



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Erwinia amylovora ENFEKSİYONU SONUCU FARKLI ELMA, ARMUT ve AYVA ÇEŞİTLERİNDEKİ KONUKÇU PROTEİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Şerife ÇETİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bitki Koruma

Nisan-2014
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Erwinia amylovora ENFEKSİYONU SONUCU FARKLI ELMA, ARMUT VE AYVA ÇEŞİTLERİNDEKİ KONUKÇU PROTEİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Şerife ÇETİN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ

2014, 62 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ
Prof. Dr. Nuh BOYRAZ
Prof. Dr. Lütfi PIRLAK

Ateş yanıklığı hastalığına neden olan *Erwinia amylovora*, Rosaceae familyasından başta armut, elma ve ayvalarda tahripkar bakteriyel bir patojendir. Bu çalışmada, *E. amylovora*' nın 2 virülent izolatının (Ea234-1 ve Ea240-3) farklı elma (Braeburn, Fuji, Gala ve Golden), armut (Santa Maria ve Williams) ve ayva (Eşme ve Ekmek) çeşitlerinde zamana bağlı olarak toplam protein miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. *E. amylovora* (10^8 hücre ml^{-1}) ile yaprak inokulasyonundan sonraki 24, 36 ve 72. saatlerde örnekler alınmış, Koch postulatları gereği re-izolasyon yapılmış ve elde edilen bakteriler biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler metotlarla *E. amylovora* olarak tanılanmıştır. Toplam protein miktarlarının belirlenmesinde Bradford ve SDS-PAGE analizleri için Laemmli yöntemleri kullanılmış, alınan yaprak örneklerine ait protein ekstraktlarının 595 nm' de absorbans değerleri elde edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, elma çeşitlerinde *E. amylovora* enfeksiyonu sonrası kontrole kıyasla 24. saatte toplam protein miktarının arttığı, 36. ve 72. saatte miktarın azaldığı, Braeburn çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Armut çeşitlerinde, 24. ve 36. saatlerde toplam protein miktarı artarken, 72. saatte protein miktarının azaldığı ve Santa Maria çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayva çeşitlerinde, toplam protein miktarının 72. saatte arttığı ve Eşme çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda, farklı molekül ağırlıklarına sahip protein fraksiyonları elde edilmiştir. Elma ve ayva çeşitlerinde sırasıyla yaklaşık 55-70 ve 35-55 kDa, armut çeşitlerinde ise yaklaşık 55-70 kDa molekül ağırlığında protein bantları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Erwinia amylovora*, elma, armut, ayva, protein, SDS-PAGE

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF QUANTITIES OF HOST PROTEIN AFTER INFECTION WITH *Erwinia amylovora* OF DIFFERENT APPLE, PEAR AND QUINCE VARIETIES

Şerife ÇETİN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE PLANT PROTECTION

Advisor: Asst. Prof. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ

2014, 62 Pages

Jury
Asst. Prof. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ
Prof. Dr. Nuh BOYRAZ
Prof. Dr. Lütfi PIRLAK

Fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* is a destructive bacterial pathogen mainly on pears, apples and quinces from Rosaceae family. In this study, it was aimed determination of total protein amounts in different apple cultivars (Braeburn, Fuji, Gala and Golden), different pear cultivars (Santa Maria and Williams) and different quince cultivars (Eşme and Ekmek) of two virulent *E. amylovora* strains (Ea234-1 and Ea240-3) according as the time. It was taken samples after leaf inoculation with *E. amylovora* (10^8 CFU ml^{-1}) at 24^{th}, 36^{th} and 72^{nd} hours, and according to Koch postulates re-isolation was made and obtaining the bacteria were identified as *E. amylovora* by biochemical, physiological and molecular tests. In determining the amounts of total protein and in the SDS-PAGE analyses were used Bradford and Laemmli methods, respectively, and absorbance values of protein extracts derived from the leaf samples taken, were obtained at 595 nm wavelength. According to the findings obtained; after infection of *E. amylovora* in the apple varieties comparing to controls, total protein concentrations at 24^{th} hours increased and a decrease in the amount of 36^{th} to 72^{nd} hours and Braeburn has the highest protein content was determined. In the pear varieties, while total protein concentrations at 24^{th} and 36^{th} hours increased, a decrease in the amount of 72^{nd} hour, and Santa Maria variety has the highest protein content was detected. In the quince varieties, total protein concentrations at 72^{th} hour increased and Eşme variety has the highest protein content was identified. As a result of SDS-PAGE analysis, protein fractions which have different molecular weights were obtained. The protein bands were defined approximately 55-70 kDa and 35-55 kDa molecule weight on apple and quince varieties, respectively and also approx. 55-70 kDa in pear varieties.

Keywords: *Erwinia amylovora,* apple, pear, quince, protein, SDS-PAGE

ÖNSÖZ

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden faydalandığım ve çalışmam süresince yardımını esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay K. BAŞTAŞ' a, yardım ve desteğini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Mehmet HAMURCU' ya Prof. Dr. Haydar HACISEFEROĞULLARI' na, , çalışmam sırasında yanımda olan yüksek lisans arkadaşlarım Öznur EKİCİ, Esra KARACİF, Neşe BOZKAN ve Kezban BÜYÜKDEVECİ' ye, ayrıca her zaman yanımda ve hep destek olan sevgili anneme ve tüm aileme göstermiş oldukları anlayış ve desteklerinden dolayı şükranlarımı sunarım.

Şerife ÇETİN
KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **V**

ÖNSÖZ ..... **Vİ**

İÇİNDEKİLER ..... **Vİİ**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1.GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **15**

3.1. Materyal 15
3.1.1. Bitki Materyali 15
3.1.2. Yetiştirme Koşulları 15
3.1.3. Bakteriyel İzolatlar 15
3.1.4. Kullanılan Kimyasal, Alet ve Ekipmanlar 16
3.1.5. Protein Analizlerinde Kullanılan Çözeltiler 16
3.2. Yöntem 18
3.2.1. Bitkilerin *Erwinia amylovora* ile İnokulasyonu 18
3.2.2. Bitki Örneklerinin Alınması 18
3.2.3. *Erwinia amylovora'* nın Re-izolasyonu 18
3.2.4. Patojenin Tanısı 19
3.2.5. Moleküler Tanılama 19
3.2.6. Bitki Örneklerinden Protein İzolasyonu 19
3.2.7. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini 20
3.2.8. SDS-PAGE Analizi 21
3.2.8.1. Jellerin Hazırlanması 21
3.2.8.2. Protein Örneklerinin SDS-PAGE Yüklenmesi ve Yürütülmesi 22
3.2.8.3. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Yıkanması 22
3.2.9. İstatistiksel Analizler 23

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **24**

4.1. Bakteri İnokulasyonu 24
4.2. *Erwinia amylovora*' nın Re-izolasyonu ve Tanılaması 25
4.3. *Erwinia amylovora*' nın Moleküler Tanılanması 25
4.4. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi için Hazırlanan Standart Eğri 26
4.5. Elma Çeşitlerinde Farklı *Erwinia amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonları Sonrası Toplam Protein Miktarına Olan Etkileri 28
4.5.1. Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Elma Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı 28
4.5.2. Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Elma Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı 29

4.6. Armut Çeşitlerinde Farklı *Erwinia amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonları Sonrası Toplam Protein Miktarına Olan Etkileri.....31
4.6.1. Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Armut Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı 31
4.6.2. Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Armut Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı 32
4.7. Ayva Çeşitlerinde Farklı *Erwinia amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonları Sonrası Toplam Protein Miktarına Olan Etkileri.....34
4.7.1. Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Ayva Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı..34
4.7.2. Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Ayva Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı..35
4.8. Farklı *Erwinia amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonu Sonrasında Elma, Armut ve Ayva Bitkilerinden Saflaştırılan Proteinlerin SDS-PAGE Analiz Sonuçları.....37

5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....45

KAYNAKLAR 46

EKLER 60

ÖZGEÇMİŞ.....62

SİMGELER VE KISALTMALAR

^{o}C: Santigrat Derece
dk: Dakika
sa: Saat
µl: Mikrolitre
µg: Mikrogram
ml: Mililitre
nm: Nanometre
ddH_2O: Distile Saf Su
Avr: Avirülens
dsp: Hastalığa spesifik patojenite
hrp: Hipersensitif reaksiyon ve patojenite
kDa: Kilodalton
SA: Salisilik Asit
PR: Patojenez ile İlgili Proteinler
HR: Hipersensitif Yanıt
SAR: Sistemik Kazanılmış Dayanıklılık
RLK: Reseptör Benzeri Kinazlar
LRR: Lösince Zengin Tekrar
ROS: Aktif Oksijen Türleri
TMV: Tütün Mozaik Virüsü
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
BSA: Bovine Serum Albumin
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE: Polycrilamid Jel
TTSS: Tip 3 Salgı Sistemi
MAPK: Mitojen Aktive Olmuş Protein Kinaz
PVPP: Polyvinylpolypyrrolidon

1.GİRİŞ

Meyvecilik, ülkemiz tarımsal üretimi içinde önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde 2012 yılı itibariyle, 1.937.000.000 hektar alanda 17.810.942 ton meyve üretilmektedir. Bu üretim miktarının %19' luk kısmını yumuşak çekirdekli meyveler oluşturmaktadır (Anonim, 2012).

Türkiye önemli yumuşak çekirdekli meyve üreticisi ülkelerden biri olmakla birlikte, bu meyve grubuna giren elma, armut ve ayvanın anavatanlarından biri olarak da ayrı bir öneme sahiptir (Ülkümen, 1938; Özbek, 1978). Ülkemiz dünyada yetiştiriciliği yapılan 76.378.738 ton elma üretiminin %4' nü oluşturmasıyla ile 3. sırada, 23.580.845 ton armut üretiminde 7. sırada ve 596.532 ton ayva üretiminin %23' ü ile 1. sırada yer almaktadır (Anonim, 2012).

Tüm bitkilerde olduğu gibi yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde de hastalık ve zararlılardan dolayı önemli kalite ve verim kayıpları meydana gelmektedir. Dünyada yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde fungal, bakteriyel ve viral etmenler oldukça yaygındır. Bunlar içerisinde ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora*) ve bakteriyel dal yanıklığı (*Pseudomonas syringae* pv. *siyringae*) en tahripkar bakteriyel hastalıklardır.

Erwinia amylovora (Burr.) Winslow et al., isimli bakteriyel patojenin neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı; armut, elma, ayva ve yenidünya gibi yumuşak çekirdekli meyve türlerinde ekonomik anlamda zarar veren en tahripkar hastalıktır. Etmen özellikle armutlarda büyük zarara neden olmaktadır (Zwet ve Keil, 1979).

Ateş yanıklığının bilinen en eski gözlemleri 1780' de ABD' de New York Hudson Vadisi' ndedir. Bu tarihten sonra, hastalık başta ABD olmak üzere yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan ülkelere hızla yayılmaya başlamıştır (Zwet ve Keil, 1979; Zwet, 1993; Zwet ve Beer, 1995; Sobiczewski ve ark., 1997; Vanneste, 2000). Dünya çapında 46' dan fazla ülkede ateş yanıklığı rapor edilmiştir (Zwet, 2006).

Ateş yanıklığı yumuşak çekirdekli meyve üretimi yapılan ülkelerde özellikle armut, elma ve ayva konukçularında ciddi ekonomik kayıplardan sorumludur. Ateş yanıklığı, ABD' nin Michigan eyaletinde 1991 yılında tahmini 3.8 milyon dolar (Zwet ve Beer, 1995), Washington ve Oregon eyaletinde 1998 yılında 68 milyon dolar kayba neden olmuştur (Johnson ve Stockwell, 1998; Bonn ve Zwet, 2000). Amerika da meyve endüstrisinde yıllık ekonomik kayıp 100 milyon dolardır (Norelli ve ark., 2003). Yeni

Zelanda da tahmini 10 milyon dolar kayba neden olmuştur (Vanneste, 2000). İtalya da ateş yanıklığından 5 bin meyve ağacı yok olmuştur (Calzolari ve ark., 1999). İsviçre de 1997 ve 2000 yılları arasında yaklaşık olarak 9 milyon dolar kayıp rapor edilmiştir (Hasler ve ark., 2002). Almanya' nın Constance gölü bölgesinde 2007 yıllında ateş yanıklığı enfeksiyonu sonrasında 1.6 milyon dolar kayıp hesaplanmıştır (Scheer, 2009). Kanada da yaklaşık olarak elma ağaçlarında 142 milyon dolar, armut ağaçlarında da 6 milyon dolar kayba neden olmuştur (Anonymous, 2010).

Türkiye' de ilk defa 1985 yılında Afyon ili Sultandağı ilçesinde armutlarda tespit edilerek kesin tanısı yapılmıştır (Öktem ve Benlioğlu, 1988). Hastalığın elma, ayva ve yenidünyada da bulunduğu bildirilmiştir (Momol ve Yeğen, 1993). Ülkemizde hastalığın yayılma alanlarının belirlenmesi amacıyla sürvey çalışmaları yapılmış ve bunun sonucunda hastalığın yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında değişik oranlarda bulunduğu belirlenmiştir (Tokgönül, 1991).

Son zamanlarda fitopatoloji bilim dalının önemli bir araştırma odağı, patojen saldırısına maruz kalan bitkide hücreler arasındaki sinyal iletimi ve bu olaya karşı hücre içinde moleküler ve biyokimyasal düzeydeki cevap oluşumudur. Bitkilerde patojene karşı oluşan dayanıklılık sistemi; salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve etilen olarak üç çeşit sinyal molekülü tarafından sağlanır (Schenk ve ark., 2000; Cheong ve ark., 2002). Salisilik asit, patojenlerle ilgili (*PR*-Patogenesis Related) genlerin aktivasyonunu düzenleyen ve sistemik direncin başlamasından sorumlu olan merkezi sinyal iletim molekülüdür (Dong, 2001).

Sinyal iletiminin başlamasında öncelikle hücre membranında yer alan reseptörler tarafından sinyalin algılanması gerekmektedir. G proteinine bağlı reseptörler, bitkilerde patojen saldırısı ve abiyotik strese karşı ilk biyokimyasal yanıtlar arasında olan süperoksit (O_2-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) hücre içi kaynaklarını aktive etmekte gereklidir (Joo ve ark., 2005). Reseptör Benzeri Kinazlar (RLK), bir protein kinaz katalitik bölge, bir transmembran bölge, bir ekstraselüler ligand bağlayıcı bölge ve lösinden zengin tekrarlı bölgeleri kapsamaktadır. Bu özelliklerden dolayı güçlü protein-protein etkileşimlerini sağlamakta ve ekstraselüler peptidlere bağlanabilmektedir (Koç ve Üstün, 2008). Mitojen Aktive Olmuş Protein Kinaz kaskatları (MAPK), farklı abiyotik ve biyotik stres sinyal iletim yollarında önemli rolleri bulunmaktadır (Mizoguchi ve ark., 1997).

Bitkiler patojen saldırısını etkili bir biçimde durdurabilmek için yapılarında var olan fiziksel ve kimyasal engeller kadar, patojen atağı ile aktive olan, uyarılabilir

savunma tepkilerini de kullanırlar. Dayanıklılık geninin ürünü olan proteinler, patojenlerce kodlanan avirülens (Avr) proteinlerini tanıma yeteneğine sahiptir. Bu tanıma işlemi bitkinin savunma sisteminin harekete geçirilmesi bakımından zorunludur. Sonuçta bitki savunma mekanizmasının uyarılması antimikrobiyal etkiye sahip birçok proteinin bitkide üretilmesine neden olmaktadır (Özcan ve ark., 2001).

Hücrede pek çok işlev binlerce farklı tipte protein molekülü tarafından yürütülür. Büyük çeşitliliğe ve farklı işlevlerine karşın temelde oldukça benzer yapıları olan proteinlerin, üstlendikleri önemli görevler nedeniyle yapılarının aydınlatılması, sentezlerinin ve işlevlerinin ortaya konulması çok büyük önem taşır (Temizkan ve Arda, 2004). Nicel ve nitel protein analizleri metabolizmanın işleyişi hakkında önemli ipuçları sağladığından canlı ile ilişkili tüm temel bilim dallarında büyük yer tutar. Özellikle son yıllarda rekombinat DNA teknolojisinin ürünü olarak elde edilen proteinlerin izolasyonu ve tanımlanması moleküler biyoloji araştırmalarının en temel işlemleri arasında yer almaktadır.

Ateş yanıklığına karşı günümüze kadar uygulanan mücadele yöntemlerinin hiçbirinde etkili ve kalıcı bir çözüm görülmemiştir. Günümüzde pek çok araştırmacı konukçu patojen arasındaki etkileşimin anlaşılması üzerine çalışmaktadır. Konukçu patojen arasındaki etkileşimin anlaşılması, hastalığa karşı konukçuda direnç geliştirilmesi ve hastalık yönetiminde etkili stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bitki patojen arasındaki etkileşimin anlaşılabilmesi için konukçuda patojeni tanıyan proteinlerin yanı sıra patojen enfeksiyonu sonucu oluşan sinyal sistemi ve bitki savunma mekanizmasında etkili olan proteinlerin çalışılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde uygun şartlar altında büyük zararlara sebep olan *Erwinia amylovora*' nın bitkilerde oluşturduğu biyotik stresin elma, armut ve ayva çeşitlerinde, zamana bağlı olarak bitki savunma mekanizmasında bulunan toplam protein miktarları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında farklı konukçu ve bunların çeşitleri arasındaki toplam protein miktarlarının bitki savunma sistemi içerisindeki etkinliklerinin belirlenmesi sağlanacaktır. Yürütülen çalışmada, bitkinin *E. amylovora*' dan kaynaklanan biyotik stres reaksiyonlarına karşı bitkinin savunmasından sorumlu proteinlerin spesifik olarak incelenebilmesi ve bunların bitki savunmasındaki rollerinin ortaya konması ile hastalıkla mücadele stratejilerinin geliştirilmesinde önemli sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Erwinia amylovora (Burr.) Winslow et al.' ın neden olduğu ateş yanıklığı, yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının en tahripkâr bakteriyel hastalığıdır. Etmenin, *Pyrus* ve *Malus* cinslerinin yanı sıra Rosaceae familyasının 37 cinsine ait 400 türde hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu cinslerin içinde en şiddetli yanıklık belirtisi gösterenler ve ekonomik olarak, önemli ölçüde zarar görenler başta *Pyrus* ve *Malus* olmak üzere *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha* ve *Sorbus* cinsleridir (Zwet and Keil, 1979).

Ateş yanıklığı hastalığı dünyada iki asırlık geçmişi olan bir hastalıktır. Onsekizinci yüzyılda 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 *Erwinia amylovora* ismi verilmiştir (Zwet ve Keil, 1979).

Hastalığın ilk simptomları, bahar başlarında ılık nemli havalarda genellikle çiçeklerde görülür. Çiçekler önce sulanmış gibi görünür sonra hızla pörsür, kahverengine döner ve siyahlaşır. Çiçekler ağaçta asılı kalabilir veya düşebilir. Bu belirtiler hemen aynı mahmuzdaki diğer yapraklara veya yakın dallardaki yapraklara sıçrar. Yapraklarda ana damar boyunca ve yaprak kenarlarında kahverengi-siyah lekeler başlar. Siyahlaşma ilerlerken, yapraklar kıvrılır ve pörsür, aşağı doğru asılı kalır ve genelde bükük yanık filizlere asılı kalırlar (Fahy ve Persley, 1983). Bu ateş yanıklığının en tipik belirtilerindendir. Bu yapraklar yazın koyu yeşil yapraklı sıhhatli sürgün veya ağaçlar ile kışın sıhhatli ağaçların çıplak dallarıyla zıt bir görünüm oluştururlar. Diğer hiç bir meyve hastalığında yapraklar ölü sürgünlere bu kadar sağlam asılı kalmaz (Çınar, 1988). Genellikle elmalarda yapraklar kahverengileşir, armutlarda koyu kahveden siyaha döner (Fahy ve Persley, 1983).

Yanık sürgünlerde karakteristik simptom, sürgün uçlarının çobandeğneği ya da kanca gibi bir forma dönüşmesi ve yaprakların siyahlaşarak sürgünlere asılı kalmasıdır. Simptomlar meyve mahmuzları ve uç dallardan aşağı doğru ilerleyerek yan dallara geçer ve burada kanserleri oluşturur (Zwet ve Keil, 1979). Uç noktadan başlayan hastalık, şiddet derecesine göre sürgünü kalın dallara kadar kurutabilir (Karaca, 1977).

Meyve enfeksiyonları genellikle saptan olur. Küçük olmayan meyveler sulu bir hal alır, sonra kahverengine döner, pörsür, mumyalaşır ve sonunda siyahlaşırlar. Ölü

meyveler enfeksiyondan bir kaç ay sonrada ağaca asılı kalırlar (Fahy ve Persley, 1983; Maden, 1989). Ayrıca hasat sonrası paketlenen meyvelerde de etmen bulunabilmektedir (Zwet ve Keil, 1979).

