

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AYVADA ATEŞ YANIKLIĞI HASTALIĞI
ETMENİNİN (*Erwinia amylovora*) TANISI VE
ENTEĞRE MÜCADELE OLANAKLARI**

Hande Evren ARDA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 19.09.2016

Bornova-İZMİR

2016

Hande Evren ARDA tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak sunulan "Ayvada Ateş Yanıklığı Hastalığı Etmeninin (*Erwinia amylovora*) Tanısı ve Entegre Mücadele Olanakları" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 19.09.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Raportör Üye : Prof. Dr. Serra HEPAKSOY

Üye :Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Ayvada Ateş Yanıklığı Hastalığı Etmeninin (*Erwinia amylovora*) Tanısı ve Entegre Mücadele Olanakları” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

19/09/2016

Hande Evren ARDA

ÖZET**AYVADA ATEŞ YANIKLIĞI HASTALIĞI ETMENİNİN (*Erwinia amylovora*) TANISI VE ENTEGRE MÜCADELE OLANAKLARI**

ARDA, Hande Evren

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

Eylül 2016,82 sayfa

Bu çalışmanın amacı; ayva ve diğer yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarındaki ateş yanıklığı belirtilerinden elde edilen *Erwinia amylovora* (Ea) izolatlarının klasik ve moleküler yöntemle tanısı ve entegre mücadele olanaklarının değerlendirilmesidir. Tez çalışmasında, *Pantoea agglomerans* (Pa - Eh24, E325), *P. vagans* (Pv - C9/1) ve *Pseudomonas fluorescens* (Pf - A506) izolatları, ve Oxolinic asit (OA), Prohexadione Calcium (ProCa) gibi kimyasalların Ea'ya etkililiği ham armut meyve (HAMT) ve koparılmış ayva çiçek testi ile gerçekleştirilmiştir. HAMT'nde OA uygulaması en başarılı sonucu vermiş ve bunu Pa E325 izolatı izlemiştir. Test edilen bakteriyel antagonistler, ayva çiçek testinde uygulama yapılmamış kontrole kıyasla çiçek yanıklığını %33-55 oranında azaltmıştır. Ancak, OA ve ProCa uygulamalarının koparılmış ayva çiçek testinde başarılı olmadığı görülmüştür. Bu testlere göre seçilen bakteriyel antagonistler (Pf A506, Pa E325 ve Pv C9/1), ProCa ve streptomisin 1 yaşındaki ayva fidanlarına (cv. *Ege1*) püskürtülmüştür. Antagonistlerin uygulanmasından 24 saat sonra patojen bakteri süspansiyonu Ea, enjeksiyon yöntemiyle fidanın büyüme ucundan uygulanmıştır. Pv C9/1 ve Pf A506 izolatları kontrole kıyasla sürgün yanıklığını %81 ve %77 oranında engellemiş ve streptomisin (100µg/ml) uygulamasından daha başarılı bulunmuştur. ProCa ayva fidanları üzerinde sürgün yanıklığını önlemede etkisiz bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Erwinia amylovora*, ateş yanıklığı, biyolojik kontrol, ProCa, entegre kontrol.

ABSTRACT**DIAGNOSIS AND INTEGRATED CONTROL OF FIRE BLIGHT
CAUSAL AGENT (*Erwinia amylovora*) ON QUINCE**

ARDA, Hande Evren

MSc in Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN

September 2016, 82 pages

The aim of this work was classical and molecular diagnosis, and evaluation of integrated control possibilities of *Erwinia amylovora* (*Ea*) strains obtained showing from fireblight symptoms on pome fruits. In this thesis, *Pantoea agglomerans* (*Pa* - Eh24, E325), *P. vagans* (*Pv* - C9/1) and *Pseudomonas fluorescens* (*Pf* - A506) and the chemicals such as Oxolinic acid (OA), Prohexadione Calcium (ProCa) were extensively studied for control of *Ea* on immature pear fruits (IPFA) and detached blossoms of quince. OA effectively inhibited *Ea* development on IPFA, it was followed by *Pa* - E325. Tested bacterial antagonists significantly reduced the percentage of blighted blossoms on detached quince blossom assay by 33 % to 55 % compared to the untreated control. However, OA and ProCa treatments couldn't inhibit the blossom blight of *Ea* on detached quince blossom assay. Then, the selected bacterial antagonists (*Pf*A506, *Pa*E325, and *Pv*C9/1), ProCa and streptomycin were applied onto one year old quince transplants (cv. *Ege1*) as spray treatment. *Ea* inoculation was performed by injecting the pathogenic bacterial suspension into the apical bud of quince transplants 24h after treatments. *Pv* - C9/1 and *Pf* - A506 inhibited the development of shoot blight on quince transplants at the rate of 81 % and 77 % compared to pathogen alone treatment, respectively, and found more promising than streptomycin treatment (100 µg/ml). ProCa was ineffective to inhibit the shoot blight symptom of *Ea* on quince transplants.

Key words: *Erwinia amylovora*, fireblight, biological control, ProCa, integrated control.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında tecrübeleri ile bana destek veren, görüş ve katkıları ile bana yol gösteren, yüksek lisans öğrenim sürecim boyunca bana güvenip beni yarı yolda bırakmadığı için çok sevdiğim hocam Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN' a, çalışmam süresince bilimsel desteği için Yrd. Doç. Dr. Ahmet AKKÖPRÜ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı bakteriyoloji laboratuvarı arkadaşlarım Dr. Daver FAKHRAEİ, Arş. Gör. Mustafa AKBABA, Zir. Yük. Müh. Şahika AKAT' a tüm yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Bitkisel materyallerimi sağlamada ve her türlü kaynak yardımında bulunan Zir. Yük. Müh. Müge ŞAHİN' e ve YL tez projeme finansal destek sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Müdürlüğüne içten teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yazım aşamasında bana yardımcı olan Zir. Yük. Müh. Seda RAJABI KHIABANI ve istatistiksel verilerimi değerlendirmemde yardımcı olan Zir. Yük. Müh. Ebru FİTİL KAVUT' a teşekkür ederim.

Bu bölümü seçmemde bana yardımcı olan çok sevdiğim Fizik öğretmenim Sayın Ekrem DEMİRCİ' ye ve yüksek lisans eğitim hayatım boyunca manevi desteklerini esirgemeyen Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi (TOTEM) çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatımın başlangıcından bu güne kadar bu uzun süreçte verdikleri maddi ve manevi katkıları, sabırları ve destekleri nedeniyle başta aileme ve hep yanımda olan tüm arkadaşlarıma, şu anda hayatta olmayan ancak manevi desteğini daima yanımda hissettiğim rahmetli babama,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	8
2.1 Ateş Yanıklığı Hastalığı ve Etmene İlişkin Genel Bilgiler	8
2.2. Ateş Yanıklığı Hastalığının Tanısına Yönelik Çalışmalar	12
2.3. Ateş Yanıklığı Hastalığının Mücadelesine Yönelik Çalışmalar	16
2.3.1 Kültürel önlemler	16
2.3.2 Dayanıklı çeşitlerin kullanımı	17
2.3.3 Kimyasal mücadele	19
2.3.4 Biyolojik mücadele	23

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1 Materyal	28
3.1.1. Çalışmada kullanılan test patojeni bakteriler	28
3.1.2 Çalışmada kullanılan yararlı bakteriler	28
3.1.3 Çalışmada kullanılan bitkisel materyaller	29
3.1.4 Çalışmada kullanılan besi yerleri	29
3.1.5 Çalışmada kullanılan kimyasallar	31
3.1.6 Çalışmada kullanılan primerler	31
3.2 Yöntem	32
3.2.1 <i>Ea</i> etmeninin izolasyonu	32
3.2.2 <i>Ea</i> 'nın tanı testleri	32
3.2.3 Antagonist bakteri ve kimyasalların <i>Ea</i> 'ya karşı <i>in vivo</i> etkililiğinin değerlendirilmesi	38
3.2.4 Verilerin analizi	42

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4. BULGULAR.....	43
4.1 İzolasyon Sonuçları	43
4.2 Tanılama Testi Sonuçları.....	43
4.2.1 Klasik tanılama testleri sonuçları.....	43
4.2.2 Moleküler tanı.....	45
4.3 Patojenisite Testi Sonuçları	45
4.4 Antagonist Bakteriler ve Bazı Kimyasalların <i>Ea'</i> ya Karşı Etkililiği Testi Sonuçları	47
4.4.1 Ham armut meyve testi (HAMT) sonuçları.....	47
4.4.2 Koparılmış ayva çiçek testi sonuçları	50
4.4.3 Fidan testi sonuçları.....	53

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

5.TARTIŞMA	58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR DİZİNİ	65
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>Ea</i> etmeninin sürgün uçlarında oluşturduğu “çoban değneği” belirtisi	9
2.2 <i>Ea</i> etmeninin gövdelerde oluşturduğu kanser belirtisi	10
2.3 <i>Ea</i> etmeninin ayva ağaçlarındaki yanıklık belirtisi	10
2.4 <i>Ea</i> etmeninin meyvelerde yaptığı yanıklık belirtisi.....	11
2.5 <i>Ea</i> etmenin meyvelerde yaptığı akıntı	11
3.1 HAMT için meyvelerin dezenfeksiyonu, bakteri süspansiyonlarının hazırlanması ve uygulanması.....	37
3.2 HAMT’de sonuçların değerlendirilmesinde yararlanılan 0-3 skalası.....	37
3.3 Antagonistik bakterilerin etkililiğini test etmek amacıyla koparılmış ayva çiçek testinin uygulanışı.....	40
3.4 Ayva fidan testinde antagonist bakterilerin ve patojen bakterinin uygulanması ve fidanların bitki büyüme odasında inkubasyonu.....	41
4.1 G1F/G2R primerleri ile testlenen <i>Ea</i> ’nın PCR elektroferaz-jel görüntüsü	45
4.2 HAMT’de en yüksek hastalık şiddetine (%) sahip olan 163 numaralı <i>Ea</i> izolatının oluşturduğu belirtiler.....	47
4.3 Testlenen antagonist bakteriler ve kimyasalların farklı dozlarının <i>Ea</i> ’ya HAMT’nde etkililiği	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 <i>Ea</i> 'ya karşı HAMT'nde başarılı bulunan OA (150 ppm'lik dozu) uygulaması	49
4.5 Antagonist bakterilerden en başarılı uygulama olan E 325'in <i>Ea</i> 'ya etkisi	42
4.6 Referans kimyasal olan streptomisin uygulamasının <i>Ea</i> 'ya etkisi	50
4.7 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların koparılmış çiçek testinde <i>Ea</i> 'ya etkililiği sonuçları.....	52
4.8 Referans kimyasal olan streptomisin uygulamasının koparılmış çiçek testinde <i>Ea</i> 'ya etkisi	52
4.9 Koparılmış çiçek testinde başarısız uygulama olarak değerlendirilen OA'nın <i>Ea</i> 'ya etkisi	52
4.10 Antagonist bakteri uygulamasında başarılı sonuç veren C9/1 izolatının <i>Ea</i> 'ya etkisi	53
4.11 Başarılı antagonist uygulamalarından biri olan PfA 506'nın <i>Ea</i> 'ya etkisi	53
4.12 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların fidan testinde <i>Ea</i> 'ya etkililiği sonuçları	55
4.13 Antagonist bakterilerden C9/1 uygulamasının fidanlarda <i>Ea</i> 'nın sürgün yanıklığına olan etkisi	55

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 4.14 *PfA* 506 uygulamasının fidanlardaki *Ea*'nın sürgün yanıklıklarına olan etkisi.....56
- 4.15 Fidan testinde başarısız uygulama olarak değerlendirilen streptomisin uygulamasının *Ea*'nın neden olduğu sürgün yanıklığına olan etkisi.....56
- 4.16 Uygulamadaki pozitif ve negatif kontrol bitkileri 57

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 100 g için ayva besin değerleri	2
1.2 Türkiye’de ayva üreticisi olan illerin üretim miktarları.....	3
3.1 Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan ve tez çalışmasında kullanılan <i>Ea</i> izolatlarının listesi	28
3.2 Çalışmada kullanılan antagonist bakterilerin listesi	29
3.3 Bakteri izolasyonu, pigment oluşumu ve genel besi yeri olarak kullanılan King B ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları	30
3.4 Levan oluşumunun gözlemlenmesi için hazırlanan SNA besi yerinin yapımında kullanılan kimyasallar ve miktarları	30
3.5 Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin ticari isimleri, aktif madde oranları ve kullanım dozları	31
3.6 Tez çalışmasında kullanılan primer çiftlerinin oligo dizinleri.....	31
3.7 <i>Ea</i> için PCR protokolü.....	35
3.8 <i>Ea</i> için PCR çalışma koşulları	35
3.9 HAMT testi için 0-3 skalası.....	36
4.1 Tez çalışması sırasında ayva bahçelerinden elde edilen <i>Ea</i> izolatları	43
4.2 Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından elde edilen <i>Ea</i> izolatlarının klasik tanılama testi sonuçları.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.3 Ham armut meyvelerinde patojenisite testi sonuçları	46
4.4 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların HAMT'nde <i>Ea</i> 'ya etkililiği sonuçları	48
4.5 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların koparılmış çiçek testinde <i>Ea</i> 'ya etkililiği sonuçları	51
4.6 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların ayva fidan testinde <i>Ea</i> 'ya etkililiği sonuçları.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
cv	Kültüvar
CFU	Koloni oluşturan birim
Fe	Demir
NaOCL	Sodyum Hipoklorit
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum fosfat.
MgSO ₄ 7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat.
FeCl ₃	Demir klorid.
UV	Ultraviolet
HCl	Hidroklorik asit
KOH	Potasyum Hidroksit
NaCl	Sodyumklorür
SNA	Sucrose Nurtient Agar

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
<i>Ea</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
ProCa	Prohexadione Kalsiyum
OA	Oxolinic asit
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
pv.	Pathovar
var.	varyete
sp.	Tür
spp.	Türler
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulse Field Jel Elektroforezi
DNA	Deoksiribonükleik asit
rRNA	Ribozomol Ribo Nükleik Asit
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TAE	Tris-acetate-EDTA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
GKGM	Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü

SAR	Systemic Acquired Resistance
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
OD	Optik yoğunluk
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
REP PCR	Repetitive sequence-based PCR
AP PCR	Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPS	Ekstraselular polisakkarit
HR	Hipersensitif Reaksiyon
kb	Kilobaz
KB	King's medium B
PR	Pathogenesis Related
LAB	Laktik Asit Bakterileri

1.GİRİŞ

İklim koşullarının uygun olması ve dünya üzerindeki konumu nedeniyle ülkemizde yumuşak çekirdekli meyve türlerinin yetiştiriciliği çok eski yıllardan beri yapılmaktadır.

Yumuşak çekirdekli meyve türleri elma, armut, ayva, alıç, muşmula, üvez, Malta eriği (yenidünya)'dır. Dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliği yapılan bu meyve türleri arasında elma, armut ve ayva en önemlileridir. Dünya'nın bir çok ülkesinde ayva yetiştiriciliği; diğer iki önemli yumuşak çekirdekli meyveler olan elma ve armut yetiştiriciliği kadar yaygın değildir (Gencer S.,2011).

Ayva (*Cydonia oblonga*), gülgiller (Rosaceae) familyasından 4-5 m boylanan, kırmızı kahverengi gövdeli meyve ağacıdır. *Cydonia* cinsi içerisinde özellikle süs bitkisi olarak bilinen *C. japonica* ve *C. maulei* olmak üzere 2 tür daha bulunmaktadır.

Ayvalar, meyve şekillerine göre de 2'ye ayrılmaktadırlar. Bunlar *C. oblonga* var. *pyriformis* yani meyveleri armut şeklinde olan ayvalar, diğeri ise *C. oblonga* var. *maliformis* yani meyveleri elma şeklinde olanlardır. Bu iki alttürün yanı sıra meyveleri armut şeklinde olan *C. oblonga* var. *lusitanica*'nın da yetiştiriciliği yapılmaktadır (Nagy-Déri, 2011; Pektaş, 2011).

Ayva kültürü çok eski çağlardan beri bilinmektedir. Kültürü milattan önceki yıllarda Anadolu'dan Yunanistan ve Roma'ya geçmiştir. Daha sonra orta ve doğu Avrupa'ya yayılmıştır. (Özçağırın vd., 2005; Özkan, 1995).

Ayvanın ana vatanı kuzey-batı İran, Türkistan, kuzey Kafkasya, Hazar denizi dolayları ve Anadolu'dur. Bazı araştırmacılar ise ayvanın Kırım ve kuzey Yunanistan'da da yabani olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. Daha sonra yabani ayvaların Suriye, Doğu Avrupa, İtalya, Güney Batı Avrupa ve Cezayir'e yayıldığı bilinmektedir.

Çizelge 1.1'de görüleceği üzere ayva; vitamin, mineral madde ve şeker açısından zengin, besleyici bir meyvedir. C vitamini miktarı da oldukça yüksektir.

Çizelge 1.1 100 g için ayva besin değerleri (Anonymous, 2011; Özçağırın, vd., 2011).

Enerji	238 kJ (57 kcal)	Potasyum	200.00 mg
Karbonhidratlar	6.30 g	Kalsiyum	14.00 mg
Toplam Şeker	6.30 g	Magnezyum	6.00 mg
Malik asit	0.80 g	Fosfor	19.00 mg
Yağ	0.10 g	Demir	0.30 mg
Protein	0.30 g	Vitamin C	15.00 mg
Su	84.20 g	Çinko	0.50 mg
Sodyum	3.00 mg	Kükürt	5.00 mg

Ayva aynı zamanda uzun yıllardan beri bazı hastalıkların tedavisinde, bitkisel ilaç olarak da kullanılmaktadır. Bu faydalarını mide ve bağırsakları kuvvetlendirmesi, karaciğerin ve kan dolaşımının çalışmasını düzenlemesi, kaynatılıp suyu içildiğinde boğaz ağrılarına iyi gelmesi, çekirdeklerinin öksürüğü tedavi edici olması, ayvadan yapılan merhemlerin deri hastalıklarına ve yanıklıklara iyi gelmesi, çiçeğinin kaynatılarak içilmesi halinde anne sütünü artırması, yapraklarının çay gibi demlenip içilmesi sakinleştirici ve uykusuzluğu giderici etkiye sahip olması şeklinde sıralanabilmektedir. Şeker içeriğinin düşük olması nedeniyle şeker hastaları tarafından da rahatlıkla tüketilebilir. Ayrıca ayva kozmetik sanayisinde losyon ve cilt kremleri yapımında kullanılır. Aynı zamanda afrodizyak özelliğe de sahiptir. (Anonymous, 2011; Özçağırın vd., 2005).

Ticari olarak yetiştiriciliği yapılan yerli ayva çeşitleri arasında “Bardak ayvası”, “Demir ayvası”, “Limon (Eşme) ayvası” ve “Ekmek ayvası” sayılabilir.

Bunlar arasında Limon ve Ekmek ayvası çeşitleri yetiştiriciliği yaygın olan çeşitlerdir (Soylu, 1997).

Ayva Anadolu'nun yerli ve en önemli bitkilerinden biridir. Yetiştiriciliği Türkiye'nin her bölgesine yayılmış durumdadır. 2014 yılı verilerine göre Türkiye'de 53 982 dekar alanda bulunan ayva ağacı sayısı 3 103 564 adettir. Üretim miktarı ise 107 243 tondur. Türkiye'de 2014 yılında ayva üretiminde öncü olan iller Çizelge 1.2 de görüldüğü gibidir.

Çizelge 1.2 Türkiye'de ayva üreticisi olan illerin üretim miktarları (TÜİK, 2014).

İller	Üretim Miktarı (ton)
Sakarya	22.309
Bursa	15.640
Bilecik	8.595
Denizli	6.406
Antalya	5.508
Çanakkale	4.081
Isparta	3.991
Kocaeli	3.846

Ayva ılıman iklimi seven bir meyve türüdür. Kışın soğuklanma isteği elma ve armuda göre daha azdır. Çok rüzgarlı yerlerde iyi bir gelişme gösteremez.

Dalları kırılır ve meyve dökümleri gözlenir. Besin maddelerince zengin, kumlu-killi topraklarda yetiştirilmektedir. Toprakta bulunan fazla kireçten zarar görür.

Ayva ağaçlarında sorun olan pek çok hastalık etmeni ve zararlı böcekler bulunmaktadır. En önemli zararlılar arasında Elma iç kurdu (*Cydia pomonella*), Akdeniz meyve sineği (*Ceratitis capitata*), Yaprakbüklenler (*Archips* spp.) yer alır. Fungal hastalıklar ise; Monilya (*Sclerotinia linhartiana*), Kahverengi leke (*Diplocarpon mespili*)'dir. Ayvadaki en önemli bakteriyel hastalık ise diğer tüm yumuşak çekirdekli meyvelerde sorun olan *Erwinia amylovora* ((Burr.) Winslow)'nın neden olduğu Ateş Yanıklığı hastalığıdır (GKGM,2015).

Ea (Winslow *et al.*)'nın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı, bakteriyel bir etmen tarafından meydana getirildiği saptanan ilk bitki hastalığıdır (Beer and Opgenorth, 1976; Smith, 1920). Rosaceae familyasına ait 39 farklı cins ve 128 türe ait bitkide hastalık yapmaktadır (Beer and Opgenorth, 1976; Smith, 1920). Elma, armut ve ayva başta olmak üzere yenedünya, muşmula gibi yumuşak çekirdekli meyve ağaçları yanı sıra, dağ muşmulası, ateş diken, üvez ve birçok süs bitkisinin de bu patojenin konukçuları arasında olduğu bilinmektedir (Van der Zwet and Keil, 1979; Van der Zwet *et al*, 1988).

Ea (Burr.) Winslow *et al.*'nın William Denning'in 1793 yılında yayınlanan raporunda hastalığın ilk olarak 1780 yılında New York'ta Hudson Vadisi'nin dağlık bölgesindeki sırasıyla elma, armut ve ayvalarda görüldüğü bildirilmiştir (Van Der Zwet and Keil, 1979). Bu tarihten itibaren 1900'lü yılların başlarına kadar hastalık Kuzey Amerika kıtasıyla sınırlı kalmıştır (Van Der Zwet, 1996). Daha sonra, 1903 yılında Japonya'da bulunan armut ağaçlarında, 1919 yılında ise Yeni Zelanda'daki yenedünya ağaçlarında tespit edilmiştir (Van Der Zwet and Bonn, 1999). 1950'li yılların ortalarında bulaşık meyve ve taşıma materyaliyle patojen yayılarak 1957'de İngiltere'ye ve 1964'de ise Mısır'a giriş yaptığı saptanmıştır (Van Der Zwet, 1996). Mısır'dan Kıbrıs ve İsrail'e yayılmış, buralardan da Türkiye, İran, Yunanistan ve Doğu Avrupa'nın iç kısımlarına doğru ilerlemiştir (Van Der Zwet and Bonn, 1999).

