Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bursa, s55.**
- Yılmaz, A. M., Aysan, Y., 2009. *Erwinia amylovora*’nın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığının elmalardan izolasyonu, belirtileri, yayılması ve mücadelesi. **Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi**, 2 (1):75-77.
- Yücel, F., Benlioğlu, K., Çirakoğlu, B., 1998. A simple and quick way for diagnosis of *Erwinia amylovora*. **Eighth International Workshop on Fire Blight**. 12-15 October, 33-38 pp., Kuşadası, Turkey.

- Zaiter, H. Z., Coyne, D. P., Vidaver, A. K., Steadman, J. R., 1989. Differential reaction of tepary bean lines to *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*. ***HotrScience***, 24 (1), 134-137.
- Zhang, Y., Geider, K., 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed-field gel electrophoresis. ***Applied and Environmental Microbiology***, p. 4421–4426, Vol. 63, No. 11.
- Zwet, T., Wells J.M., 1993. Application of fatty acid class analyses for the detection and identification of *Erwinia amylovora*. ***ISHS Acta Horticulturae 338: VI International Workshop on Fire Blight***. 10.17660/ ActaHortic.1993.338.34.

## ÖZ GEÇMİŞ

1993 yılında Van/Erciş' te doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Erciş' te tamamladıktan sonra 2010 yılında Iğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandı ve 2014 yılında başarıyla tamamlayarak Ziraat Mühendisi ünvanı almaya hak kazandı. 2014 yılında Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.