Bakteriler bir önceki mevsim sırasında oluşan kanserlerin kenarlarında, diğer konukçulardaki kanserlerde ve tomurcuklarda ve belirgin şekilde sağlam görülen odun dokularında kışlarlar. Bakteriler çoğunlukla büyük dallarda canlılıklarını sürdürürler ve 1 cm çapından daha küçük filizlerde nadiren kışlayabilirler. İlkbaharda, bakteriler canlı kaldığı bu kanserlerde aktif hale gelirler, çoğalırlar ve bitişik sağlam kabuğa yayılırlar. Nemli veya ıslak havalarda bu bakteriyel kümeler tarafından su alınır, öyle ki hacimce dokunun kapasitesinden daha fazla büyür, böylelikle onların bir kısmı lentiseller ve doku üzerindeki yarıklardan dışarı çıkar. Bakteriyel akıntı veya salgı olarak adlandırılan bu salgı hücre ve öz suyu, milyonlarca bakteri ve bakteriyel yan ürünlerden ibarettir. Akıntı ekseri armutlar çiçek açarken görülür. Bakteriler çiçeklerden aşağı doğru çiçek sapına oradan da meyve mahmuzunun kabuğu içine hareket ederler. Mahmuzun enfeksiyonu onun üzerindeki tüm çiçeklerin, yaprakların ve meyvelerin ölümüne neden olur (Jones ve Aldwinckle, 1997).

Hastalığın yayılmasında, genel olarak böcekler en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. 1891' de balarıları ve yabanarılarının bakteriyi çiçekten çiçeğe yaydığının gözlenmesinden beri yapılan araştırmalar sonucunda 77 böcek cinsinin patojeni yayabildiği saptanmıştır (Zwet ve Keil, 1979).

Yağmur ve rüzgar, patojenin kanserlerden veya taze inokulumdan yayılmasında önemli bir faktördür. *E. amylovora'* nın ürettiği bakteriyel iplikçikler rüzgar yardımıyla uzun mesafelere taşınabilmektedir. Ayrıca yağmurun etkisiyle konsantre haldeki nektar seyreltik hale gelerek bakteri çoğalması ve enfeksiyon kolaylaşır (Zwet ve Keil, 1979).

Türkiye' de ateş yanıklığının ilk görüldüğü Afyon Sultandağı İlçesi' nin 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 bölgede ülkemize bulaştırdıkları sanılmaktadır (Öktem ve Benlioğlu, 1988).

Ateş yanıklığı insanlar, bahçe aletleri, meyve ya da aşı gözüyle yayılabilir. Mekanik yaralar oluşturması nedeniyle dolu, hastalık çıkışında etkili olmaktadır (Zwet ve Keil, 1979).

Erwinia amylovora, Enterobacteriaceae familyasında *Erwinia* genusu içerisinde yer alan, gram negatif, fakültatif anaeorob, kısa çubuk şeklinde, peritrik kamçılı, pektoltik enzim üretmeyen bir bakteridir (Scroth ve Hilderbrand, 1980). *In vitro*' da

optimum 21-28^{o}C arasında gelişen bakterinin, termal ölüm noktası 45-50^{o}C ve optimum pH gelişimi 6.0-7.5' dir (Zwet ve Keil, 1979).

E. amylovora' nın tanılanmasında; KOH ile gram reaksiyonun belirlenmesi (Fahy ve Hayward, 1983), 36^{o}C' de gelişim, %5 SNA besiyerinde gelişim, KingB besiyerinde fluoresans pigment oluşumu, karbonhidratlardan asit oluşumu (Ayers ve ark., 1919), jelatinin hidrolizi (Klement ve ark., 1990), üreaz olşumu (Dye, 1968), indol oluşumu (Dickey ve Kelman, 1988), acetoin oluşumu (Dye, 1968), sakkarozdan indirgenmiş maddeler oluşumu (Klement ve ark., 1990), aesculin' in hidrolizi (Sneath, 1956; Schaad, 1988), sisteinden H_2S oluşumu (Klement ve ark., 1990) gösteren biyokimyasal testleri ve tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyon (Lelliott ve Stead, 1987; Mohan ve Schaad, 1987; Klement ve ark., 1990) testi esas alınmaktadır.

Ateş yanıklığı hastalığının mücadelesinde kullanılan yöntemler koruyucu nitelikteki önlemlerdir. Ateş yanıklığının bilinen en eski mücadele metodu hastalıklı sürgünlerin ve dalların budanmasıdır.

Ateş yanıklığına en etkili yöntemlerden birinin kimyasal mücadele olduğu kabul edilse de ateş yanıklığı kontrolünde kullanılan bakırlı bileşikler genellikle çiçeklenme dönemi sırasında çiçeklerde ve meyve yüzeyinde fitotoksiteye neden olmaktadır (Swaidat, 2007).

Ateş yanıklığı kontrolündeki en önemli gelişmelerden biri, 1950' lerde antibiyotiklerin keşfi ve uygulanmaya başlanması olmuştur. Genelde, streptomisin sülfat, elma ve armutlarda hastalığın kontrolünde bakırdan daha iyi sonuç vermektedir. Ancak çevre ve insan sağlığına etkisi ve ekonomik olmamasından dolayı pek çok ülkede kullanımı sınırlandırılmıştır. Ayrıca streptomisin kullanımı dayanıklı izolatların oluşumuna neden olmaktadır (McManus ve ark., 2002).

E. amylovora' nın biyolojik mücadelesi için yapılan denemeler sonucunda *Pantoea agglomerans* (syn. *Erwinia herbicola*) ve *Pseudomonas fluorescens* isimli bakteriyel etmenler diğerlerine göre daha başarılı bulunmuştur (Ishimaru ve ark., 1988; Vanneste ve ark., 1990; Vanneste ve Paulin, 1990; Hickey ve Travis, 1995; Alay, 1997).

E. amylovora' nın en önemli patojenite faktörleri ekzopolisakkarit amylovoran ve *hrp-dsp* gen bölgesinden kodlanan proteinlerdir (Bugert ve Geider, 1995; Bogdanove ve ark., 1998).

Amylovoran bitki savunmasını baskılar ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunur (Konczan ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009). Amylovoran kodlayan *ams* genlerini mutasyonu sonucunda bakterinin virülensliğini kaybettiği belirlenmiştir (Geider, 2000).

hrp-dsp bölgesi konukçu bitkide hastalık oluşturma kabiliyetini ve konukçusu olmayan bitkide hipersensitif yanıt (Hypersensitive Response, HR) oluşturma kabiliyetini kontrol eder (Barny ve ark., 1990; Dellagi ve ark., 1998).

Tip 3 salgı sistemi (TTSS) *hrp* genleri tarafından kodlanır (Alfano ve Collmer, 1997) ve *E. amylovora*' nın virülensliği için mutlak gereklidir. TTSS olmaksızın patojen, bitki içerisinde gelişmeyi, konukçusu olmayan bitkide HR veya konukçusunda hastalık lezyonları oluşturmayı ve temel savunma sistemini engellemeyi başaramaz (Alfano ve Collmer, 2004). TTSS patojenite ile ilgili proteinlerin konukçu bitki hücrelerine taşınmasını sağlar ve pek çok bitki ve hayvan patojenleri bu sistemi kullanır. *E. amylovora* tarafından salgılanan TTSS proteinleri, HrpA HrpN, HrpW, $AvrRpt2_{EA}$, HopC1 ve DspA/E' dır (Oh ve Beer, 2005; Zhao ve ark., 2005).

HrpN ve HrpW harpin familyasına ait proteinlerdir. HrpN ve HrpW proteinleri *E. amylovora*' nın konukçusu olmayan tütün bitkisinde HR oluşturur (Wei ve ark., 1992; Gaudriault ve ark., 1998; Kim ve Beer, 1998). Mutant analizi ile HrpN önemli bir virülens faktörü olduğu belirlenmiştir (Barny, 1995).

DspA/E bir patojenite/avirülens efektör proteini ve *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* da bulunan AvrE proteinin homoloğudur. Mutant *dspA/E* genine sahip *E. amylovora*' nın, elma fidanlarında ve ham armutlarda patojenik fonksiyon göstermediği belirlenmiştir (Gaudriault ve ark., 1997; Bognadove ve ark., 1998).

DspA/E ve HrpN proteinleri *E. amylovora*' nın konukçusu ve konukçusu olmayan bitkilerde hücre ölümü ve kallos birikiminin yanı sıra bitki savunma yollarının aktif hale gelmesi, aktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi ve bakteri gelişimine yardımcı olmada önemli bir role sahiptirler (Boureau ve ark., 2006; Oh ve ark., 2007; Reboutier ve ark., 2007a-b; Degrave ve ark., 2008; Bocsanczy ve ark., 2008; Boureau ve ark., 2011).

Bitkiler, maruz kaldıkları abiyotik (tuzluluk, sıcaklık, kuraklık, vb.) ve biyotik (bakteri, virüs, böcek, vb.) stres faktörlerini algılama, sinyal ve cevap verme yeteneğine sahiptirler (Bohnert ve ark., 1995).

Bitkinin patojen saldırısına karşı mevcut yapısal ve biyokimyasal savunmalarını harekete geçirmesi için bitki tarafından patojenin tanınması gereklidir. Patojen kaynaklı elisitörler, konukçu tarafından bir defa tanındığında, konukçu hücrede, direnç genlerinin

ve proteinlerinin aktive olmasını sağlayan, patojen gelişimini engelleyen maddelerin üretilmesi ve patojen tarafından saldırıya uğramış hücrelerin bulunduğu noktaya doğru hareket etmesine neden olan bir seri sinyal gönderilir (Agrios, 1997).

Sinyal iletim yolu, sinyalin algılanması ile başlar. Bunu ikinci mesajcıların (örneğin reaktif oksijen türleri, vb.) oluşturulması takip eder. İkinci mesajcılar hücre içi Ca^{+2} seviyelerini ayarlayabilir. Son aşamada sıklıkla düzenlenen genlerin özgün gruplarını kontrol eden transkripsiyon faktörleri veya hücre savunmasıyla direkt ilgili proteinleri hedefleyen protein fosforilasyon zinciri başlatılır (Keskin, 2012).

Sinyal iletiminin başlamasında öncelikle reseptör tarafından sinyalin algılanması gereklidir. G proteinine bağlı reseptörler bitkilerde patojen saldırısı ve abiyotik strese karşı savunma sırasında hem Ca kanallarının aktivasyonunu hem de membrana bağlı NADPH oksidaz' in aktivasyonunu uyarmaktadır (Xing ve Higgins, 1997).

Reseptör Benzeri Kinazlar (RLK), reseptör proteinlerin en farklı ve en geniş sınıfını oluştururlar. Bu proteinlerin genel özelliği hücre dışına uzanan Lösince Zengin Tekrar (LRR) sınıfı protein bulundurmalarıdır. LRR-RLK proteinler hastalığa dirençte de görev alırlar. Çeltik (*Oryzae sativa* L.) bitkilerinin reseptör benzeri kinaz içeren Xa21 ve Xa26 dayanıklılık proteinleri çeltik bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ırklarına karşı dayanıklılık sağlamaktadırlar (Song ve ark., 1995; Sun ve ark., 2004).

Reseptör yönetimli aktivasyonda, Mitojen Aktive Olmuş Protein Kinaz kaskatları (MAPK) nükleusa geçer ve burada transkripsiyon faktörleriyle etkileşerek savunma genlerinin anlatımını uyarabilir (Ligterik ve ark., 1997).

Sürekli olarak aktive olan MAPKK 'nın domateste fazla anlatım yapması virülent bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*' a karşı direnç artışı olduğu belirlenmiştir (Xing ve ark., 2001).

Salisilik asit (SA) birikimi, bitki dokularında patojene karşı hem lokal savunma tepkilerinin oluşturulmasında, hem de Sistemik kazanılmış dayanıklılığın (SAR) kurulmasında gereklidir (Ryals ve ark., 1996). Tütün yaprakları TMV (Tütün Mozaik Virüsü) ile inoküle edildiğinde, SA içeriğinin 180 kat arttığı bulunmuştur (Malamy ve ark., 1990).

Milčevičová ve ark. (2010), *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş farklı hassasiyete sahip iki elma çeşidinde *E. amylovora* infeksiyonundan sonra SA sentezinin artığını belirlemişlerdir. Sonuç olarak SA sentezinin ateş yanıklığına karşı savunma stratejisinin önemli bir parçası olduğunu doğrulamışlardır.

Uzun mesafe taşınabilen (lipid türevli sinyaller) sinyallerin algılanması, enfekte olmamış dokularda SA birikimine neden olur; bunun sonucu olarak da aralarında *PR* genlerinin de yer aldığı savunma genlerinin aktivasyonu gerçekleşir (Sticher ve ark., 1997; Van Loon ve Van Strien, 1999).

Konukçu bitkiler hastalıkların oluşturacağı zararlara engel olmak için dayanıklılık (Resistance, *R*) genlerini geliştirmişlerdir. Dayanıklılık genin ürünü olan proteinler hastalık etmeninin bitkiye girmesi sırasında salgıladığı avirülens gen ürünlerini tanıma yeteneğine sahiptirler. Dayanıklılık geninin ürünü olan proteinler tarafından alınan sinyal herhangi bir yolla hücre içerisindeki gerekli yerlere iletildiğinde, bitki aktif savunma sistemi ve tepki mekanizması çalışmakta ve sonuçta da dayanıklılık olgusu ortaya çıkmaktadır (Dixon ve Lamb, 1990; Lamb, 1994).

Flor (1971), bitkilerdeki dayanıklılığı sağlayan her bir gene karşı, patojende bu gene denk gelen ve virülensliği kontrol eden bir genin (gene-karşı-gen) bulunduğunu ortaya çıkarmıştır.

Pseudomonas syringae pv. *tomato*' nun *avrPto* avirülenslik geni ürünü ile domateslerde *pto* dayanıklılık geni ürünü (serin/threonine protein kinaz) etkileşiminde domates bitkisinde etmenin yol açtığı bakteriyel lekelenmeye karşı dayanıklılık belirlenmiştir (Zhou ve ark., 1995). *pto* geni hassas domates çeşitlerine aktarıldığında, *avrPto* genini taşıyan bakteri ırkına karşı da dayanıklılık sağlamaktadır.

Arabidopsis thaliana' nın *RPS2* geni, bakteriyel patojenlerden, *avrRpt2* avirülenslik geni taşıyan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *P. s*. pv *maculicola*' ya karsı dayanıklılık sağlamaktadır (Bent ve ark., 1994; Mindrinos ve ark., 1994).

Parravicini ve ark. (2011), *Malus* x *domestica* cv. Evereste' nin ateş yanıklığına direnç lokusunda iki gen belirlemişlerdir. Bu iki genin domatesteki *pto*/*prf* direnç gen mekanizmasına benzer olduğunu göstermişlerdir.

Fahrentrapp ve ark. (2012), *Malus* x *robusta* 5 (Mr5) elma kültüründe ateş yanıklığına karşı direnç geni (*FB_MR5*) belirlemişlerdir. Vogt ve ark. (2013), mutant $avrRPt2_{Ea}$ izolatının Mr5 elma kültüründe simptom oluşturmadığını ve $avrRPt2_{Ea}$' nın konukçu patojen (Mrp5-*E. amylovora*) ilişkisinde avirülens olarak hareket ettiğini belirlemişlerdir. $avrRPt2_{Ea}$ geni susturulmuş *E. amylovora*' nın Mr5' de başarılı bir şekilde enfeksiyon oluşturmasıyla Mr5 ve *E. amylovora* arasındaki ilişkinin gene karşı gen olduğunu göstermişlerdir. *FB_MR5* direnç geni ile *E. amylovora*' nın $AvrRPt2_{Ea}$ efektörü arasında ki ilişkinin Arabidopsis' in *RPS2* direnç geni ile *P. s*. pv. *tomato*' nun efektörü AvrRPt2 arasındaki ilişkiye benzer olabileceği düşünülmektir.

Patojenle ilişkili proteinler ile oluşturulan savunma tepkisi, saldırı bölgesinde bulunan hücrelerde hızlı nekrozların (Hipersensitif Yanıt) ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Erkan, 1992). Hipersensitif yanıt olayında patojen ile temasa geçen konukçu hücre ve bu hücreyi çevreleyen komşu hücreler hızlı bir şekilde ölmekte ve nekrotik lekeler halinde kurumaktadır (Mansfield, 1984). HR ile birlikte, hücre duvarlarında değişmeler, kalloz, fenolik polimerler, lignin, süberin, hidroksi prolince zengin glikoproteinler ve en önemlisi antimikrobiyal bileşikler, fitoaleksinler sentezlenmekte ve infeksiyon noktalarına lokalize olmaktadır. Bitki patojene karşı oluşturduğu böyle bir tepkiyle, patojenin besin alımını engelleyerek gelişmesini durdurduğu gibi bundan sonra olabilecek ikincil infeksiyonlardan da kendini korumaktadır (Crute ve ark., 1985; Dangl, 1992).

Gene-karşı-gen yolu bitkide sadece lokalize hipersensitif yanıtı uyarmaz aynı zamanda gelecek patojen saldırıları için SAR uyarır. SAR yolunda bir patojen tarafından konak hücresinde meydana getirilen infeksiyon, bitki boyunca yayılan bir sinyali tetikler, bu sinyal infekte olmamış dokularda savunma genlerinin aktivasyonunu tetikler ve bitkide bir dizi patojenin takip eden infeksiyonuna karşı artmış bir direnç görülür (Glazebrook ve ark., 1997).

Sistemik direnç sırasında fitoaleksin ve PR proteinlerinin üretimi gerçekleşmektedir. Fitoaleksinler lokal cevapların başlıca antimikrobial birleşikleriyken PR proteinleri hem lokal hem de sistemik direnç sürecinde meydana gelmektedir (Mansfield ve ark., 1999).

PR proteinleri, sağlıklı bitkilerde yaygın olarak eser miktarlarda bulunurlar fakat bitkilerin virüsler, viroidler, funguslar veya bakteriler ile enfeksiyonuyla çok yüksek konsantrasyonlarda üretilirler (De Wit ve Bakker, 1980; Gianinazzi ve ark., 1980; Ahl ve ark., 1981; Camacho Henriquez ve Sänger, 1982).

PR proteinleri ortak ayırt edici özelliklere sahiptirler. Örneğin, düşük pH' ta seçici olarak ekstrakte edilebilirler, proteolitik enzimlere yüksek oranda dirençlidirler ve doğal poliakrilamid jelde elektroforez ile çözülebilirler. PR proteinleri düşük molekül ağırlığına sahip (6-43kDa) proteinlerdir ve apoplast onların biriktiği temel alanı oluşturur (Van Loon, 1999).

PR proteinler interselüler alanlarda lokalize olan asidik ve genellikle vakuolde intraselüler alanlarda biriken fonksiyonel olarak asidik PR proteinlerine benzeyen fakat farklı moleküler ağırlıklarına ve aminoasid dizilerine sahip bazik proteinler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Legrand ve ark., 1987).

Van Loon ve Van Kammen (1970), Tütün Mozaik Virüsü tarafından enfekte edilmiş olan tütün bitkilerinde ilk kez PR proteinleri bulmuşlardır. Tütünde 10 önemli asidik PR proteini saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Van Loon, 1982; Jamet ve Fritig, 1986; Pierpoint, 1986). PR proteinlerinin değişik tipleri, çeşitli bitkilerden izole edilmiştir (Agrios, 1997).

Asidik PR proteinlerinden en iyi bilineni PR1 adlı proteindir. Bu protein, Tütün Mozaik Virüsü ile enfekte olmuş tütün bitkilerinde toplam hücre proteininin %2' sine ulaşacak kadar yüksek miktarda üretilir. Bazik PR proteinlerinin en iyi bilinen örneğini thaumatine benzer proteinler grubu oluşturur, bu proteinler genelde hem patojen enfeksiyonunda sonra hem de ozmotik strese maruz kalmış bitkilerde üretilir (Kazan ve Gürel, 2001).

Çeşitli PR proteini grupları fonksiyonlarına, serolojik ilişkilerine, amino asit sekansına, molekül ağırlığına ve diğer belli özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. İyi bilinen PR proteinleri; PR1 proteinleri, β -1,3-glukanazlar (PR2), kitinazlar (PR3, PR4), lizozimler (PR8), ozmotin ve taumatin benzeri proteinler (PR5), lipid transfer proteinleri (PR14), proteinaz inhibitörleri (PR6), endoproteinazlar (PR7), peroksidazlar (PR9), sistince zengin proteinler, glisince zengin proteinler, ve kitosanazlar' dır. Birçok bitkide genelde her PR proteininin çeşitli izoformları vardır (Agrios, 1997; Van Loon ve ark., 2006).