Hastalık, ülkemizde ise ilk kez 1985 yılında Afyon İli Sultandağı İlçesindeki armut ağaçlarında tespit edilmiştir (Öktem ve Benlioğlu, 1986). Hastalığın ayrıca ayva (Momol vd., 1993; Saygılı vd., 2006) ve yenedünyada da (Momol vd., 1993; Tokgönül ve Turan, 1993) problem olduğu bildirilmiştir. 1987 yılı itibariyle Türkiye'deki bütün armut yetişen alanlarda ateş yanıklığı belirtileri görülmüş ve ciddi zararlar oluşarak pek çok bahçe sökülme zorunda kalmıştır (Momol vd., 1993).

Hastalığın isminden de anlaşıldığı gibi en tipik belirtisi, enfekteli bitki aksamının ateşten yanmış bir görünüm almasıdır. Nemli havalarda bu enfekteli kısımlarda krem rengi sütünsü bir akıntı oluşur. Bu akıntı, hastalık etmeninin en karakteristik işaretidir. İlk belirtiler genellikle tek bir çiçek veya tüm çiçek demetinde görülür. Başlangıçta enfekteli kısımlar su da haşlanmış gibi bir görünüm alır, solar, büzüşür, kahverengileşir, zamanla siyahlaşarak ateşte yanmış gibi bir görünüm alır. Enfeksiyon çiçek tablasına doğru ilerler ve çiçek tablası koyu yeşil renkte, suda haşlanmış bir görünüm alır. Çiçek enfeksiyonunu genç meyve enfeksiyonları takip eder. Hastalık ilerledikçe tüm sürgün, ana dallar ve gövdeye kadar enfeksiyon yayılabilir. Taze sürgünler enfekte olduğunda siyahlaşır ve uç kısımları geriye doğru 180° kıvrılır. Bu belirti “Çoban değneği” olarak adlandırılır. Dal ve gövdelerde enfekteli kısımlardaki dokular içeriye doğru çöker ve başlangıçta kırmızımsı-kahverengi bir hal alır. Koşullar uygun olduğunda yine bu kısımlarda bakteriyel akıntılar oluşur. Hastalıklı kısımlarda kabuk bir bıçakla kaldırıldığında, kabuk dokusunun kahverengileştiği ve bu kahverengileşmenin sağlam doku içine doğru ilerlediği görülür.

Ateş yanıklığı hastalığı tüm dünyada karantinaya tabi olup, yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarına en çok zarar veren hastalıktır. Sadece o yılın ürünü etkilemekle kalmayıp, ağaçlarda sürgün, ana dal ve gövdeyi hastalandırarak gelecek yıllardaki ürüne de etki edip ağacı kurutabilmektedir.

Ateş yanıklığı hastalığına karşı etkin bir mücadele için 3 önemli esas üzerinde durulmaktadır. Bahçede inokulumu en aza indirmek için hastalıkla bulaşık materyallerin bahçeden uzaklaştırılması, konukçudaki duyarlılığı minimuma indirecek yetiştiricilik tekniklerinin uygulanması ve son olarak

hastalığın kritik dönemlerinde ilaçlamalar yaparak enfeksiyonun önlenmesi gerekmektedir.

Ea karantina altına alınmış bakteriyel bir hastalıktır. Tohumları hariç tüm bitki organları, patojenin yayılması için potansiyel kaynaklar olarak kabul edilmiştir. Patojenin bitki dokusunu yıkmadan bitki materyalinden uzaklaştırmak için uygun kimyasal ya da başka bir tedavi yöntemi yoktur. Hastalığın meyve bahçelerine ya da yabani bitkilere bir kez bulaştığında, eradikasyon oranlarının bölgedeki hastalığın yayılmasına engel olmada etkisiz olduğu kanıtlanmıştır. Bazı durumlarda, ithal fidanlık bitkilerin hastalık taşıdığı tespit edilmiş ve en yakın zamanda dikiminin önüne geçmek için yok edilmiştir (**EPPO**, 2015. <https://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.html>). *Ea* iç karantina etmeni olup, bulaşık her türlü üretim materyalinin ülkeye girişi yasaklanmıştır (17/8/1995 tarih ve 22377 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan "İç Karantinaya Tabi Hastalık ve Zararlılar Listesi").

Bu hastalıkla mücadele yöntemlerinin hiç biri etkin bir kontrol yöntemi olmadığı için Ateş yanıklığı, yönetimi oldukça zor bir hastalıktır. Hastalıkla savaşmada bakırlı bileşikler ve antibiyotikler önerilmektedir. Ancak; bakırlı preparatlar etkili oldukları dozlarda fitotoksik etkileri nedeniyle ilaçlama programında rutin olarak kullanılmamaktadır. Streptomisin ise ekonomik olmayışı ve dayanıklılık sorunu nedeniyle birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de kullanımına izin verilmemektedir.

Son yıllarda, hastalıkla mücadelede biyolojik yöntemler yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ateş yanıklığı hastalığında, kontrolün pahalı ve insan sağlığına zararlı olması nedeniyle, mücadele uygulamaları giderek azalmaktadır. Kimyasal savaşımın yeterince başarılı olmayışı, insan ve doğaya karşı olan olumsuz etkiler sebebiyle beraberinde birçok sorun getirmesi ve organik yetiştiriciliğin de gündeme gelmesiyle son yıllarda alternatif bir önlem olarak biyolojik savaş olasılıkları araştırılmış ve *Ea* 'ya karşı epifitik bakterilerin kullanıldığı çalışmalardan etkili sonuçların alındığı dikkat çekmiştir.

Bu tez projesinin amacı; yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından elde edilen *Ea* izolatlarının klasik ve moleküler yöntemlerle tanınması, *in vivo*

testlerle hastalığın entegre mücadelesine yönelik çalışmalar yapılmasıdır. Bu amaçla, bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan bakteriyel antagonistler ve bazı zararsız kimyasalların ham meyve, koparılmış iek ve fidan testleriyle ateş yanıklığı hastalığı etmeninin engellenme potansiyelleri araştırılmıştır.



2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Ateş Yanıklığı Hastalığı ve Etmene İlişkin Genel Bilgiler

Ateş Yanıklığı dünyada yaklaşık iki yüzyıllık geçmişi olan bir hastalıktır. 18. yüzyılda ateş yanıklığının sebebi olarak böcek ve fungus olmak üzere iki teori geliştirilmiş, fakat 1882’de Burrill tarafından patojenin ilk bakteriyel tanılması yapılarak *Micrococcus amylovorus* olarak adlandırılmıştır. Nomenklatürde *Bacillus amylovorus* (Burr.) Trevisan, *Bacterium amylovorus* (Burr.) Chester, *Bacterium amylovorum* (Burr.) Serbinof gibi isimler alan ateş yanıklığı etmenine son olarak 1920 yılında WINSLOW ve arkadaşları tarafından *Erwinia* cinsi içinde yer verilerek *Erwinia amylovora* ismi konulmuştur (Van der Zwet and Keil, 1979).

Ea Gram-negatif, kısa çubuk şeklinde bir bakteridir. Zincir şeklinde veya tek tek görülebilen bakteri hücresi, peritrik kamçılı ve hareketlidir. Optimum 21–28°C arasında gelişen bakterinin, minimum gelişme sıcaklığı 3-8°C ve maksimum 37°C’dir. Optimum pH gelişimi 6.0-7.5’ dir (Van Der Zwet and Keil, 1979).

Kado (2010)’nun bildirdiğine göre bitki patojeni bakterilerin sınıflandırmasında *Ea* ((Burr.) Winslow *et.al.*)’nın son taksonomisi aşağıdaki gibidir.

Alem : *Prokaryota*

Şube : *Bacteria*

Bölüm : *Proteobacteria*

Sınıf : *Gammaproteobacteria*

Familiya: *Enterobacteriaceae*

Cins : *Erwinia*

Tür : *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et.al.*

Ea, birçok protein üretir ve salgılar, enfekte ettiği bitki üzerinde oluşturduğu bakteriyel akıntı (ooze) içinde, önemli heteropolysakkaritlerden olan amylovoranı

 retir. Amylovoran etmenin virülensliği için gerekli bir salgıdır. Bakteri hücreleri tarafından salgılanan ve *Hrp* type III salgı sistemi vasıtasıyla bitki hücresine yerleştirilen efektör proteinler virülenslik faktörlerindendir. *Harpin* proteini bitkinin hücreler arası boşluklarında salgılanan yüksek oranda glisin içeren bir protein olup tedavi edici olarak bitkide kazanılmış dayanıklılık (Systemic Acquired Resistance, SAR) mekanizmasını teşvik ettiği belirtilmiştir. Patojenler demir bakımından zayıf olan alanlarda gelişmeleri için demire ihtiyaç duyarlar. Sideroforlar patogenezi (hastalık gelişimi) için önemli doğal demir bağlayıcı bileşiklerdir. *Ea*  nemli sideroforlardan proferrioxamine üretmektedir (Kado, 2010).

Bahar aylarında ılık ve nemli havalar esnasında, ilk belirtiler çiçeklerde görülmektedir. Çiçekler önce suda haşlanmış gibi bir görünüm almakta ve hızla p rs y p, kahverengiye dönmekte, siyahlaştıktan sonra düşebilmekte veya mumya şeklinde ağaçta asılı kalabilmektedir. Çiçeklerden sonra taze sürgün ve dallar da hastalığa duyarlıdır. Taze sürgünler enfekte olduğunda siyahlaşır ve uç kısımları geriye doğru kıvrılır (şekil 2.1). Bu görünüm “ oban değneği” belirtisi olarak adlandırılır. Yapraklarda ana damar boyunca ve yaprak kenarlarında kahverengi-siyah lekeler başlar. Hastalıklı kısımlarda kabuk bir bıçakla kaldırıldığında kabuk dokusunun kahverengileştiği ve bu kahverengileşmenin sağlıklı doku içine doğru uzadığı görülür (şekil 2.2). En tipik belirtili, enfekteli bitki aksamının ateşten yanmış bir görünüm almasıdır (şekil 2.3).



Şekil 2.1 *Ea* etmeninin sürgün uçlarında oluşturduğu “çoban değneği” belirtisi (www.metos.at ‘den alınmıştır.)



Şekil 2.2 *Ea* etmeninin gövdelerde oluşturduğu kanser belirtisi (www.zmo.org.tr ‘den alınmıştır.)



Şekil 2.3 *Ea* etmeninin ayva ağaçlarındaki yanıklık belirtisi (Zir. Yük. Müh. Müge Şahin’den alınmıştır)

Meyve enfeksiyonları genellikle meyve sapından olur. Küçük olmayan meyveler sulu bir hal alır, sonra kahverengiye döner, pörsür, mumyalaşır ve sonunda siyahlaşırlar (Şekil 2.4). Nemli koşullar altında, süt rengi yapışkan bakteriyel akıntı damlaları bitki yüzeyinde akar ve sonunda köke kadar yayılan bakteriler tüm ağacın kurumasına yol açabilirler. Hastalık yangından sonraki bir

ağacın görünümüne çok benzemesinden dolayı hastalığa ateş yanıklığı denilmiştir (Van Der Zwet and Keil, 1979).



Şekil 2.4 *Ea* etmeninin meyvelerde yaptığı yanıklık belirtisi (en.wikipedia.org'dan alınmıştır.)

Hastalık etmeni, duyarlı olan konukçularda çiçek, sürgün ve meyve yanıklıklarından sonra gövde kanserlerine de neden olmaktadır. Enfeksiyonun ağaçlarda ilerlemesi yavaşlayınca kabuk dokusunda kanserler gelişir. Hastalıklı dokular soyulup kesildiğinde hastalığın karakteristik özelliği olan kırmızımsı - kahverengi çizgiler görülmektedir (Şekil 2.2). Bu durumun erken belirtisi ise kabuk dokusundaki sızıntı ve beraberinde gözlemlenen küçük çatlaklardır.



2.5. *Ea* etmeninin meyvede yaptığı akıntı (www.apsnet.org 'dan alınmıştır.)

Ea taze sürgün, enfekteli meyve ve ağaç kabuklarında akışkan formda damlacıklar halinde “ooze” adı verilen bakteriyel eksudat ve “bakteriyel iplikçik” oluşturur (Şekil 2.5). Bakteriyel eksudat genellikle virülenttir yani

hastalık yapma yeteneğindedir. Bakteri oda sıcaklığında 2 yıl gibi uzun bir süre yaşamını sürdürmekte ve patojenisitesini korumaktadır. Bakteriyel iplikçikler çok sağlam ve sert yapıda olup olumsuz çevresel koşullara karşı dayanıklıdır (Van Der Zwet and Keil, 1979).

Bakteri bir önceki mevsim sırasında oluşan gövdedeki yanıklıkların (gövde kanserleri) kenarlarında ve belirgin şekilde sağlam görülen odun dokularında kışı geçirmektedir. Primer enfeksiyonlar ilkbaharda, bakterilerin canlı olduğu kanserli dokuların aktif hale geçmesiyle çoğalır ve sağlıklı dokulara doğru yayılarak gerçekleşir. Yağmur, böcekler ve rüzgar, bakteri inokulumunu çiçeklere, sürgünlere ve genç yapraklara taşımaktadır. İlk enfeksiyonlar bir kez olduğu zaman patojen, dokular içinde çoğalmaya ve ilerlemeye devam etmektedir. Enfekteli dokularda meydana gelen bakteriyel eksudatlardan sekonder enfeksiyonlar gerçekleşmektedir (Van Der Zwet and Beer, 1995).

2.2. Ateş Yanıklığı Hastalığının Tanısına Yönelik Çalışmalar

Armut, elma, ayva, muşmula, yeni dünya ve diğer Rosaceae familyasına ait bitkilerden elde edilen *Ea* izolatlarına patolojik ve biyokimyasal testlerden sonra tüm izolatların moleküler düzeyde kesin tanısının yapılması için PCR (Polymerase chain reaction) tekniği kullanılmış ve patojenik bakterilerin polisakkarit üretiminden sorumlu olan ve kromozomal DNA üzerinde bulunan *ams* geninin (1.6 kb) çoğaltılması ile izole edilen tüm *Ea* izolatlarının kesin tanısı gerçekleştirilmiştir (Ünlü, 2002).

Ateş yanıklığı hastalığının etmeni olan *Ea* hipersensitif reaksiyonu teşvik eden *hrp* genine sahiptir. Yapılan bir çalışmada *Ea* 321 izolatındaki *hrp* geni izole edildikten sonra *Erwinia herboricola* ve *Pseudomonas syringae* bakterilerine gen açısından benzerlikleri araştırılmıştır. DNA hibridizasyon tekniğiyle *Ea*321 ve diğer *Ea* izolatlarındaki *hrp* geni *E.herboricola* 'daki *wts* geni ve *P.syringae*'deki *hrp* geni ile benzer özellikte bulunmuştur (Laby and Beer,1992).

HR ilgili yapılan bir başka çalışmada ise *Ea*'nın virulent izolatlarının ateş yanıklığı simptomsu oluşturduğu, avirulent ırkların ise sadece küçük kahverengi lekeler şeklinde belirti verdiği gözlemlenmiştir. Bitki dokuları incelendiğinde

avirulent izolatların inokulasyondan 24 saat sonra çoğalmasının durduğu diğer izolatların çoğalmaya devam ettiği saptanmıştır. Yine aynı çalışmada sağlıklı yapraklara amonyum gazı uygulandığında *Ea* ile benzer belirtilerin elde edildiği belirtilmiştir. Bu da bakteriler tarafından nekro toksin olarak amonyum gazının üretilebileceği ortaya konmuştur. *Ea*'dan izole edilen *harpin* proteini *Tn5tac1* ile mutasyona uğratıldığında armutta ve tütünde HR neden olmadığı gözlenmiştir (Wei *et al.*, 1992).

Ea'nın virülensliği için ekstrasellüler polisakkaritlerin (EPS) üretimi önemli bir faktördür. Konukçu hücrenin savunma mekanizmasına karşı koruyucu özellik gösterirler. EPS üretimi yönünden mutant olan bireyler patojenik özellik göstermez. Bazı bakteriyofajların salgıladığı enzimler EPS'ye bağlanarak, bakteriyofaj konukçu hücre yüzeyine tutununcaya kadar parçalar. Bakteriyofaj litik döneme kadar hücre nükleik asidini enjekte eder. Viral DNA genomunun kesimi ile EPS-depolimeraz sentezleyen DNA fragmenti *Escherichia coli*'de taranmıştır. Bu çalışma ile EPS-depolimeraz aktivitesinin kodlandığı ortaya çıkmıştır. Bu gen başka vektörlere aktararak kodlanan enzimin biyokimyasal yapısı incelenmiştir (Geider and Kim, 2000).

Türkiye'nin değişik bölgelerinden elde edilen 58 *Ea* izolatı epifitik ve endofitik halde bulunan *Ea*'ya karşı spesifik monoklonal antibodiler (MAM1F10) kullanılarak ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ile tanılamaları yapılmıştır (Yücel vd.,1998).

Ea'nın tanılanması için moleküler yöntem olan PCR, ürünlerin immunoenzimatik tespiti üzerine dayandırılarak geliştirilmiştir. Çalışmada değişik coğrafi alanlardan ve değişik konukçulardan izole edilen *Ea* ve diğer bitkilerden elde edilen bakteriler kullanılmıştır. Doğal enfekteli bitki organlarından patojenin tespiti uygun görülmüştür. Bu sonuçlar standart PCR tekniğiyle karşılaştırılmıştır (Merighi *et al.*,1998).

Bir başka çalışmada ise 16s ve 23s genleri arasındaki bölgenin amplifikasyonu için PCR yöntemi kullanılmıştır. *Ea* izolatları, *E. herboricola*, *P. syringae* ve *Agrobacterium tumefaciens*' in 23s DNA fragmentinin amplifikasyonundaki büyüklük farklılıkları ortaya çıkarılmış ve bunların EcoRI enzimi ile kesilmeleri sonucu bakterilerin tür teşhisi yapılarak ayrımında

kullanılmıştır. Enfekteli ahududu bitkisinden elde edilen *Ea* izolatları 4 PCR fragmenti oluştururken, enfekteli elma ve armuttan elde edilen *Ea* izolatlarında 6 DNA bandı gözlenmiştir. Bu veriler 16s/23s rRNA geninin amplifikasyonu ile *Ea*'nın alt gruplarının tanılanması için kullanılmıştır (Jeng *et al.*,1998).

Ea'nın genetik olarak farklı 16 ırkı 16s/23s ribozomal DNA analiziyle araştırılmıştır. *E. herboricola* ve *A. tumefaciens* grup dışı olarak kullanılmıştır. 16s ve 23s genleri arasındaki intergenik spacer bölgesinin rDNA'sı PCR ile çoğaltılmış ve çoğaltılan bölge 6 farklı restriksiyon endonuklease ile kesilmiştir. Analizler sonucu elde edilen fragment sayısına bağlı olarak Maloidae alt familyasının *Ea* izolatları bir gruba, Rubus'dan elde edilen 3 ırk 2. bir gruba dahil edilmiştir. Bu çalışma ile *Ea*'nın genetik çeşitliliği ribozomal DNA restriksiyon analiziyle tespit edilmiştir (Momol *et al.*,1998).

Ateş yanıklığına sebep olan *Ea* birçok yöntemle kesin olarak tanılanır. Özellikle PCR, ateş yanıklığı salgınlarından bu yana izole edilen *Ea* ırklarının tanılanmasında hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Özellikle pEA29 PCR, ribotyping ve REP PCR *Ea*'nın karakterizasyonu için önemli 3 tekniktir (Brown *et al.*,1998).

İtalya ve İspanya'nın değişik bölgelerinden elde edilen virulent *Ea* izolatları genomik DNA'nın *XbaI* enzimi ile kesilmesi sonucu PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) sistemi ile analizleri yapılmıştır (Bazzi *et al.*,1998).

Yapılan bir başka çalışmada Avustralya'dan elde edilen *Cotoneaster* spp. izolatlarıyla İngiltere ve Yeni Zelanda'dan elde edilen *Pyrus communis*, *Malus* spp., *Crateagus monogyna* ve *Cotoneaster melanacarpus* izolatlarını moleküler düzeyde araştırmışlardır. PCR'da Ea71 primerleri ile 187 bp'lik bantların olduğu gözlemlenmiştir. AP-PCR VE RAPD ile *Cotoneaster*'den elde edilen izolatların *Ea*'ya has bantlar olduğu belirtilmiştir (Taylor and Hale,1998).

Ea'nın tüm izolatları orta büyüklükte 29 kilobazlık (pEA29) plazmid taşımasıyla karakterize olurlar. Bu plazmidin çeşitli enzimlerle kesilip DNA'nın *E.coli*'nin plazmidine klonlanmasıyla alt klonlu fragmentleri oluşturmuşlardır (Falkenstein *et al.*,1988).

29 kb'lik plazmid *Ea* izolatlarında yaygın olarak görülmektedir. Plazmid içermeyen *Ea* ırkları standart ham armut meyve testinde virülenttir, fakat yabancı izolatla karşılaştırılacak olunursa simptom gelişimi gecikmektedir. Armut fidanlarına uygulanırsa patojenisitede eksiklik gözlemlenmiştir. pEA29'dan yoksun olan izolatlar armut hücrelerinde yabancı tip ırklara göre daha yavaş yayılım göstermektedirler (Falkenstein *et al.*,1988).

Ea'yı tanılamada konvensiyonel yöntemler küçük popülasyonları tespit edemez ve bu nedenden dolayı özel PCR'a dayalı yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntem 187 bp'lik *Ea*'ya özgü DNA'nın çoğaltılmasıyla gerçekleştirilmiştir. 69 *Ea* izolatı 10 farklı konukçu türünden ve 5 ayrı ülkedeki koleksiyondan elde edilip primerin kullanımı ile başarılı bir şekilde tanılanmıştır (Guilford *et al.*,1996).

Manulis *et al.*,(1998)'ın yaptıkları bir çalışmada ise İsrail'de 12 yıllık bir süreçte 205 izolatlık *Ea* koleksiyonu elde edilmiştir. Armut, ayva, elma, yenidoğru yetiştiriciliğı yapılan bölgelerden toplanan *Ea* izolatları serolojik ve moleküler karakterle karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmada ELISA ve immunofluoresens teknikleriyle İsrail'deki izolatların arasında serotipik bir grup gözlenmemiştir. Genomik çeşitlilik rastgele 10 bazlık primerler kullanılarak RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analizleriyle yapılmıştır. Test edilen tüm izolatlar kullanılan primerler bakımından aynı RAPD bantlarını göstermiştir.

Ea'nın 189 adet izolatı Kuzey Amerika ve Yeni Zelanda'da meyve yetiştiriciliğı yapılan değişik bölgelerden ve değişik konukçulardan izole edilip rep-PCR VE PCR robotyping olmak üzere iki farklı PCR tekniğıyle genetik özellikleri saptanmıştır (McManus and Jones,1994).

Farklı konukçulardan ve farklı coğrafi bölgelerden elde edilen 16 adet *Ea* izolatı arasındaki genetik özellikler RAPD analizleri ile araştırılmıştır. 6 farklı 10-mer'lik primer kullanımı ile 98 adet farklı RAPD fragmenti elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, *Ea* izolatları arasında genetik farklılık RAPD tekniğı ile ortaya çıkarılmıştır (Momol vd.,1997).

Bir başka moleküler teknik olan PFGE ise *P. syringae* ve *Xanthomonas campestris*'in patovaryları arasındaki farklılığı ortaya koymak için yapılmıştır. Bu teknik daha sonra *Ea* izolatları için de modifiye edilmiştir. *Xba*I enzimi ile kesilen bantlar arasında Kuzey Amerika'dan elde edilen E9 ve Ea-Rb izolatlarının diğerlerinden farklılık gösterdiği bulunurken, Fransa'dan elde edilen izolatların Avrupa ve İngiltere'den elde edilenlerden farklı olduğu bulunmuştur. Avrupa ve Yeni Zelanda'dan elde edilen izolatların Mısır, Yunanistan ve Türkiye'den elde edilen izolatlarla benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Zhang and Geider,1997).

2.3. Ateş Yanıklığı Hastalığının Mücadelesine Yönelik Çalışmalar

Ateş yanıklığı hastalığı yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında görülen en önemli hastalık olduğu için mücadelesinde tek bir uygulama yeterli olmamaktadır. Hastalığın kontrolü için dayanıklı veya tolerant çeşitlerin kullanımı, ağaçlara uygulanan doğru bitki besleme programları, budama, hastalıklı ağaçların eradikasyonu ve kimyasal mücadele ile birlikte entegre bir program tavsiye edilmektedir (Lightner and Steiner,1990; Thomson *et al.*,1982).

2.3.1. Kültürel Önlemler

Hastalıkla bulaşık alanlardaki konukçu bitkilerden üretim materyalinin (fidan, çelik, aşı gözü, aşı kalemi, anaç vs.) alınmaması önerilmektedir. Eradikasyon anlamında ise, etmenin karantina patojeni olması nedeniyle, bu alanlarda bulunan resmi ve özel fidanlıklar ve anaçlıklar sürekli denetlenerek hastalık saptandığı takdirde yakılarak imha edilmektedir. Hastalıklı dallar kesildiğinde budama yerlerine %10'luk Sodyum hipoklorit sürülmesi ve aşı macunuyla kapatılması, budamada kullanılan bıçak, alet ve ekipmanların yine aynı çözeltiye daldırılarak dezenfekte edilmesi tavsiye edilmektedir. Vejetasyon döneminde ağaçlar sürekli kontrol edilerek, hastalıklı çiçek demeti, sürgün ve dalların enfeksiyon noktasının en az 30-40 cm altından kesilip uzaklaştırılması öneriler arasındadır. Bahçelerde bakım işlemlerinin düzenli bir şekilde yapılması, aşırı vejetatif gelişmeyi arttırıcı gübrelemelerden kaçınılması ve damla sulama sisteminin kullanılması da hastalıkla mücadelede önem taşımaktadır.

Hastalığın yayılmasında önemli olan Ateş diken, Dağ muşmulası, Ak diken, üvez gibi orman ve süs ağaçları da enfeksiyon varsa kesilerek yok edilmesi gerekmektedir (bitkikorumarehberi.wordpress.com, Haziran 2012).

2.3.2. Dayanıklı Çeşit Kullanımı

Ateş yanıklığı hastalığıyla mücadelede kesin çözümünün bulunmaması yanında, organik yetiştiriciliğin de gündeme gelmesiyle, dayanıklı çeşit, anaç ve ara anaçların kullanımı, hastalığın kontrolünde birinci derecede önem kazanmaktadır. Bu noktadan hareketle, ateş yanıklığına dayanıklı çeşit ıslahının üzerinde durulması gerektiğine dikkat çekilmektedir (Layne and Quamme, 1975).

Elma, armut türleri ve bu hastalığa dayanıklılığı bulunan diğer konukçularda, hastalığa dayanımı, klasik metotlar ya da genetik mühendislik yoluyla artırma esasına dayanan ıslah programları düzenlenmektedir. Bu çalışmalarda, nekrozların uzunluğu, infekte sürgün oranı ve sayısı ile hastalığın şiddetinin interaksyonu dikkate alınmaktadır (Van der Zwet and Keil 1979). Amerika’da, doğal enfeksiyonu takiben bahçe koşullarında duyarlılık düzeyini değerlendirmek için ortaya atılan bu oranlama sistemi, fidanlıklar ile tür ve çeşit koleksiyonlarında ıslahçılar tarafından etkin biçimde kullanılmıştır. Sistem, farklı bölgelerdeki armut çeşit ve türlerinin oransal dayanımını karşılaştırmaya da olanak sağlamaktadır (Van der Zwet et al., 1970). Kanada’da yürütülen ateş yanıklığına dayanıklılık programında, *P. communis*, *P. ussuriensis* ve *P. pyrifolia* türlerinin seleksiyonları hastalıklara dayanım; *P. communis* çeşitleri ise meyve özellikleri yönünden seçilmiştir. Çalışma sonucunda hem hastalığa dayanımı, hem de meyve özellikleri açısından Harrow Queen, Harrow Delight ve Harrow Sweet olumlu bulunmuştur. Amerika Birleşik Devletleri tarım bakanlığının (USDA) ıslah programında ise, yüksek dayanıklılığı olan Seckel’den daha dayanıklı 8 yeni klon elde edilmiştir (Bell and Van der Zwet, 1993).

Çeşitlerin duyarlılık düzeyinin saptanması amacıyla İsviçre’de görülen ateş yanıklığı salgınından sonra, 101 elma ve 43 armut çeşidi, hastalığa hassasiyet açısından değerlendirilmiş, kara leke hastalığına hassasiyeti bulunan türlerin, ateş yanıklığına da hassas oldukları belirlenmiştir (Hasler and Kellerhals., 1995). Önemli armut çeşitlerinin duyarlılık düzeyini belirlemeyi amaçlayan çalışmada,

Bucak ve Korkuteli’nde, armut ağaçlarının ince dallarından izole edilen bakteri eksudatları, Santa Maria, Williams ve Ankara armuduna uygulandığında, Ankara çeşidinin en dayanıklı, Williams’ın orta, Santa Maria’nın ise en hassas olduğu tespit edilmiştir (Momol *et al.*, 1992). Benzer bir araştırmada ise, Williams hastalığa en hassas grupta yer alırken, Conference ve Kaiser Alexander çeşitleri orta dayanıklı grupta bulunmuşlardır (Van der Zwet and Beer., 1991).

Tokat ve Amasya’da yetiştirilen armut çeşitlerinin *Ea*’ya duyarlılığının incelendiği bir araştırmada, Santa Maria, Williams, Mustafa Bey ve Akça gibi erkenci çeşitler çok hassas, yine erkenci çeşitlerden Kieffer ve Keklik, geçici çeşitlerden Ankara, Taş ve Çiçek armudunun dayanıklı görünümde olduğu tespit edilmiştir (Çıtır ve Mirik., 1999.).

Bir başka çalışmada yapay inokulasyon yoluyla çiçeklenme dönemindeki armut ve ayva türleri ateş yanıklığı hastalığına direnç seviyeleri açısından testlenmiştir. Direnç seviyesini belirlemede yanık sürgün uzunluğunun toplam sürgün uzunluğuna oranı ölçülerek hesaplanmıştır. Hem armut hem de ayva türleri arasında önemli direnç farklılıkları kaydedilmiştir. *P. ussuriensis* cv. ‘Prairie Gem’ çeşidi %1 yanık sürgün oranıyla oldukça dayanıklı bulunmuştur. *P. calleryana* cv. ‘Bradford’ ise, %50 lezyon uzunluğu ile orta seviyede dirençli kabul edilmiştir. Ayvada ise *Chaenomeles speciosa* cv. ‘Contorta’ çeşidi %15 lezyon uzunluğuyla yüksek oranda dirençli seçilmiştir (Andrew *et al.*, 2004).

Elma anaçları olan M9 ve M26’nın köklerinde ateş yanığı hastalığının şiddetinde artış gözlemlendikten sonra bu hastalığa karşı dirençli anaçlar üretmek önem kazanmıştır. Dayanıklı anaçların ateş yanıklığı enfeksiyonunu hassas aşı materyallerinde önlemeseler de ağacı koruduğu bilinmektedir. Geneva (A.B.D) ve Vineland (Kanada)’da üretim programları son zamanlarda anaçların ateş yanığına karşı dirençli anaçlardan seçilmesine izin vermiştir. Buna ek olarak, Budagovsky (B9) ve bazı Japon anaçlarının bu hastalığa dirençli ya da toleranslı olduğu rapor edilmiştir (Norelli *et al.*, 2003).

Ea ‘ya dayanıklılık ıslahı konusunda yürütülen çalışmalara rağmen, dayanıklı çeşit elde edilmesinde fazla başarı sağlanamamıştır. Ortaya çıkan çeşitlerden birçoğu da endüstrinin başlıca dayanağı olan hassas çeşitlerin yerini alacak ve hatta yarışacak gibi görünmemektedir. Buna rağmen çeşitli ıslah

programlarından bazı yeni seleksiyonlar, hassas çeşitlerle yarışabilecek iyi meyve kalitesi ile birlikte yeterli dayanıklılığa sahip olarak belirlenmiştir.

2.3.3. Kimyasal Mücadele

Bitki hastalıklarına bağlı olarak tarım ürünlerindeki nicelik ve nitelikteki azalmayı ortadan kaldırmak için, etkili zirai mücadele metotlarının uygulanması zorunludur. Streptomisin antibiyotiği bitki bakteriyel hastalıklarının kontrolünde ABD’de uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ateş yanıklığı ile mücadelede bakırlı fungusitlerin ve streptomisin uygulamasının etkili bir kontrol sağladığı belirtilmektedir (Watkins, 1992). Türkiye’de yapılan bir çalışmada; ateş yanıklığı hastalığına karşı bazı kimyasalların etkinlikleri test edilmiş ve en iyi aktiviteyi streptomisin sülfatın sağladığı belirlenmiştir (Saygılı ve Üstün, 1996).

Kimyasal pestisitler kullanılarak kısa vadeli uygulamalarda bazı bitki hastalıklarına karşı etkili ve başarılı sonuçlar alınabilmesine rağmen; virüs, viroid ve bakteri gibi bitki patojenlerine karşı sürekli olarak kullanılan kimyasallara karşı patojenlerin direnç kazanması söz konusudur (Sobieczewski, 1991).

Meyve ağaçlarındaki ateş yanıklığı hastalığını kontrol etmek için en önemli kimyasallar olarak bakırlı bileşikler ve antibiyotikler bulunmaktadır (Psallidas and Tsiantos., 2000). Ancak bakırlı bileşiklerin kullanımı nedeniyle fitotoksosite, antibiyotiklerin kullanımı sonucunda ise insanlardaki patojenlerin antibiyotiklere karşı direnç gelişimini teşvik edici riski nedeniyle bu uygulamalar hala tartışılmaktadır (McManus *et al.*, 2002).

Ateş yanıklığı hastalığının özellikle bazı yıllarda çok yıkıcı olabilmesinin yanı sıra, yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının çoğunun bu hastalığa karşı hassas olması, mücadelesinin zor ve pahalı olması, şu ana kadar etkili ve kalıcı bir çözüm bulunamaması (Basım, 1999), antibiyotik kullanımı ile bazı zamanlarda etmenle mücadelede başarı sağlansa da, zamanla dayanıklı biyotiplerin oluşumuna zemin hazırladığı ve insan sağlığı açısından pek çok olumsuz sonuçlar ortaya çıkardığı (Moller *et al.*, 1981) vurgulanmaktadır.

Ea’nın streptomisine karşı dayanıklılık geliştirdiği ilk olarak 1971 yılında ABD’de tespit edilmiştir (Schroth *et al.*, 1971). Ancak, günümüzde artık *Ea*’nın

streptomisine karşı dayanıklılık geliştirdiği pek çok bölgede yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Aysan vd., 2006; Burr *et al.*, 1993; Chiou and Jones, 1991; Manulis *et al.*, 1998; Sholberg *et al.*, 2001; Sobiczewski *et al.*, 1991). *Ea*'nın streptomisine karşı dayanıklı strainlerinin bulunduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (Aysan *et al.*, 2006; Burr *et al.*, 1993; Chiou and Jones, 1991; Manulis *et al.*, 1998; Saygılı ve Üstün., 1996; Schroth *et al.*, 1971; Sholberg *et al.*, 2001; Sobiczewski *et al.*, 1991). Dayanıklı izolatlara rastlanma nedeni bahçe tesisinde kullanılan fidanların büyük bir çoğunluğunun başka bölgelerden gelmiş olmasıdır. Üreticilerin ülkemizde yasa dışı olarak antibiyotik kullandığı bilinmektedir. Diğer bölgelerden streptomisin uygulanmış fidanların bölgeye girişi ile bu dayanıklı izolatların bölgeye gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

Çiçekler üzerinde gelişen epifitik *Ea* popülasyonu hastalığın birincil bulaşma kaynağını oluşturduğu için, ateş yanıklığının savaşımında izlenecek strateji çiçek enfeksiyonlarını önlemeye yönelik olmalıdır. Armut ağaçlarının çiçeklenme döneminde uygulanan bakırlı preparatların çiçek ve meyvelere fitotoksik etkinin yanı sıra, dayanıklılık sorununun da gündeme gelmesi kullanımı kısıtlamaktadır (Isenberk and Schulz,1985; Loper *et al.*,1991; Teviotdale and Viveros,1999; Wilson *et al.*,1990). Hastalığın önlenmesinde yaygın olarak kullanılan streptomisin kullanan ülkelerde ise *Ea*'nın dayanıklılık kazanması en önemli sorundur (Jones and Schnabel ,1999; Loper *et al.*,1991). Türkiye'de insan sağlığına olumsuz etkileri nedeniyle tarımda streptomisin kullanımı yasaklanmıştır (WHO,1969).

Ateş yanıklığı için kabul edilebilir, etkili ve fitotoksik olmayan kimyasal uygulamaların yetersizliği nedeniyle son yıllarda yeni uygulamalar ilgi görmeye başlamıştır. Bu durum çok sayıdaki araştırmacıyı konukçu-patojen arasındaki ilişkiye dayanarak hastalığı ekolojik yönden kontrol etmeye yöneltmiştir. Bitki aktivatörleri ve büyüme düzenleyicileri en çok umut veren kimyasallar olarak anılmaktadır (Tosun ve Ergün, 2002). Systemic Acquired Resistance (SAR) bitki aktivatörleri sayesinde harekete geçirilerek hastalıklara karşı uzun süre koruma sağlanması geliştirilmektedir. Bu yeni yaklaşım kimyasallara karşı kazanılan direnç nedeniyle ve çevre dostu olmasının da etkisiyle kullanımları artmaktadır.

Konukçu duyarlılığının belirlenmesindeki ilk etken ateş yanıklığının neden olduğu sürgün enfeksiyonları için meyve ağaçlarındaki vejetatif sürgün yoğunluğudur (Beyers and Yoder,1997). Prohexadione Ca (ProCa) özellikle elma ve armut ağaçlarının bitkisel büyümesini kontrol etmek için kullanılan bir bitki büyüme düzenleyicisidir (Evans *et al.*, 1997; Evans *et al.*,1999). Pro Ca sadece elma sürgün gelişimini durdurmak için değil, aynı zamanda ikincil ateş yanıklığı enfeksiyonlarının oluşmasını azaltmak (Baştas ve Maden, 2004; Breth *et al* 1999) ve lezyonların büyümesini baskılamak için de kullanılmaktadır (Beyers and Yoders,1997; Rademacher,2004).

ProCa aslında bir giberellik asit inhibitörüdür. Bu kimyasal, sürgün gelişimini engelleyerek vejetatif büyüme ve generatif gelişme arasında dengeyi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Giberellik asit yapraklarda ve sürgünlerde sentezlenmekte, hücreler arası uzamayı uyararak vejetatif gelişmeyi arttırmaktadır. ProCa giberellik asit sentezini veya taşınımını engelleyerek vejetatif büyümeyi kontrol altına almaktadır (Davies and Curry, 1991). Ayrıca, ProCa'nın ilkbaharda hızlı sürgün gelişmesini engellemesi nedeniyle, elma ve armut yetiştiriciliğinde önemli bir sorun olan ateş yanıklığı hastalığının ağaçlara zarar verme riskini de önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Rademacher, 2004; Winkler, 1997).

ProCa ile ilgili araştırmalar 1990'lı yılların ortalarında başlamış olup son 4-5 yıl içinde giderek yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar elde edilen sonuçlar, bu kimyasalın vejetatif büyümenin kontrolünde etkili olduğunu göstermiştir. Costa *et al.*(1999), ProCa uygulamasını hem sera koşullarında 1 yaşındaki armut fidanlarında, hem de armut bahçesinde (*P. communis*/Abbate Fetel) ateş yanıklığının kontrol edilmesinde ve büyümeyi geciktirici olarak test etmişlerdir. Araştırmacılar, bahçedeki uygulamada ProCa' yı 50–100 mg/l dozunda ve taç yapraklar dökülmeye başlarken (uç sürgün büyümesi 4 cm olduğunda, nisan ayı ortasında) 2 hafta aralıkla 4 kez uygulamışlardır. Fidanlarda ise 250 mg/l dozunda tek bir uygulama yaptıktan 2 hafta sonra fidanları seraya aktarmışlar ve burada *Ea* 'nın bir virulent ırkı ile bulaştırmışlardır. Bahçede uygulanan yüksek dozdaki ProCa konsantrasyonunun sürgün gelişiminin azalmasında, meyve ağırlığının artmasında ve ateş yanıklığı hastalığının kontrolünde daha da etkili olduğu;

seradaki fidanlarda da hastalığın ilerlemesi ve büyüme parametrelerinde aynı etkilere rastlandığı belirlenmiştir.

Baştaş vd., (2004), bir bitki gelişim düzenleyicisi olan (Prohexadione-Ca) bitki aktivatörünün ve sistemik bir fungusit (Benzothiadiazole+ Metalaxyl) karışımının Ankara, Santa Maria, Willams, Deveci, Rıza Bey armut çeşitlerinde, *Ea*'nın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığının yol açtığı sürgün yanıklığına etkileri *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre; hastalığı önlemede streptomisin serada % 68.85 – 95.70 arazi koşullarında % 95.60 – 98.08 ile en yüksek etkiye sahip madde olmuş, bunu ProCa (serada % 16.50 – 25.20, meyve bahçesinde % 17.22 – 27.58), Benzothiadiazole + Metalaxyl (serada %12.27 – 16.29, meyve bahçesinde % 6.38 – 17.21) ve Tenn Cop 5 E (serada % 6.57 – 14.38, meyve bahçesinde % 6.51 – 15.95) takip etmişlerdir.

Sistemik kazanılmış direnç (SAR) ise bitkilerin kendini savunma mekanizmasıdır. SAR Pathogenesisle ilişkili proteinler (PR) arasındaki ilişkiyi yanıtlar. PR proteinleri benzothiadiazole ve harpin proteinleri gibi bazı bitki aktivatörlerini uyarır. Benzothiadiazole savunma reaksiyonlarında salisilik asitin rolünü oynar ve bitkilerin ürettiği PR proteinler gibi davranarak bakterilerin hücre duvarlarının bozulmasına neden olur (Kessmann *et al.*,1996; Oostendorp *et al.*, 2001; Thomson *et al.*,1999). Harpin proteini *Ea*'dan izole edilir ve bitkideki bir dizi karmaşık metabolik işlemleri başlatır, doğal gen ekspresyonuna neden olur, bitkinin doğal savunma ve büyüme sisteminin oluşmasını sağlar (Momol *et al.*, 1999; Wei *et al.*,1992; Wei and Beer.,1996). Bu kimyasallar doğal büyüme sistemlerini etkinleştirir, üründen alınan verimi, kalite ve gıda güvenliğini artırır, aynı zamanda ise bitkiyi hastalık ve zararlılara karşı korumak için savunma sistemini tetikler (Momol *et al.*, 1991).

Avrupa'nın kuzeyinde, streptomisinin tarımda kullanılmasına izin verilmeyen yerlerde, bazı flumequine, kasugamycin, fosetyl-Al gibi diğer kimyasallar test edilmiştir. Oxolinic asit ateş yanıklığı hastalığının kontrolü için umut verici bir kimyasal gibi görünmektedir. (Dimova, 1990; Hikiki *et al.*, 1989; Jones and Byrde, 1987).

Oxolinic asit 1998 yılından beri İsrail'de armut ve ayva bahçelerinde ateş yanıklığıyla mücadelede kullanılan tek bakterisit olmuştur. *Ea*'ya karşı OA

dayanıklılığı ise 1999-2001 yılları arasında Kuzey Galilee bölgesindeki bahçelerde tespit edilmiştir. 2000-2003 döneminde Kuzey İsrail'deki bahçelerde fazla miktarda uygulanan antibiyotik spreyler nedeniyle OA'ya dayanıklılık kazanan *Ea* izolatları belirlenmiştir (Kleitman *et al.*,2005).

Ülkemizde *Ea*'ya karşı ruhsatlı bir kimyasal olan OA İsrail'de 1998'den bu yana ticari olarak kullanılmaktadır Oxolinic asitin 200 ve 300 µg/ml'lik dozların İsrail'de armut bahçesinde doğal *Ea* enfeksiyonuna karşı denenmiş ve 300 µg/ml'lik dozun *Ea* enfeksiyonunu başarıyla engellediği, 200 µg/ml'lik dozun ise pozitif kontrolden farklı olmadığı belirtilmiştir (Shtienberg *et al.*, 2001).

Ancak 2003 yılında bir başka çalışmada dayanıklılık sorunu nedeniyle başarısız bulunmuştur (Manulis *et al.*, 2003).

2.3.4. Biyolojik Mücadele

Son yıllarda, hastalıkla mücadelede biyolojik yöntemler yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. *Ea* 'ya karşı epifitik bakterilerle biyolojik kontrol, bu hastalığın mücadelesinde potansiyel bir yöntem olarak nitelendirilmiştir (Beer *et al.*, 1984).

Bu bakteriyel izolatlar *Pantoea agglomerans*, *P. vagans* ve *Pseudomonas fluorescens* türlerine aittir ve ateş yanıklığının potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak kapsamlı bir biçimde çalışılmaktadır (Johnson *et al.*,1993; Johnson and Stockwell,1998; Vanneste and Yu,1996; Wilson and Lindow,1993).