Bakteri ve fungus avirülens gen ürünleri PR proteinlerini indükleyebilme kabiliyetindedir (Staskawicz ve ark., 1995; Hennin ve ark., 2001).

Ward ve ark. (1991), tütünün TMV ile enfeksiyonundan sonra *PR5* genin ifadesini belirlemişlerdir. *PR5* genin tütünde yalnızca enfekteli yapraklarda lokal olarak değil aynı zamanda bitkinin enfekteli olmayan yapraklarında da ifade edildiği belirlenmiştir. Benzer şekilde *Pseudomonas syringae* ile enfekteli *Arabidopsis* ve *Xantomonas campestris* pv. *vesicotari*a ile infekteli biber bitkisinde de *PR5* sistemik ifadesi belirlenmiştir (Van Wees ve ark., 1999; Hong ve ark., 2004).

Peroksidaz aktivitesi (PR9), patojen saldırısına karşı yanıtta, bitki hücre duvarının güçlendirilmesine katkıda bulunur (Lagrirmini ve ark., 1987). PR8' in lizozim aktivitesinden dolayı gram pozitif bakterileri engelleyebilir (Van Loon ve Van Strien 1999; Van Loon 2001; Selitrennikoff, 2001).

Dayanıklı bitkilerde PR protein birikimi hassas bitkilere göre daha fazladır. Hassas ve dirençli bitkilerdeki yanıt farklılığı, *Cladosporium fulvum* enfekteli domates (Wubben ve ark., 1996), *Phytophythora infestans* enfekteli patates (Tónon ve ark.,

2002), *Venturia inaequalis* enfekteli elma (Poupard ve ark., 2003) ve *Xanthomonas campestris* pv. *vesicotaria* enfekteli biber bitkilerinde belirlenmiştir (Edreva, 2005).

Erwinia amylovora saldırısı üzerine elmada farklı PR proteinlerin biriktiği belirlenmiştir (Venisse ve ark., 2002; Norelli ve ark., 2009).

Bonusera ve ark. (2006) Elmada, *E. amylovora* ile inokulasyondan sonra PR1 protein ifadesinde artış olmadığını bunun aksine PR2, PR5 ve PR8 proteinlerinin ifadesinin artığını belirlemişlerdir.

E. amylovora ile enfekteli elmada PR1 proteinlerin ifadesinin patojen tarafından baskılandığı belirlenmiş bunun yanında patojen saldırısına karşı PR1 benzeri proteinlerin ifade edildiği belirlenmiştir (Bonusera ve ark., 2006; Milčevičová ve ark., 2010).

Venisse ve ark. (2002), iki elma kültüründe *E. amylovora* inokulasyonundan sonra üç PR proteinin (β -1,3-glukanaz, kitinaz ve peroksidaz) ve Fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzim ifadelerinin artışını belirlemişlerdir. Bütün enzim aktiviteleri inokulasyondan sonra 18. ve 24. saatleri arasında önemli artış göstermiştir.

PR genleri olmayan *A. thaliana* mutantlarının genetik analizi, SA sinyali ile ilişkili olan *NPR1* (nonexpressor of *PR* genes) lokusunun keşfedilmesine olanak sağlamıştır. SAR gelişimi için NPR1 proteininin gerekli olduğu ve bunun *A. thaliana* yaban tipleri için virülent olan *Pseudomonas syringae* ve *Peronospora parasitica*' ya karşı bitki direncini önemli derecede artırdığı gösterilmiştir (Dong, 1998).

Arabidopsis ve pirinçte NPR1 aşırı ifade edildiğinde fungal ve bakteriyel direnç artmıştır (Cao ve ark., 1998; Chern ve ark., 2001). Elmada NPR1' in aşırı ifadesinin sonucunda *E. amylovora* ve diğer pek çok patojene karşı PR proteinlerin ifadesi artmıştır (Malnoy ve ark., 2007).

Bitkilerde, doğrudan patojenin hücre duvarını etkileyen proteinlerin olduğu bilinmektedir. Bu gruba giren proteinleri kodlayan genlerin bitkide ifade edilmesindeki amaç patojenin hayati bir unsuru olan hücre duvarını etkilemek ve böylelikle patojenin bitkiye vereceği zararı azaltmaktır. Thionin ve permatin grubu proteinler (zeamatin, thaumatin, osmatin vb.) bakteriyel membranlar üzerine etkide bulunarak (büyük olasılıkla membranlarda delikler açarak) hücre içi sıvının dışarı akmasına neden olurlar. Lizozim grubuna giren proteinler, bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikonu eriterek etkide bulunurlar. Lektinler ya da öteki karbonhidratlara bağlanabilen proteinler hastalık etmeninin hücre duvarının yapısını bozarak normal işlevini önlerler (Özcan ve ark., 2001).

Bakterilerin salgıladığı virülens faktörlerinin etkisiz hale getirilmesi yoluyla da bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılık artırılabilir. Çeşitli toksinlerin, pektik enzimlerin, ekzopolisakkaritlerin ve hormonların virülens faktörleri olarak görev yaptığı bilinmektedir. *Pseudomonas syringae* tarafından salgılanan toksin bitkilerde klorotik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu toksin aynı zamanda antibakteriyel bir aktiviteye sahip olduğundan, başka türlere ait bazı bakteriler bu toksinden korunmak için toksini inaktif hale getirici proteinler geliştirmişlerdir. Bu proteinleri kodlayan genlerin bakterilerden izole edilerek bitkilerde ifade edilmesi durumunda ise bitkinin toksini etkisiz hale getirmesi beklenir. Böyle bir toksini üreten transgenik tütün bitkisi, *Pseudomonas syringae* bakterisine karşı dayanıklı hale gelmiştir (Anzai ve ark., 1989).

Bakteri toksinlerinin bitkide etkilediği hedeflerin değiştirilmesi yolu ile bakterinin vereceği zararda önlenebilir. Örneğin, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bakterisi, arginin amino asidinin biyosentezi sırasında ornitin karbomil transferaz (ornithine carbomyl transferase) adlı bir enzimi kullanılır. Bakterinin konukçusu olan bitkinin enzimi bu toksinden zarar görürken, bakterideki aynı enzim bu toksine karşı doğal olarak dayanıklılık gösterir (Fuente-Martinez ve ark., 1992). Ornitin karboksilaz transferaz geni (argK) bakteriden klonlanıp fasulye bitkisine aktarıldığında ise fasulye bitkisi *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*' ya karşı tam dayanıklı bir hale gelmiştir (Fuente-Martinez ve ark., 1993).

Gene karşı gen dayanıklılığının sadece *avr* ve *R* gen ürünlerinin etkileşimine bağlı olmadığı görülmüştür. Chang ve ark. (2004)' na göre, konukçu ve patojen arsındaki etkileşim veya tanıma için konukçunun ek birleşenlerine ihtiyaç vardır.

Dayanıklılık genlerinin Avr proteinlerini tanımasıyla savunma sinyali oluşmakta ve böylece dayanıklılık başlamaktadır. Fakat bu model, tüm R-Avr çiftlerine uymamaktadır bunun için koruma hipotezi geliştirilmiştir. Koruma hipotezi, koruma ve korunanlar arasında gerçekleşmektedir. Burada korunanlar, enfeksiyon için patojen tarafından gereksinim duyulan konukçu hücresel proteinleri; koruma ise, dayanıklılık proteinleri (R proteinleri)' dir. Hipoteze göre, Avr proteininin korunanlarla potansiyel etkileşimi sonucunda oluşan hücresel protein, korumayı tanımakta ve savunma sinyali oluşmaktadır. Koruma hipotezi, birçok sisteme uyduğu için günümüzde geçerli olan bir mekanizmadır (Çandar ve Erkan, 2011).

Meng ve ark. (2006), maya ikili hibrit sistemini kullanarak *E. amylovora* efektör proteini DspA/E ile etkileşime giren dört elma proteini (DIPMs) belirlemişlerdir. Bu dört protein benzer dizilim yapısında ve diğer organizmalardaki LRR-RLK' a benzerlik

göstermektedir. *E. amylovora*' nın efektör DspA/E proteini elmada hedef hücrelere enjekte edilerek, DIPM proteiniyle etkileşim gösterdiği belirlenmiştir. Bu etkileşim savunma yanıtına öncülük eden sinyal transdüksiyonu engellemiş ve sonucunda da hastalık gelişimi görülmüştür. DIPM proteinleri, DspA/E efektör proteinlerinin hedef proteinleri ve hassasiyet faktörü olarak kabul edilirler. Avr efektörle, konukçunun spesifik protein (patojenite hedefi) etkileşimi hastalığı teşvik eder. Elma direnç proteinlerinin, patojenite hedefi ile koruyucu etkileşiminin olabileceği düşünülmektedir.

Borejsza-Wysocka ve ark. (2006), Elmada DIPM proteinlerini kodlayan genleri susturarak *E. amylovora*' nın DspA/E proteinleriyle etkileşimini ve hasatlık gelişimini engellemişlerdir. Bu genlerin susturulmasıyla bitkide hastalığa karşı direnç sağlanmıştır.

Oh ve Beer (2007), maya ikili hibrit sistemini kullanarak elmada *E. amylovora* HrpN proteinin etkileşim gösterdiği HIPM proteinini bulmuşlardır. HIPM plasma membranıyla ilişkili ve sinyal peptit fonksiyonu göstermektedir. HIPM konukçu bitkide hassasiyeti arttırmaktadır. HrpN 198 amino asitlik amino ucunun HIPM proteini ile etkileşim göstermesi için gerekli olmasına rağmen ham armut meyvelerinde virülenslik için yeterli olmadığı görülmüştür.

Song ve ark. (2002), *E. amylovora*' nın HrpN proteinin FIB4 proteini ile etkileşim gösterdiğini belirlemişlerdir. FIB4 proteini *E. amylovora*' nın hedef veya reseptör proteini olabilir. FIB4 proteini abiyotik ve biyotik stres yanıtı için gereklidir. Singh ve ark. (2010), RNAi teknolojisi kullanılarak elmada *fib4* genini susturarak bu elmaların *E. amylovora*' ya karşı çok hassas olduklarını göstermişlerdir.

Toplam protein miktarının belirlenmesi de kullanılan Bradford (1976) yönteminde, farklı konsantrasyonlarda BSA içeren standart protein örnekleri hazırlanır ve standartların 595 nm' de absorbans değerleri ölçülür. Belirlenen absorbans değerleri kullanılarak standart eğri oluşturulur ve bu standart eğri grafiği kullanılarak protein konsantrasyonu tespit edilecek örneklerin değerleri belirlenmektedir.

SDS-PAGE yöntemi proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemede ve proteinlerin saflık derecesini belirlemede kullanmaktadır. SDS-PAGE elektroforez yönteminde, yükleme ve ayırma jelinden oluşan poliakrilamid jele protein örnekleri yüklenip elektrik akımına maruz bırakılır. Elektroforezden sonra jel çıkarılarak bantların görülebilmesi için Coomasie Brillant Blue ile boyanır. Jele bağlanmış fazla boyanın uzaklaştırılması için jel yıkama çözeltisine alınır ve fazla olan boya uzaklaştırılarak bantlar görünür hale getirilmektedir (Laemmli, 1970; Bollag ve ark., 1996).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Denemede Breaburn, Gala, Golden, Fuji elma çeşitleri, Santa Maria, Williams armut çeşitleri ve Ekmek, Eşme ayva çeşitlerinin 3 yaşındaki fidanları materyal olarak kullanılmışlardır. Armut ve Ayva fidanları Arelya Fidancılık Konya/Selçuklu ve Elma fidanları Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Isparta/Eğirdir' den temin edilmiştir.

3.1.2. Yetiştirme Koşulları

Fidanlar, toprak-gübre-kum (1:1:1) karışımı içeren 5 kg saksılar içerisine dikilmiştir. Fidanlar 23-25^{o}C sıcaklık, %65-70 nispi nem koşullarına sahip serada yetiştirilmişlerdir. Bitkilere toplamda 15 gr kalsiyum nitrat ve 50 ml hümik asit gübreleri 7 gün arayla yarı dozları uygulanmıştır.



Şekil 3.1.2.1. Sera Koşullarında Yetiştirilen Bitkilerin Genel Görünümü

3.1.3. Bakteriyel İzolatlar

Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan seçilen 10 adet *E. amylovora* izolatına, Norelli ve ark. (1988)' a göre virülens testi yapılmış ve yüksek virülent sahip iki izolat Ea234-1 (%84) ve Ea240-3 (%91) denemelerde kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan Kimyasal, Alet ve Ekipmanlar

Denemede kimyasal olarak; Coomassie Brilliant Blue G-250, %95 Ethanol, %85 Phosphoric asit (H_3PO_4), BSA (Bovine Serum Albumin), Akrilamid, Bisakrilamid, Tris, Hidrojen Klorür (HCl), SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), Amonyum Persülfat, Glycine, TEMED (N,N,N',N'- Tetrametilenetilendiamin), EDTA (Ethylenediaminetetracetic), Sodyum Fosfat, PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon), DTT (Dithiothreitol), Glycerol, Agar, 2-Mercaptoethanol, Tryptone, Gelatin, Esculin, Borik asit, Ferric amonium citrate, Proteose Pepton, Yeast extract, Ethidium Bromür, Bromphenol blue-xylene, n-Bütanol, İzopropanol, PCR Master, A ve B primerleri, Sakkaroz Nutrient Agar (SNA), Asetik asit (Glasiyel), Sıvı Azot kullanılmıştır.

Denemede alet ve ekipman olarak; BioPhotometer (Eppendorf), Dikey Elektroforez Tankı (Thermo), Soğutmalı Santrifüj, Termal Cycler (Eppendorf Mastercycler Personal), Yatay Elektroforez Tankı (Thermo), Dikey Elektroforez Tankı (Thermo), Termal Cycler (Eppendorf), Vorteks (WiseMix), Isı Bloğu (Techne), Hassas terazi (Precisa), Jel Görüntüleme Sistemi (Prizma Quantum), Çalkalayıcı (Heidolph), Güç Kaynağı (Thermo), Santrifüj (WiseSpin), pH metre, Mikropipet (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl), Whatman No:1 Filtre Kağıdı, Porselen havan, Pipet uçları (0.5 µl, 5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl) ve Eppendorf tüpler (1.5 ml ve 2 ml) kullanılmıştır.

3.1.5. Protein Analizlerinde Kullanılan Çözeltiler

Akrilamid/bis Çözeltisi (%30 T, %2.7 C_{bis})

Birleşen	Miktar
Akrilamid	29.2 g
Bisakrilamid	0.8 g
ddH_2O	100 ml

5x Tank Tamponu (0.025 M Tris, 0.192 M Glycine, %0.1 SDS)

Birleşen	Miktar
Tris	15 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
ddH_2O	1L

2x Örnek Uygulama Tamponu (0.125 M Tris, %4 SDS, %20 Glycerol, %10 2- Mercaptoethanol, %0.2 Bromphenol Blue, pH 6.8)

Birleşen	Miktar
Tris (0.5 M)	2.5 ml
SDS (%10)	4 ml
Glycerol	2 ml
2-Mercaptoethanol	1 ml
Bromphenol Blue	0.02 g
ddH_2O	10 ml

Boyama Çözeltisi

Birleşen	Miktar
Asetik asit	100 ml
Coomassie G-250	0.06 g
ddH_2O	900 ml

İzopropanollü Fiksatif

Birleşen	Miktar
İzopropanol	250 ml
Asetik asit	100 ml
ddH_2O	650 ml

Yıkama Çözeltisi

Birleşen	Miktar
Asetik asit	250 ml
ddH_2O	2250 ml

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin *Erwinia amylovora* ile İnokulasyonu

Erwinia amylovora izolatları stok kültürden Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine ekimleri yapılmış ve 48 saatlik kültürler inokulasyon için kullanılmışlardır. İnokulasyon için *Erwinia amylovora* izolatlarının 10^8 hücre/ml yoğunlukta süspansiyonları hazırlanmıştır. Süspansiyona batırılan steril bir makas yardımıyla bitkinin genç yaprakların merkezinden uzakta 1/3' lik kısmı kesilmiş ve bakteriyel süspansiyon içerisine 30 sn kadar batırılmıştır (Bonasera ve ark., 2006), (Şekil 3.2.1.1).



Şekil 3.2.1.1. *Erwinia amylovora*' nın inokulasyonu

3.2.2. Bitki Örneklerinin Alınması

Bakteri inokulasyonundan sonraki 24., 36. ve 72. saatlerde kontrol bitkilerde dahil olmak üzere yaprak örnekleri alüminyum folyo içerisine alınıp sıvı azota batırılarak dondurulmuştur. Protein analizi yapılıncaya kadar örnekler -80^{o}C' de saklanmıştır (Bonasera ve ark., 2006).

3.2.3. *Erwinia amylovora'* nın Re-izolasyonu

Bitki örnekleri öncelikli olarak üzerindeki çamur ve tozlardan arındırmak için akan musluk suyunda iyice yıkanmıştır. Daha sonra %1' lik sodyum hipokloritte 1 dakika tutulmuştur ve 3 seri steril saf sudan geçirildikten sonra laminar kabinde, steril bir bistüri yardımıyla birkaç mm boyunda parçalara ayrılmıştır. Bu küçük parçalar içerisinde 10 ml steril saf su veya steril % 6' lık peptonlu su içerisine atılarak 30 dakika bekletilmiştir. Örnekler 10^{-3} oranında seyreltilerek steril öze yardımı ile Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine ekimi yapılmış ve 23-25^{o}C' de inkübe edilmiştir. Kırk sekiz saat inkübasyondan sonra SNA besi yerinde tipik levan şeklinde oluşan kolonilerden saflaştırma yapılmıştır (Saygılı, 1995).

3.2.4. Patojenin Tanısı

İzolasyonu yapılan *E. amylovora* tanısı için biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik testler yapılmıştır. Fahy ve Parsley (1983), Lelliot ve Stead (1987), Schaad ve ark. (2001)' e göre; 36^{o}C' de gelişim, indol üretimi, jelatinin hidrolizi, KOH testi, KingB besi yerinde fluoresans pigment oluşumu, %5 SNA' da gelişim, oksidatif-fermentatif testi, aesculin hidrolizi, karbonhidratlardan asit üretimi tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu testleri esas alınarak yapılmıştır. Aynı koşullarda her bir test 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.5. Moleküler Tanılama

Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen ve *E. amylovora* olduğu biyokimyasal testlerle belirlenen izolatların PCR metodu kullanılarak moleküler tanılamaları yapılmıştır. *E. amylovora* izolatlarının PCR ile tanılanmasında bakterinin patojenisitesinde önemli bir yeri olan pEA29 plazmidinin 1 kb' lık DNA dizilisinden yararlanılarak iki primer amplifikasyonu sağlanmıştır (Lecomte ve ark., 1997; Bereswill ve ark., 1992). Spesifik A ve B primerlerinin baz dizilişi ve PCR protokolü aşağıda verilmiştir;

A: 5'- CGGTTTTTAACGCTGGG- 3'
B: 5'- GGGCAAATACTCGGATT- 3'

Termal cycler programı; 95^{o}C de 3 dk (1 döngü), 94^{o}C de 1 dk ,52^{o}C de 1 dk, 72^{o}C de 1 dk (35 döngü), 72^{o}C de 10 dk (1 döngü)' dır.

Amplifiye edilen bölge için 1000 bp bant oluşturması beklenilmiştir (Momol ve ark., 1998).

3.2.6. Bitki Örneklerinden Protein İzolasyonu

Bitki örnekleri üç tekerrürlü olarak 0.5' er g tartılarak 0,1 M sodyum fosfat tamponu ve % 2 PVPP ile homojenize edilmiştir. Daha sonra 4^{o}C' de 14000 rpm' de 30 dk. santrifüj edilerek süpernatantlar yeni eppendorf tüplere alınmıştır (Ben Khaled ve ark., 2002).

3.2.7. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Bitki ekstraktlarının protein içeriği Bradford (1976)' a göre belirlenmiştir. Protein özütlerinin konsantrasyonun belirlemek için Coomasie Brillant Blue reaktifi ve protein standartlarının hazırlanması için Bovin Serum Albümin (BSA) kullanılmıştır.

Coomasie Brillant Blue reaktifi, 100 mg Coomasie Brillant Blue G-250, 50 ml %95'lik ethanol içerisinde çözündürülmüş ve 100 ml %85' lik fosforik asit ilave edilerek, distile saf su ile son hacim 1L tamamlanarak hazırlanmıştır.

Protein standart eğrisini hazırlamak için gerekli standart protein aralıklarına uygun olacak şekilde BSA stoğundan (1000 µg/ml) Çizelge 3.2.7.1' de belirtilen dilüsyonlar hazırlanmıştır.