Elma ve armut çiçeklerine püskürtülen *P. agglomerans* süspansiyonları ateş yanıklığının kontrolünde streptomisin kadar başarılı olmuştur (Wodzinski *et al.*, 1990). Ateş yanıklığının kontrolünde ticari olarak kullanılan antagonistik bakteri formülasyonunun geliştirilmesi ile bu bakterilerin uzun bir süre bitki üzerinde yaşamlarını sürdürebildikleri görülmüştür. Bu antagonistlerden biri olan *P. fluorescens* izolatı A506 Amerika'da liyofilize formülasyon halinde ateş yanıklığının mücadelesinde ve don zararlanmalarında ticari olarak kullanılmaktadır (Johnson and Stockwell, 1998). Amerika ve Yeni Zelanda da *P. agglomerans*'ın çeşitli strainleri ticari olarak geliştirilmektedir (Johnson and Stockwell,1998).

Ülkemizde ise Bora ve Özaktan tarafından birbirini takip eden projeler yürütülerek, hastalığın biyolojik mücadelesinde ülkemizin florasına ait antagonist özellikle *P. agglomerans* izolatlarını elde etmişlerdir. Bu izolatlar Ege Bölgesi'ndeki armut alanlarında *Ea*'nın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığının entegre mücadelesinde başarıyla kullanılmıştır (Özaktan ve Bora, 2004).

Çiçek ve sürgün enfeksiyonlarına karşı yeni etkili malzemelere önemli derecede ihtiyaç duyulmaktadır, çünkü birçok elma yetiştirilen yerde *Ea*'ya karşı en etkili koruyucu olan streptomisine karşı direnç kazanılmıştır. Etkili kimyasallara eskisinden daha çok ihtiyaç olmasına rağmen, son yıllarda çıkan ateş yanıklığı hastalığına karşı kullanılan antibiyotikler hala kayıtlı değildir. Diğer antibiyotikler, sentetik kimyasallar ve biyolojik kontrol ajanları örneğin *Bacillus subtilis* QRD-137, *P. fluorescens* A506, ve *P. agglomerans* C9-1) bazı denemelerde potansiyel mücadele araçları olarak gösterilmiştir (Stockwell et al., 2010).

Bir başka çalışmada ise *P. agglomerans* 'ın da içlerinde olduğu 167 epifitik bakteri izolatı, floresan *Pseudomonas* ve bazı gram (+) bakteriler Ege bölgesindeki sağlıklı armut ağaçlarının dokularından elde edilmiştir. *P. agglomerans* izolatı olan Eh-24 ve 1B, armut çiçeklerindeki çiçek yanıklığını uygulama yapılmamış çiçeklere kıyasla %98'den %82'ye azaltmıştır (Özaktan vd., 1999).

Karabıçak ve Kotan (2014) tarafından yapılan armut ağaçlarında ateş yanıklığı hastalığının biyolojik mücadelesinin araştırılması konulu bir diğer çalışmada uygulamalarda kullanılan biyolojik mücadele etmenlerindeki hastalık şiddeti *P. putida* RK-142'da %32,63, *P. agglomerans* RK-84' de %38,90 olmuştur. *P. agglomerans* RK-79'da hastalık şiddeti %67,51 olmuştur. Uygulamada yüksek etki %57,2 ile *P. putida* RK-142 izolatında olmuş, bunu %48,9 ile *P. agglomerans* RK-84 izolatı takip etmiştir. En düşük etki ise %14,4 ile *P. agglomerans* RK-79 izolatında görülmüştür.

B. subtilis'in ateş yanıklığına karşı etkisinin araştırıldığı çalışmada; 2005 ve 2006 yıllarında yapılan denemelerde Serenade ilacının (Biyofungisit, litrede 2,5–3,5 g *B. subtilis* içeren) hastalığı %62-68 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Biondi et al., 2007).

Meyve bahçelerinde *P. fluorescens* A506 ve *P. vagans* C9–1 gibi biyolojik mücadele etmenlerinin uygulanması ile çiçek enfeksiyonlarının %60–70 oranında azaldığı bildirilmektedir (Nuclo *et al.*, 1998).

Ateş yanıklığı hastalığının ilk enfeksiyonları çiçeklenme döneminde başlamaktadır ve bu nedenden dolayı çiçeklenme döneminde yapılacak biyolojik mücadele uygulamalarının hastalığın neden olduğu çiçek enfeksiyonlarını önlenmesinde önemli olmaktadır (Stockwell *et al.* 1996, Özaktan vd. 2001). Biyolojik mücadelede kullanılan bakteriler çiçeklenme başlangıcında elma ve armut çiçeklerine uygulandığında hızla çoğalarak patojeni enfeksiyon yerinde baskılayabilmektedir (Johnson *et al.*, 1993; Kearns and Hale,1993). Bundan dolayı biyolojik mücadele etmenlerinin *Ea*, *Pseudomonas viridiflava*, *P. syringae* gibi patojenlere karşı etkili olabilmesi için bu etmenlerin; epifitik popülasyonunun ve rekabetin düşük olduğu erken çiçeklenme döneminde uygulanması önerilmektedir (Stockwell *et al.*, 1999).

Sürgünler üzerinde yapılan yapay inokulasyon uygulamalarının sonuçları değerlendirildiğinde ise biyolojik mücadele etmenlerinden *P. putida* RK-142 ve *P. agglomerans* RK-84 izolatlarının hastalığın şiddetini azaltmada etkili olduğu ve bu etkinin biyolojik mücadele etmenlerinin uygulama sayısına bağlı olarak değiştiği saptanmıştır (Karabıçak ve Kotan, 2014).

Yapılan araştırmalar sonucunda *P. agglomerans*'ın epifitik bir bakteri olduğu, epifitik bakterilerin etki mekanizmasının, *in vitro* koşullarda antibiyotik üretiminden ziyade, bitki dokusunda besinler ve yer açısından rekabet oluşumu nedeniyle gerçekleştiği belirtilmektedir (Vanneste *et al.*, 1990). Besin kaynakları yönünden rekabet edildiğinde en önemli besinin azot olduğu; bitkiye verilen organik azot ile antagonist bakterinin etkinliğinde azalma meydana geldiği, bu yüzden özellikle *P. agglomerans* izolatlarının armut dokularındaki azotu kullanarak *Ea*'nın gelişimini engelledikleri öne sürülmüştür (Wodzinski *et al.*, 1990). Yapılan çalışmalar *P. putida* ve *P. fluorescens* izolatlarının biyokontrol etkisinin, ürettikleri sideroforlar ile rizosferdeki Fe^{+3} 'ü tutarak ve zararlı patojenlerin demir alımını engelleyerek baskı altında tuttukları bildirilmektedir (Bakker *et al.*,1986).

Ateş yanıklığı mücadelesinde kullanılan biyolojik kontrol ajanlarından şu

anda ticari olarak yararlanılmakta ve umut verici sonuçlar elde edilmektedir. Bu kontrol ajanları *Pseudomonas fluorescens* A506 (Wilson and Lindow, 1993), *Pantoea vagans* C9/1 (Ishimaru et al.,1988; Smiths et al.,2010), *P. agglomerans* E325 (Pusey,1999), *P.agglomerans* P10c (Vanneste et al.,2002), *Bacillus subtilis* QST713 (Aldwinckle et al.,2002) and *B.subtilis* BD170 (Broggini- Schärer et al.,2005). Bunların yanı sıra henüz ticarileşmemiş fakat çalışmaları devam eden *P. fluorescens* EPS62e (Cabrefiga et al.,2007,2011; Pujol et al., 2007) gibi antagonistler de bulunmaktadır (Roselló et al.,2013).

Roselló et al. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise ateş yanıklığı hastalığının biyolojik mücadelesinde Laktik Asit Bakterileri (LAB)'nden yararlanılmıştır. Çeşitli LAB türlerinin patojen bakterilere karşı antagonistik özelliğinin bulunması ve aynı zamanda bu LAB türlerinin gıda koruyucusu olarak kullanılmasından dolayı güvenli olarak kabul edilmektedir. *Lactobacillus plantarum* TC92, PM411 ve TC54 izolatlarının, referans biyokontrol ajanı olan *B.subtilis* QST713 ve streptomisin uygulamalarıyla benzer etki düzeyinde olduğu belirtilmiştir (%50-68 TC92, %35-65 PM411, %28-58 TC54). Bu çalışmada en iyi uygulamalar *P. vagans* C9/1 ve *P. fluorescens* EPS62e'dir.

Lp'nin PM411, TC54 ve TC92 izolatlarının bitki dokularında *Ea* enfeksiyonlarına karşı baskılayıcı etkisi olduğu belirtilmiştir. Plantarisin biyosentezi genlerini içeren bu izolatlar *Ea*'ya karşı güçlü antagonist etkiye sahiptir. Aynı zamanda mikrobiyal pestisitlerin aktif maddesi olarak kullanılan *Lp*'un bazı türlerinin *Ea* kontrolü için başarılı olduğu ve diğer bakteriyel hastalıklarda da etkili olabileceği belirtilmektedir (Roselló et al.,2013).

Yine bir başka yapılan ön denemede *Pseudomonas graminis* 49M ırkının hem laboratuvar hem de arazi çalışmalarında ateş yanıklığı hastalığına karşı iyi bir koruma sağladığı belirtilmiştir (Mikiciński et al.,2008).

Ea'ya karşı mikrokapsüllenmiş biyolojik kontrol ajanı olan *P. agglomerans* E325'in elma çiçeklerindeki stigmalarda bulunan *Ea* popülasyonunun aktivitesini baskıladığı, bu hastalıkla mücadelede başarılı sonuçlar elde ettiği ve etkin bir şekilde ateş yanıklığı hastalığına karşı kullanıldığı belirtilmiştir (Pusey et al.,1997).

Yine bir başka ajan olan *P. agglomerans* P10c koruyucu tedavi yöntemi olarak çiçeklere püskürtüldüğünde yıl boyunca ağaçtaki hastalık kontrolünü %96 oranında sağlamıştır. İyileştirici tedavinin etkisi %40'lara kadar artmıştır. Dönem boyunca (%10 ve %60 çiçeklenme zamanında) *P. agglomerans* P10c 'nin 2 kez uygulanması sonucu ateş yanıklığının etkisi %64.7-%76.9 oranında azalmıştır. Yapılan bu çalışmada *P. agglomerans* P10c'nin stigmalaradaki varlığı 4.5×10^4 'ten 7.6×10^5 cfu/çiçek oranına artış göstermiştir (Smail et al., 2016).

Mikiciński et al. (2016) yaptığı çalışmada ise, elma çiçekleri ve sürgünlerini korumak için laboratuvar ve sera koşullarında *P. graminis* 49M izolatlarının etkinliği, kullanılan referans izolatlar olan *P. fluorescens* A506 ve *P. vagans* C9-1 ve de kimyasal referans olarak kabul edilen streptomisinden daha yüksek bulunmuştur. Çalışma armut meyvelerinde yapıldığında ise etkinlik biraz daha düşük bulunmuş (%10'dan fazla) olmakla birlikte *P. fluorescens* A506'dan yüksek sonuçlar elde edilmiştir. 49M izolatı bahçelerdeki elma çiçekleri üzerine verildiğinde yağmur dahil olmak üzere tüm hava koşullarında ve çiçeklenme periyodu boyunca etkin halde bulunmuştur.

Son 20 yılda, bakteriyofajların (bakteriyel virüsler) biyolojik savaş açısından kullanılabilecek güvenli araçlar olduğu belirtilmektedir (Kolozsvári Nagy et al., 2012). Özellikle, antibiyotiğe dayanıklılık kazanmış *Ea* popülasyonun için faj terapisi iyi bir alternatif olarak görülmektedir. Özellikle Kuzey Amerika'da yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarda ateş yanıklığının mücadelesinde bakteriyofajla yapılan mücadeleden umutvar sonuçların alındığı ve yan etkilerinin olmadığı belirtilmektedir (Schnabel et al., 1999; Schwarczinger et al., 2011; Summers, 2001).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan test patojeni bakteriler

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan ve özellikleri Çizelge 3.1’de belirtilen izolatların yanı sıra, tez çalışması sırasında hastalıklı ayva ağaçlarından izole edilen *Ea* izolatları kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan *Ea* izolatlarının listesi

Sıra No	İzolatların Kod Numaraları	İzole Edildiği Yer	İzole Edildiği Bitki
1	119	İzmir/Bayındır	Armut
2	162	Muğla/Milas	Elma
3	163	Muğla/Milas	Elma
4	164	Muğla/Milas	Elma
5	165	İzmir/Kemalpaşa	Armut
6	172	İzmir/Kemalpaşa	Armut

3.1.2. Çalışmada kullanılan yararlı bakteriler

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan, daha önce elma ve armutta *Ea*’ya karşı biyolojik mücadele etkinliği kanıtlanmış olan - 80°C ‘de sıvı besiyerinde muhafaza edilen Çizelge 3.2’de belirtilen antagonist bakteri izolatları kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan antagonist bakteriler

İzolat Adı	Ticari Adı	Menşei
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506*	BLIGHTBAN A506	Amerika Birleşik Devletleri
<i>Pantoea agglomerans</i> E325*	BLOOMTIME	Amerika Birleşik Devletleri
<i>Pantoea agglomerans</i> Eh24	---	İzmir, Türkiye
<i>Pantoea vagans</i> C9-1*	BLIGHTBAN C9-1	Amerika Birleşik Devletleri

*Söz konusu bakteriler Dr. Virginia O. Stockwell (Oregon State University, ABD)'den sağlanmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan bitkisel materyaller

Çalışmada bitkisel materyal olarak ham armut meyve testi için henüz olgunlaşmamış ve *Ea*'ya karşı duyarlı olduğu bilinen Santa Maria armut çeşidinin meyveleri, koparılmış çiçek testi için Menemen Tarımsal Araştırma Enstitüsü bahçelerinden toplanan pembe tomurcuk dönemindeki *Ege1* ayva çeşidinin çiçekleri ve 1 yaşındaki ayva fidanları kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan besi yerleri

Çizelge 3.3'te belirtildiği gibi *Ea* izolatlarının *in vitro* testlerinin gerçekleştirilmesi için King B ve Çizelge 3.4'te belirtilen SNA (Sucrose Nutrient Agar) besiyerleri kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Schaad *et al.*, 2001). Ayrıca bakteri kültürlerinin -80°C'de uzun süreli saklanması amacıyla %15 gliserol içeren nutrient broth (8 g/l saf su) kullanılmıştır.

Çizelge 3.3 Bakteri izolasyonu, pigment oluşumu ve genel besi yeri olarak kullanılan King B ortamı için gerekli kimyasallar ve miktarları

1 litre King B Besi ortamı		
King's B (King et al., 1954)	Kimyasal	Miktar
	Pepton	20 g
	K ₂ HPO ₄	1,5 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g
	Gliserol	10 ml
	Agar	16 g
	121°C'de 20 dk. Otoklavlanır.	

Çizelge 3.4 Levan oluşumunun gözlemlenmesi için hazırlanan SNA besi yerinin yapımında kullanılan kimyasallar ve miktarları

1 litre SNA Besi ortamı		
SNA	Kimyasal	Miktar
	Nutrient Broth	8 g
	Glikoz	50 g
	Agar	20 g
	121°C'de 20 dk. Otoklavlanır.	

3.1.5. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Ea'ya karşı *in vivo* testlerde Çizelge 3.5'te verilen kimyasallar kullanılmıştır.

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin ticari isimleri, aktif madde oranları ve kullanım dozları

Aktif Madde	Ticari Adı	Aktif Madde (%)	Kullanım dozları
Prohexadione Calcium (ProCa)	Regalis, BASF	10	125 µg/ml
			250 µg/ml
Oxolinic asit (OA)	Starnet 20WP SUMITOMO	20	50 µg/ml
			100 µg/ml
			150 µg/ml
Streptomisin sülfat	-	saf	100 µg/ml

3.1.6. Çalışmada kullanılan primerler

Çalışma sırasında Genomik DNA'lar ve Çizelge 3.6'da belirtilen G1F-G2R primerleri kullanılarak PCR testi gerçekleştirilmiştir. Tüm izolatların PCR ürünleri için agaroz jel (%1.5'luk) elektroforezi analizleri için Tris-acetate-EDTA (TAE) Buffer kullanılmıştır.

Çizelge 3.6 Primer çiftlerinin oligo dizinleri

Primer İsimleri	Oligo dizin	
G1-F	F	5'- CCTGCATAAATCACCGCTGACAGCTCAATG- 3'
G2-R	R	5'- GCTACCACTGATCGCTCGAATCAAATCGGC- 3'

50XTAE (Fermentas) bufferdan seyreltme ile 0.5X TAE buffer elde edilmiş, %1,5'luk agaroz jelin hazırlanması ve jel elektroforezi için kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. *Ea* etmeninin izolasyonu

Ayva bahçelerinden tipik hastalık belirtisi gösteren yaprak ve meyve örneklerinin hastalıklı ve sağlıklı doku kısımları içerecek şekilde kesitler alınıp %1'lik Sodyum hipoklorit içerisinde iki dakika bekletilerek yüzey dezenfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra iki defa steril saf su ile durulanarak yine içerisinde 2 ml steril saf su bulunan havanlarda ezilmiştir. Elde edilen ekstraktan bir öze dolusu alınarak King B (KB) besi yerine çizgi ekim yöntemiyle ekimler yapılmıştır. 23- 25°C 'de 48 saatlik inkubasyondan sonra gelişen krem renkli koloniler saflaştırılmış ve çalışmada kullanılmak üzere sıvı besi ortamında -80°C dondurucuda saklanmıştır.

3.2.2. *Ea*'nın tanı testleri

3.2.2.1. Klasik tanı testleri

Potasyum Hidroksit Testi (KOH)

Hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine damlatıldıktan sonra kültüre alınan *Ea* izolatlarından özeyle alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 15-20 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanimsi bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands, 1990).

Levan Oluşumu Testi

Sucrose Nutrient Agar (SNA) besi yerine çizilen *Ea* izolatları 48-60 saatlik 23-25°C inkubasyondan sonra kabarık, mukoid ve konveks oluşan koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot and Stead, 1987).

Oksidaz Testi

Taze hazırlanan %1 lik N:N:N:N- Tetrametilyl-1,4 phenylene diammonium diclorid solüsyonu filtre kağıdı üzerine damlatılmış ve King B besi yerinde 48 saat geliştirilen *Ea* izolatları öze ile filtre kağıtları üzerine sürülmüştür. 10 saniye sonra

bakteri kitlesi mavi renge dönüşürse pozitif, mavi renk değişimi olmaz ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovaks, 1956).

Patateste Pektolitik Aktivite Testi

Patateslerin yüzeysel sterilizasyonu için önce suda fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra %1'lik NaOCI'de 3 dakika bekletildikten sonra NaOCI'di uzaklaştırmak için 2 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemten sonra steril bir bistüri ile kabukları soyulmuştur. Steril ıslak filtre kağıdı içeren steril petri içine kabuğu soyulmuş yaklaşık bir cm kalınlığındaki patates dilimleri orta kısımlarına oyuk açılarak yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu *Ea* kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25°C'de iki günlük inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliot and Stead, 1987).

Arginin Dehidrolaz Testi

Litrede 1 g pepton, 5 g NaCl, 0.3 g K₂HPO₄, 10 g L (+) arginin HCl, 0.01 g fenol kırmızısı, 3 g agar içeren besi yeri hazırlandıktan sonra pH 7.2'ye ayarlanmıştır. 16*1,5 cm'lik tüplere 3'er ml besi yeri konup otoklav edilmiştir. Taze geliştirilmiş *Ea* izolatları nokta aşılama ile besi yerine ekimi yapılmıştır. Tüplerin üzerine steril parafin ilave edilerek kapatılmıştır. Kültürler 26°C'de 2 hafta inkübe edildikten sonra kırmızıdan (pembe) vişne rengine dönenler pozitif kabul edilmiştir (Lelliot and Stead, 1987).

Tütünde Aşırı Duyarlılık (HR) Reaksiyonu

Tütün (*Nicotiana tabacum* Samsun N) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına *Ea* izolatlarının 10⁸ hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu bir enjektör yardımı ile enjekte edilmiştir. 24 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif olarak kabul edilmiştir (Klement and Goodman, 1967).

Jelatinin Hidrolizi Testi

Litrede 3g yeast ekstrakt, 5g pepton, 120g jelatin içeren besi yerinden tüplere 5'er ml konup 121 °C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Besi yeri katılaştıktan sonra 48 saatlik *Ea* izolatları 3 tekrarlı olarak delme aşılama ile

ekimleri yapılmıştır. 25°C’de 14 günlük inkübasyondan sonra +4°C’de yarım saat bekletilip buzdolabından çıkartılan tüplerde görülen sıvılaşma pozitif olarak kabul edilmiştir (Lelliot and Stead, 1987).

Oksidasyon / Fermantasyon Testi (O/F)

Litrede 2 g pepton, 5 g NaCl, 0.3 g K₂HPO₄, 3 g agar, 3 ml %1’lik bromothymolblue içeren besi yeri hazırlandıktan sonra tüplere 5’er ml konulmuştur. Otoklavdan sonra 50°C’ye kadar soğutulan tüplerin her birine soğuk sterilizasyon yapılan %10’luk glikoz solüsyonundan 0.5 ml ilave edilmiştir. Taze geliştirilmiş ve *Ea* izolatları ile nokta aşılama yapılmıştır. 25°C’de 5-6 günlük inkübasyondan sonra besi yeri renginin sarıya dönmesi pozitif olarak kabul edilmiştir (Sands, 1990).

3.2.2.2. Moleküler tanı testi

King B besi yerinde geliştirilen *Ea* izolatlarının steril saf su ile süspansiyonu hazırlanarak spektrofotometrede OD_{600nm}: 0.1 değeri ölçülüp daha sonra 1.5 ml’lik eppendorf tüplere doldurulmuştur. 10 dakika süre ile kaynatılan bakteri süspansiyonu daha sonra kullanılmak üzere -20°C’ye kaldırılmıştır.

PCR çalışması Çizelge 3.7’de belirtilen Taylor *et al.*, (2001)’a göre yapılmıştır. Çalışma, reaksiyon tüpü adı verilen 0.5ml’lik ince duvarlı eppendorf tüplerde toplam hacmi 25µl olan reaksiyon karışımının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7 *Ea* için PCR protokolü

<i>Erwinia amylovora</i> için PCR Master Mix			
Gerekli Kimyasallar	Stok/Başlangıç	Final Konsantrasyon	1 örnek için gerekli miktar
PCR reaction			
buffer	10 X	1X	2.5 µl
MgCl₂	25 mM	1.5mM	1.2 µl
dNTPs	2.5 mM	0.1 mM	1 µl
G1F	10 mM	0.4 mM	1 µl
G2R	10 mM	0.4 mM	1 µl
H₂O	-	-	13.1 µl
TaqPolimeraz	5U	1U	0.2 µl
Örnek nükleik asit	10 ⁷ CFU/ml	-	5 µl
Toplam Hacim	-	-	25 µl

Thermalcyclers cihazında kullanılan program Çizelge 3.8’de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.8 *Ea* için PCR çalışma koşulları

PCR çalışma koşulları					
1 döngü	30 döngü			1 döngü	1 döngü
95 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	15 °C
3 dk	30 sn	30 sn	1 dk	5 dk	∞

Elde edilen PCR ürünleri Agaroz jelde yürütülmüştür. Bunun için 1.5 g agaroz 100 ml 1XTAE tamponuna konularak mikrodalga fırınında eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Soğutulan solüsyonun içine Cybersafe (Fermentas) eklenerek tarak yerleştirilen tankın içerisine dökülmüştür. Agaroz jelin donmasından sonra tarak dikkatli bir şekilde çekilerek çıkartılmıştır. Daha sonra içerisine jeli örtünceye kadar 1XTAE tamponu eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan agaroz jel çukurlarına 1 µl loading buffer ve 5 µl PCR ürünü karıştırılıp 5µl mikropipet içerisine çekilerek dikkatli bir biçimde kuyucuklara yerleştirilmiştir.

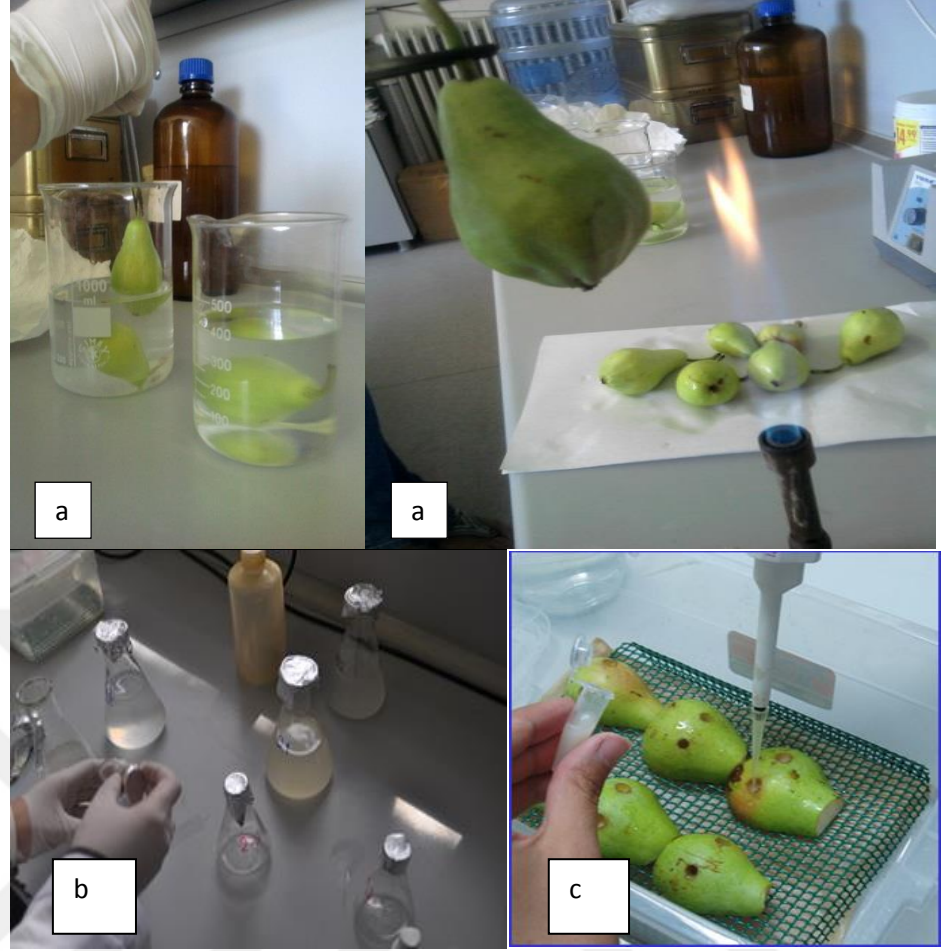
Moleküler ağırlık işaretleyici (Marker) 100 bp DNA işaretleyici kullanılmıştır. Elektroforez tankında agaroz jeldeki örnek hücrelerin bulunduğu yer güç kaynağının negatif (-) kutbuna denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve PCR ürünleri 100V elektrik akımında yaklaşık 40 dakika süre ile yürütülmüştür. Daha sonra transliminatörde bantlar incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.2.3. Patojenisite testi

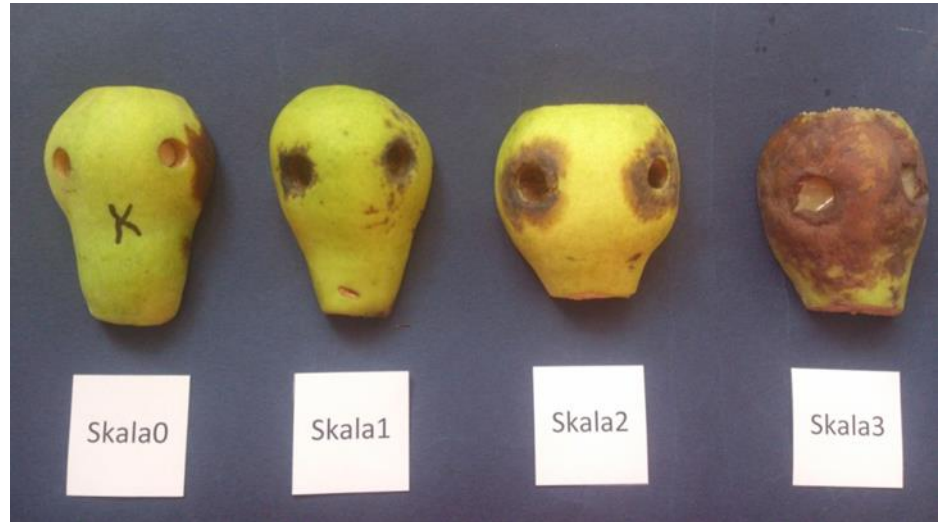
Ea izolatlarının virülensliği ham armut meyve testiyle (HAMT) belirlenmiştir. Haziran ayında toplanan, henüz olgunlaşmamış 2-3 cm çaplı Santa Maria armudu meyveleri %70'lik alkol ile dezenfenkte edilip uzunlamasına 2'ye kesilmiş, her bir dilimin dış yan yüzüne mantar deliciyle 2 adet çukur açılmıştır (Şekil 3.1). King B besiyeri üzerinde geliştirilen 48 saatlik bakteri kültüründen saf su ile elde edilen ve spektrofotometrede 10^7 cfu/ml yoğunlukta ($OD_{600nm}:0.1$) ölçülen süspansiyondan meyvelerde mantar deliciyle açılan çukurlara 40 µl verilmiştir (Şekil 3.1). Her bir izolat için 4 adet meyve dilimi kullanılmış ve armut dilimleri nemlendirilmiş steril kurutma kağıtlı plastik kaplara yerleştirilerek 27°C 'de 6 gün süreyle inkubasyona bırakılmıştır (Beer et al., 1984). İzolatların patojenisitesi ham armut meyve testinde 0-3 skalasına göre (Goraani and Hassaanein,1991) değerlendirilmiştir (Çizelge 3.9, Şekil 3.2).

Çizelge 3.9 HAMT testi için 0-3 skalası

Skala Değeri	Açıklama
0	Hiç simptom yok
1	Hafif bakteriyel sızıntı ve suda ıslanmış görüntü
2	Daha çok bakteriyel sızıntı ve hafif renk değişikliği
3	Siyah lezyonlarla birlikte yoğun bakteriyel sızıntı



Şekil 3.1 HAMT için meyvelerin a) dezenfeksiyonu b) bakteri süspansiyonlarının hazırlanması c) uygulanması



Şekil 3.2 HAMT’de sonuçların değerlendirilmesinde yararlanılan 0-3 skalası

Elde edilen skala değerleri Townsend Heuberger (T.H) formülü yardımı ile % hastalık şiddeti değerlerine dönüştürülmüştür. Patojenisite testi sonucunda virülensi en yüksek olan *Ea* izolatı seçilerek *in vivo* biyokontrol testlerine devam edilmiştir.

3.2.3. Antagonist bakteri ve kimyasalların *Ea*'ya karşı *in vivo* etkililiğinin değerlendirilmesi

3.2.3.1. Ham armut meyve testi (HAMT)

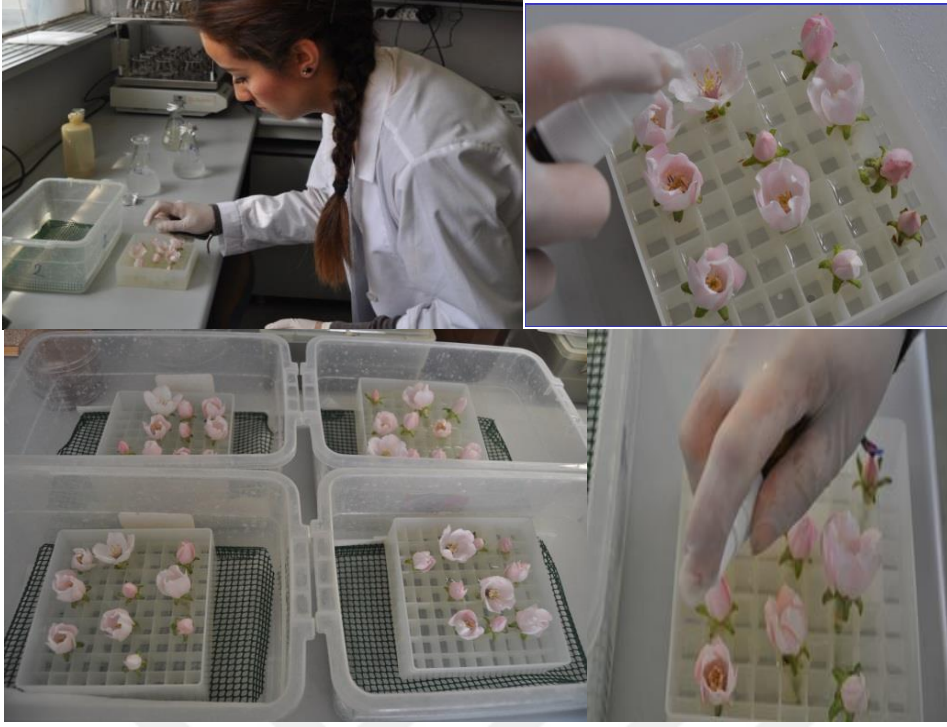
3.2.2.3. bölümünde belirtildiği şekilde dezenfekte edilerek hazırlanan ham armut meyvelerinde açılan çukurlara 60 µl antagonist bakterilerin ve kimyasalların süspansiyonu (King B besi yerinde geliştirilmiş antagonist bakterilerin taze kültürlerinden saf su ile süspansiyon hazırlanan ve spektrofotometrede OD_{600nm}:0.7 olarak ölçülen 10⁷cfu/ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonu) verilmiştir. 2 saat sonra bu çukurlara virülensliği en yüksek olan *Ea* izolatından hazırlanan 40 µl süspansiyonu inokule edilmiştir. Deneme Tesadüf Parselleri deneme desenine göre, her bir izolat için 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 2 meyve dilimi olacak şekilde planlanmış ve armut dilimleri nemlendirilmiş steril kurutma kağıtlı plastik kaplara yerleştirilerek 27°C 'de inkubasyona bırakılmıştır (Beer ve ark., 1984). Bakterilerin etkililiğini karşılaştırmak amacıyla streptomisin (100 ppm) uygulamasına yer verilmiştir. Sadece *Ea* ile inokule edilen meyveler pozitif kontrol, sadece steril su verilen meyveler ise Negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Konukçu reaksiyonu uygulamadan 6 gün sonra 0-3 skalasına göre (Şekil 3.2) değerlendirilmiştir (Goorani and Hassanein, 1991). Elde edilen skala değerleri Townsend Heuberger (T.H) formülü* yardımı ile % hastalık şiddeti değerlerine dönüştürülmüş, ABBOTT** formülü yardımıyla uygulamaların Pozitif Kontrole karşı etkililikleri karşılaştırılmıştır.

$$*\% \text{ Hastalık şiddeti} = \frac{\sum(\text{Skala değeri} \times \text{Skalada değerlendirilen bitki sayısı})}{\text{Toplam bitki sayısı} \times \text{En yüksek skala değeri}} \times 100$$

$$**\text{ABBOTT \%etki} = \frac{\sum(\text{Pozitif kontroldeki hastalık şiddeti} - \text{Uygulamadaki hastalık şiddeti})}{\text{Pozitif kontroldeki hastalık şiddeti}} \times 100$$

3.2.3.2. Koparılmış ayva çiçek testi

Pembe tomurcuk döneminde toplanan ayva çiçekleri steril eppendorf kutularına teksele olarak homojen bir şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). 48 saatlik antagonist bakterileri kültüründen elde edilen süspansiyon ($OD_{600nm}:0.7$, 10^7 cfu/ml) ve kimyasallar, çiçeklerin üzerine kaplanacak şekilde püskürtülmüştür. Virülensi en yüksek olan *Ea* izolatının 48 saatlik kültüründen hazırlanan patojen bakteri süspansiyonu ($OD_{600nm}:0.1$, 10^7 cfu/ml) yine aynı püskürtme yöntemiyle 1 saat sonra çiçeklerin üzerine inokule edilmiştir (Kearns and Hale, 1993). Deneme Tesadüf Parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 4 çiçek olacak şekilde toplam 12 çiçek / uygulama olarak planlanmıştır. Sadece *Ea* ile inokule edilmiş çiçekler pozitif kontrol, sadece steril su uygulanmış çiçekler ise negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Çiçeklerdeki hastalık oranı (%), inkulasyondan 4-5 gün sonra, yanık çiçeklerin sayımıyla değerlendirilmiştir. Uygulama görmüş çiçeklerdeki yanıklık oranı (%), pozitif kontroldeki yanık çiçek oranı (%) ile ABBOTT formülü yardımıyla karşılaştırılarak uygulamaların etkililiği belirlenmiştir.

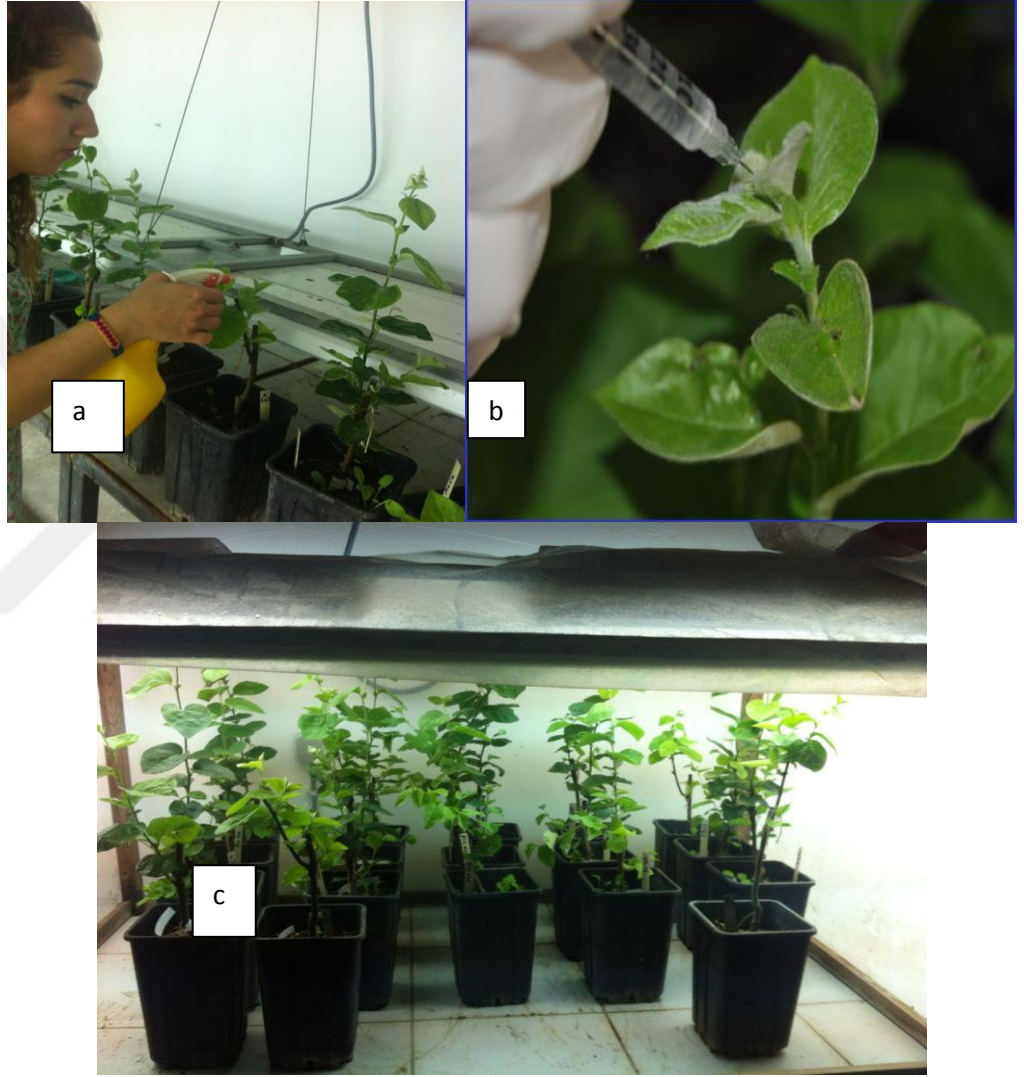


Şekil 3.3 Antagonistik bakterilerin etkililiğini test etmek amacıyla, koparılmış ayva çiçek testinin uygulanaşı

3.2.3.3. Ayva Fidan Testi

Daha önce yapılan armut meyve testi ve çiçek testinde yüksek oranda başarı gösteren antagonist bakteri ve kimyasalların etkililiğini test etmek amacıyla ayva fidan testleri gerçekleştirilmiştir. Saksıda yetiştirilen 1-2 yaşındaki aşılı ayva fidanları yaklaşık 25 cm uzunluğundayken inokulasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 48 saatlik antagonist bakteri kültüründen hazırlanan süspansiyon ($OD_{600nm}: 0.7$, 10^7 cfu/ml) ve kimyasallar tüm yaprak ve gövde kaplanacak şekilde püskürtülmüştür (Şekil 4). Antagonsit bakterilerin uygulanmasından 24 saat sonra, tüm fidanlara virülensi en yüksek olan *Ea* izolatından hazırlanan patojen bakteri süspansiyonu ($OD_{600nm}: 0.1$, 10^7 cfu/ml) steril bir enjektör yardımıyla tepe sürgününün enjeksiyonu (10 µl) yöntemiyle uygulanmıştır (Şekil 3.4). Sadece *Ea* ile sürgün ucu enjeksiyonu yapılan fidanlar pozitif kontrol, sadece su ile sürgün ucu enjekte edilen bitkiler ise negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre, 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 1 bitki olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Deneme hastalık gelişimi için optimum koşullar olan 24-27°C sıcaklık, %80 oransal nem olacak şekilde, 14 saat

aydınlık/10 saat karanlık fotoperiyotta bitki büyüme odasında gerçekleştirilmiştir. Sürgün inokulasyonundan 4-6 hafta sonra her bitkideki dalların enfekteli kısımlarının uzunluğu ve toplam sürgün boyu ölçülerek kaydedilmiştir (Layne and Quamme,1975). Enfekteli sürgün uzunluğunun toplam sürgün uzunluğuna oranı hesaplanmıştır. Uygulamaların etkililiği pozitif kontrol bitkilerinde elde edilen enfekteli sürgün oranı (%) ABBOTT formülüyle karşılaştırılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.4 Ayva fidan testinde a) antagonist bakterilerin ve b) patojen bakterinin uygulanması ve c) fidanların bitki büyüme odasında inkubasyonu

3.2.4 Verilerin analizi

Çalışmada elde edilen verilere, bilgisayarda SPSS (SPSS Inc. PASW Statistics version 18) paket programı ile varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar DUNCAN testiyle belirlenmiştir.

.



4.BULGULAR

4.1 İzolasyon Sonuçları

Zonguldak ili Karadeniz Ereğli ilçesi, Bursa ili Gürsu ilçesi ve Kocaeli ili Gölcük ilçesinde ayva plantasyonlarından hastalık belirtisi gösteren yaprak, meyve ve sürgün örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu Çizelge 4.1’de özellikleri belirtilen *Ea* izolatları elde edilmiştir. Tez çalışmasında ayvadan izole edilen 7 *Ea* izolatına ek olarak daha önce bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan elma ve armuttan elde edilmiş 6 *Ea* izolatıyla birlikte toplam 13 adet *Ea* izolatı ile tanılama çalışmalarına devam edilmiştir.

Çizelge 4.1 Tez çalışması sırasında ayva bahçelerinden elde edilen *Ea* izolatları

Sıra No	İzolatların Kod Numaraları	İzole Edildiği Yer	İzole Edildiği Bitki
1	11	Bursa/Gürsu	Ayva
2	81	Bursa/Gürsu	Ayva
3	86	Bursa/Gürsu	Ayva
4	154	Zonguldak/K.Ereğli	Ayva
5	159	Zonguldak/K.Ereğli	Ayva
6	169	Kocaeli/Gölcük	Ayva
7	170	Zonguldak/K.Ereğli	Ayva

4.2 Tanılama Testi Sonuçları

4.2.1 Klasik tanılama testleri sonuçları

Ateş yanıklığı belirtisi gösteren ayva örneklerinden elde edilen ve bakteriyoloji laboratuvarı stoklarında bulunan *Ea* izolatlarının klasik tanılama testlerinde, Gram reaksiyonu, LOPAT (Levan oluşumu, oksidaz testi, patatest pektolitik aktivite testi, arginin dehidrolaz testi, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu) testler, jelatinin hidrolizi, Oksidasyon / Fermantasyon Testi (O/F) vb.

gibi tanılama testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de toplu olarak görülmektedir.