BSA standart örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri, 450 µl Coomasie Brillant Blue reaktifi içeren test tüplerine BSA örneklerinden 50 µl ilave edilmiş, pipetlenerek karıştırılmış ve karışımlar plastik küvetlere aktarıldıktan sonra 595 nm' de absorbans değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.2.7.1. Standart proteinlerin hazırlanması

BSA Stoğu (1000 µg/ml)	Çözücü (Na_2HPO_4 tamponu)	BSA Standart Konsantrasyonu
5 µl	45 µl	0.2 mg/ml
15 µl	35 µl	0.6 mg/ml
20 µl	30 µl	0.8 mg/ml
30 µl	20 µl	1.2 mg/ml
35 µl	15 µl	1.4 mg/ml
50 µl	0 µl	2 mg/ml

Bitki örneklerindeki protein miktarı 450 µl Coomasie Brillant Blue reaktifi içeren test tüplerine protein miktarı tespit edilecek örneklerden 50 µl ilave edilerek karıştırıldıktan sonra karışım plastik küvetlere aktarılmış ve 595 nm' de absorbans değerleri ölçülmüştür. Örneklerin total protein miktarları daha önce oluşturulan protein standart eğri grafiği kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.8. SDS-PAGE Analizi

E. amylovora inokulasyonundan 24., 36. ve 72. saatlerinde izole edilen proteinlerin molekül ağırlıklarının SDS-PAGE uygulamasında Laemmli (1970)' nin önerdiği yönteme göre belirlenmiştir.

SDS-PAGE uygulamasında yükleme ve ayırma jeli olmak üzere, yoğunlukları farklı iki ayırma ortamının birlikte kullanılması söz konusudur. Jel oluşturulması sırasında uygun şekilde hazırlanmış cam plakalar kullanılmıştır.

3.2.8.1. Jellerin Hazırlanması

Jel dökme aparatı hazırlandıktan sonra bir erlen içerisine Çizelge 3.2.8.1.1' de içeriği verilen ayırma jelini oluşturan çözeltiler, amonyum persülfat hariç olmak üzere karıştırılmış ve karışımın havası alınmıştır. Amonyum persülfat eklendikten sonra yavaşça çalkalanmıştır. Karışım jel kasetine pastör pipetiyle üsten 2-3 cm kalana kadar doldurulmuştur. Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için 0.3 ml su ile doyurulmuş n-bütanol çözeltisi bir enjektör yardımıyla jel kasetinin her iki tarafından dökülmüştür. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra üst yüzeydeki bütanol dökülmüş ve jel yüzeyi saf su ile birkaç kez yıkanmıştır (Arda ve Ertan, 2004).

Bir erlende Çizelge 3.2.8.1.1' de içeriği verilen yükleme jelini oluşturan çözeltiler amonyum persülfat hariç olarak karıştırılmış ve karışımın havası alınmıştır. Amonyum persülfat eklendikten sonra yavaşça çalkalanmıştır. Ayırma jeli polimerizasyonundan sonra üzeri yükleme jeli ile tamamen doldurulmuştur ve tarak yerleştirilerek en az yarım saat polimerize olması beklenmiştir (Arda ve Ertan, 2004).

Çizelge 3.2.8.1.1. SDS-PAGE Kullanılan Jel Karışım Oranları

Ayırma jeli	**% 12T**	**Yükleme jeli**	**%5T**
Akrilamid/bis	12 ml	Akrilamid/bis	1.6 ml
Tris (pH 8.8)	7.5 ml	Tris (pH 6.8)	2.5 ml
% 10 SDS	0.3 ml	% 10 SDS	0.1 ml
ddH_2O	10 ml	ddH_2O	6 ml
TEMED	15 µl	TEMED	5 µl
Amonyum persülfat	150 µl	Amonyum persülfat	50 µl

3.2.8.2. Protein Örneklerinin SDS-PAGE Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Eşit hacimde protein örneği ile 2x örnek uygulama tamponu bir eppendorf tüp de karıştırılmıştır. Hazırlanan tüm tüpler 100^{o}C' de 5 dk ısı bloğunda bekletilmiştir.

Yükleme jelindeki tarak, bir taraftan başlayarak yavaşça kaldırılıp kuyucuklar saf su ile yıkanmış ve elektroforez tankına 5x tank tamponu elektrotun temas edebileceği bir yüksekliğe kadar doldurulmuştur. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirilmiş, aletin üst bölmesi de 5x tamponu ile doldurulmuş ve jeldeki kuyucuklara 20 µl örnek proteinler yüklenmiştir. Sistem güç kaynağına bağlanarak, alet 16 mA akım geçecek şekilde ayarlanmıştır. Proteinlerin jeldeki hareketlerini izlememizi sağlayan boyaya ait bant, yükleme jelinden çıkıp ayırma jeline girdiğinde, akım 30 mA' e artırılıp işlem sonuna kadar bu akımda devam edilmiştir. İzleme boyası jelin diğer ucuna 2 cm uzaklığa ulaştığı zaman elektroforez işlemi sonlandırılmıştır (Arda ve Ertan, 2004).



Şekil 3.2.8.2.1. Proteinlerin Dikey Elektroforez Tankında Yürütülmesi

3.2.8.3. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Yıkanması

Elektroforezden sonra jel, cam plakalar arasından çıkarılarak izopropanollü fiksatif içinde, oda sıcaklığında 30 dk düşük hızda çalkalanmıştır. İzopropanollü fiksatif dökülerek hızlı boyama çözeltisi katılmış ve oda sıcaklığında en az 2 saat çalkalanmıştır. Daha sonra boyama çözeltisi uzaklaştırılmış ve jel yıkama çözeltisinde çalkalanarak yıkanmıştır. Jel yıkama çözeltisiyle protein örneklerine bağlanan boya jelden çıkmadığı halde jelin diğer bölgelerindeki boya ortamdan uzaklaşmıştır ve örnekler görünür hale getirilmiştir (Arda ve Ertan, 2004).

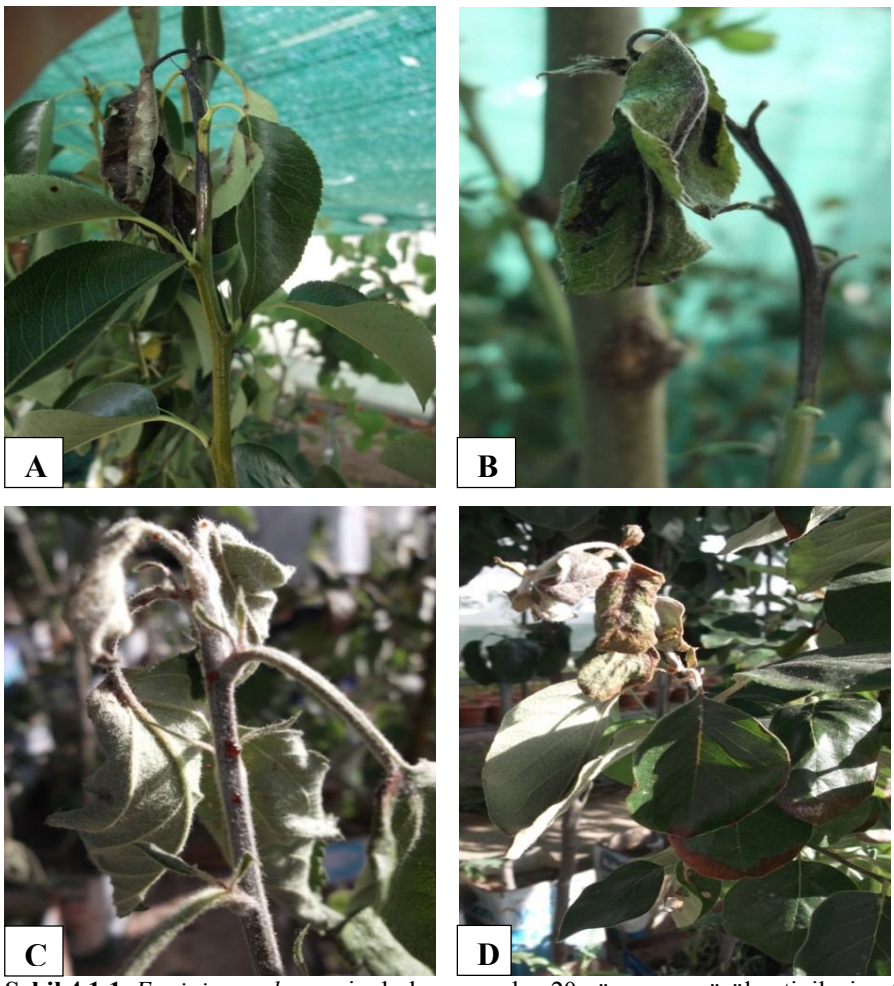
3.2.9. İstatistiksel Analizler

Tüm parametreler Minitab 14 (ANOVA) programında Vayans analizi ve Duncan testi kullanılarak analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Bakteri İnokulasyonu

Elma, armut ve ayva çeşitlerinin, iki farklı *E. amylovora* izolatına (Ea234-1 ve Ea240-3) karşı gösterdikleri reaksiyon sonucu protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla bakteriyel süspansiyonuna batırılan bir makas yardımıyla yapraklar kesilerek inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyondan sonraki 24., 36. ve 72., saatlerde protein analizleri için yaprak örnekleri alınmıştır. İlk ateş yanıklığı simptomları 5-7 gün içerisinde görülmüştür. Re-izolasyon için simptom görünen sürgünlerden örnekler 20. günde alınmıştır. Şekil 4.1.1' de farklı konukçulardaki hastalık simptomları gösterilmiştir.



Şekil 4.1.1. *Erwinia amylovora* inokulasyonundan 20 gün sonra görülen tipik simptomlar
A: Armut da Santa Maria çeşidi, B: Armut da Williams çeşidi, C:Elma da Gala çeşidi,
D: Ayva da Ekmek çeşidi.

4.2. *Erwinia amylovora*' nın Re-İzolasyonu ve Tanılaması

E. amylovora inokulasyonundan sonra Koch postulatları gereği re-izolasyon yapılmış ve elde edilen bakterilerin tanısı yapılmıştır (Çizelge 4.2.1.).

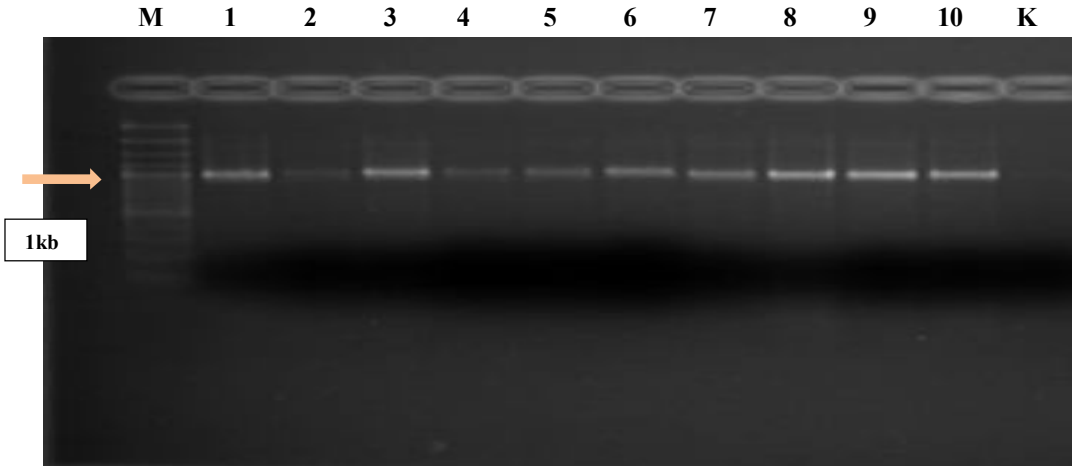
Çizelge 4.2.1. Elma, armut ve ayva bitkilerinden re-izolasyonu yapılan bakteriyel izolatların tanılanması

TEST	Referans kültürler (Ea234-1, Ea240-3)	İzole edilen bakteriler
36°C' de gelişim	-	-
İndol üretimi	-	-
Jelatin hidrolizi	+	+
KOH testi	+	+
%5 SNA' da gelişim	+	+
KingB besi yerinde fluoresan pigment oluşumu	-	-
Oksidatif-fermantatif reaksiyon	+	+
Aesculin hidrolizi	+	+
Karbonhidratlardan asit üretimi:		
Maltose	-	-
Glycerol	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	+	+
Tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu	+	+

(+): Pozitif sonuç , (-): Negatif sonuç

4.3. *Erwinia amylovora*' nın Moleküler Tanılanması

Erwinia amylovora' dan DNA izolasyonu sonucu elde edilen bakteri DNA'sı A ve B primerleri ile PCR termocycler cihazında amplifiye edilmiştir. PCR sonucunda oluşan amplikonlar elektroforez sisteminde yürütülerek bakteriyel izolatlara ait DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1. *E*rwinia *amylovora* izolatlarının 1000 bp' de bant oluşturduğu PCR sonuçları.
M: Marker, 1-5: Ea234-1, 6-10: Ea240-3, K: Kontrol.

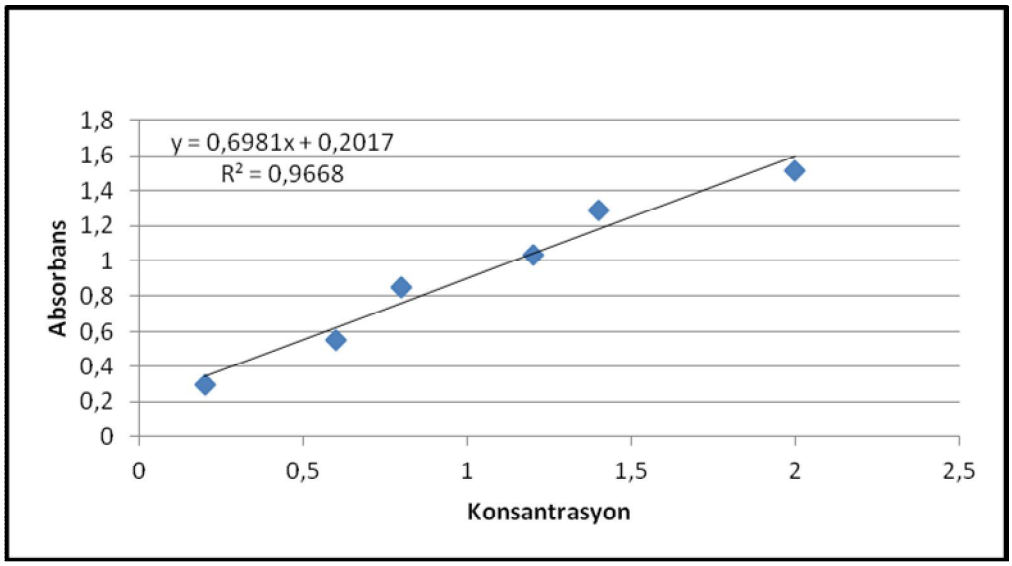
4.4. Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi için Hazırlanan Standart Eğri

Toplam protein miktarının belirlenmesinde Bradford (1976) yöntemi kullanılmıştır. Bradford yöntemiyle hazırlanan protein standartlarının ve *Erwinia amylovora* inokulasyonu sonrası zamana (24., 36., ve 72. sa) bağlı olarak armut, elma ve ayva fidanlarından alınan yaprak örneklerine ait protein ekstraktlarının 595 nm' de absorbans değerleri elde edilmiştir. Standart protein örneklerinin absorbans değerleri Çizelge 4.4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4.1. Standart Proteinlerin Absorbans Değerleri

BSA (mg/ml)	Absorbans
0.2	0.300
0.6	0.552
0.8	0.853
1.2	1.032
1.4	1.288
2	1.514

Standart proteinlerin absorbans değerleriyle standart bir eğri hazırlanmıştır (Şekil 4.4.1) ve bu eğriye göre örneklerin protein miktarı belirlenmiştir.



Şekil 4.4.1. Protein Standart Eğri Grafiği

Çalışmamızda elde edilen standart eğrinin R=0,9668 değeri, lineer regresyonun güvenilir olduğunu göstermiştir.

4.5. Elma Çeşitlerinde Farklı *Erwinia amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonları Sonrası Toplam Protein Miktarına Olan Etkileri

4.5.1. Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Elma Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı

E. amylovora Ea234-1 izolatının enfeksiyonunun Braeburn, Fuji, Gala ve Golden elma çeşitlerinde toplam protein miktarına olan etkisi Çizelge 4.5.1.1' de verilmiştir. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş tablo değerleri ortalamalar olarak verilmiştir. Enfeksiyondan sonraki 24. saatte toplam protein miktarı Gala çeşidinde sayısal olarak azalış gösterirken diğer çeşitlerde sayısal olarak artış görülmüştür. 36. ve 72. saatlerde toplam protein miktarı Gala çeşidinde sayısal olarak artmış diğer çeşitlerde ise sayısal olarak düşüş görülmüştür.

Elma çeşidi ve zaman etkileşimleri arasında, tüm çeşitler arasında ve tüm örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak farklılıklar belirlenmiştir (Ek Çizelge 1).

Elma çeşidi ve zaman etkileşimleri $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 1). Elde edilen verilere göre enfeksiyondan sonraki 24. saatte Fuji çeşidinde kontrol 0,70 mg/ml' lık değerine oranla 1,10 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere, 36. saatte Braeburn çeşidinde kontrol 1,30 mg/ml' lık değerine oranla 1,10 mg/ml' lık en düşük sayısal değere ve 72. saatte Golden çeşidinde kontrol 1,90 mg/ml' lık değerine oranla 0,83 mg/ml' lık en düşük sayısal değere ulaşılmıştır (Çizelge 4.3.5.1).

Çizelge 4.5.1.1. Toplam protein miktarı bakımından elma çeşitleri ve zamanlar arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	ZAMAN					
	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Braeburn	0,90±0,10ef	0,93±0,15ef	1,30±0,10cd	1,10±0,10cd	1,80±0,10ab	1,33±0,51c
Fuji	0,70±0,10fg	1,10±0,17cde	1,00±0,10def	0,93±0,06ef	1,90±0,10a	0,97±0,12e
Gala	1,10±0,10cde	0,97±0,12ef	0,80±0,10efg	1,00±0,10def	0,80±0,10efg	0,83±0,15e
Golden	0,90±0,10ef	0,97±0,06ef	0,70±0,10fg	0,57±0,06g	1,90±0,10a	0,83±0,06e

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 1). Bu verilere göre Braeburn çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5.1.2).

Çizelge 4.5.1.2. Toplam protein miktarı bakımından elma çeşitleri arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	Braeburn	Fuji	Gala	Golden
ORTALAMA	1,23±0,37a	1,10±0,40b	0,92±0,15b	0,98±0,45b

Örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 1). Bu verilere göre kontrole oranla 24. saatte alınan örneklerin protein miktarında artış, 36. ve 72. saatte alınan örneklerin protein miktarında düşüş belirlenmiştir (Çizelge 4.5.1.3).

Çizelge 4.5.1.3. Toplam protein miktarı bakımından zamanlar arasındaki değerlendirme

ZAMAN	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
ORTALAMA	0,90±0,17b	0,99±0,13b	0,95±0,25b	0,90±0,22b	1,60±0,49a	0,99±0,32b

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

4.5.2. Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Elma Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı

E. amylovora Ea240-3 izolatının enfeksiyonunun Braeburn, Fuji, Gala ve Golden elma çeşitlerinde toplam protein miktarına olan etkisi Çizelge 4.5.2.1' de verilmiştir. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş tablo değerleri ortalamalar olarak verilmiştir. Enfeksiyondan sonraki 24. saatte toplam protein miktarı Golden ve Braeburn çeşitlerinde sayısal olarak azalış gösterirken diğer çeşitlerde sayısal olarak artış görülmüştür. 36. saatte toplam protein miktarı Golden ve Fuji çeşitlerinde sayısal olarak azalış gösterirken diğer çeşitlerde sayısal olarak artış görülmüştür. 72. saatlerde toplam protein miktarı Braeburn çeşidinde sayısal olarak artmış diğer çeşitlerde ise sayısal olarak düşüş görülmüştür.

Elma çeşidi ve zaman etkileşimleri arasında ve tüm çeşitler arasında istatistiki olarak farklılıklar belirlenmiştir. Tüm örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak farklılık belirlenmemiştir (Ek Çizelge 2).

Elma çeşidi ve zaman etkileşimleri $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 2). Elde edilen verilere göre enfeksiyondan sonraki 24. saatte Gala çeşidinde kontrol 0,80 mg/ml' lık değerine oranla 1,00 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere, 36. saatte Gala çeşidinde kontrol 0,80 mg/ml' lık değerine oranla 1,20 mg/ml' lık en yüksek

sayısal değere ve 72. saatte Braeburn çeşidinde kontrol 0,80 mg/ml' lık değerine oranla 1,27 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere ulaşılmıştır (Çizelge 4.5.2.1).