Çizelge 4.2 Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından elde edilen *Ea* izolatlarının klasik tanılama testi sonuçları

No	İzolat No	Uygulanan Klasik Tanı Testleri									
		Gram reaksiyon	Levan oluşumu	. Oksidaz	Patateste Pek. Aktiv	Arginin dehidrolaz	Tütünde HR	Floresan pigment	O/F testi	Jelatinin hidrolizi	
1	11	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
2	81	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
3	86	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
4	119	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
5	154	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
6	159	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
7	162	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
8	163	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
9	164	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
10	165	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
11	169	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
12	170	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
13	172	-	+	-	-	-	+	-	F	+	
Referans*	<i>Ea</i>	-	+	-	-	-	+	-	F	+	

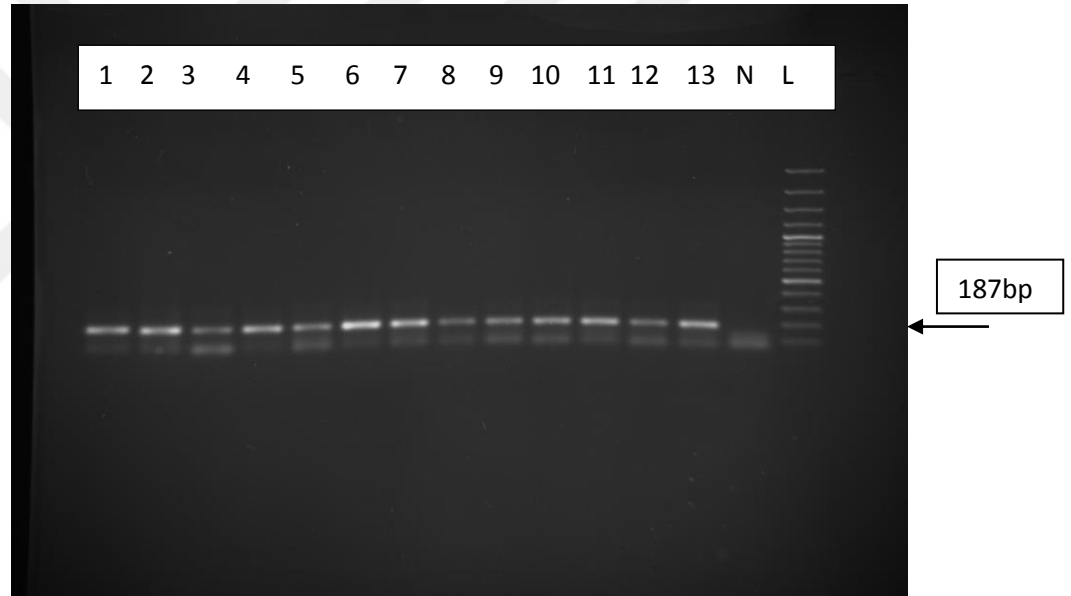
* Schaad et al (2001)’den alınan tanılama testi sonuçlarıdır.

Yapılan fizyolojik ve biyokimyasal testlerin sonucunda, izolatların tamamının Gram negatif, King B besiyerinde non floresan, pektolitik aktivite

negatif, oksidaz negatif, levan oluşumu pozitif, tütünde aşırı duyarlılık belirtileri göstermesi nedeniyle HR pozitif, oksijensiz besi yerinde de gelişme göstermesi nedeniyle fakültatif anaerob özellikte olduğu saptanmış ve Schaad *et al.*,(2001) tarafından verilen referans bilgileriyle benzer bulgular elde edilmiştir.

4.2.2 Moleküler tanı

Ea izolatlarından elde edilen genomik DNA'ların *Ea* için spesifik primer çifti G1F-G2R kullanılarak yapılan PCR testinde %1.5'lik agaroz jel üzerinde 187 bp'de belirgin bantlar oluşturmuştur (Şekil 4.1). Bu çalışma ile 13 adet izolatın yapılan biyokimyasal ve fizyolojik testler ve moleküler çalışma ile *Ea* olduğu kanıtlanmış ve izolatların spesifik, hızlı ve duyarlı olarak tanısı yapılmıştır.



Şekil 4.1 G1F/G2R primerleri ile testlenen *Ea*'nın PCR elektroforez-jel görüntüsü (soldan sağa:1-13'e kadar *Ea* izolatları, N: Negatif Kontrol, M: 100bp Ladder DNA)

4.3 Patogenisite Testi Sonuçları

Yapılan klasik ve moleküler testler sonucunda *Ea* olduğu kanıtlanan 13 adet izolat arasından virülensi en yüksek olanı belirlemek ve yapılacak diğer uygulamalarda kullanmak üzere Ham armut meyve testi (HAMT) gerçekleştirilmiştir. Ham armut meyvelerinde patogenisite testi sonuçları Çizelge 4.3'de görülmektedir.

Çizelge 4.3 Ham armut meyvelerinde patojenisite testi sonuçları

İzolat Kodu		HAMT'de Ortalama Hastalık şiddeti (%)*
1	11	58.3 ^{abc}
2	81	62.5 ^{ab}
3	86	79.1 ^{bc}
4	119	87.5 ^{bc}
5	154	91.6 ^c
6	159	70.8 ^{bc}
7	162	83.3 ^{bc}
8	163	100 ^c
9	164	62.5 ^{abc}
10	165	33.3 ^a
11	169	87.5 ^{bc}
12	170	66.6 ^{abc}
13	172	33.3 ^a

*Hastalık şiddeti (%) değerleri 4 tekerrür ortalamasıdır.

** Tekerrürlerde saptanan ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan DUNCAN testi sonucunda aynı harfi taşıyan uygulamalar, $P \leq 0.05$ olasılıkla birbirinden farklıdır.

Çizelge 4.3'deki sonuçlardan *Ea* izolatlarının hastalık şiddeti değerleri %33.3 - 100 arasında değiştiği görülmektedir. En yüksek hastalık şiddeti değerine sahip olan 163 numaralı (Şekil 4.2) izolat seçilerek tez çalışmasına bu izolatla devam edilmiştir.



Şekil 4.2 HAMT’de en yüksek hastalık şiddetine (%) sahip olan 163 numaralı *Ea* izolatının oluşturduğu belirtiler

4.4 Antagonist Bakteriler ve Bazı Kimyasalların *Ea*’ ya Karşı Etkililiği Testi Sonuçları

Tez çalışmasında, ABD’nde ateş yanıklığı hastalığı etmeni *Ea*’ya karşı ruhsatlı biyolojik preparatların aktif organizmaları olan *P. fluorescens* A506 (BLIGHTBAN A506), *P. agglomerans* E325 (BLOOMTIME), *P. agglomerans* Eh24 ve *P. vagans* C9-1 (BLIGHTBAN C9-1) izolatlarıyla Oxolinic asit (OA) ve Prohexadione – Calcium (Pro Ca) gibi kimyasalların etkililiğini test etmek üzere ham armut meyve testi, ayva çiçek ve fidan testleri gerçekleştirilmiştir.

4.4.1 Ham armut meyve testi (HAMT) sonuçları

P. fluorescens A506 (BLIGHTBAN A506), *P. agglomerans* E325 (BLOOMTIME) ve *P. agglomerans* Eh24, *P. vagans* C9-1 (BLIGHTBAN C9-1) izolatları, Oxolinic asidin 3 farklı dozu ve Prohexadione Calcium (Pro-Ca)’un 2 farklı dozu armut meyvelerinde açılan çukurlara uygulanmıştır. Testlenen yararlı bakteriler ve kimyasalların armut meyvelerinde *Ea*’ ya etkililiği sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların HAMT’nde *Ea*’ya etkililiği sonuçları

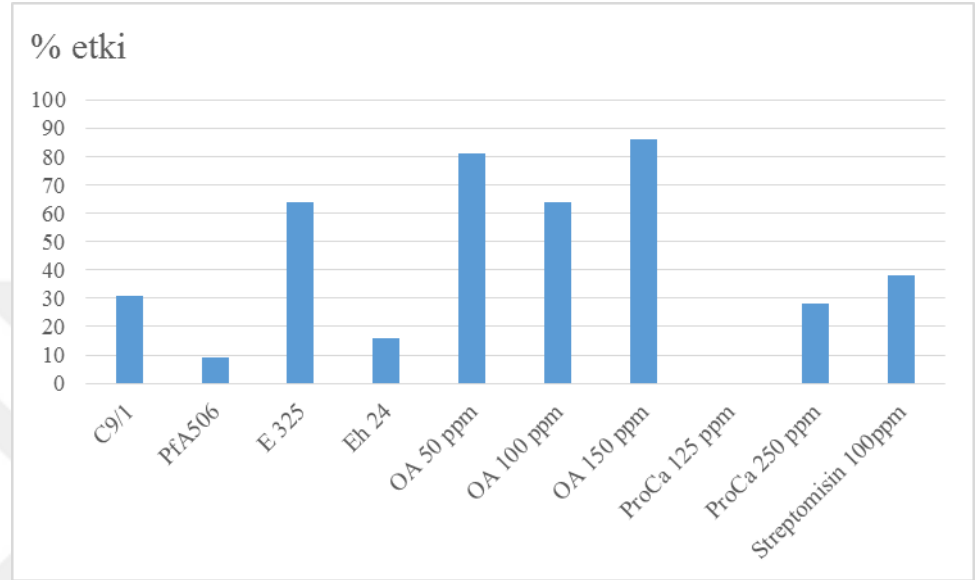
Uygulamalar	Tekerrürlerde hastalık şiddeti (%)					Ortalama hastalık şiddeti *(%)	% Etki**
	1.	2.	3.	4.	5.		
Kontrol (-)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00 ^a	-
Kontrol (+)	100	100	100	100	83,33	96,67^f	-
C9/1	41,67	41,67	100	100	50	66,67 ^{ef}	31
PfA506	100	83,33	83,33	83,33	91,66	88,33 ^{ef}	9
E 325	33,33	33,33	66,67	16,66	25	35,00 ^{cd}	64
Eh 24	83,33	83,33	66,67	75	100	81,67 ^{ef}	16
OA 50 ppm	25	0,0	16,66	16,66	33,33	18,33 ^{bc}	81
OA 100 ppm	33,33	8,33	66,67	33,33	33,33	35,00 ^{cd}	64
OA 150 ppm	8,33	8,33	0,0	0,0	50	13,33 ^b	86
ProCa 125 ppm	100	100	100	100	100	100,00 ^f	-
ProCa 250 ppm	50	66,67	83,33	50	100	70,00 ^{ef}	28
Streptomisin 100ppm	50	83,33	25	91,66	50	60,00 ^{de}	38

* Tekerrürlerde saptanan ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan DUNCAN testi sonucunda aynı harfi taşıyan uygulamalar, $P \leq 0.05$ olasılıkla birbirinden farklıdır.

** Uygulamaların % hastalık şiddeti değerlerinin Pozitif Kontrol uygulamasına göre farkı (%) alınmıştır.

Ham armut meyve testinde pozitif kontrolde hastalık şiddeti %96,6 olarak değerlendirilmiştir. Test edilen 10 uygulamanın hastalık şiddetini pozitif kontrole göre %9 – 86 arasında engellediği gözlemlenmiştir. *Ea* için Referans kimyasal olarak denemeye alınan streptomisin (100 ppm) ise (Şekil 4.6) HAMT’nde *Ea*’nın

gelişimini %38 oranında engelleyerek test edilen bazı kimyasal ve antagonist bakterilerden istatistiksel olarak farklı grupta yer alan başarısız bir uygulama olmuştur. *Ea*'ya karşı en başarılı sonuç OA 'nın 150 ppm'lik dozunda hastalık şiddetinin %86 oranında engellenmesiyle elde edilmiştir (Çizelge 4.4; Şekil 4.3; Şekil 4.4). Bunu OA'nın 50 ppm'lik dozu izlemiştir. Bitki büyüme düzenleyici olarak bilinen ProCa ise, HAMT'nde başarılı bulunmamıştır.



Şekil 4.3 Testlenen antagonist bakteriler ve kimyasalların farklı dozlarının *Ea*'ya HAMT'de etkililiği

Antagonist bakteriler arasında ise en başarılı uygulamanın *P. agglomerans* E325 (Şekil 4.5) numaralı antagonist izolat olduğu, bunu *P. vagans* C9/1'in (Şekil 4.6) izlediği saptanmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.3).



Şekil 4.4 *Ea*'ya karşı HAMT'nde başarılı bulunan OA (150 ppm'lik dozu) uygulaması



Şekil 4.5 Antagonist bakterilerden en başarılı uygulama olan E 325'in *Ea*'ya etkisi



Şekil 4.6. Referans kimyasal olan streptomisin uygulamasının *Ea*'ya etkisi

4.4.2 Koparılmış ayva çiçek testi sonuçları

Ham armut meyve testinde yapılan uygulamalarda elde edilen sonuçlar dikkate alınarak koparılmış çiçek testi gerçekleştirilmiştir. Çiçekler teksel olarak değerlendirilmiş ve yanıklık belirtileri gözlenen çiçekler hasta olarak sayılmıştır. 10 adet uygulama pozitif kontrole göre hastalık şiddetlerini etkileme oranları aritmetik olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Koparılmış çiçek testi sonuçlarına bakıldığında; sadece steril su uygulanan Negatif Kontrol çiçeklerinde de %57 oranında çiçek yanıklığı belirtisinin gözlenmesi bahçeden gelen doğal *Ea* bulaşıklığını göstermiştir. Koparılmış çiçek testinde en başarılı uygulamalar antagonist bakteriler olmuştur. Sırasıyla C9/1 (Şekil 4.10), PfA 506 (Şekil 4.11) ve Eh 24 %55-44 oranında çiçek yanıklığını Pozitif kontrole oranla engellemiştir.

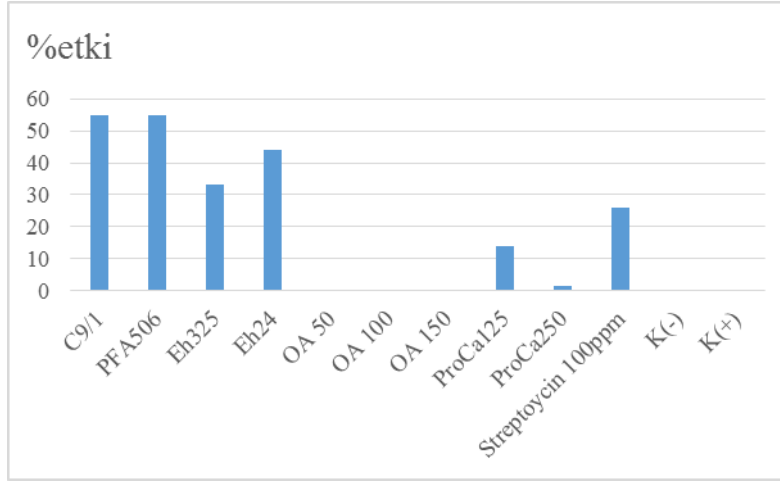
Referans kimyasal olarak çiçek testine alınan streptomisin (Şekil 4.8) ise, HAMT sonuçlarına benzer şekilde, çiçek yanıklığını %26 oranında engelleyebilmiştir. Testlenen diğer kimyasallar (Şekil 4.9) *Ea*'nın çiçek yanıklığını engellemede başarısız bulunmuştur (Çizelge 4.5, Şekil 4.7).'

Çizelge 4.5 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların koparılmış çiçek testinde *Ea*'ya etkililiği sonuçları

Uygulamalar	Ortalama çiçek yanıklığı *(%)	% Etki**
Kontrol (-)	57.14	-
Kontrol (+)	90	-
C9/1	40	55
PfA 506	40	55
E 325	60	33
Eh 24	50	44
OA 50 ppm	90	-
OA 100 ppm	100	-
OA 150 ppm	90	-
ProCa 125 ppm	77.7	14
ProCa 250 ppm	88.88	1.3
Streptomisin 100ppm	66.66	26

* Ortalama çiçek yanıklığı her birinde 3 teksel çiçek bulunan 4 tekerrürün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

** Uygulamaların % çiçek yanıklığı değerlerinin Pozitif Kontrol uygulamasına göre farkı (%) alınmıştır.



Şekil 4.7 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların koparılmış çiçek testinde *Ea*'ya etkililiği sonuçları



Şekil 4.8 Referans kimyasal olan streptomisin uygulamasının koparılmış çiçek testinde *Ea*'ya etkisi



Şekil 4.9 Koparılmış çiçek testinde başarısız uygulama olarak değerlendirilen OA'nın *Ea*'ya etkisi



Şekil 4.10 Antagonist bakteri uygulamasında başarılı sonuç veren C9/1 izolatının *Ea*'ya etkisi



Şekil 4.11 Başarılı antagonist uygulamalarından biri olan *PfA 506*'nın *Ea*'ya etkisi

4.4.3 Fidan Testi Sonuçları

Fidan testi için uygulamaların seçiminde daha çok koparılmış ayva çiçek testi sonuçları dikkate alınmıştır. Koparılmış çiçek testinde *Ea*'nın çiçek belirtilerini başarıyla engelleyen antagonist bakterilerden *PfA506*, *C9/1* ve *E 325* fidan testi için seçilmiştir. Oxolinic asit çiçek testinde başarısız bulunması nedeniyle fidan testlerine alınmamıştır. Her ne kadar, *ProCa* (125 mg/ml) uygulaması da çiçek testinde etkili bulunmasa da, bir bitki büyüme düzenleyici olarak körpe sürgünlerde ligninleşmeyi uyardığı için *Ea*'nın sürgün enfeksiyonunun etkisini araştırmak amacıyla ayva fidan testine alınmıştır. Ayva

fidan testinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.12’de toplu olarak görülmektedir.

Çizelge 4.6 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların ayva fidan testinde *Ea*’ya etkililiği sonuçları

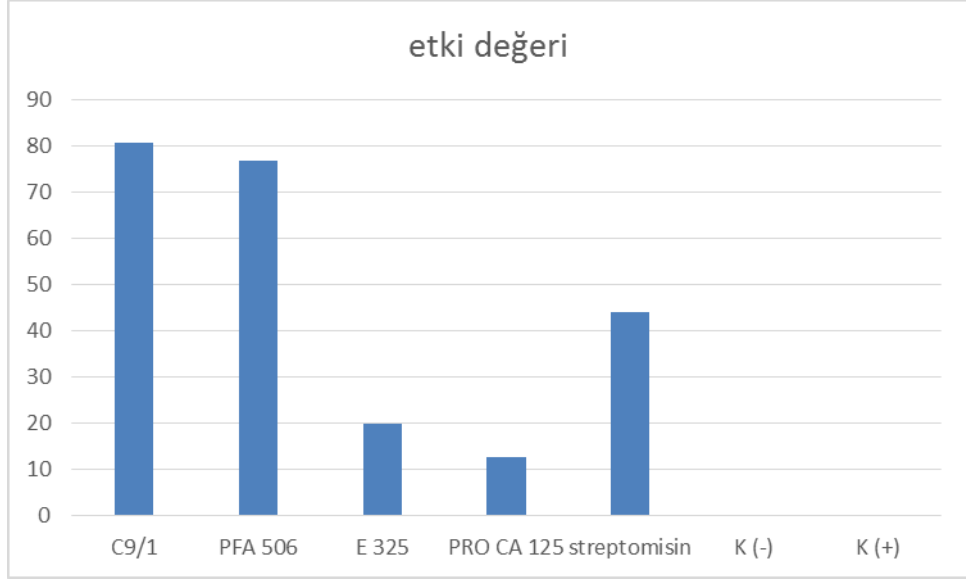
Uygulamalar	Ortalama hastalık şiddeti (%) [*]	% Etki ^{***}
K (-)	0 ^{a **}	-
K (+)	43 ^c	-
C9/1	8,30 ^b	80,7
Eh 325	34,5 ^c	19,8
PFA 506	10 ^b	76,7
PRO CA 125 ppm	37,5 ^c	12,7
Streptomisin 100 ppm	24 ^{bc}	44

*Değerler her birinde 1 fidan bulunan 3 tekerrür ortalamasıdır.

** Tekerrürlerde saptanan ortalama hastalık şiddeti (%) değerlerine uygulanan DUNCAN testi sonucunda aynı harfi taşıyan uygulamalar, $P \leq 0.05$ olasılıkla birbirinden farklıdır.

** Uygulamaların % hastalık şiddeti değerlerinin Pozitif Kontrol uygulamasına göre farkı (%) alınmıştır.

Ayva fidan testi sonucunda, pozitif kontrolde ateş yanıklığının tipik belirtisi olan sürgün ucu yanıklığı ve “çoban değneği” belirtileri gözlenmiş ve hastalık şiddeti %43 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.16). *Ea*’nın sürgün enfeksiyonlarını engellemede en başarılı uygulamaların C9/1 (Şekil 4.13) ve *PfA* 506 (Şekil 4.14) gibi antagonist bakteriler olduğu ve pozitif kontrolden istatistiksel olarak tamamen farklı grupta yer aldığı dikkati çekmiştir. Referans kimyasal olarak denemede yer alan streptomisin ise sürgün enfeksiyonunu engellemede antagonist bakteriler kadar başarılı bulunmamıştır (Şekil 4.15). Sürgün yanıklıklarında etkili olduğu bilinen ProCa uygulaması antagonist bakterilerden daha kötü bir sonuç vermiş ve pozitif kontrolle istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır.



Şekil 4.12 Yararlı bakterilerin ve kimyasalların fidan testinde *Ea*'ya etkililiği sonuçları



Şekil 4.13 Antagonist bakterilerden C9/1 uygulamasının fidanlarda *Ea*'nın sürgün yanıklığına olan etkisi



Şekil 4.14 *PfA 506* uygulamasının fidanlardaki *Ea*'nın sürgün yanıklıklarına olan etkisi



Şekil 4.15 Fidan testinde başarısız uygulama olarak değerlendirilen streptomisinin *Ea*'nın neden olduğu sürgün yanıklığına olan etkisi



Şekil 4.16 Uygulamadaki a) pozitif ve b) negatif kontrol bitkileri

5.TARTIŞMA

Ea'nın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı Kuzey Amerika'da ilk saptandığından bu yana yaklaşık 220 yıldır dünya genelinde yayılış gösteren (Powney *et al.*, 2010), yıkıcı ve halen Türkiye de dahil bir çok Avrupa ülkesi, Japonya ve Avustralya'da en önemli karantina etmenidir (EPPO,2015 www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm). Bu nedenle *Ea*'nın hızlı ve kesin tanısı hem karantina organizasyonu açısından hem de etmenin henüz hastalık belirtilerinin görülmediği erken evrede saptanıp uygun mücadele önlemlerinin uygulanması açısından büyük önem taşımaktadır. *Ea*'nın tanısı konusunda geliştirilen yarı selektif ortamlar ve serolojik testler bulunmakla birlikte, bunların zaman alıcı olması ve duyarlı tanılama konusunda yaşanan sorunlar, yanlış pozitifler nedeniyle, son yıllarda moleküler tanı testleri ağırlık kazanmıştır (Geider *et al.*, 2006). Moleküler yöntemlerden klasik PCR ile *Ea*'nın tanılanması konusunda birçok protokol geliştirilmiştir (Bereswill *et al.*,1992,1995; Llop *et al.*,2000; Maes *et al.*,1996; McManus and Jones,1995; Taylor *et al.*,2001). Ancak, bunların konukçuya ve primere bağlı olarak seçicilikleri ve duyarlılıkları konusunda da soru işaretleri bulunmaktadır (Kokoskova and Mraz, 2005; Kokoskova *et al.*,2007; Llop *et al.*,2000; Rosellò *et al.*,2006).