Çizelge 4.5.2.1. Toplam protein miktarı bakımından elma çeşitleri ve zamanlar arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	ZAMAN					
	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Braeburn	1,60±0,10a	1,00±0,17bcd	1,10±0,10abcd	1,33±0,49ab	0,80±0,15bcd	1,27±0,50ab
Fuji	0,80±0,15bcd	0,93±0,60bcd	1,10±0,10abcd	0,97±0,15bcd	1,60±0,10a	1,37±0,50ab
Gala	0,80±0,10bcd	1,00±0,20bcd	0,80±0,10bcd	1,20±0,53abcd	0,70±0,10cd	0,67±0,06d
Golden	0,90±0,10bcd	0,87±0,29bcd	1,20±0,10abcd	0,67±0,06d	0,90±0,10bcd	0,67±0,06d

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 2). Bu verilere göre Braeburn çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5.2.2).

Çizelge 4.5.2.2. Toplam protein miktarı bakımından elma çeşitleri arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	Braeburn	Fuji	Gala	Golden
ORTALAMA	1,18±0,38a	1,13±0,41a	0,86±0,28b	0,87±0,22b

Örnekleme zamanları arasında istatistiki farklılıklar $p<0,01$-0,05 seviyesinde belirlenmemiştir (Ek Çizelge 2).

Çizelge 4.5.2.3. Toplam protein miktarı bakımından zamanlar arasındaki değerlendirme

ZAMAN	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
ORTALAMA	1,02±0,37	0,95±0,31	1,05±0,18	1,04±0,41	1,00±0,39	0,99±0,46

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

4.6. Armut Çeşitlerinde Farklı *Erwinia amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonları Sonrası Toplam Protein Miktarına Olan Etkileri

4.6.1. Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Armut Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı

E. amylovora Ea234-1 izolatının enfeksiyonunun Santa Maria ve Williams armut çeşitlerinde toplam protein miktarına olan etkisi Çizelge 4.6.1.1' de verilmiştir. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş tablo değerleri ortalamalar olarak verilmiştir. Enfeksiyondan sonraki 24. ve 36. saatte toplam protein miktarı Santa Maria çeşidinde sayısal olarak artış gösterirken Williams çeşidinde sayısal olarak düşüş görülmüştür. 72. saatte toplam protein miktarının her iki çeşitte de sayısal olarak artığı görülmüştür.

Armut çeşidi ve zaman etkileşimleri arasında ve tüm çeşitler arasında istatistiki olarak farklılıklar belirlenmiştir. Tüm örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak farklılık belirlenmemiştir (Ek Çizelge 3).

Armut çeşidi ve zaman etkileşimleri $p<0,05$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 3). Elde edilen verilere göre enfeksiyondan sonraki 24. saatte Santa Maria çeşidinde kontrol 0,60 mg/ml' lık değerine oranla 0,83 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere, 36. saatte Santa Maria çeşidinde kontrol 0,60 mg/ml' lık değerine oranla 0,87 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere ve 72. saatte Santa Maria çeşidinde kontrol 0,40 mg/ml' lık değerine oranla 0,63 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere ulaşılmıştır (Çizelge 4.6.1.1).

Çizelge 4.6.1.1. Toplam protein miktarı bakımından armut çeşitleri ve zamanlar arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	ZAMAN					
	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
S. Maria	0,60±0,10ab	0,83±0,15a	0,60±0,10ab	0,87±0,35a	0,40±0,10b	0,63±0,35ab
Williams	0,90±0,10a	0,60±0,35ab	0,90±0,10a	0,73±0,06ab	0,90±0,10a	0,93±0,32a

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak $p<0,05$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 3). Bu verilere göre Santa Maria çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6.1.2).

Çizelge 4.6.1.2. Toplam protein miktarı bakımından armut çeşitleri arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	S. Maria	Williams
ORTALAMA	1,23±0,25a	1,10±0,21b

Örnekleme zamanları arasında istatistiki farklılıklar p<0,01-0,05 seviyesinde belirlenmemiştir (Ek Çizelge 3).

Çizelge 4.6.1.3. Toplam protein miktarı bakımından zamanlar arasındaki değerlendirme

ZAMAN	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
ORTALAMA	0,90±0,19	0,99±0,27	0,95±0,19	0,90±0,24	1,60±0,29	0,99±0,34

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

4.6.2. Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Armut Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı

E. amylovora Ea240-3 izolatının enfeksiyonunun Santa Maria ve Williams armut çeşitlerinde toplam protein miktarına olan etkisi Çizelge 4.6.2.1' de verilmiştir. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş tablo değerleri ortalamalar olarak verilmiştir. Enfeksiyondan sonraki 24. saatte toplam protein miktarında her iki çeşitte de sayısal olarak artış görülmüştür. 36. saatte Santa Maria çeşidinde sayısal olarak artış görülürken Williams çeşidinde sayısal olarak düşüş görülmüştür. 72. saatte toplam protein miktarı Santa Maria çeşidinde sayısal olarak düşüş görülmüştür.

Armut çeşidi ve zaman etkileşimleri arasında, tüm çeşitler arasında ve tüm örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak farklılıklar belirlenmiştir (Ek Çizelge 4).

Armut çeşidi ve zaman etkileşimleri p<0,01 seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 4). Elde edilen verilere göre enfeksiyondan sonraki 24. saatte Santa Maria çeşidinde kontrol 0,60 mg/ml' lık değerine oranla 0,83 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere, 36. saatte Santa Maria çeşidinde kontrol 0,70 mg/ml' lık değerine oranla 1,17 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere ve 72. saatte Santa Maria çeşidinde kontrol 1,10 mg/ml' lık değerine oranla 0,77 mg/ml' lık en düşük sayısal değere ulaşılmıştır (Çizelge 4.6.2.1).

Çizelge 4.6.2.1. Toplam protein miktarı bakımından armut çeşitleri ve zamanlar arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	ZAMAN					
	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
S. Maria	0,60±0,10de	0,83±0,12cd	0,70±0,10cde	1,17±0,06a	1,10±0,10ab	0,77±0,06cd
Williams	0,60±0,10de	0,63±0,21de	0,90±0,10bc	0,70±0,10cde	0,50±0,10e	0,50±0,10e

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 4). Bu verilere göre Santa Maria çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6.2.2).

Çizelge 4.6.2.2. Toplam protein miktarı bakımından armut çeşitleri arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	S. Maria	Williams
ORTALAMA	0,86±0,23a	0,64±0,18a

Örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur. Bu verilere göre kontrole oranla 24. ve 36. saatte alınan örneklerin protein miktarında artış, 72. saatte alınan örneklerin protein miktarında düşüş belirlenmiştir (Çizelge 4.6.2.3).

Çizelge 4.6.2.3. Toplam protein miktarı bakımından zamanlar arasındaki değerlendirme

ZAMAN	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
ORTALAMA	0,60±0,09c	0,73±0,19c	0,80±0,14b	0,93±0,27a	0,80±0,34b	0,63±0,16c

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

4.7. Ayva Çeşitlerinde Farklı *Erwinia amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonları Sonrası Toplam Protein Miktarına Olan Etkileri

4.7.1. Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Ayva Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı

E. amylovora Ea234-1 izolatının enfeksiyonunun Ekmek ve Eşme armut çeşitlerinde toplam protein miktarına olan etkisi Çizelge 4.7.1.1' de verilmiştir. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş tablo değerleri ortalamalar olarak verilmiştir. Enfeksiyondan sonraki 24. saatte toplam protein miktarı Ekmek çeşidinde sayısal olarak artış görülürken Eşme çeşidinde sayısal olarak düşüş görülmüştür. 36. saatte Eşme çeşidinde sayısal olarak artış görülürken Ekmek çeşidinde sayısal olarak düşüş görülmüştür. 72. saatte toplam protein miktarında her iki çeşitte de sayısal olarak düşüş görülmüştür.

Ayva çeşidi ve zaman etkileşimleri arasında ve tüm çeşitler arasında istatistiki olarak farklılıklar belirlenmiştir. Tüm örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak farklılık belirlenmemiştir (Ek Çizelge 5).

Ayva çeşidi ve zaman etkileşimleri $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 5). Elde edilen verilere göre enfeksiyondan sonraki 24. saatte Ekmek çeşidinde kontrol 0,50 mg/ml' lık değerine oranla 0,87 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere, 36. saatte Eşme çeşidinde kontrol 0,60 mg/ml' lık değerine oranla 1,57 mg/ml' lık en yüksek sayısal değere ve 72. saatte Eşme çeşidinde kontrol 1,40 mg/ml' lık değerine oranla 1,00 mg/ml' lık en düşük sayısal değere ulaşılmıştır (Çizelge 4.7.1.1).

Çizelge 4.7.1.1. Toplam protein miktarı bakımından ayva çeşitleri ve zamanlar arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	ZAMAN					
	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Ekmek	0,50±0,10e	0,87±0,29cde	1,40±0,10ab	0,60±0,10de	1,00±0,10bcd	0,83±0,21cde
Eşme	1,20±0,10abc	1,00±0,10bcd	0,60±0,10de	1,57±0,40a	1,40±0,10ab	1,00±0,36bcd

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasında istatistiki açıdan farklılıklar $p<0,01$ seviyesinde önemli bulunmuştur (Ek Çizelge 5). Bu verilere göre Eşme çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7.1.2).

Çizelge 4.7.1.2. Toplam protein miktarı bakımından ayva çeşitleri arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	Ekmek	Eşme
ORTALAMA	0,87±0,33b	1,13±0,38a

Örnekleme zamanları arasında istatistiki farklılıklar p<0,01-0,05 seviyesinde belirlenmemiştir (Ek Çizelge 5).

Çizelge 4.7.1.3. Toplam protein miktarı bakımından zamanlar arasındaki değerlendirme

ZAMAN	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
ORTALAMA	0,85±0,39	0,93±0,21	1,00±0,45	1,08±0,59	1,20±0,24	0,91±0,28

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

4.7.2. Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Ayva Çeşitlerinde Toplam Protein Miktarı

E. amylovora Ea240-3 izolatının enfeksiyonunun Ekmek ve Eşme armut çeşitlerinde toplam protein miktarına olan etkisi Çizelge 4.7.2.1' de verilmiştir. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş tablo değerleri ortalamalar olarak verilmiştir. Enfeksiyondan sonraki 24. ve 36. saatte toplam protein miktarında her iki çeşitte de sayısal olarak düşüş görülmüştür. 72. saatte toplam protein miktarında her iki çeşitte de sayısal olarak artış görülmüştür.

Ayva çeşidi ve zaman etkileşimleri arasında ve tüm çeşitler arasında istatistiki olarak farklılıklar belirlenmemiştir. Tüm örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak farklılık belirlenmiştir (Ek Çizelge 6).

Ayva çeşidi ve zaman etkileşimleri p<0,01-0,05 seviyesinde önemli bulunmamıştır (Ek Çizelge 6).

Çizelge 4.7.2.1. Toplam protein miktarı bakımından ayva çeşitleri ve zamanlar arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	ZAMAN					
	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Ekmek	1,00±0,10	0,87±0,38	1,00±0,10	0,73±0,15	0,80±0,10	1,17±0,25
Eşme	0,80±0,10	0,77±0,15	1,60±0,10	1,03±0,68	0,80±0,10	1,03±0,31

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasında istatistiki açıdan farklılıklar p<0,01-0,05 seviyesinde önemli bulunmamıştır (Ek Çizelge 6).

Çizelge 4.7.2.2. Toplam protein miktarı bakımından ayva çeşitleri arasındaki değerlendirme

ÇEŞİT	Ekmek	Eşme
ORTALAMA	0,93±0,23	1,00±0,40

Örnekleme zamanları arasında istatistiki farklılıklar $p<0,05$ seviyesinde belirlenmiştir (Ek Çizelge 6). Bu verilere göre kontrole oranla 24. ve 36. saatte alınan örneklerin protein miktarında düşüş, 72. saatte alınan örneklerin protein miktarında artış belirlenmiştir (Çizelge 4.7.2.3).

Çizelge 4.7.2.3. Toplam protein miktarı bakımından zamanlar arasındaki değerlendirme

ZAMAN	24. SAAT		36. SAAT		72. SAAT	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
ORTALAMA	0,90±0,14c	0,82±0,26c	1,30±0,34a	0,88±0,47c	0,80±0,09c	1,10±0,26b

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki
Kontrol: Su inokule edilmiş bitki

4.8. Farklı *Erwinia amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonu Sonrasında Elma, Armut ve Ayva Bitkilerinden Saflaştırılan Proteinlerin SDS-PAGE Analiz Sonuçları

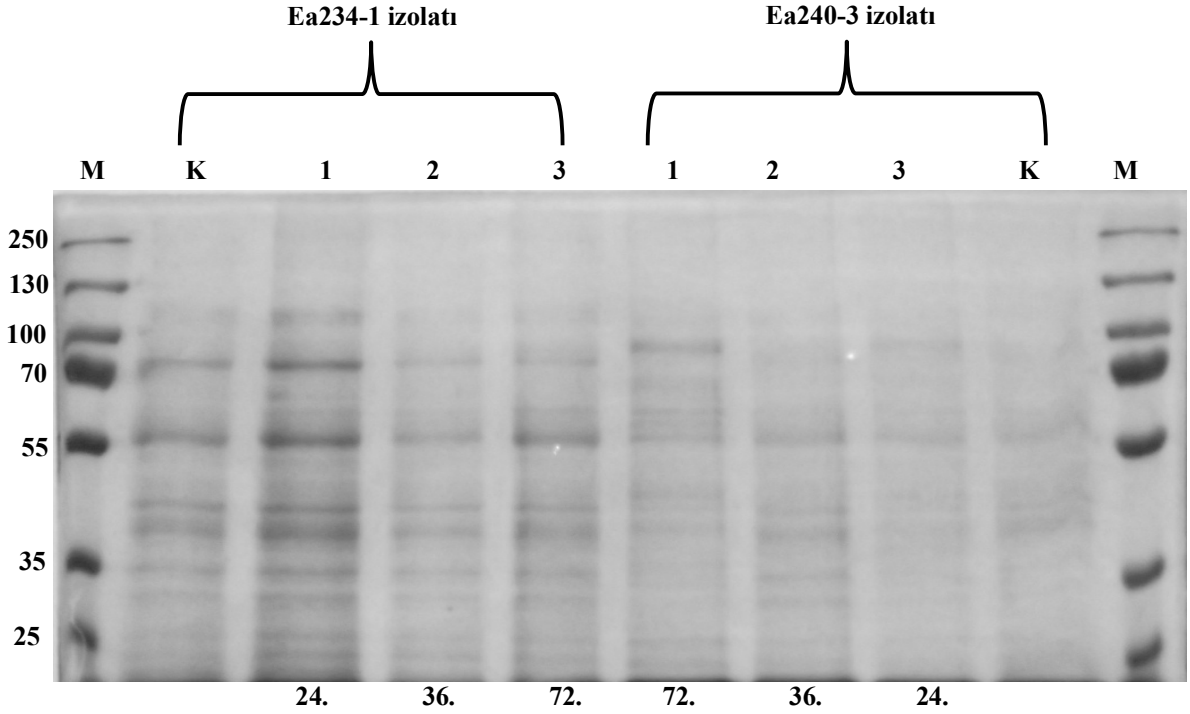
Erwinia amylovora izolatları (Ea234-1, Ea240-3) ve saf su inokulasyonu sonrası zamana (24., 36., ve 72. sa) bağlı olarak elma, armut ve ayva fidanlarından alınan yaprak örneklerine ait protein ekstraktları SDS-PAGE (Laemmli, 1970) yöntemine tabi tutulmuştur.

Farklı molekül ağırlıklarına sahip protein fraksiyonları elde edilmiştir. Elma çeşitlerinde yaklaşık 100, 70, 55 ve 35 kDa molekül ağırlığında protein bantları, armut çeşitlerinde yaklaşık 55-35 kDa molekül ağırlığında protein bantları ve ayva çeşitlerinde yaklaşık 250, 130, 100, 70, 55 ve 35 kDa molekül ağırlığında protein bantları belirlenmiştir (Şekil 4.8.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

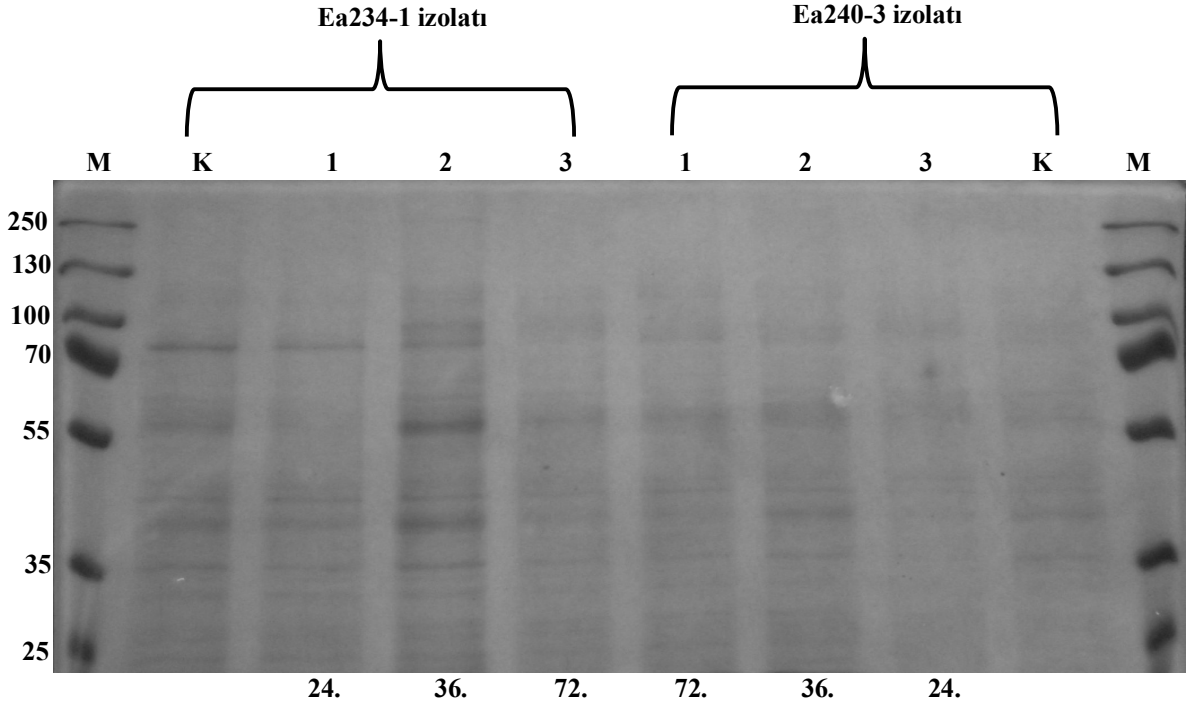
Elma çeşitlerinde *E. amylovora* Ea234-1 ile inokulasyonu sonrasında kontrole kıyasla 24. saatte Braeburn çeşidinde, 36. saatte Fuji ve Gala çeşitlerinde, 72. saatte Golden çeşidinde protein ifadesinin artığı belirlenmiştir. *E. amylovora* Ea240-3 inokulasyonu sonrasında kontrole kıyasla 24. saatte Gala ve Golden çeşidinde, 72. saatte Braeburn çeşidinde protein ifadesinin artığı belirlenmiştir (Şekil 4.8.1, 2, 3, 4).

Armut çeşitlerinde *E. amylovora* Ea234-1 ve Ea240-3 inokulasyonu sonrasında kontrole kıyasla 24., 36. ve 72. saatlerinde Santa Maria ve Williams çeşitlerinde protein ifadelerinin artığı belirlenmiştir (Şekil 4.8.5, 6).