Yapılan bir araştırmada, *Ea* etmeninin moleküler açıdan tanılanması için yayınlanan 7 protokolden 6 tanesinin *Ea* izolatları için spesifik olmadığı belirtilmiştir (Powney *et al.*, 2010). Genetik olarak farklı olan 40 adet *Ea* izolatu ve *Ea* ile aynı ekolojik nişi paylaşan, farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş *Ea*'ya benzer koloni özellikleri gösteren 55 farklı bakterinin tanılanması için 7 adet PCR protokolü kullanılmıştır (Powney *et al.*, 2010). Tüm bakterilerin ham armut meyve testi ile virülensliği belirlenmiş ve seçici besi yerinde bakteri kültürlerinin karakteristik özellikleri test edilmiştir. Testlenen 7 farklı PCR protokolünden Sadece Taylor *et al.*, (2001) tarafından uygulanan protokolde *Ea* izolatları diğer bakteri izolatlarından ayırt edilmiştir. Taylor *et al.*, (2001) G1F-G2R primerleri ile yaptıkları çalışma sonrasında, *Ea* izolatlarının spesifik olarak 187 bp'de bantlar oluşturduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışmasında da, kültürel ve fizyolojik tanı testlerinin yanı sıra, ham armut meyvelerinde patojenisite testi ve G1F-G2R primerleri ile yapılan klasik PCR çalışmasının sonuçlarının birbirini

teyid edici bulunması Taylor *et al.* (2001) ile uyumlu olmuş ve *Ea*'nın kesin tanısı gerçekleştirilmiştir.

Çiçek ve meyve testlerinde kullanılacak antagonist izolatların belirlenmesi için yarı *in vivo* test olarak kabul edilen ham armut meyve testi uygulamasının antagonist bakterilerin seçiminde yeterli bir eleme ölçütü olduğu belirtilmektedir (Beer *et al.*, 1984; Mc Laughlin and Roberts, 1993; Nicholson *et al.*,1990). Yaptığımız çalışmada da, bu eleme kriterlerine göre seçilen antagonist bakteri izolatlarının çiçek ve fidan testinde enfeksiyonları önlemedeki başarısının meyve testinde elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu göze çarpmaktadır.

Ateş Yanıklığının primer enfeksiyonları çiçeklerden başladığı için, çiçeklenme döneminde yapılacak uygulamalarla çiçek enfeksiyonlarının önlenmesi büyük önem taşır (Stockwell *et al.*,1998). Ancak, çiçeklenme döneminde kimyasalların uygulanabilme şansı çok az olmasına karşın, *P. agglomerans* ve *P. fluorescens* gibi biyolojik savaş elemanı bakteriler çiçeklenme başlangıcında elma ve armut çiçeklerine uygulandığında hızla çoğalarak patojeni enfeksiyon yerinden uzaklaştırabilmektedir (Johnson *et al.*,1993; Kearns and Hale,1993). Antagonist popülasyonu çiçekler üzerinde ne kadar erken saptanırsa, *Ea*'nın engellenmesi de o kadar başarılı olmaktadır (Wilson and Lindow, 1993; Nuclo *et al.*,1998; Stockwell *et al.*,1998; Johnson and Stockwell,1998). *P.agglomerans* ve *P. fluorescens* gibi bakteriyel antagonistlerin etkili olabilmeleri için *Ea*, *P. viridiflava*, *P. syringae* gibi yerleşik (endemik) bakterilerin epifitik popülasyonunun ve rekabetin düşük olduğu erken çiçeklenme döneminde uygulanması önerilmektedir (Stockwell *et al.*,1999).

P. fluorescens PfA506 ve *P. vagans* C9-1 kullanılarak yapılan 2 uygulamanın Pacific Northwest'de (Nuclo *et al.*, 1998) ve Kaliforniya'da (Lindow *et al.*, 1996) *Ea*'nın neden olduğu bakteriyel çiçek yanıklığını %60 oranında engellediği belirtilmiştir. Lindow *et al.*, (1996) ise; aynı bakteriyel antagonistlerle yaptıkları biyolojik mücadele çalışmasının meyve bahçelerinde kimyasal mücadele ile elde edilen başarı düzeyine yakın olduğunu vurgulamıştır. Oregon'da yürütülen bir meyve bahçesi çalışmasında, *P. fluorescens* A506 ve *P. vagans* C9-1'in etkililiği karşılaştırılmış, *P. vagans* C9-1'in *Ea*'nın çiçek yanıklığı şiddetini ortalama %40-70 oranında engelleyen daha başarılı uygulama olduğu

belirtilmiştir (Stockwell *et al.*, 2002). Özaktan vd.(2011) tarafından yürütülen bir uluslararası araştırma projesinde ise; *P. vagans* C9-1 izolatu, *P. agglomerans* Eh24 izolatu ve *P. fluorescens* PfA506 izolatının liyofilize formülasyonları doğal enfeksiyon koşulları altında elma ve armut bahçelerinde *Ea*'ya karşı %30 ve %100 çiçeklenme dönemlerinde, 3 yıl süreyle teksele ve kombinasyon halinde uygulanmış, çiçeklerde ateş yanıklığını uygulama görmemiş pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında ortalama %20-70 oranında engelleyerek bakır oksiklorid + maneb uygulamasından daha başarılı bulunmuştur. Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda çiçek uygulamalarından elde ettiğimiz bulgularla büyük ölçüde örtüşmektedir. Antagonistik bakterilerin çiçek ve fidan testinde diğer kimyasallara oranla başarılı bulunması, bu bakterilerin besin ve yer için rekabet etme ve bazı metabolitleri üretme gibi çok yönlü biyolojik savaş mekanizmalarına sahip olmalarından kaynaklanabilir (Bora ve Özaktan, 1999).

Bu tez çalışmasının özgün tarafı, yukarıda belirtilen ve armut/elma plantasyonlarında Dünyanın farklı ülkelerinde denendiğinde başarılı bulunan söz konusu bakteriyel antagonistlerin ayvada ateş yanıklığı çiçek enfeksiyonlarına karşı da etkili olarak bulunmasıdır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ve daha önce birçok araştırmacının bulguları (Kearns and Hale, 1993; Nicholson *et al.*,1990; Stockwell *et al.*, 2002), *P. agglomerans*, *P. vagans* ve *P. fluorescens*'in ateş yanıklığının biyolojik mücadelesinde etkili birer biyolojik mücadele elemanı olduğunu bir kez daha göstermektedir. Günümüzde *P. vagans* ve *P. fluorescens*'in ABD ve Yeni Zelanda'da (Vanneste *et al.*, 2002) ateş yanıklığının biyolojik mücadelesinde kullanılmak üzere ruhsatlı preparatı olduğu bilinmektedir (Johnson and Stockwell, 1998; Norelli and Aldwinckle, 1992).

Son yıllarda sürdürülebilir tarım anlayışının gelişmesiyle güvenli ya da zararsız kimyasallar olarak nitelendirilen Prohexadione-kalsiyum (Regalis, Apogee) gibi büyüme regülatörleriyle (Norelli and Miller, 2004; Spinelli *et al.*,2004; Özaktan vd., 2011) ve acibenzolar-S-methyl (BION) gibi sistemik kazanılmış dayanıklılığı uyaran kimyasal preparatlarla umutvar sonuçların alındığı (Baştas ve Maden,2004; Bazzi *et al.*,2003; Spinelli *et al.*,2004) ileri sürülmektedir.

Bu tez çalışmasında testlenen kimyasallarda ProCa armut meyve testi, çiçek testi ve fidan testinde *Ea*'yı engelleme konusunda başarılı bulunmamıştır. Bir giberellik asit inhibitörü olan Prohexadione Ca (ProCa), özellikle elma ve armut ağaçlarının bitkisel büyümesini kontrol etmek için kullanılan bir bitki büyüme düzenleyicisidir (Evans *et al.*, 1997; Evans *et al.*,1999). Bu kimyasal, sürgün gelişimini engelleyerek vejetatif büyüme ve generatif gelişme arasında dengeyi sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. ProCa'nın ilkbaharda hızlı sürgün gelişmesini engellemesi nedeniyle, elma ve armut yetiştiriciliğinde önemli bir sorun olan ateş yanıklığı hastalığının ağaçlara zarar verme riskini de önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Winkler, 1997; Rademacher, 2004). Sonuç olarak ProCa, bir bitki büyüme inhibitörü olup sürgün gelişimini hızlandırarak süberin-lignin oluşumunu sağlamakta ve böylece *Ea*'nın sürgün enfeksiyonu yapma riskini azaltmaktadır. ProCa uygulanan meyve bahçelerindeki sürgünlerin hastalık şiddetinin azaldığı görülmüştür (Norelli *et al.*, 2003). Yapılan bu uygulamalardan sonra hastalık şiddetindeki azalmanın bu hastalığın sistemik olarak yayılmasını durdurmada fiziksel bir bariyer oluşturan ProCa uygulamasının parankima dokusunda hücre duvarının kalınlaşmasına neden olarak ağacın fizyolojisinde değişiklik yapıp ateş yanıklığı enfeksiyonunu azaltmaya yönelik olduğunu göstermiştir (Norelli *et al.*, 2003).

Ancak, bu kimyasal bir bakterisit değildir. Bu nedenle çiçek, meyve ve fidan testlerinde başarısız bulunmuştur. Özellikle fidan testleri de yapay inokulasyon koşullarında ve bitki büyüme odasında gerçekleştirilmiş ve 14-21 gün arasında sonuçlar alınmıştır. Bu nedenle, doğal enfeksiyon koşullarında meyve bahçesi uygulamalarında sürgün enfeksiyonlarını engellemede başarılı bulunan Pro Ca'un (Özaktan vd., 2011) gerçek etkisi görülememiştir.

Ülkemizde *Ea*'ya karşı ruhsatlı bir kimyasal olan Oxolinic asit İsrail'de 1998'den bu yana ticari olarak kullanılmaktadır (Shtienberg *et al.*, 2001). Shtienberg *et al.* (2001) Oxolinic asitin 200 ve 300 µg/ml'lik dozlarını İsrail'de armut bahçesinde doğal *Ea* enfeksiyonuna karşı denemiler ve 300 µg/ml'lik dozun *Ea* enfeksiyonunu başarıyla engellediğini, 200 µg/ml'lik dozun ise pozitif kontrolden farklı olmadığını saptamışlardır. Bu tez çalışmasında, Oxolinic asitin firma tarafından önerilen 100 µg/ml'lik dozunun yanı sıra, bir üst doz olan 150 µg/ml'lik dozu *Ea*'ya karşı çiçek ve meyve testleriyle araştırıldığında, meyve

testinde başarılı olmasına karşın çiçek testinde başarısız bulunmuştur. Çiçek testinde meyve bahçesinden kaynaklanan doğal bulaşık bir *Ea* popülasyonunun olması hastalık şiddetinin pozitif kontrolde %90, negatif kontrolde ise %57 olmasıyla sonuçlanmıştır. Bu kadar yüksek hastalık baskısı karşısında Oxolinic asit başarılı olamamıştır. Shtienberg *et al.*,(2001)' da benzer şekilde doğal enfeksiyon basıncının yüksek olduğu armut bahçelerinde Oxolinic asit uygulamasının başarısız olduğunu ve bu kimyasala karşı da *Ea* izolatları arasında dayanıklı bir popülasyonun gelişmesi riski bulunduğunu belirtmiştir (Manulis *et al.*, 2003). İsrail'de 2001 yılında yapılan çalışmada *Ea*'ya karşı başarılı bulunan Oxolinic asit (Shtienberg *et al.*, 2001) 2003 yılında bir başka çalışmada dayanıklılık sorunu nedeniyle başarısız bulunmuştur (Manulis *et al.*, 2003). Ülkemizde de Tarım bakanlığı tarafından ruhsatlı olan ve ticari olarak kullanılan bu preparata karşı *Ea* izolatlarının dayanıklılık kazanması olasılığı mevcuttur. Çiçeklerdeki doğal bulaşık *Ea* popülasyonu bu preparata dayanıklı bir popülasyon olabilir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen veriler ışığında pratiğe ve bu konuda çalışan araştırmacılara dönük olarak yapılabilecek öneriler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Ea çiçek, sürgün, gövde ve yapraklarda simptomsuz olarak epifit fazda yaşayabilir ve epidemilere neden olabilir. Bu nedenle, hala bir karantina etmeni olan bu bakterinin hızlı, güvenilir ve kesin tanısının yapılması hem karantina hem de mücadele açısından önem taşımaktadır. Tez çalışması sonucunda, etmenin güvenilir ve hızlı tanısının G1F/G2R primer çifti kullanılarak klasik PCR ile gerçekleştirilebileceği söylenebilir.

Projedeki bulguların vakit kaybetmeden pratiğe aktarılabilmesi, bu yararlı bakterilerin endüstriyel koşullarda, geniş ölçekte üretimlerinin yapılabilmesine ve ticari kullanım açısından ruhsatlandırılmasına bağlıdır. Bu konuda, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ve özel sektör işbirliğinde girişimlere hız verilmelidir. Bunlar arasında aktif organizması *P. vagans* C9/1 olan Frost Ban ve *P.fluorescens* strain A506 olan Blight Ban gibi iki bakteriyel preparatın ABD’de Ateş Yanıklığı ve don zararına karşı ruhsatlı olduğu ve kullanıldığı bilinmektedir Aktif organizması *P. agglomerans* strain E325 olan Blossom Bless isimli bir biyopreparat ise Yeni Zelanda ve İtalya’da ticari kullanım izni almıştır.

Ea infeksiyonları çiçeklerden başladığı ve çiçeklenme döneminde kimyasalların uygulanamayacağı gerçeği unutulmamalıdır. Ateş yanıklığı ile savaşmada en ideal yaklaşım entegre savaşım olabilir. Bir model olarak, kış aylarında bilinçli bir hastalık budaması ve bakteriyel antagonistlere olumsuz etkisi olmayan bakırlı preparatlarla kış ilaçlaması yapıldıktan sonra, yararlı bakterilerin çiçeklere birkaç kez uygulanması önerilebilir.

Acibenzolar S methyl (BION), Pro Ca, Fosetil Al vb. gibi kalıntı, dayanıklılık riski olmayan zararsız kimyasallara mücadele programlarında daha fazla yer verilmelidir.

Oxolinic asit ve streptomisin gibi antibiyotik özelliği taşıyan kimyasallar ise, *Ea*’nın dayanıklı popülasyonlar geliştirme riski nedeniyle kullanılmaları konusunda dikkatli olunması gereken preparatlardır. Bu tez çalışmasında da,

Oxolinic asit uygulamasının sürgün infeksiyonlarını engellemede başarısız olduğu saptanmıştır.

Bakteriyel antagonistler *Ea*'nın çiçek infeksiyonlarını engellemede başarılı olmakla birlikte, sürgün yanıklığına karşı çok başarılı olamamaktadır. Bu nedenle, bir büyüme düzenleyici olarak ProCa uygulaması körpe sürgünlerin hızla süberinleşmesini sağlayarak *Ea*'nın sürgün infeksiyonunu önlemektedir. Üstelik ProCa uygulamasının meyve verimini de olumlu etkilediği yetiştiriciler tarafından bilinmektedir. İntegre mücadele yaklaşımında IPM programlarında bu tür zararsız kimyasallara da yer verilmelidir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ait Bahadou, S., Ouïja A. and Tahiri A.,**2016. Evaluation of biological control agent *Pantoea agglomerans* P10c against fire blight in Morocco. African Journal of Agricultural Research Vol. 11(18), pp. 1661-1667.
- Aldwinckle, H. S., Bhaskara Reddy, M. V. and Norelli, J. L.,** 2002. Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Horticulturae*, 590, 325–331.
- Anonymous,** 1995. İç Karantinaya Tabi Hastalık ve Zararlılar Listesi,22377 sayılı Resmi Gazete.
- Anonymous.,** 2011, Quince. <http://en.wikipedia.org/wiki/Quince>; (Erişim tarihi: 04.03.2014).
- Anonymous.,** 2012. <http://bitkikorumarehberi.wordpress.com>, (Erişim tarihi: 15.06.2015).
- Aysan, Y., Mirik, M., Sahin, F., Kotan, R. ve Saygılı, H.,** 2006. Phenotypic characterization of *Erwinia amylovora* from pome fruits in Turkey. *Acta Hort*, 704, 459-464.
- Bakker, P. A. H. M., Lamers, J. G., Bakker, A. W., Marrugo, J. D., Weisbe, E. K. and Schippers, B.,** 1986. The role of siderophores in potato tuber yield increase by *Pseudomonas putida* in a short rotation. *Potato Neth. J. Pl. Path.*, 92, 249-256.
- Basım, H.,** 1999. *Erwinia amylovora* (Burr.) İzolatlarının Streptomycin ve Bakır’a Dayanıklılıkları ve Plazmid Profilleri. Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 12, 22-30.
- Baştaş, K. K. and Maden, S.,** 2004. Researches on the control of fire blight (*E. amylovora* (Burr.) Winslow et al.) with prohexadione-Ca (BAS 125 10 W) and benzothiadiazole + metalaxyl (BION MX 44 WG). Selçuk University Journal of Agriculture Faculty 18 (33): 49–58.
- Bazzi, C., Merighi, M., Lopez, M.M., Zhang, Y., Jock, S. and Geider, K.** 1998. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains isolated in southern

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Europe by PFGE analysis. Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 197-200 pp., Kuşadası, Turkey.

Bazzi, C., Messina, C. H., Tortoreto, L., Stefani, E., Bini, F., Brunelli, A. and Hauptmann, S., 2003. Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. *European Journal of Horticultural Science*, 108-114.

Beer, S. V. and Opgenorth, D. C., 1976. *Erwinia amylovora* on fireblight canker surfaces and blossoms in relation to diseaseoccurrence. *Phytopathology*, 66, 317-322.

Beer. S.V., Rundk, J.R. and Wodzinski. R.S., 1984. Interaction between *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola* in vitro, in immature pear fruits and in apple blossoms. *Acta Horticulture*. 151 : 203-204.

Bell, A. A., and Van der Zwet, T., 1993. New fire blight resistant adnavced selectionsfrom USDA pear breeding program, 84 p., *Fire Blight (Erwinia amylovora)*, Some Aspects of Epidemiology and Control, P. Sobiczewski, T. Deckers, and J. Pulawska (Eds.), Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland.

Bell, A.C., Ranney, T.G. and Eaker, T.A., 2004. Resistance to Fire Blight among Flowering Pears and Quince. *HortScience* 40(2):413-415.

Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. and Geider, K., 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11), 3522-3526.

Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmüller, I. and Geider, K., 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2636-2642.

Beyers, R. E. and Yoder, K. S., 1997. The effect of BAS 125 W on apple tree growth, fruit quality and fire blight suppression. *HortScience* 32(3): 557

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Biondi E., Brunelli A., Ladurner E., Portillo I., Lancioni P., Benuzzi M. and Bazzi C.,** 2007. Efficacy of *Bacillus subtilis* against Fire Blight in Pears. *Informature Agrario*. 63 (19), 58-60.
- Breth, D. I., Bentley, A., Momol, M. T. and Aldwinckle, H. S.,** 1999. Alternative control measures for blossom blight in commercial apple and pear orchards. *Acta Horticulturae* 489: 559–564
- Broggini-Schärer, G. A. L., Duffy, B., Holliger, E., Scharer, H. J., Gessler, C. and Patocchi, A.,** 2005. Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 93–100.
- Brown, E.W., Davis, R.M. and Van Der Zwet, T.** 1998. PCR- based strategies used for the identification and differentiation of typical strains of *Erwinia amylovora*. Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 159-166 pp., Kuşadası, Turkey.
- Burr, T. J., Norelli, J. L., Reid, C. L., Capron, L. K., Nelson, L. S., Aldwinckle, H. S. and Wilcox, W. F.,** 1993. Streptomycin resistant bacteria associated with fire blight infections. *Plant Dis.*, 77, 63-66.
- Cabrefiga, J., Bonaterra, A. and Montesinos, E.,** 2007. Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *International Microbiology*, 10, 123–132.
- Cabrefiga J., Francés J., Montesinos E. and Bonaterra A.,** 2011. Improvement of fitness and efficacy of a fire blight biocontrol agent via nutritional enhancement combined with osmoadaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 3174–3181.
- Chiou, C. S. and Jones, A. L.,** 1991. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 81, 710-714.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Costa, G., C. Andreotti, F. Bucchi, E. Sabatini, C. Bazzi, S. Malaguti and W. Rademacher.,** 1999. Reduction of Fire Blight Incidence in Pears, Cv. ‘Abate Fetel’, By The Plant Growth Regulator Prohexadione-Ca. *Phytopathology* Vol. 89, No. 6 (Supplement), P18.
- Çıtır, A., ve Mirik, M.,** 1999. Fire blight of pome fruits and search for resistant or tolerant cultivars in Amasya and Tokat Regions in Turkey, *Acta Horticulturae*, 489: 215-220.
- Davies, T. D. And Curry, E. A.,** 1991. Chemical Regulation of Vegetative Growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10: 151-188.
- Dimova, A.,** 1990. Chemical control of fire blight blossom infection under field conditions in Cyprus. *Acta Horticulturae* 273: 377–382.
- EPPO,** 2015. <https://www.eppo.int/QUARANTINE/quarantine.htm> (Erişim tarihi: 20.01.2016).
- Evans, J. R., Ishida, C. A., Regusci, C. L., Evans, R. R. and Rademacher, W.,** 1997. Mode of action, metabolism, and uptake of BAS 125 W, prohexadione Ca. *HortScience* 32 (3): 557–558
- Evans, J. R., Evans, R. R., Regusci, C. L. and Rademacher, W.,** 1999. Mode of action, metabolism and uptake of BAS 125W, prohexadione-calcium. *HortScience* 34 (7): 1200–1201
- Falkenstein, H., Bellemann, P., Walter, S., Zeller, W. and Geider, K.,**1988. Identification of *E. amylovora*, the fire blight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2798-2802.
- Geider, K. and Kim,W.,** 2000. Characterization of a viral EPS-Depolymerase, a potential tool for control of fire blight. *Phytopath.*,90(11):1263-1268.
- Geider, K., Auling, G., Du, Z., Jakovljevic, V., Jock, S. and Völksch, B.,** 2006. *Erwinia tasmaniensis* sp. nov., a non-phytopathogenic bacterium from

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

apple and pear trees. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*,56(12), 2937-2943.

Gencer, S., 2011 Tokat Ekolojisinde Yetiştirilen “Eşme” ve “Limon” Ayva (*Cydonia vulgaris* L.) Çeşitlerinin Fenolojik, Morfolojik ve Pomolojik Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

GKGM (Gıda Ve Kontrol Genel Müdürlüğü), 2015, Armut-Ayva Hastalık ve Zararlılarıyla Mücadele, http://www.tarim.gov.tr/GKGM/Belgeler/BitkiHizmetleri/hastalik_zararlilari_ile_mucadele_dokumanlari/armut-ayva.pdf. (Erişim tarihi: 20.11.2015).

Goorani, M.A. and Hassanein, E.N., 1991. The effect of *Bacillus subtilis* on in vitro growth and pathogenicity of *Erwinia amylovora*. J, Phytopathology, 133: 134-138.