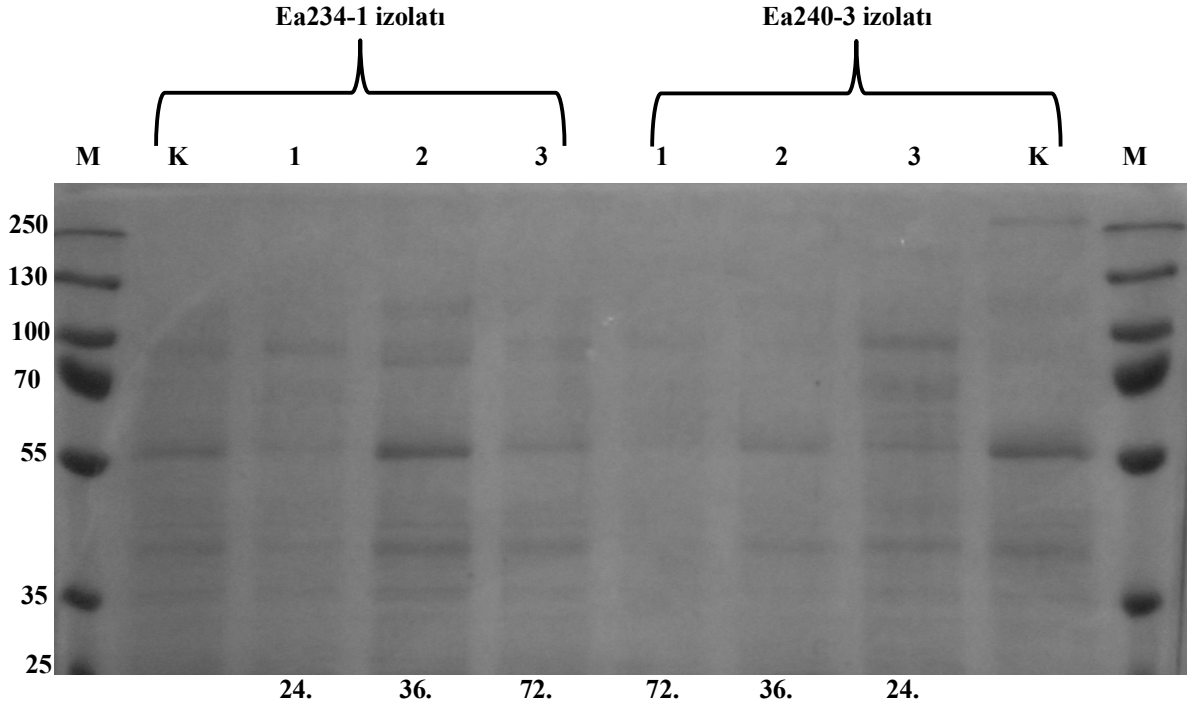
Ayva çeşitlerinde *E. amylovora* Ea234-1 ile inokulasyonu sonrasında kontrole kıyasla 24. saatte Ekmek ve Eşme çeşitlerinde protein ifadesinin artığı belirlenmiştir. *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokulasyonu sonrasında kontrole kıyasla 24. saatte Ekmek çeşidinde, 72. saatte Eşme çeşidinde protein ifadesinin artığı belirlenmiştir (Şekil 4.8.7, 8).



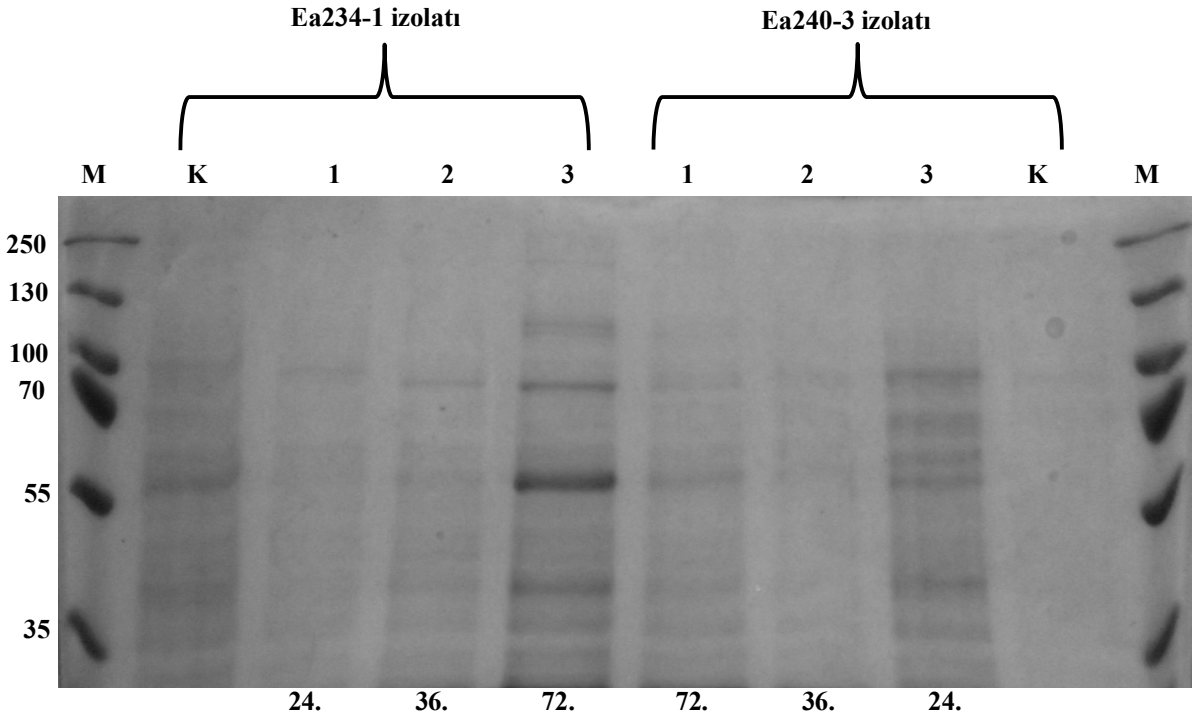
Şekil 4.8.1. Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Braeburn çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Braeburn çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.



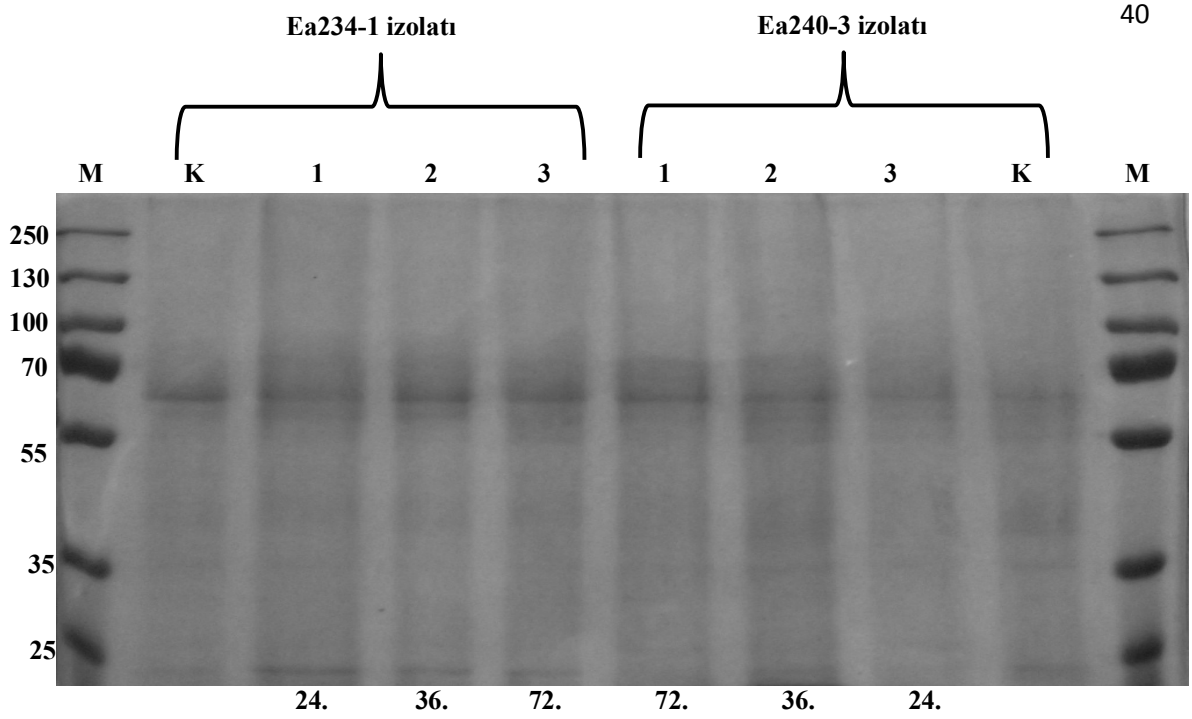
Şekil 4.8.2. Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Fuji çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Fuji çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.



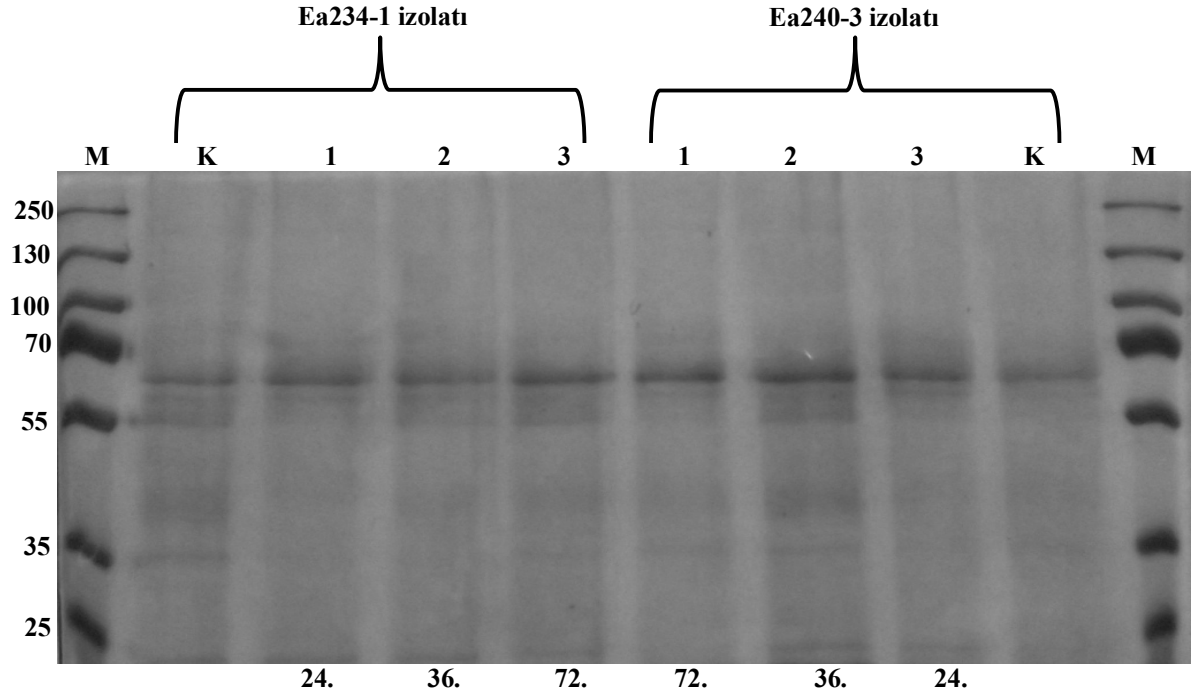
Şekil 4.8.3. Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Gala çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Gala çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.



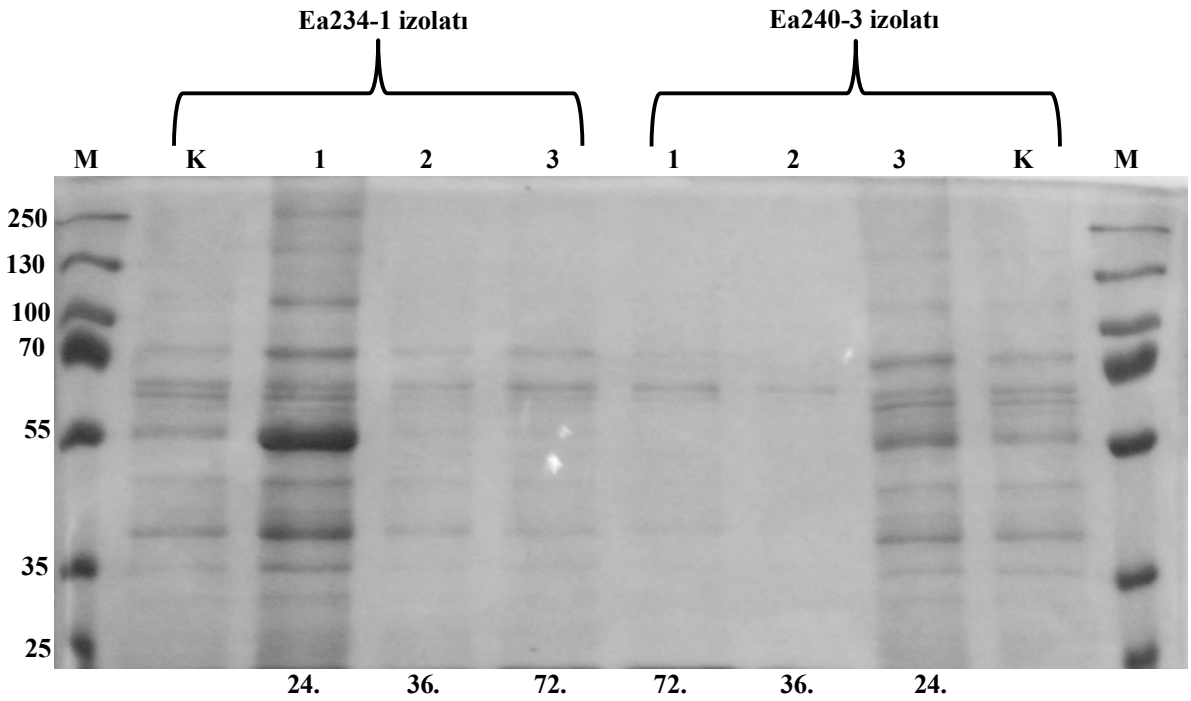
Şekil 4.8.4. Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Golden çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Golden çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.



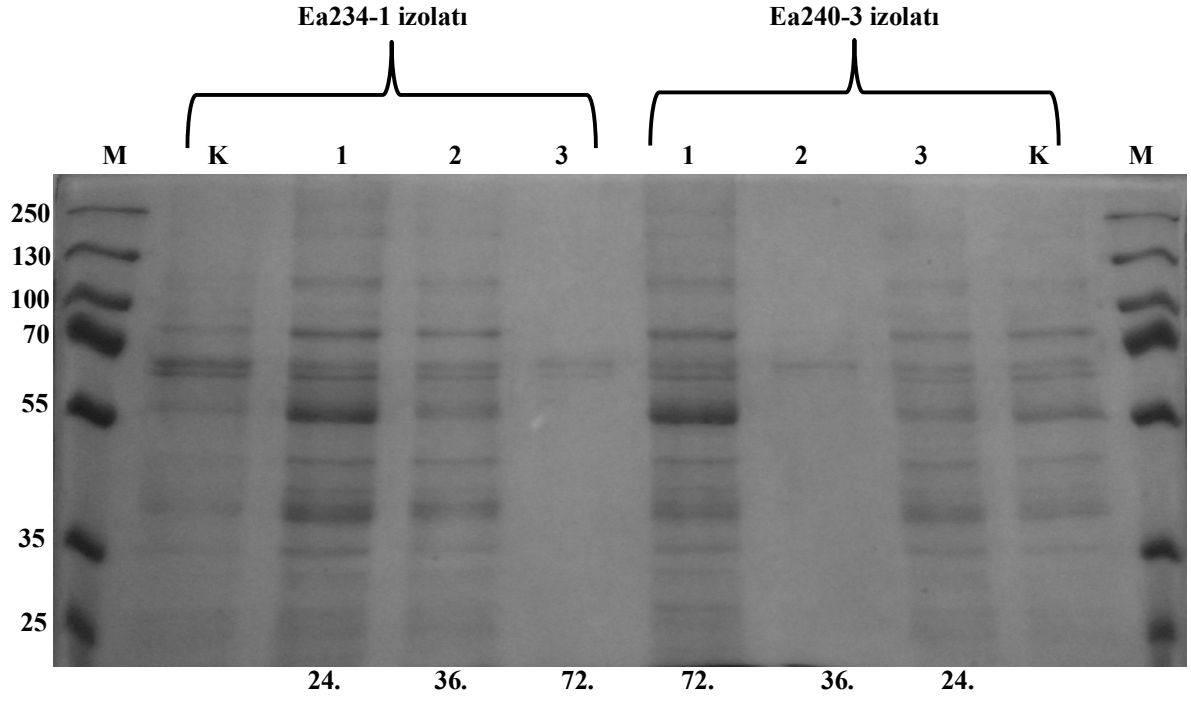
Şekil 4.8.5. Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş S. Maria çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş S. Maria çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.



Şekil 4.8.6. Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Williams çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Williams çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.



Şekil 4.8.7. Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Ekmek çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Ekmek çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.



Şekil 4.8.8. Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Eşme çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Eşme çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.

Bu çalışmada *Erwinia amylovora* enfeksiyonu sonrası elma, armut ve ayva da zamana bağlı olarak toplam protein miktarındaki değişimler belirlenmiştir.

Sistemik olarak uyarılmış dayanıklılığın ortaya çıkmasında bazı proteinlerin (PR) birikimi, domates, salatalık, tütün gibi dikotiledon bitkilerde çeşitli biyokimyasal çalışmalarla saptanmıştır. Bu PR proteinleri hücreler arasında, örneğin patojenin hücreye saldırmadan önce gelişme eğilimi olan alanlarda hâkim olarak birikirler. Bazı PR proteinleri fungal veya bakteriyel hücre duvarını bozabilen enzimler olan β-1,3 glukanazlar ve kitinazlar olarak karakterize edilmişlerdir (Aiba, 1992; Hirano ve Nagano, 1998).

Bonasera ve ark. (2006), Gala ve Red Delicious elma kültürlerinin *Erwinia amylovora* ve *P. s*. pv. *tomato* DC3000 patojenleriyle inokulasyondan öncesi ve inokulasyondan sonrasındaki 96 saat boyunca PR proteinlerinin (PR1, PR2, PR5 ve PR8) ifadelerini gözlemlemişlerdir. PR2, PR5 ve PR8 proteinlerinin elma patojeni olmayan *P. s*. pv. *tomato* DC3000 ve kontrollere kıyasla *E. amylovora* ile inokulasyonundan 24. ve 48. saatleri arasında elma yapraklarında ifadelerinin artığını belirlemişlerdir.

Venisse ve ark. (2002)' nın yaptığı çalışmada iki elma kültüründe *E. amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabac*i ve *E. amylovora hrp* mutantı patojenlerin inokulasyonundan sonraki 6. ve 72. saat arasında iki antioksidatif enzim ve PR proteinin üç familyasındaki değişimleri Bradford (1976) metodunu kullanarak gözlemlemişlerdir. *E. amylovora* ve *P. s*. pv. *tabaci* ile enfekteli iki elma kültüründe PR protein familyasından kitinaz, β -1,3-glukanaz ve peroksidaz aktivitelerinin 48. saatte maksimum seviyeye ulaştığı ve daha sonrasında yavaş yavaş azaldığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da *E. amylovora* enfeksiyonu sonrası elma çeşitlerinde 24. saatte protein miktarının artığı, 36. ve 72. saatte azaldığı belirlenmiştir. Armut çeşitlerinde de enfeksiyondan sonraki 24. ve 36. saatte protein miktarının artığı, 72. saatte protein miktarının azaldığı belirlenmiştir. Elma ve armut çeşitlerinin aksine ayva çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki 24. ve 36. saatte protein miktarının azaldığı, 72. saatte protein miktarının artığı belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, iki şeftali kültürü Venture ve BabyGold5' un *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* ile inokulasyonundan sonraki 1. ve 48. saatler arasında PR protein familyasından iki PR1 (Pp-PR1a, Pp-PR1b) ve üç PR5 (Pp-TLP1, Pp-TLP2 ve Pp-TLP3) proteinlerinin ifadeleri gözlemlenmiştir. İnokulasyondan sonraki 1. saatte Venture kültüründe PR proteinlerin ifadesinin BabyGold5 kültüründen,

kontrole kıyasla yaklaşık olarak 7 katı olduğu, inokulasyondan sonraki 4. saatte BabyGold5 kültüründe PR proteinlerin ifadesinin Venture kültüründen, kontrole kıyasla yaklaşık olarak 3 katı olduğu belirlenmiştir. İnokulasyondan sonraki 8. saatte her iki kültürde de PR proteinlerin ifadesi azaldığı, 24. saatte maksimum seviyeye ulaştığı ve 48. saatte azalmaya başladığı görülmüştür. Pp-PR1a hariç bütün PR proteinlerin dirençli kültürde (Venture) daha yüksek seviyede ifade edildiği saptanmıştır (Sherif ve ark., 2012).

Biberde avirulent *Xanthomonas campestris* pv. *vesicotaria* enfeksiyonu hücre ölümüyle ilişkili olan PR10 proteinini tetiklediği belirlenmiştir (Choi ve ark., 2012).

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo) ile enfeksiyondan sonra çeltikte PR proteinlerinin ifadesinin artığı belirlenmiştir (Chittoor ve ark., 1997; Ponciano ve ark., 2007; Mitsuhara ve ark., 2008; Wu ve ark., 2011).