Guilford, P.J., Taylor, R.K., Clark, R.G., Hale, J.N. and Forster, R.L.S. 1996. PCR based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.*, 411: 53-56.

Hasler, T., and Kellerhals, M., 1995. Feuerbrandanfälligkeit verschiedener Apfelund Birnensorten, 84 p., Fire Blight (*Erwinia amylovora*), Some Aspects of Epidemiology and Control, P. Sobiczewski, T. Deckers, and J. Pulawska (Eds.), Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland.

Hikiki, Y., Noda, Ch. and Shimizu, K., 1989 Oxonilic acid. Japan Pesticide Information 55, 21-23.

Isenbeck, M. and Schulz, F. A., 1985. Biological control of fire blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et af.) on ornamentals. 1. Control of the pathogen by antagonistic bacteria. *Phytopathology* 75:324-333.

Ishimaru, C. A., Klos, E. J., and Brubaker, R. R., 1988. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology* 78:746- 750.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jeng, R.S., Beliaeva, L., Hubbes, M., Svircev, A.M. and Myers, A.L., 1998.**
The use of 16s and 16s-23s rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *Erwinia amylovora*. Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 49-54 pp., Kuşadası, Turkey.
- Johnson, K. B., Stockwell, V. O., McLaughlin, R. J., Sugar, D., Loper, J. E. and Roberts, R. G., 1993.** Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. *Phytopathology-New York And Baltimore Then St Paul*-,83, 995-995.
- Johnson, K. B. and Stockwell, V. O., 1998.** Management of fire blight: a case study in microbial ecology. *Annual review of phytopathology*, 36(1), 227-248.
- Jones, D.R. and Byrde, R.J.W., 1987.** Chemical control of fireblight on cider apple. *Acta Horticulturae* No. 217, pp. 235-238.
- Kado, C. I., 2010.** Plant bacteriology. The American Phytopathological Society. Minnesota U.S.A., 336p.
- Karabıçak, Y. ve Kotan, R., 2014.** Armut ağaçlarında Ateş Yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.'ya karşı bakteri uygulamaları ile biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. *Bitki Koruma Bülteni*, 54(4):355-370.
- Kearns, L. P. and Hale, C. N., 1993.** Biological control of fire blight by *Erwinia herbicola* : survival of applied bacteria in orchard and glasshouse trials. *Acta Hort* 338, 333.
- Kessmann, H., Oostendorp, M., Ruess, W., Staub, T., Kunz, W. and Ryals, J., 1996.** Systemic activated resistance a new technology for plant disease control. *Pesticide Outlook* 6: 1– 4
- Kleitman, F., Shtienberg, D., Blachinsky, D., Oppenheim, D., Zilberstaine, M., Dror, O. and Manulis, S., 2005.** *Erwinia amylovora* populations

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

resistant to oxolinic acid in Israel: prevalence, persistence and fitness. *Plant pathology*, 54(2), 108-115.

Klement, Z. and Goodman, R. N., 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 5:17- 44.

Kokošková, B. and Mraz, I., 2005. Reliability of diagnostic techniques for *Erwinia amylovora*, the causative agent of fire blight disease. *Folia microbiologica*, 50(3), 217-221.

Kokošková, B. and Pavela, R., 2007. Effectiveness of plant essential oil on the growth of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease. *Pest Technol*, 1, 76-80.

Kolozsvári Nagy, J., Király, L. and Schwarczinger, I., 2012. Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Cent. Eur. J. Biol.* 7(1): 1-12.

Kovaks, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (London)* 178:703.

Laby, R.J. and Beer, S.V., 1992. Hybridization and functional complementation of the *hrp* gene cluster from *E.amylovora* Ea321 with DNA of other bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5(5):412-419.

Layne E.C. and Quamme H.A., 1975. Pears, eds: Janick J. And Moore J.N., Purdue University Press, West Lafayette, Indiana.

Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Diagnostic procedures for bacterial plant diseases. In *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants* 58-59. Blackwell Scientific Publications, 216p.

Lightner, G.W. and Steiner, P.W., 1990. Computerization of blossom blight prediction model. *Acta Horticulturae* No. 273, pp. 171-184.

Lindow, S. E., McGourty, G. and Elkins, R., 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology*, 86(8), 841-848.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. and López, M. M.,** 2000. Development of a Highly Sensitive Nested-PCR Procedure Using a Single Closed Tube for Detection of *Erwinia amylovora* in Asymptomatic Plant Material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2071-2078.
- Loper, J. E., Henkels, M. D., Roberts, R. G., Grove, G. G., Willet, M. J. and Smith, T. J.,** 1991. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State. *Plant Dis* 75, 287-290.
- Maes, M., Garbeva, P. and Crepel, C.,** 1996. Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 45(6), 1139-1149.
- Manulis, S., Kleitman, F., Dror, O., David, I. and Zutra, D.** 1998. Characterization of the *Erwinia amylovora* population in Israel. *Phytoparasitica* 26:39-46.
- Manulis, S., Zutra, D., Kleitman, F., Dror, O., David, I., Zilberstaine, M. and Shabi, E.,** 1998. Distribution of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. *Phytoparasitica*, 26 (3): 223-230.
- Manulis, S., Kleitman, F., Shtienberg, D., Shwartz, H., Oppenheim, D., Zilberstaine, M., and Shabi, E.,** 2003. Changes in the sensitivity of *Erwinia amylovora* populations to streptomycin and oxolinic acid in Israel. *Plant Dis*. 87:650-654.
- McManus, P.S. and Jones, A.L.** 1994. Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology* 84:627-633.
- McManus, P. S. and Jones, A. L.,** 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridizations. In *VII International Workshop on Fire Blight* 411 (pp. 87-90).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W. and Jones, A. J., 2002.**
Antibiotic use in agriculture. Annual Review of Phytopathology 40: 443–465.
- Merighi, M., Malaguti, S., Bazzi, C., Sandrini, A., Landini, S., Ghini, S. and Girotti, S., 1998.** Spesific detection of *Erwinia amylovora* by Chemiluminescent immunoenzymatic determination of PCR. Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 39-42 pp., Kuşadası, Turkey.
- Mikiciński, A., Sobiczewski, P. and Berczynski, S., 2008.** Selection of bacteria from epiphytic populations on apple trees and soil environment for ability to control fire blight (*Erwinia amylovora*). Phytopathol Polonica 47:43–55.
- Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Pulawska, J., and Malusa E., 2016.** Antagonistic potential of *Pseudomonas graminis* 49M against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. Arch Microbiol 198:531–539.
- Moller, W.J., Schroth, M.N. and Thomson, S.V., 1981.** The Scenario of Fire Blight and Streptomycine Resistance. Plant Disease, 65, pp:563-56.
- Momol, M. T., Yeğen, O., Basım, H., Rudolp, K. ve Zachowski, M. A., 1991.** Batı Akdenizde *Erwinia amylovora*'nın neden olduğu ateş yanıklığının epidemisi ve mücadelesi. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 7-11 Ekim, İzmir, Türkiye, 301-305.
- Momol, M. T., Yeğen, O., Basım, H. and Rudolph, K., 1992.** Identification Of *Erwinia amylovora* and Occurence of Fire Blight of Pear in Western Mediterranean Region of Turkey, Journal of Turkish Phytopathology 1992, 21: 1, 41-47.
- Momol, T. ve Yeğen, O., 1993.** Fire blight in Turkey. Acta Horticulturae. 338:37-40.
- Momol, M. T., Momol, E. A., Lamboy, W. F., Norelli, J. L., Beer, S. V., and Aldwinckle, H. S., 1997.** Characterization of *Erwinia amylovora* strains

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *Journal of Applied Microbiology*, 82, 389–398.

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). Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 55-59 pp., Kuşadası, Turkey.

Momol, M. T., Ugine, J. D., Norelli, J. R. and Aldwinckle, H. S., 1999b. The effect of prohexadione Ca, SAR inducers and Prohexadione-Calcium on the control of shoot blight caused by *E. amylovora* on apple. *Acta Horticulturae* 489: 601–605.

Nagy-Déri, H., 2011. Morphological Investigations on Anthers and Pollen Grains of Some Quince Cultivars. *Acta Biologica Szegediensis*, Volume 55(2):231-235.

Nicholson, S. L., Sigee, D. C. and Epton, H. A. S., 1990. Biological control of fire blight of perry pear: comparative evaluation of antagonists on immature fruit slices, micropropagated shoots and orchard blossom. In *V International Workshop on Fire Blight* 273 (pp. 397-404).

Norelli, J. and Aldwinckle, H., 1992. Orchard evaluation of chemical and biological spray materials to control fire blight. In *VI International Workshop on Fire Blight* 338 (pp. 363-368).

Norelli, J. L., Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S., 2003. Fire blight management in the twenty first century. *Plant Disease* 87: 756–765.

Norelli, J. L. and Miller, S. S., 2004. Effect of prohexadione-calcium dose level on shoot growth and fire blight in young apple trees. *Plant Disease*, 88(10), 1099-1106.

Nuclo, R.L., Johnson, K.B., Stockwell, V.O. and Sugar, D., 1998. Secondary colonization of pear blossom by two bacterial antagonists of fire blight pathogen. *Plant Dis.*, 82, 661-668.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. and Staub, T.,** 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107: 19–28.
- Öktem, Y.E. ve Benlioğlu K.,** 1986. Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Ateş Yanıklığı Hastalık Etmeni (*Erwinia amylovora* (Burr.)) Üzerinde Çalışmalar, Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Antalya, Pp. 71.
- Özaktan, H. ve Türküsay, H.,** 1996. Ateş Yanıklığı hastalığının (*Erwinia amylovora*) biyolojik savaşımında epifitik bakterilerin kullanılma olanakları üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK-TOAG/1077 sayılı kesin proje raporu.27s.
- Özaktan, H., Bora, T., Sukan, S., Sargin, S. ve Vardar Sukan, F.,** 1998. Studies on determination of antagonistic potential and biopreparation of some bacteria against the Fireblight pathogen. In *VIII International Workshop on Fire Blight* 489 (pp. 663-668).
- Özaktan H., Bora T. ve Altın N.,** 2001. Armutlarda Ateş Yanıklığı hastalığına etkili antagonistik bakterilerin kitle üretimi ve biyopreparatlarının meyve bahçelerinde kullanılması üzerine araştırmalar. TÜBİTAK-TARP/1897 sayılı kesin proje raporu, 32 sayfa.
- Özaktan, H. ve Bora, T.,** 2004. Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain Eh 24. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 224-229.
- Özaktan, H., Akköprü, A., Aslan, E., İlhan, K., ve Koltuksuz, T.,** 2011. Integrated Control Possibilities of fire blight in Pear Orchard in Turkey using prohexadione-Ca and bacterial antagonists, *Acta Hort.* 896, ISHS 2011: 441-446.
- Özçağiran, R., Ünal, A., Özeker, E. ve İsfendiyaroğlu, M.,** 2011. Ilıman İklim Meyve Türleri (Yumuşak Çekirdekli Meyveler). Cilt:2, E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 556, Bornova/İzmir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özkan, Y.**, 1995. Ilıman İklim Meyveleri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Notu, Tokat.
- Pektaş, M.**, 2011. Ayva Yetiştiriciliği, <http://www.marim.gov.tr/bilgikaynagi/ayvayet.pdf> (Erişim tarihi: 23.04.2014).
- Powney, R., Beer, S. V., Plummer, K., Luck, J. and Rodoni, B.**, 2011. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australasian Plant Pathology*, 40(1), 87-97.
- Powney, R., Smits, T. H., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J. E. and Rodoni, B.**, 2011. Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to Rubus plants. *Journal of bacteriology*, 193(3), 785-786.
- Psallidas, P. G. and Tsiantos, J.**, 2000. Chemical control of fire blight. In: Fireblight: the disease and its causative agent, *E. amylovora* (Ed. Vanneste, J.L.), p 199–234. CABI Publishing, NY.
- Pujol, M., Badosa, E. and Montesinos, E.**, 2007. Epiphytic fitness of a biological control agent of fire blight in apple and pear orchards under Mediterranean weather conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 186–193.
- Pusey, P. L.**, 1997. Crab apple blossoms as a model for research on biological control of fire blight. *Phytopathology*, 87, 1096–1102.
- Pusey, P. L.**, 1999. Laboratory and field trials with selected microorganisms as biocontrol agents for fire blight. *Acta Horticulturae*, 489, 655–661.
- Rademacher, W.**, 2004. Prohexadione-Ca induces resistance to fire blight and other diseases. *EPPO Bulletin* 34 (3): 383.
- Roselló, M., Peñalver, J., Llop, P., Gorris, M. T., Cambra, M., López, M. M. and Montón, C.**, 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian journal of plant pathology*, 28(1), 30-41.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roselló, G., Bonaterra, A., Francés, J., Montesinos, L., Badosa, E. and Montesinos, E.,** 2013. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. *European journal of plant pathology*, 137(3), 621-633.
- Sands, D. C.,** 1990. Physiological criteria-determinate tests. In *Methods in Phytobacteriology*. (Edts. Klement, Z.; Rhudolp, K.; Sands, D. C.) Academia Kiado, Budapest, Hungary.
- Saygılı, H. ve Üstün, N.,** 1996. Studies on effectiveness of some chemicals to fire blight pathogen (*Erwinia amylovora* Burr. Winslow et al.). *Acta Hort.*, 411, 331-335.
- Saygılı H., Şahin, F., ve Aysan, Y.,** 2006. Fitobakteriyoloji, 219-230. Meta Basım, İzmir.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W.,** 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd Ed. APS. St. Paul. Minnesota, USA.
- Schnabel, E.L., Fernando, W.G.D., Meyer, M.P., Jones, A.L. and Jackson, L.E.,** 1999. Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol, *Acta Hortic.*, 489, 649–654.
- Schwarczinger, I., Kiss, E., Süle, S., Tóth, M. And Hevesi, M.,** 2011. Control of fire blight by bacteriophages on apple flowers, *Acta Hortic.*, 896, 457-462.
- Schroth, M. N., Thomson, S. V. and Moller, W. J.,** 1971. Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 69, 565-568.
- Sholberg, P. L., Bedford, K. E., Haag, P. and Randall, P.,** 2001. Survey of *Erwinia amylovora* isolated from British Columbia for resistance to bactericides and virulence on apple. *Can. J. Plant. Pathol.*, 23: 60-67.
- Shtienberg, D., Zilberstaine, M., Oppenheim, D., Herzog, Z., Manulis, S., Shwartz, H., and Kritzman, G.,** 2001. Efficacy of oxolinic acid and other

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- bactericides in suppression of *Erwinia amylovora* in pear orchards in Israel. *Phytoparasitica*, 29(2), 143-154.
- Smith, E. F., 1920.** An introduction to bacterial diseases of plants. W. B. Saunders, Philadelphia, 1, 688.
- Smits, T. H. M., Rezzonico, F., Kamber, T., Goesmann, A., Ishimaru, C. A., Stockwell, V. O. et al., 2010.** Complete genome sequence of *Pantoea vagans* plant-beneficial strain C9-1. *Journal of Bacteriology*, 192, 6486–6487.
- Sobieczewski, P., Chiou, C. S. and Jones, A. L., 1991.** Streptomycin-resistant epiphytic bacteria with homologous DNA for streptomycin resistance in Michigan apple orchards. *Plant Dis.*, 75, 1110-1113.
- Soylu, A., 1997.** İlman İklim Meyveleri – II. Uludağ Üniversitesi Ders Notları, No: 72, Bursa.
- Spinelli, F., Noferini, M. and Costa, G., 2004.** Near infrared spectroscopy (NIRs): perspective of fire blight detection in asymptomatic plant material. In *X International Workshop on Fire Blight 704* (pp. 87-90).
- Stockwell, V. O., Johnson, K. B. and Loper, J. E., 1996.** Compatibility of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* with antibiotics used to control fire blight. *Phytopathology*, 86(8), 834-840.
- Stockwell, V. O., McLaughlin, R. J., Henkels, M. D., Loper, J. E., Sugar, D., and Roberts, R. G., 1999.** Epiphytic colonization of pear stigmas and hypanthia by bacteria during primary bloom. *Phytopathology* 89:1162-1168.
- Stockwell, V. O., Johnson, K. B., Sugar, D. and Loper, J. E., 2002.** Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology*, 92(11), 1202-1209.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D., and Loper, J.E., 2010.** Control of fire blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pantoea vagans* C9-1

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

applied as single strains and mixed inocula. *Phytopathology* 100:1330-1339.

Summers W.C., 2001. Bacteriophage therapy, *Ann. Rev. Microbiol.*, 55, 437-451.

Taylor, R.K. and Hale, C.N. 1998. Identification and characterization of isolates of *Erwinia amylovora* from Cotoneaster in Australia. *Austral. Biotech.*, 8(6): 353-356.

Taylor, R.K., Guilford, P.J., Clark, R.G., Hale, C.N. and Forster, R.L.S., 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 29:35-43.

Teviotdale, B. L. and Viveros, M., 1999. Fruit Russetting and Tree Toxicity Symptoms Associated with Copper Treatments of Granny Smith Apple Trees (*Malus sylvestris* Mill.). *Acta Hort.* 489, 565-571.

Thomson, S.V., Schroth, M.N., Moller, W.J. and Reid, M.D., 1982. A forecasting model for fireblight of pear. *Plant Disease* 66, 576-577.

Thomson, S. V., M. N. Brisset, R. Chartier and J. P. Paulin., 1999 (b). Induced Resistance in Apple and Pear Seedlings to Fire Blight by BION and Correlation with Some Defense-Related Enzymes. *Acta Hort.* 489, 583-588.

Tosun, N. ve A. Ergün, 2002. Bitkisel Üretimde ve Tarımsal Savaşmada Yeni Bir Yaklaşım Olarak Bitki Aktivatörlerinin Rolü. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No: 109 Tatek/Tyuap Tarımsal Araştırma Yayın Ve Koordinasyonu 2002 Yılı Tarla Bitkileri Grubu Bilgi Alışveriş Toplantısı Bildirileri s.251-263.

TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu), 2014, Bitkisel üretim istatistikleri (Erişim tarihi: 12 Aralık 2015).

Turan, K. ve Tokgönül, S., 1993. Akdeniz Bölgesi meyve fidanlıklarında görülen fungal ve bakteriyel hastalıkların tespiti üzerinde çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 33 (3-4), 109-118.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ünlü, A.**, 2002. Türkiye'deki *Erwinia amylovora* İzolatlarının Elde Edilmesi ve Bu İzolatların, Patolojik, Biyokimyasal ve Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Van der Zwet, T., Oitto, W. A., and Brooks, H. J.**, 1970, Scoring system for rating the severity of fire blight in pear, 38-70, *Advances in Fruit Breeding*, E.C. Layne and H.A. Quamme (Eds.), Purdue University Press, West Lafayette, Indiana.
- Van der Zwet, T. and Keil, H.L.**, 1979. Fire blight a bacterial disease of rosaceous plants. *Agriculture Handbook*. Number: 510., 199p, U.S.A.
- Van der Zwet, T., Zoller, D. C. and Thomson, S. V.**, 1988. Controlling fire blight of pear and apple by accurate prediction of the blossom blight phase. *Plant Dis.*, 72, 467-472.
- Van der Zwet, T., and Beer, S. V.**, 1991, Fire Blight -It's Nature, Prevention and Control: A Practical Guide to Integrated Disease Management, U. S. Department of Agriculture, Agriculture Information Bulletin No. 631, 83 p.
- Van der Zwet, T. and Bell, R.L.**, 1995. Response of central European *Pyrus* germplasm to natural fire blight infection and artificial inoculation. *HortScience* 30, 1287–1291.
- Van der Zwet, T.**, 1996. Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* 411:7-8.
- Van der Zwet, T. and Bonn, W.G.**, 1999. Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* 489:167-168.
- Vanneste, J.L., Yu, J., Harper, G.E. and Perry, J.H.**, 1996. Plugs of immature pear fruit to assess the virulence of *Erwinia amylovora* and to study in the laboratory the interaction between biological control agents and the fire blight pathogen. *Acta Horticulturae* 411: 303-308.
- Vanneste, J. L. and Voyle, M. D.**, 1998. Genetic basis of streptomycin resistance in pathogenic and epiphytic bacteria isolated in apple orchards in New

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zealand. In *VIII International Workshop on Fire Blight* 489 (pp. 671-672).
- Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Yu, J. and Voyle, M. D.,** 2002. P10c: a new biological control agent for control of fire blight which can be sprayed or distributed using honey bees. *Acta Horticulturae*, 590, 231–236.
- Watkins, J. E.,** 1992. Fire blight of apple, pear and woody ornamentals. NebGuide, G92-1120-A.
- Wei, Z.M., Laby,R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer,A. and Beer ,S.V.,**1992. Harpin,elictor of hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*,257:1-13.
- Wei, Z. M. and Beer, S. V.,** 1996. Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance. *Acta Horticulturae* 411: 223–225.
- WHO,** 1969. World health Organization, Technical report No 430, Geneve.
- Wilson, M., Sigee, D. C., and Epton, H. A. S.,** 1990. *Erwinia amylovora* infection of hawthorn blossom: III. The nectary. *J. Phytopathol.*128:62-74.
- Wilson, M., and Lindow, S. E.,** 1993. Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology* 83:117-123.
- Winkler., V. W.,** 1997. Reduced Risk Concept for Prohexadione-Calcium, a Vegetative Growth Control Plant Growth Regulator in Apples. *Acta Horticulturae*, 451: 667– 672.
- Wodzinski V.S., Beer S.V., Zumoff C.H., Clardy J.C. and Coval S.J.,** 1990. Antibiotics produced by strains of *Erwinia herbicola* that are highly effective in suppressing fireblight. *Acta Horticulturae*, 273, 411-412.
- Yücel, F., Benlioğlu, K. and Çırakoğlu,B.,** 1998. A simple and quick way for diagnosis of *Erwinia amylovora*. Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 33-38 pp., Kuşadası, Turkey.
- Zhang, Y. and Geider, K.** 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by Pulsed- Field Gel Electrophoresis. *Appl. and Env.Mic.*, 63(11):4421-4426.

ÖZGEÇMİŞ

19/11/1990 tarihinde İzmir’de doğdu. İlköğrenimini 4.sınıfa kadar Bursa’da, 4.sınıfı Kırkağaç/MANİSA’da, orta öğrenimini ise yine Bursa’da tamamladı. 2008 yılında Bursa Erkek Lisesi’nin Yabancı Dil Ağırlıklı bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği bölümünü kazandı. 2012 yılında ise Bitki Koruma Bölümü’nden lisans derecesiyle mezun oldu. Mezun olduktan sonra Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitime başladı. 2013-2015 yılları arasında Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi (TOTEM)’nde part-time öğrenci olarak çalıştı. 2015 yılı Mart ayından itibaren aynı merkezde patoloji laboratuvar sorumlusu olarak görev yapmaktadır.