Ponciano ve ark. (2007), Xoo ile enfeksiyonundan sonra 72. saatte PR proteinleri OsPR1a, OsPR1b ve OsPR10a ifadelerinin artığını belirlemişlerdir.

Hou ve ark. (2012), Xoo ile enfeksiyondan sonra çeltikte 10 PR proteininden 6' sının (PR1, PR2, PR3, PR4b, PR8 ve PR-pha) ifadesinin artığı, 4' ün (PR5, PR6, PR15 ve PR16) ifadelerinde değişiklik göstermediği belirlemişlerdir.

Kürkcüoglu ve ark. (2004), elma kültürüne *Pseudomonas fluorescens* Bk3 uygulamasından sonraki 1., 2. ve 5. gündeki PR proteinlerinin ifadesini gözlemlemişlerdir. β -1,3-glukanaz ve taumatin benzeri proteinlerin ifadesinin 1 ve 2. güne kıyasla 5. günde daha yüksek olduğu, kitinazın ise 1 ve 2. gündeki ifadesinin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, SDS-PAGE metoduyla *Venturia inaequalis* ile enfekteli Elstar elma kültüründe, kontrole (sağlıklı Elstar elma kültürü ve *V. inaequalis*' e dayanıklı Remo elma kültürü) kıyasla moleküler ağırlıkları 22 ve 32 kDa arasında bant oluşumu belirlenmiştir. Ayrıca *V. inaequalis* ile inokulasyonun birinci haftasından sonra kontrole kıyasla düşük moleküler ağırlıklı polipepetide ait bant oluşumunun azaldığı belirlenmiştir. Daha sonra Q-TOF mass spectrocopy analizi ile oluşan bantların PR protein sınıfına ait oldukları belirlenmiştir. 22 kDa molekül ağırlığındaki proteinin sistein proteinaz, 25 kDa molekül ağırlığındaki proteinin kitinaz, 28 kDa molekül ağırlığındaki proteinin taumatin benzeri protein, 32 kDa molekül ağırlığındaki proteinin β -1,3-glukanaz ve 9 kDa molekül ağırlığındaki proteinin lipid transfer proteini olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda, enfekteli Elstar elma kültürü ve Remo

elma kültüründe, sağlıklı Elstar elma kültürüne kıyasla PR protein sınıfına ait proteinlerin yüksek bir şekilde ifade edildiğini belirlenmiştir (Gau ve ark., 2004).

Meng ve ark. (2006), maya ikili hibrit sistemini kullanarak *E. amylovora* efektör proteini DspA/E ile etkileşime giren dört elma proteini (DIPMs) belirlemişlerdir. Elmadaki dört DIPM proteinin molekül ağırlıkları sırasıyla 72.9, 73.1, 73.2 ve 74.4 kDa olarak belirlenmiştir. Farklı duyarlılık ve dayanıklılık gösteren elma çeşitlerinde (Gala, Idared, Jonagold, Mutsu, Rogers Mac, Libert, Red Delicious) DIPM proteinlerinin ifade edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca *E. amylovora*' nın konukçusu olan, armut, alıç, dağ muşmulası, ateş dikeni ve çilekte bu dört genin varlığı doğrulanmıştır. Bizim SDS-PAGE çalışmamızda da elma ve ayva çeşitlerinde yaklaşık 70 ve 55 kDa molekül ağırlığında protein bantları belirlenmiştir. Meng ve ark. (2006), 70 kDa civarında patojenisle ilgili proteinlerin varlığı gösterirlerken çalışmamızda elde edilen bulgularda benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *Erwinia amylovora*' nın bitkilerde oluşturduğu biyotik stresin elma, armut ve ayva çeşitlerinde zamana bağlı olarak bitki savunma mekanizmasında bulunan toplam protein miktarları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Deneme sonucunda elma çeşitlerinde *E. amylovora* enfeksiyonu sonrası kontrole kıyasla 24. saatte toplam protein miktarının artığı, 36. ve 72. saatte toplam protein miktarının azaldığı görülmüştür. Elmada, Braeburn çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Armut çeşitlerinde enfeksiyon sonrası kontrole kıyasla 24. ve 36. saatlerde toplam protein miktarının artığı, 72. saatte protein miktarının azaldığı görülmüştür. Armutta, Santa Maria çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Ayva çeşitlerinde, enfeksiyon sonrası kontrole kıyasla 24. ve 36. saatlerde toplam protein miktarının azaldığı, 72. saatte protein miktarının arttığı görülmüştür. Ayvada, Eşme çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir.

SDS-PAGE analizi sonucunda farklı molekül ağırlıklarına sahip protein fraksiyonları elde edilmiştir. Elma ve ayva çeşitlerinde yaklaşık 70, 55 ve 55-35 kDa molekül ağırlığında protein bantları, armut çeşitlerinde yaklaşık 70-55 kDa molekül ağırlığında protein bantları belirlenmiştir.

Bu çalışma ile elma armut ve ayva bitkilerinde *E. amylovora*' nın oluşturduğu biyotik stresin bitki savunma mekanizmasındaki ve hastalık oluşumundaki proteinlerin miktarı araştırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen bulgular farklı konukçu ve bunların çeşitleri arasındaki toplam protein miktarının bitki savunma sistemindeki etkinliklerinin belirlenmesine, konukçu patojen arasındaki etkileşimin anlaşılmasına ve hastalık yönetiminde etkili stratejilerin geliştirilmesi gibi konular da çalışmalara örnek ve fikir verici olacaktır.

KAYNAKLAR

Agarwal, P., Agarwal, P. K., Nair, S., Sopory, S. K. and Reddy, M. K., 2007, Stress-inducible DREB2A Transcription Factor from *Pennisetum glaucumis* a Phosphoprotein and Its Phosphorylation Negatively Regulates Its DNA-binding Activity, *Molecular Genetics and Genomics*, 277, 189-198.

Agrios, G. N., 1997, Plant Pathology, Fourth Edition, *Academic Press*., San Diego, CA USA, 93-112, 192-193.

Agrios, G. N., 2005. Histological Defence Structure. *Plant Pathology*, California USA, Academic Pres, p. 215.

Ahl, P., Benjoma, A., Samson, R., and Gianinazzi, S., 1981, Phytopath. Z., 102:201-212.

Aiba, S., 1992, A convenient assay for chitinase that uses partially N-acetylated chitosans as substrates. Carbonhydrate Research, 230:373-376.

Alay, A. 1997. *Pyrus* Türlerinde Ateş Yanıklığı (*Erwinia amylovora*)' nın Mücadelesinde Konukçu Dayanıklılığı ve Önemi, Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniv. Fen Bil. Enst., Ankara.

Alfano, J. R., Collmer A., 1997, The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death, *J. Bacteriol*, 179:5655–62.

Alfano, J. R., Collmer A., 2004, Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense, *Annu Rev Phytopathol*, 42: 385–414.

Anzai, H., Yoneyama K., Tamaguchi, I., 1989, Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin, *Mol. Gen. Gen*., 219:492-494.

Arda, N., ve Ertan, H., 2004, Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması, Temizkan, G., ve Arda, N. (ed), Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, *Nobel Tıp Kitabevleri*, 177-273.

Anonim, 2012 **(**http://www.tuik.gov.tr)

Anonymous, 2010, http://www.statcan.gc.ca/pub/22-003-x/2011001/t029-eng.pdf . 2010.

Ayers, S. H., Rupp, P., and Johnson, W. T., 1919, A Study of The Alkali-Forming Bacteria in Milk. U. S. Dept. of Agric. Bull., 782: 1-39.

Barny, M. A., Guinebretiere, M. H., Marcais, B., Coissac, E., Paulin, J. P., and Laurent, J., 1990, Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence, *Mol. Microbiol.*, 4:777-786.

Barny, M. A., 1995, *Erwinia amylovora hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco, *Eur. J. Plant Pathol.*, 101:333-340.

Ben Khaled, L., Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Dreyer, B., Oihabi, A., Honrubia, M., 2002, Peroxidase study in date palm inoculated with *Trichoderma horzianum* and arbuscular mycorrhızal fungus *Glomus mosseae*, *Plant Peroxidases*, 267-270.

Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudant, J., Leung, J., Staskawicz, B. J., 1994, RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeats class of plant disease resistance genes, *Science*, 265:1856-1860.

Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., and Geider, K., 1992, Sensitive and Species Spesific-Detection of *Erwinia amylovora* by Polymerase Chain Reaction, *Appl. and Env. Mic.*, 58 (11): 3522-3526.

Bocsanczy, A. M., Nissinen, R. I., Oh, C. S., and Beer, S. V., 2008, HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells, *Mol. Plant Pathol.*, 9:425-434.

Bogdanove, A. J., Bauer, D. W., and Beer, S. V., 1998, *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway, *J. Bacteriol.*, 180:2244-2247.

Bohnert, H. J., Nelson, D. E., and Jensen, R. G., 1995, Adaptations to Environmental Stresses, *The Plant Cell*, 7:1099-1111.

Bollag, D. M., and Edelstein, S. J., 1991, Protein Methods, *VILLEY_LISS Pres.*

Bonasera, J. M., Kim, J. F., Beer, S. V., 2006, PR genes of apple: identification and expression in response elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*, *BMC Plant Biol. doi*: *10*, 1186/1471-2229-6-23.

Bonn, W. G., and Van der Zwet, T., 2000, Distribution and economic importance of fire blight. Pages 37-54 in: Fire Blight, the Disease and Its Causative Agent, *Erwinia amylovora*, J. L. Vanneste, ed. *CAB International*, Wallingford, U.K.

Borejsza-Wysocka, E. E., Malnoy, M., Aldwinckle, H. S., Meng, X., Bonasera, J. M., Nissinen, R. M., Kim, J. F., and Beer, S. V., 2006, Fire Blight Resistance of Apple Clones in Which DspE-Interacting Proteins Are Sliend, *Acta Hort.*, 704:509-513.

Boureau, T., El Maarouf-Bouteau, H., Garnier, A., Brisset, M., Perino, C., Pucheu, I., Barny, M., 2006, DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. *Mol. Plant Microbe Interact*, 19, 16-24.

Boureau, T., Siamer, S., Perino, C., Gaubert, S., Patrit, O., Degrave, A., Fagard, M., Chevreau, E., Barny, M. A., 2011, The HrpN effector of *Erwinia amylovora*, which is involved in type III translocation, contributes directly or indirectly to callose elicitation on apple leaves. *Mol. Plant Microbe Interact*., *24*, 577-584.

Bradford**,** M**.** M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Bugert, P., and Geider, K., 1995, Molecular analysis of the ams operon required for exopolsaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*, *Mol*. *Microbiol*. 15, 917–933.

Calzolari, A., Finelli, F., and Mazzoli, G. L., 1999, A severe unforeseen outbreak of fire blight in the Emilia–Romagna region, *Acta Horticulturae* 489, 171–176.

Camacho Henriquez, A., Sänger, H. L., 1982, Analysis of acid-extractable tomato leaf proteins after infection with a viroid, two viruses and a fungus and partial purification of the 'pathogenesis-related' protein p14, *Arch*. *Virol.*, 74, 181-196.

Cao, I-I., Li, X., and Dong, X., 1998, Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance, *Proc. Natl*. *Acad.* Sci. USA 95:6531-6536.

Chang, J. H., Goel, A. K., Grant, S. R., and Dangl, J. F., 2004, Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria, *Curr*. *Opin*. *Micribiol*, 7:11-18.

Chern, M. S., Fitzgerald, H. A., Yadav, R. C., Canlas, P. E., Dong, X., and Ronald, P. C., 2001, Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the nprl-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*, *Plant J*., 27:101-113.

Cheong, Y. H., Chang, H. S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, X., Luan, S., 2002, Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 129, 661–677.

Chittoor, J. M., Leach J. E., White F. F., 1997, Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Mol. Plant Microbe Interact*, 10:861–871.

Choi, D. S., Hwang, I. S., and Hwang, B. K., 2012, Requirement of The Cytosolic Interaction Between Pathogenesis-Related Protein10 and Leucine-Rich Repeat Protein1 for Cell Death and Defense Signaling in Pepper, *The Plant Cell*, Vol. 24: 1675–1690.

Crute, I. R., de Wit, P. J. G. M., Wade, M., 1985, Mechanisms by which genetically control resistance and virulence influence host colonization by fungal and bacterial parasites. In R. S. S. fraser (Eds.), *Mechanisms of Resistance of Plant Diseases*, Boston, Nijhoff/Junk, 197-309.

Çandar, A., ve Erkan, S., 2011, Bitkilerde Viral Etmenlere Karşı Genetik Dayanıklılık Mekanizmaları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR*,* 09-3: 13-17.

Çınar, Ö., 1988, Bakteriyoloji, *Çukurova Üniv. Zir. Fak. Ders Kitabı*, No: 67, Adana.

Dangl, J. L., 1992, The major histocompatibility complex a la carte: are there anologies to plant disease resistance genes on the menu?, *Plant Journal*, 2:3-11.

Degrave, A., Fagard, M., Perino, C., Brisset, M. N., Gaubert, S., Laroche, S., Patrit, O., and Barny, M. A., 2008, *Erwinia amylovora* type three secreted proteins trigger cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Plant-Microbe Interact*, 21:1076-1086.

Dellagi, A., Brisset, M.-N., Paulin, J.-P., and Expert, D., 1998, Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity, *Mol. Plant Microbe Interact*. 11, 734–742.

De Wit, P. J. G. M., and Bakker, J., 1980, Phsiol. Plant Pathol., 17:121-130.

Dickey, R. S. and Kelman, A., 1988, *Erwinia* The "c*aratovora*" Group in Laboratory Guide for The Identification of Plant Pathogenic Bacteria, II. Edition N. W. Schaad, Aps Pres, St. Paul, 44-49 pp., Minnesota.

Dixon, R. A., and Lamb, C. J., 1990, Molecular communications in interactions between plants and microbial pathogens, *Ann.Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol*, 41: 339-367.

Dong, X., 1998, Salicylic Acid, Jasmonic Acid, Ethylene, and Disease Resistance in Plants., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 316-323.

Dong, X., 2001, Genetic dissection of systemic acquired resisrance, *Current Opinion Plant Biology*, 4:309-314.

Dye, D. W., 1968, A Taxonomic Study of The Genus *Erwinia*. I. The "*amylovora"* Group, *New Zealand Journal of Science*, 11: 590-607.

Edreva, A., 2005, Pathogenesıs-Related Proteıns: Research Progress in The Last 15 Years *Gen. Appl. Plant Physıology, 2005, 31(1-2), 105-124*.

Erkan, S., 1992. Moleküler Biyoloji, Bornova/ İzmir, 140:85-92.

Fahrentrapp, J., Broggini, G. A. L., Kellerhals, M., Peil, A., Richter, K., Malnoy, M., Gessler, C., 2012, A candidate gene for Fire Blight resistance in *Malus* x *robusta 5* is coding for a CC-NBS-LRR, *Tree Genetics and Genome. doi 10*,1007: 11295-012-0550-3.

Fahy, P. C., and Hayward, A. C., 1983, Media and Methods for Isolation and Diagnotic Test, *Plant Disease*. *Academic Pres.*, Sydney,337-378.

Fahy, P. C., and Persley, G. J., 1983, Plant Bacterial Diseases A Diagnostic Guide, *Academic Press*.

Falkenstein, H., Bellem, P., Walter, S., Zeller W., and Geider, K., 1988, Identification of *Erwinia amylovora*, the fire bligth pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid Pea29, *App. Environ*. *Microbiol*, 54, 2798-2802.

Flachowsky, H., Peil, A., Rollins, J., Hanke, M., Richter, K., Lee, D., 2008, Improved fire blight resistance in transgenic apple lines by constitutive over expression of the *mbr4* gene of *Malus baccata*, *Acta Hort*, 793: 287-291.

Flor, H-H., 1971, Current status of gene-for-gene concept, *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275–296.

Frick, S., Kutchan, T. M., 1999, Molecular cloning and functional expression of Omethyl transferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Journal*, 17(4): 329-339.

Fuente-Martinez, J. M. D. L., Mosqueda-Cano, G., Alvarez-Morales, A., Herrera-Estrella, L., 1992, Expression of a bacterial phaseolotoxin- resistant ornithyl transcar-bamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*, *Bio/Technology*, 10: 905-909.

Fuente-Martinez, J. M. D. L., Mosqueda-Cano, G., Alvarez-Morales, A., Herrera-Estrella, L., 1993, Pathogen-derived strategy to produce transgenic plants resistant to the bacterial toxin phaseolotoxin, *Curr*. *Plant Sci*. *Biotechnol*. *Agric*., 14: 579-586.

Gau, A. E., Koutb, M., Piotrowski, M., and Kloppstech, K., 2004, Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica cv.* Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo, *Eur. J. Plant Pathol.*, 110, 703-711.

Gaudriault, S., Malandrin, L., Paulin, J. P., and Barny, M. A., 1997, *DspA*, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with *AvrE* of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a *DspB*-dependent way, *Mol*. *Microbiol*., 26: 1057-1069.

Gaudriault, S., Brisset, M. N., and Barny, M. A., 1998, HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein, *FEBS Lett*., 428: 224-228.

Geider, K., 2000, Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan, In Vanneste J. L. (ed), Fire Blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*, *CABI*, New York, 117-140.

Gianinazzi, S., Ahl, P., Cornu, A., Scalla, R., Cassini, R., 1980, Physiol. Plant Pathol., 16: 337-342.

Glazebrook, J., Rogers, E. E., Ausubel, F. M., 1997, Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defence responses, *Annu. Rev. Genet.*, 31: 547-569.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J-K., Bohnert, H. J., 2000, Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-99.

Hasler, T, Schaerer H. J., Holliger, E., Vogelsanger, J., Vignutelli, A., Schoch, B., 2002, Fire blight situation in Switzerland, *Acta Horticulturae* (*ISHS*), 590: 73–79.

Hennin, C., Diederichsen, E., Höfte, M., 2001, Local and systemic resistance to fungal pathogens triggered by an AVR9-mediated hypersensitive response in tomato and oilseed rape carrying the *Cf-9* resistance gene, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59, 287-295.

Hickey, K. D., and Travis, J. W., 1995, Evalution of Predictive Models and Antagonistic Bacteria for Control of Fire Blight Blossom Blight, *Pennsylvania-Fruit-News*, 75: 2, 41-43.

Hirano, S., and Nagano, N., 1998, Effect of chitosan, petic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several pytopathogens, *Agric. Biol. Chem.*, 53:3065-3066.

Hong, J. K., Jung, H.W., Lee, B. K., Lee, S. C., Lee, Y. K., and Hwang, B. K., 2004, An osmotin-like protein gene, CAOSM1, from pepper: differential expression and *in situ* localization of its mRNA during pathogen infection and abiotic stress, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64, 301-310.

Hou, M., Xu, W., Bai, H., Liu, Y., Li, L., Liu, L., Liu, B., Liu, G., 2012, Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Plant Cell Reports*, Vol. 31: 895-904.

Ishumaru, C. A., Klos, E. J., and Brubaker, R. R., 1988, Multiple Antibiotic Production by *Erwinia herbicola*, Phytopathology 78: 746-750.

Jamet, E., and Fritig, B., 1986, Plant Mol. Biol., 6:69-80.

Johnson, K. B., and Stockwell, V. O., 1998, Management of fire blight: A case study in microbial ecology, *Annual Review of Phytopathology*, 36, 227–248.

Jones, A. L., and H. S., Aldwinckle, 1997, Compendium of Apple and Pear Diseases, *Third Edition*, *APS Press*, 100p.

Jones, A. L., and Geider, K., 2000, *Erwinia amylovora* Group. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Edited by N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chun, p 40-55. APS pres, USA.

Joo, J. H., Wang, S., Chen, J. G., Jones, A. M., Fedoroff N. V., 2005, Different signaling and cell death roles of heterotrimerig G protein α and β Subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone, *Plant Cell*.

Karaca, İ., 1977, Fitobakteriyoloji ve Bakteriyal Hastalıklar, *Ege Üniversitesi Zir. Fak.* Bornova- İzmir.

Kazan, K., ve Gürel, E., 2001, Hastalıklara Dayanıklılığın Artırılması, Özcan, S., Gürel, E., ve Babaoğlu, M. (ed), Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, Konya, 261-287.

Keskin, B. C., 2012, Bitkilerde Sinyal İletimi, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5 (1): 53-73.*

Kim, J. F., and Beer, S. V., 1998, HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class, *J. Bacteriol*. 180:5203-5210.

Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C., 1990, Methods In Phytobacteriology, *Akademia Kiado*, Budapest, Xıv+568s.

Koczan, J. M., McGrath, M. J., Zhao, Y. F., Sundin, G. W., 2009, Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: Implications to pathogenicity, *Phytopathology*, 99, 1237-1244.

Koç, E., ve Üstün, A. S., 2008, Bitkilerde Protein Kinazların Rolü, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 20:25-34.

Kürkcüoglu, S., Piotrowski, M., Gau, A. E., 2004, Up-regulation of Pathogenesis-related Proteins in the Apoplast of *Malus domestica* after Application of a Non-pathogenic Bacterium, *Z. Naturforsch*, 59, 843-848.

Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4, *Nature*, 227: 680-685.

Lagrimini, L. M., Burkhart, W., Moyer, M., Rothstein, S., 1987, Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 84, 7542-7546.

Lamb, C. J., 1994, Plant disease resistance genes in signal perception and transduction, *Cell*, 76: 419-422.

Lecomte, P., Manceau, C., Paulin, J. P., and 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*, 103, 91-98.

Lee, S-Y., Lee, D-H., 2005, Expression of *MbR4* a TIR-NBS type of apple *R* Gene, confers resistance to bacterial spot disease in Arabidopsis, *Journal of Plant Biology,* 48: 220-228.

Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 84: 6750.

Lelliott, R. A., and Stead, D. E., 1987, Methods for the diagnosis of bacterial diseases plants, *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, UK.

Ligterink, W., Kroj, T., Zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D., 1997, Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants, *Science*, 276: 2054-2057.

Maden, S., 1989, Bitki Bakteri Hastalıkları, *Ankara Üniv. Zir. Fak. Yayınları*: *1161, Ders Kitabı*: 328, Ankara.

Malamy, J.; J. P. Carr; D. F. Klessig and I. Raskin, 1990, Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Responce of Tobacco to Viral Infection, *Science*, 250, 1002-1004.

Malnoy, M., Jin, Q., Borejsza-Wysocka, E. E., He, S. Y., Aldwinckle, H. S., 2007, Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus* x *domestica*, *Mol Plant Microbe Interact*, 20: 1568–1580.

Mansfield, J. W., 1984, Plant cell death during infection by fungi, In I.D.A.D.O.Sigee (Ed.), *Cell ageing and death*, Cambridge University Press., 323,

Mansfield, J. W., Slusarenko A. J., Fraser, R. S. S., and Van Loon L. C., (Ed), Kluwer, Amsterdam, 1999.

Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganal, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., Tanksley, S. D., 1993, Map-based cloning of protein kinase gene conferring disease resistance in tomato, *Science*, 262: 1432-1436.

McManus, P. S., and Jones, A. L., 1995, Detection of *E. amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations, *Phytopathology* 85: 618-623.

McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin G. W., Jones, A. L., 2002, Antibiotic use in plant agriculture, *Annu Rev Phytopathol*, 40: 443-463.

Meng, X. D., Bonasera, J. M., Kim, J., Nissinen, R. M., Beer, S. V., 2006, Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Mol. Plant Microbe Interact*, 19, 53-61.

Milčevičová, R., Gosch, C., Halbwirth, H., Stich, K., Hanke, M. V., Peil, A., Flachowsky, H., Rozhon, W., Jonak, C., Oufir, M., 2010, *Erwinia amylovora* induced defense mechanisms of two apple species that differ in susceptibility to fire blight, *Plant Science*, 179(1-2): 60-67.

Mindrinos, M., Fumiaki, K., Yu, G.-L., Ausubel, F. M., 1994, The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing nucleotide-binding site and leucine-rich repeats, *Cell*, *78*, 23: 1089-1099.

Mitsuhara, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y., Ohashi, Y., 2008, Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds, *Mol Genet Genomics*, 279: 415–427.

Mizoguchi, T., Ichimura, K., Shinozaki, K., 1997, Environmental stress response in plants: the role of mutagen-activated protein kinases, *Trends in Biotechnology*, 15: 15-19.

Mohan, S. K., Schaad, N. W., 1987. An Improved Agar Plating Assay For Detection *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Peudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Contaminated Bean Seed, *Phytopathology*, 77: 1390-1395.

Moller, W. J., Schroth, M. N., and Thomson, S. V., 1981, The scanario of fire blght and streptomycin resistance, *Plant Disease*, Vol: 65, 563-568.

Momol, M. T., and Yeğen, O., 1993, Fire blght in Turkey: 1985-1992, *Acta Hort*., No: 338, 37-39. Athens, Greece.

Momol, E. A., Momol, M. T., Norelli, J. L., Beer, S. V., Burr, T. J. and Aldwinckle, H. S., 1998, Relatedness of *Erwinia amylovora* Strains Based on Amplified 16s-23s Ribosomal DNA Restriction Enzyme Analysis (ARDREA), *Eight International Workshop On Fire Blight*, *12-15 October*, *Kuşadası, Turkey*, 55-59.

Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., and Beer, S. V., 1988, Virulence of *Erwinia amylovora* strains to Malus sp. novole plants grown *in vitro* and in the greenhouse, *Phytopathol*, 78:1292-1297.

Norelli, J. L., Jones, A. L., and Aldwinckle, H. S., 2003, Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple, *Plant Disease*, 87: 756–765.

Norelli, J. L., Farrell, R. E., Bassett, C. L., Baldo, A. M., Lalli, D. A., Aldwinckle, H.S., Wisniewski, M.E., 2009, Rapid transcriptional response of apple to fire blight disease revealed by cDNA suppression subtractive hybridization analysis, *Tree Genet. Genomes* 5, 27-40.

Oh, C-S., and Beer, S. V., 2005, Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight, *FEMS Microbiol. Lett*., 253: 185-192.

Oh, C-S., Beer, S. V., 2007, AtHIPM, an ortholog of the apple HrpN-interacting protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth-enhancing effect of HrpN in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 145, 426-436.

Oh, C-S., Martin, G. B., and Beer, S. V., 2007, DspA/E, a type III effector of *Erwinia amylovora*, is required for early rapid growth in *Nicotiana benthamiana* and causes NbSGT1-dependent cell death, *Mol. Plant Pathol.*, 8: 255-265.

Öktem, Y., ve Benlioğlu, K., 1988, Studies on fire bilght (*Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et al.) of pome fruits, *Journal of Turkish Phytopathology*, *5th. Turkish Phytopatholological Congress.*, Antalya, Turkey, 17: 3.

Özbek, S., 1978, Özel Meyvecilik (Kışın Yaprağını Döken Meyve Türleri), *Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları*, Ders kitabı, Adana, No: 128: 11.

Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001, Genetik mühendisliği ve uygulamaları, *Bitki Biyoteknolojisi II*, Bölüm 20: 261.

Parravicini, G., Gessler, C., DenancÉ, C., Lasserre-Zuber, P., Vergne, E., Brisset, M-N., Patocchi, A., Durel, C-E., Broggini, G. A. L., 2011, Identification of serine/ threonine kinase and nucleotide-binding site–leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar 'Evereste', *Molecular Plant Pathology* ,12: 493–505.

Pierpoint, C. L., and Kuć, J. A., 1986, Phytochemistrg, 25:1595-1601.

Ponciano, G., Yoshikawa, M., Lee J. L., Ronald, P. C., Whalen M. C., 2007, Pathogenesis-related gene expression in rice is correlated with developmentally controlled *Xa21*-mediated resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Physiol Mol Plant Pathol* 69: 9.

Poupard, P., Parisi, L., Campion, C., Ziadi, S., Simoneau, P., 2003, A wound- and ethephoninducible *PR-10* gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and incompatible race of *Venturia inaequalis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 62, 3-12.

Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Laroche, S., Rona, J. P., Barny, M. A., and Bouteau, F., 2007a, The $HrpN_{ea}$ Harpin from *Erwinia amylovora* triggers differential responses on the nonhost *Arabidopsis thaliana* cells and on the host apple cells, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 20: 94-100.

Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Rona, J. P., Haapalainen, M., Barny, M. A., and Bouteau, F., 2007b, Antagonistic action of harpin proteins: $HrpW_{ea}$ from *Erwinia amylovora* suppresses $HrpN_{ea}$ induced cell death in *Arabidopsis thaliana*, *J. Cell Sci.*, 120: 3271-3278.

Reynoird, J. P., Mourgues, F., Chevreau, E., Brisset, M. N., and Aldwickle, H. S., 1999, Expression of *SB-37* gene in transgenic pears enhanced resistance to fire blight, *Acta Horticulturae*, 489: 243-245.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, D., 1996, Systemic Acquired Resistance, *Plant Cell*, 8 pp. 1809-1819.

Saygılı, H., 1995, Fitobakteriyoloji, *Doğruluk Matbaası,* Çankaya İzmir,201.

Schaad, N. W., 1988, Laboratory Guide to Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Aps (2nd. Ed. 1988). St. Paul, Minnesota.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W., 2001, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.

Scheer, C., 2009, Feuerbrandsituation im Bodenseeraum und Ergebnisse der Feuerbrandversuche des KOB 2008, Obstbau, 3: 168-172.

Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., Manners, J. M., 2000, Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 97, 11655–11660.

Schroth, M. H., and Hilderbrand, D. C., 1980, *Erwinia* I. *Erwinia amylovora* or True Erwinia Gruop. Pages 26-30 in: Laboratuary Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. N. W. Schaad, ed. American Phytopathology Society, St. Paul, MN., 72.

Selitrennikoff, C. P., 2001, Antifungal proteins, *Appl. Env. Microbiol.*, 67, 2883-2894.

Sherif, S., Paliyath, G., Jayasankar, S., 2012, Molecular characterization of peach PR genes and their induction kinetics in response to bacterial infection and signaling molecules, *Plant Cell Rep.*, 31, 697-711.

Singh, D. K., Maximova, S. N., Jensen, P. J., Lehman, B. L., Ngugi, H. K., and McNellis, T. W., 2010, FIBRILLIN4 is required for plastoglobule development and stress resistance in apple and *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 154: 1281–1293.

Sneath, P. H. A., 1956, Cultural and Biochemical Characteristics of The Genus *Chromobacterium*., *J. Gen. Microbiol.*, 15: 70-98.

Sobiczewski, P., Deckers, T., and Pulawska, J., 1997, Fire Blight (*Erwinia amylovora*), Some Aspects of Epidemiology and Control (review of recent literatüre), *Printed in Res. Inst. of Pomology and Floriculture*, Poland, 390/97, 71 pp.

Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., 1995, A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*, *Science,* 270: 1804-1806.

Song, X., Fan, H., and Wei, Z-M., 2002, Receptors for hypersensitive response elicitors and uses thereof, U.S. Patent Application No. 20020007501.

Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G., and Jones, J. D. G., 1995, Molecular genetics of plant disease resistance, *Science*, 268, 661-667.

Steinberger, E. M., and Beer, S. V., 1988, Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1, 135-144.

Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Metraux, J. P., 1997, Systemic Acquired Resistance, *Annu Rev Phytopathol.*, 35 pp. 235-270.

Sun, X., Cao, Y., Yang, Z., Xu, C., and Li, X., 2004, *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein, *Plant J*, 37: 517-527.

Swaidat, I. Q., 2007, Development of Alternative Strategies for the Control of the Important Phytopathogens *Phytophthora infestans* (Mont.) and *Erwinia amylovora* (Burrill). Jordan

Takayama, S., and Sakagami, Y., 2002, Peptide signaling in plants, *Current Opinion Plant Biology*, 5: 382-387.

Temizkan, G. ve Arda, N., 2004, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, *Nobel Tıp Yayınları*, İstanbul.

Tokgönül, S., 1991, Doğu Akdeniz Bölgesinde Elma, Ayva ve Yenidünya Ateş Yanıklığı Hastalığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow ve ark.) Üzerinde Araştırmalar, *Bitki Koruma Bülteni*, Cilt 31, No: 1-4,31-38, Mart-Aralık 1991(Basım 1994), Ankara.

Tonón, C., Guevara, G., Oliva, C., and Daleo, G., 2002, Isolation of a potato acidic 39 kDa β-1,3 glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance, *J. Phytopathol.*, 150, 189-195.

Ülkümen, L., 1938, Malatya'nın Mühim Meyve Çeşitleri Üzerinde Morfolojik, Fizyolojik ve Biyolojik Araştırmalar, *Yüksek Ziraat Enstitüsü Çalışmaları*, Sayı: 65, Ankara.

Van Loon, L. C., and van Kammen A., 1970, Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun' and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virüs, *Virology*, 40: 199–211.

Van Loon, L. C., 1982, In Wood, R.K.S. (ed), Active Defense Mechanisms in Plants, *Plenum*, New York, 247-273.

Van Loon, L. C., 1985, Pathogenesis-related proteins, *Plant Mol. Biol.*, 4, 111-116.

Van Loon, L. C., 1997, Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins, *Eur. J. Plant Pathol.*, 103, 753-765.

Van Loon, L. C., 1999, Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Pathogenesis-related proteins in plants. Eds. S.K. Datta, S. Muthukrishnan, CRC Press LLC, Boca Raton, 1-19.

Van Loon, L. C., and Van Strien, E. A., 1999, The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55, 85-97.

Van Loon, L. C., 2001, The families of pathogenesis-related proteins, *6th International Workshop on PR-proteins*, May 20-24, 2001, Spa, Belgium, Book of abstracts, p. 9.

Van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J., 2006, Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, *Annu Rev Phytopathol*, 44: 135-162.

Van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L. C., and Pieterse, C. M. J., 1999, Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge, *Plant Mol. Biol.* 41, 537-549.

Vanneste, J. L. and Paulin, J. P., 1990, Isolation of Lytic Phages of *Erwinia amylovora*, *Acta Hort.*, 273, 95-98.

Vanneste, J. L., Smart, L. B., Zumoff, C. H., Yu, J., and Beer, S. V., 1990, Control of Fire Blight By *Erwinia herbicola* Eh 252: Role of Antibioatic Production, *Acta Hort.* 273, 393-394.

Vanneste, J. L., 2000, Fire Blight, The Disease and Its Causative Agent, *Erwinia amylovora*, *CAB Publishing*, UK., 370.

Venisse, J. S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J. P., and Brisset, M. N., 2002, Modulation of defence responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*, *Mol. Plant Microbe Interact*, 15: 1204-1212.

Vogt, I., Wőhner, T., Richter, K., Flachowsky, H., Sundin, G. W., Wensing, A., Savory, E. A., Geider, K., Day, B., Hanke, M-V., and Peil, A., 2013, Gene-for-gene relationship in the host–pathogen system *Malus* x *robusta 5–Erwinia amylovora*, *New Phytologist*, 197: 1262–1275.

Wang, S. M., Lue, W. L., Eimert, K., and Chen, J., 1996, Phytohormone-regulated beta amylase gene expression in rice, *Plant Molecular Biology*, 31: 975-982.

Wang, D., Korban, S. S., Zhao, Y. F., 2009, The *Rcs* phosphorelay system is essential for pathogenicity in *Erwinia amylovora*, *Mol. Plant Pathol.*, *10*, 277-290.

Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S.C., Dincher, S. S., Widerhold, D. L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J. P., Ryals, J. A., 1991, Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance, *Plant Cell*, 3, 1085-1094.

Wei, Z. M., Sneath, B. J., and Beer, S. V., 1992, Expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in response to environmental stimuli, *J. Bacteriol*., 174: 1875-1882.

Whetten, R., and Sederoff, R., 1995, Lignin biosynthesis, *Plant Cell*, 7(7): 1001-1013.

Wu, Q., Hou, M. M., Li, L. Y., Liu, L. J., Hou, Y. X., Liu, G. Z., 2011, Induction of pathogenesis-related proteins in rice bacterial blight resistant gene *Xa21*-mediated interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *J. Plant Pathol.*, 93: 455–459.

Wubben, J. P., Lawrence, C. B., de Wit, P. J. G. M., 1996, Differential induction of chitinase and β-1,3-glucanase gene expression in tomato by *Cladosporium fulvum* and its race specific elicitors, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 48, 105-116.

Xing, T., Higgins V. J., Blumwald, E., 1997, Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells, *The Plant Cell*, 9, 249–59.

Xing, T., Malik, K., Martin, T., and Miki, B. L., 2001, Activation of tomato PR and wound related genes by a mutagenized tomato MAP kinase kinase through divergent pathways, *Plant Mol. Biol.*, 46: 109-120.

Zhao, Y. F., Blumer, S. E., and Sundin, G. W., 2005, Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue, *J. Bacteriol*., 187, 8088-8103.

Zhou, J., Loh, Y. T., Bressan, R. A.,, Martin, G. B., 1995, The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response, *Cell*, 83:925-935.

Zwet, T., and Keil, L., 1979, Fire Blight, A Bacterial Disease of Rosaceous Plants, *Agriculturae Handbook*, Number: 510., 199, U.S.A

Zwet, T., 1993, Worldwide Spread and Present Distrubution of Fire Blight an Update, *Acta Hort*., 338: 29-32.

Zwet, T., and Beer, S. V., 1995, Fire Blight – Its Nature, Prevention, and Control. A Practical Guide to Integrated Disease Management, *US Department of Agriculture*, *Agriculture Information Bulletin*, No. 631, Washington DC, 97.

Zwet, T., and Bonn, W. G., 1999, Recent spread and current worldwide distribution of fire blight, *Acta Horticulturae*, 489, 167–168.

Zwet, T., 2006, Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases, *Acta Horticulturae* (*ISHS*), 704, 35–3.

EKLER

Ek Çizelge 1. Elma Çeşitlerinde *Erwinia amylovora* Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarı Değerlerinin Çeşitli Parametreler için Yapılan Varyans Analizi Sonuçları

Varyans Kaynakları	SD	KT	KO	F	P
Çeşit-Elma	3	1,02556	0,341852	15,78	0,000*
Süre	5	4,36944	0,873889	40,33	0,000*
Elma x Süre	15	3,46278	0,230852	10,65	0,000*
Hata	48	1,04000	0,021667		
Toplam	71	9,89778			

* 0,01 seviyesinde önemli

Ek Çizelge 2. Elma Çeşitlerinde *Erwinia amylovora* Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarı Değerlerinin Çeşitli Parametreler için Yapılan Varyans Analizi Sonuçları

Varyans Kaynakları	SD	KT	KO	F	P
Çeşit-Elma	3	1,50153	0,500509	6,96	0,001*
Süre	5	0,08236	0,016472	0,23	0,948
Elma x Süre	15	3,78931	0,252620	3,51	0,000*
Hata	48	3,45333	0,071944		
Toplam	71	8,82653			

* 0,01 seviyesinde önemli

Ek Çizelge 3. Armut Çeşitlerinde *Erwinia amylovora* Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarı Değerlerinin Çeşitli Parametreler için Yapılan Varyans Analizi Sonuçları

Varyans Kaynakları	SD	KT	KO	F	P
Çeşit-Armut	1	0,26694	0,266944	5,75	0,025**
Süre	5	0,08583	0,017167	0,37	0,864
Armut x Süre	5	0,62139	0,124278	2,68	0,046**
Hata	24	1,11333	0,046389		
Toplam	35	2,08750			

** 0,05 seviyesinde önemli

Ek Çizelge 4. Armut Çeşitlerinde *Erwinia amylovora* Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarı Değerlerinin Çeşitli Parametreler için Yapılan Varyans Analizi Sonuçları

Varyans Kaynakları	SD	KT	KO	F	P
Çeşit-Armut	1	0,44444	0,444444	37,21	0,000*
Süre	5	0,45000	0,090000	7,53	0,000*
Armut x Süre	5	0,64889	0,129778	10,87	0,000*
Hata	24	0,28667	0,011944		
Toplam	35	1,83000			

* 0,01 seviyesinde önemli

Ek Çizelge 5. Ayva Çeşitlerinde *Erwinia amylovora* Ea234-1 Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarı Değerlerinin Çeşitli Parametreler için Yapılan Varyans Analizi Sonuçları

Varyans Kaynakları	SD	KT	KO	F	P
Çeşit-Ayva	1	0,61361	0,613611	14,73	0,001*
Süre	5	0,48472	0,096944	2,33	0,074
Ayva x Süre	5	2,79139	0,558278	13,40	0,000*
Hata	24	1,00000	0,041667		
Toplam	35	4,88972			

* 0,01 seviyesinde önemli

Ek Çizelge 6. Ayva Çeşitlerinde *Erwinia amylovora* Ea240-3 Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarı Değerlerinin Çeşitli Parametreler için Yapılan Varyans Analizi Sonuçları

Varyans Kaynakları	SD	KT	KO	F	P
Çeşit-Ayva	1	0,05444	0,054444	0,75	0,395
Süre	5	1,14333	0,228667	3,15	0,025**
Ayva x Süre	5	0,72222	0,144444	1,99	0,116
Hata	24	1,74000	0,072500		
Toplam	35	3,66000			

** 0,05 seviyesinde önemli

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Şerife ÇETİN
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Karaman, 1988
Telefon : 545 471 70 41
Faks :
e-mail : serifecetin159@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Karaman YDA Lise, Karaman	2006
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, Konya	2011
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Konya	2014
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi

UZMANLIK ALANI

Bakteriyoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR