



## *Erwinia amylovora* Enfeksiyonu Sonrası Elma, Armut ve Ayva Çeşitlerinde Konukçu Protein Miktarlarının Belirlenmesi<sup>#</sup>

Şerife Çetin<sup>1</sup>, Kubilay Kurtuluş Baştaş<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 42000 Selçuklu/Konya, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

<sup>#</sup>Bu çalışma Şerife Çetin'in yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Geliş 30 Eylül 2014  
Kabul 30 Ekim 2014  
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

**Anahtar Kelimeler:**  
*Erwinia amylovora*  
Elma  
Armut  
Ayva  
Protein  
SDS-PAGE  
Dayanıklılık

### ÖZET

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

\* Sorumlu Yazar:

E-mail: kbastas@selcuk.edu.tr

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 3(3): 154-163, 2015

## Determination of Quantities of Host Protein after Infection with *Erwinia amylovora* of Apple, Pear And Quince Cultivars

### ARTICLE INFO

**Article history:**

Received 30 September 2014

Accepted 30 October 2014

Available online, ISSN: 2148-127X

**Keywords:**

*Erwinia amylovora*  
Apple  
Pear  
Quince  
Protein  
SDS-PAGE  
Resistance

### ABSTRACT

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

\* Corresponding Author:

E-mail: kbastas@selcuk.edu.tr

## Giriş

Meyvecilik, ülkemiz tarımsal üretimi içinde önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde 2012 yılı itibariyle, 1.937.000.000 hektar alanda 17.810.942 ton meyve üretilmiştir. Bu üretim miktarının %19'luk kısmını yumuşak çekirdekli meyveler oluşturmaktadır (Anonim, 2012). Türkiye önemli yumuşak çekirdekli meyve üreticisi ülkelerden biri olmakla birlikte bu meyve grubuna giren elma, armut ve ayvanın anavatanlarından biri olarak da ayrı bir öneme sahiptir (Ülkümen, 1938; Özbek, 1978). Ülkemiz dünyada yetiştiriciliği yapılan 76.378.738 ton elma üretiminin %4'nü oluşturmasıyla ile 3. sırada, 23.580.845 ton armut üretiminde 7. sırada ve 596.532 ton ayva üretiminin %23'ü ile 1. sırada yer almaktadır (Anonim, 2012).

Yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde hastalık ve zararlılardan dolayı önemli kalite ve verim kayıpları meydana gelmektedir. *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow ve ark.'nin neden olduğu ateş yanıklığı, yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının en tehlikeli bakteriyel hastalığıdır. Etmenin, *Pyrus* ve *Malus* cinslerinin yanı sıra Rosaceae familyasının 37 cinsine ait 400 türde hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu cinslerin içinde en şiddetli yanıklık belirtisi gösterenler ve ekonomik olarak, önemli ölçüde zarar görenler başta *Pyrus* ve *Malus* olmak üzere *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha* ve *Sorbus* cinsleridir (Zwet ve Keil, 1979). Ateş yanıklığı dünya çapında 46'dan fazla ülkede ateş yanıklığı rapor edilmiştir ve konukçularında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Zwet ve Beer, 1995; Norelli ve ark., 2003; Zwet, 2006; Scheer, 2009). Türkiye'de ise etmen ilk defa 1985 yılında Afyon ili Sultandağı ilçesinde armutlarda tespit edilmiştir (Öktem ve Benlioğlu, 1988).

Ateş yanıklığına karşı günümüze kadar uygulanan mücadele yöntemlerinin hiçbirinde etkili ve kalıcı bir çözüm belirlenmemiştir. Günümüzde çalışmalar, konukçu patojen arasındaki etkileşimin anlaşılması üzerinde yoğunlaşmaktadır. Konukçu bitkiler, hastalıkların oluşturacağı zararlara engel olmak için dayanıklılık (Resistance, R) genlerini geliştirmişlerdir. Dayanıklılık geninin ürünü olan proteinler hastalık etmeninin bitkiye girmesi sırasında salgıladığı avirülens (Avr) gen ürünlerini tanıma yeteneğine sahiptirler. Dayanıklılık geninin ürünü olan proteinler tarafından alınan sinyal herhangi bir yolla hücre içerisindeki gerekli yerlere iletilindiğinde, bitki aktif savunma sistemi ve tepki mekanizması çalışmakta ve sonuçta da dayanıklılık olgusu ortaya çıkmaktadır (Dixon ve Lamb, 1990; Lamb, 1994).

Büyük çeşitliliğe ve farklı işlevlerine karşın temelde oldukça benzer yapıları olan proteinlerin, üstlendikleri önemli görevler nedeniyle yapılarının aydınlatılması, sentezlerinin ve işlevlerinin ortaya konulması çok büyük önem taşımaktadır (Temizkan ve Arda, 2004). Nicel ve nitel protein analizleri metabolizmanın işleyişi hakkında önemli ipuçları sağladığından canlı ile ilişkili tüm temel bilim dallarında büyük yer tutmaktadır.

Patojenesisle ilişkili (Pathogenesis Related; PR) proteinler, sağlıklı bitkilerde yaygın olarak ve eser miktarlarda bulunurlar ancak bitkilerin virüs, viroid,

fungus veya bakteriler ile enfeksiyondan sonra çok yüksek konsantrasyonlarda üretilirler (De Wit ve Bakker, 1980; Gianinazzi ve ark., 1980; Ahl ve ark., 1981; Camacho Henriquez ve Sanger, 1982). PR proteinleri düşük molekül ağırlığına (6-43kDa) sahip proteinlerdir ve genellikle apoplastta birikmektedirler. Dayanıklı bitkilerde, PR protein birikimi hassas bitkilere göre daha fazla olmaktadır (Van Loon, 1999).

*E. amylovora* enfeksiyonu ile elmada farklı PR proteinlerin biriktiği belirlenmiştir (Venisse ve ark., 2002; Norelli ve ark., 2009). Bonasera ve ark. (2006), elmada, *E. amylovora* ile inokulasyondan sonra PR1 protein ifadesinde artış olmadığını bunun aksine patojen saldırısına karşı PR1 benzeri proteinlerin (PR2, PR5 ve PR8) ifade edildiği proteinlerinin ifadesinin arttığını belirlemişlerdir (Bonasera ve ark., 2006; Milcevicova ve ark., 2010).

Bu çalışmada, dünyada ve ülkemizde uygun şartlar altında büyük zararlara sebep olan *E. amylovora*'nın bitkilerde oluşturduğu biyotik stresin elma, armut ve ayva çeşitlerinde, zamana bağlı olarak, bitki savunma mekanizmasında bulunan toplam protein miktarları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Bitki Materyali ve Yetiştirme Koşulları

Denemede, Breaburn, Gala, Golden ve Fuji elma çeşitleri, Santa Maria ve Williams armut çeşitleri, Ekmek ve Eşme ayva çeşitlerinin sağlıklı gelişim gösteren 3 yaşındaki fidanları materyal olarak kullanılmışlardır. Armut ve ayva fidanları Arelyo Fidancılık, Konya, elma fidanları Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Isparta'dan temin edilmiştir. Fidanlar, toprak-yanmış gübre-kum (1:1:1) karışımı içeren 6 kg'lık saksılara dikilmişler, 23-25°C sıcaklık, 12.000-14.000 lux aydınlatma ve %65-70 nispi nem koşullarına sahip serada yetiştirilmişlerdir. Dikimden sonra bitkilere, toplamda 15 gr kalsiyum nitrat ve 50 ml hümik asit gübreleri 7 gün arayla yarı dozları uygulanmıştır (Kacar ve Katkat, 1999).

### Bakteriyel İzolatlar ve Bitkilerin İnokulasyonu

Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan seçilen 10 adet *E. amylovora* izolatına, Norelli ve ark. (1988)'a göre virülens testi yapılmış ve yüksek virülent olarak belirlenen iki izolat, Ea234-1 (%84) ve Ea240-3 (%91), denemelerde kullanılmıştır. *E. amylovora* izolatlarının stok kültürden Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine ekimleri yapılmış ve 48 saatlik kültürler inokulasyon için kullanılmışlardır. İnokulasyon için  $10^8$  hücre  $ml^{-1}$  yoğunlukta (OD: 0.15, 660 nm dalga boyunda) süspansiyonları hazırlanmıştır. Bakteriyel süspansiyona batırılan steril bir makas yardımıyla bitkilerin en genç yapraklarının uç kısmı kesilmiş ve bakteriyel süspansiyon içerisine 30 sn kadar batırılmıştır (Norelli ve ark., 1984 ve 1986). İnokulasyonlar, bitkilerin sürgün uzunları 25 cm'e ulaştıklarında yapılmıştır. Bu durum farklı bitki türleri ve çeşitlerinde farklılıklar göstermiştir. Bitkiler, izolat numarası, inokulasyon tarihi ve inokulasyon saati ile etiketlenmişlerdir

#### Bitki Örneklerinin Alınması

Bakteri inokulasyonundan sonraki 24, 36 ve 72. saatlerde, kontrol bitkilerde dahil olmak üzere, inokulasyon yapılan sürgün üzerindeki en genç olandan başlanarak alınan yaprak örnekleri, alüminyum folyoya sarıldıktan sonra sıvı azota batırılarak dondurulmuştur. Protein analizi yapıncaya kadar örnekler -80°C’ de saklanmıştır (Bonasera ve ark., 2006).

#### *E. amylovora*’nın Re-izolasyonu ve Tanınması

Koch postülatları gereği, bakteriyel inokulasyondan 15 gün sonra sürgün ve yaprak örnekleri alınarak aseptik koşullarda Nutrient Agar (NA) besi yerine izolasyon yapılmış ve 23-25°C’ de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 36 saat sonra oluşan tipik kolonilerden çizgi ekim yapılmıştır (Saygılı, 1995). Etmten, biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik olarak, Fahy ve Persley (1983), Lelliot ve Stead (1987), Schaad ve ark. (2001)’e göre tanılanmıştır. Elde edilen izolatların PCR ile tanılanmasında, bakterinin pEA29 plazmidini için dizayn edilen spesifik A/B primer çifti kullanılarak, 1kb’lik bölgenin amplifikasyonu yapılmıştır (Lecomte ve ark., 1997; Bereswill ve ark., 1992). Spesifik A ve B primerlerinin baz dizilişi ve PCR protokolü; A: (5’CGGTTTTTAACGCTGGG3’) ve B: (5’GGGCAAATACTCGGATT3’), Termal cyclus programı; 95°C de 3 dk (1 döngü), 94°C de 1 dk, 52°C de 1 dk, 72°C de 1 dk (35 döngü), 72°C de 10 dk (1 döngü)’dir.

#### Bitki Örneklerinden Toplam Protein İzolasyonu

Bitki örnekleri her bitki çeşidi ve örnekleme zamanına göre 4’er adet olmak üzere 0,5’er g tartılarak, 0,1 M sodyum fosfat tamponu ve %2 PVPP ile homojenize edilmiştir. Daha sonra 4°C’ de 14000 rpm’ de 30 dk. santrifüj edilerek süpernatantları yeni eppendorf tüplere alınmıştır (Ben Khaled ve ark., 2002).

Bitki ekstraktlarının protein içeriği Bradford (1976)’ a göre belirlenmiştir. Protein özütlerinin konsantrasyonunu belirlemek için Coomassie Brilliant Blue reaktif ve protein standartlarının hazırlanması için Bovin Serum Albümin (BSA) kullanılmıştır. Bitki örneklerindeki protein miktarı 595 nm’ de absorbans değerleri ölçülmüştür. Örneklerin total protein miktarları bu çalışmada oluşturulan protein standart eğri grafiği kullanılarak belirlenmiştir.

#### SDS-PAGE Analizi

*E. amylovora* inokulasyonundan 24, 36 ve 72. saatlerde izole edilen proteinlerin molekül ağırlıkları, SDS-PAGE analizi Laemmli (1970)’e göre belirlenmiştir. SDS-PAGE analizinde proteinler, yükleme jeli (%5): [Akrilamid/bis 1,6 ml, Tris (pH 6,8) 2,5 ml, %10 SDS 0,1 ml, ddH<sub>2</sub>O 6 ml, TEMED 5 µl ve Amonyum persülfat 50 µl] ve ayırma jeli (%12): [Akrilamid/bis 12 ml, Tris (pH 8,8) 7,5 ml, %10 SDS 0,3 ml, ddH<sub>2</sub>O 10 ml, TEMED 15 µl ve Amonyum persülfat 150 µl] kullanılarak ayrıştırılmıştır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra yükleme jelindeki kuyucuklar saf su ile yıkanmış ve elektroforez tankına 5X TBE doldurularak jeldeki kuyucuklara 20 µl örnek proteinler yüklenmiştir. Jeldeki ürünler 30 mA’lık akımda seperasyona tabi tutulmuşlar ve elektroforezden sonra jel, izopropanollü fiksatif içinde, oda sıcaklığında 30 dk düşük hızda çalkalanmıştır. İzopropanollü fiksatif dökülerek hızlı boyama çözeltisi

katılmış ve oda sıcaklığında en az 2 saat çalkalanmıştır. Daha sonra boyama çözeltisi uzaklaştırılmış ve jel yıkama çözeltisinde çalkalanarak yıkanmıştır. Protein bantları görünür hale geldikten sonra jeller fotoğraflanmıştır (Arda ve Ertan, 2004).

#### İstatistiksel Analizler

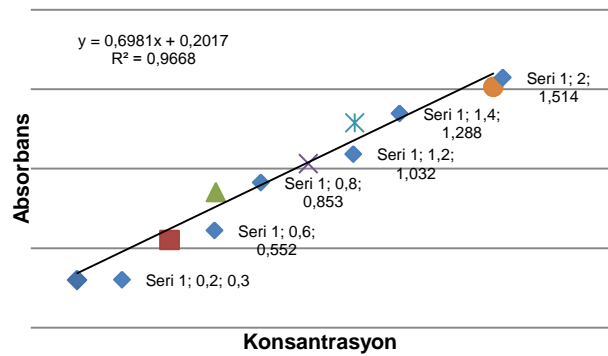
Elde edilen tüm bulgulara, MINITAB 14 (ANOVA) programında Varyans analizi ve MSTAT programında Duncan testi kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır.

#### Sonuçlar ve Tartışma

Farklı elma, armut ve ayva çeşitlerinde, *E. amylovora* enfeksiyonu sonucu, konukçu protein miktarlarındaki zamana bağlı değişimin belirlenmesi amacıyla yürütülen denemelerde, konukçu düzeyinde farklılıklar ve SDS-PAGE analizi ile spesifik bantlar elde edilmiştir.

#### Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi İçin Hazırlanan Standart Eğri

Bradford (1976) yöntemine göre hazırlanan protein standartlarının ve *E. amylovora* inokulasyonu sonrası zamana (24, 36, ve 72. saatlerde) bağlı olarak armut, elma ve ayva fidanlarından alınan yaprak örneklerine ait protein ekstraktlarının biyofotometre’de 595 nm’ de absorbans değerleri elde edilmiştir (Şekil 1). Çalışmamızda elde edilen standart eğrinin R=0,9668 değeri, lineer regresyonun güvenilir olduğunu göstermiştir.



Şekil 1 Bradford Yöntemine Göre Hazırlanan Protein Standart Eğri Grafiği

#### Elma Çeşitlerinde *E. amylovora* Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarları

Ea234-1 izolatu ile enfeksiyonunun, Braeburn, Fuji, Gala ve Golden elma çeşitlerinde toplam protein miktarı ve örnekleme zamanları arasındaki interaksiyon istatistiki olarak p<0,01 seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 1). Enfeksiyondan sonraki 24. saatte total protein miktarında Braeburn, Fuji ve Golden sayısal olarak artış belirlenirken, Gala çeşidinde ise sayısal olarak küçük bir azalma göstermiştir. Elde edilen verilere göre, enfeksiyondan sonraki 24. saatte Fuji çeşidinde toplam proteinin kontrol bitkilere oranla en yüksek sayısal değere, 36. saatte Braeburn ve Gala çeşidinde en yüksek ve 72. saatte Golden çeşidinde en düşük sayısal değere ulaşmıştır (Çizelge 1).

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak  $p < 0,01$  seviyesinde önemli bulunmuştur. Bu verilere göre, Ea234-1 enfeksiyonundan sonra Braeburn çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak  $p < 0,01$  seviyesinde önemli bulunmuştur. Bu verilere göre kontrole oranla 24. saatte alınan örneklerin protein miktarında artış, 36. ve 72. saatte alınan örneklerin protein miktarında düşüş belirlenmiştir (Çizelge 3).

Ea240-3 izolatu ile enfeksiyon sonrası elma çeşitleri ve örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak  $p < 0,01$

seviyesinde önemli bir ilişki bulunmuştur. Sayısal olarak enfeksiyondan sonraki 24. saatte toplam protein miktarı kontrol bitkilere oranla Fuji ve Gala çeşitlerinde, 36. ve 72. saatlerde Braeburn çeşidinde artışlar görülmüştür (Çizelge 4).

Ea240-3 izolatu ile enfeksiyondan sonra toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak  $p < 0,01$  seviyesinde önemli bulunmuştur. Bu verilere göre Braeburn çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5). Örnekleme zamanları arasında istatistiki farklılık belirlenmemiştir.

Çizelge 1 Ea234-1 izolatu enfeksiyondan sonra elma çeşitleri ve örnekleme zamanları arasındaki interaksiyona bağlı olarak belirlenen toplam protein miktarları

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

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki, Kontrol: Su inokule edilmiş bitki, \*Çeşit ve örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p < 0,01$ )

Çizelge 2 Ea234-1 izolatu ile enfeksiyondan sonra elma çeşitleri ve toplam protein miktarları arasındaki interaksiyon

Çeşit	Braeburn	Fuji	Gala	Golden
Ortalama	1,23±0,37a*	1,10±0,40b	0,92±0,15b	0,98±0,45b

\*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p < 0,01$ )

Çizelge 3. Ea234-1 izolatu ile enfeksiyondan sonra örnekleme zamanları bakımından değerlendirilmesi

Ortalama	Örnekleme Zamanları					
	24. saat		36. saat		72. saat	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
	0,90±0,17b*	0,99±0,13b	0,95±0,25b	0,90±0,22b	1,60±0,49a	0,99±0,32b

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki, Kontrol: Su inokule edilmiş bitki, \*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p < 0,01$ )

Çizelge 4 Ea240-3 izolatu enfeksiyondan sonra elma çeşitleri ve örnekleme zamanları arasındaki interaksiyona bağlı olarak belirlenen toplam protein miktarları

Çeşit*	Örnekleme Zamanları					
	24. saat		36. saat		72. saat	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Braeburn	1,60±0,10a	1,48±0,17abc	1,10±0,10abcd	1,33±0,49ab	0,80±0,15bcd	1,27±0,50abc
Fuji	0,80±0,15bcd	0,93±0,60bcd	1,10±0,10abcd	0,97±0,15bcd	1,60±0,10a	1,37±0,50ab
Gala	0,80±0,10bcd	1,00±0,20bcd	0,80±0,10bcd	1,20±0,53abcd	0,70±0,10cd	0,67±0,06d
Golden	0,90±0,10bcd	0,87±0,29bcd	1,20±0,10abcd	0,67±0,06d	0,90±0,10bcd	0,67±0,06d

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki, Kontrol: Su inokule edilmiş bitki, \*Çeşit ve örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p < 0,01$ )

Çizelge 5 Ea240-3 izolatu ile enfeksiyondan sonra elma çeşitleri ve toplam protein miktarları arasındaki interaksiyon

Çeşit	Braeburn	Fuji	Gala	Golden
Ortalama	1,18±0,38a*	1,13±0,41a	0,86±0,28b	0,87±0,22b

\*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p < 0,01$ )

**Armut Çeşitlerinde E. amylovora Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarları**

Ea234-1 izolatu ile enfeksiyonu sonrası, armut çeşitleri ve örnekleme zamanları arasındaki interaksiyonun toplam protein miktarına olan etkisi istatistiki olarak  $p<0,05$  seviyesinde önemli bulunmuş, enfeksiyondan sonraki 24, 36 ve 72. saatlerde total protein miktarları Santa Maria çeşidinde kontrol bitkilere oranla sayısal olarak artış göstermiştir. Williams çeşidinde ise 36 ve 72. saatlerde toplam proteinlerde sayısal olarak düşüş belirlenmiştir (Çizelge 6).

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak  $p<0,05$  seviyesinde önemli bulunmuş, Ea234-1 izolatu ile enfeksiyonu sonrası Santa Maria çeşidinin en yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 7). Örnekleme zamanları arasındaki farklılık istatistiki olarak önemsiz olarak belirlenmiştir.

Ea240-3 izolatu ile enfeksiyon sonrası armut çeşitleri ve örnekleme zamanlarının toplam protein miktarına olan etkisi istatistiki olarak  $p<0,01$  seviyesinde önemli bulunmuştur. Enfeksiyondan sonraki 24 ve 36. saatlerde toplam protein miktarı kontrol bitkilere oranla Santa Maria çeşidinde artış gösterirken, Williams çeşidinde ise 36. saatte düşüş belirlenmiştir (Çizelge 8).

Ea240-3 izolatu ile enfeksiyon sonrası toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasındaki ve örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan  $p<0,01$  seviyesinde önemli bulunmuştur (Çizelge 9 ve 10). Bu verilere göre, Santa Maria çeşidinin daha yüksek protein miktarına sahip olduğu tespit edilirken (Çizelge 9), kontrol bitkilere oranla 24 ve 36. saatte alınan örneklerin toplam protein miktarında artış, 72. saatte alınan örneklerin toplam protein miktarında düşüş belirlenmiştir (Çizelge 10).

Çizelge 6 Ea234-1 izolatu ile enfeksiyon sonrası armut çeşitleri ve örnekleme zamanları arasındaki interaksiyona bağlı olarak belirlenen toplam protein miktarları

Çeşit	Örnekleme Zamanları					
	24. saat		36. saat		72. saat	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Santa Maria	0,60±0,10ab	0,83±0,15a	0,60±0,10ab	0,87±0,35a	0,40±0,10b	0,63±0,35ab
Williams	0,90±0,10a	0,91±0,35a	0,90±0,10a	0,83±0,06ab	0,90±0,10a	0,73±0,32ab

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki, Kontrol: Su inokule edilmiş bitki, \*Çeşit ve örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p<0,05$ )

Çizelge 7 Toplam protein miktarı bakımından armut çeşitleri arasındaki değerlendirme

Çeşit	Santa Maria	Williams
Ortalama	1,23±0,25a	1,10±0,21b

\*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p<0,05$ )

Çizelge 8 Ea240-3 izolatu ile enfeksiyon sonrası armut çeşitleri ve örnekleme zamanları arasındaki interaksiyona bağlı olarak belirlenen toplam protein miktarları

Çeşit*	Örnekleme Zamanları					
	24. saat		36. saat		72. saat	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Santa Maria	0,60±0,10de	0,83±0,12cd	0,70±0,10cde	1,17±0,06a	1,10±0,10ab	0,77±0,06cd
Williams	0,60±0,10de	0,63±0,21de	0,90±0,10bc	0,70±0,10cde	0,50±0,10e	0,50±0,10e

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki, Kontrol: Su inokule edilmiş bitki, \*Çeşit ve örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p<0,01$ )

Çizelge 9 Ea240-3 izolatu ile enfeksiyon sonrası toplam protein miktarları bakımından armut çeşitleri arasındaki değerlendirme

Çeşit	Santa Maria	Williams
Ortalama	0,86±0,23a*	0,64±0,18a

\*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p<0,01$ )

Çizelge 10 Ea240-3 izolatu ile enfeksiyon sonrası toplam protein miktarları bakımından örnekleme zamanlarının değerlendirilmesi

Zaman	24. Saat		36. Saat		72. Saat	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Ortalama	0,60±0,09c*	0,73±0,19c	0,80±0,14b	0,93±0,27a	0,80±0,34b	0,63±0,16c

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki, Kontrol: Su inokule edilmiş bitki, \*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p<0,01$ )

*Ayva Çeşitlerinde E. amylovora Enfeksiyonu Sonrası Belirlenen Toplam Protein Miktarları*

Ea234-1 izolatu ile enfeksiyon sonrası ayva çeşitlerinde örnekleme zamanına bağlı toplam protein miktarına etkiler istatistiki olarak  $p<0,01$  seviyesinde önemli bulunmuştur. Enfeksiyondan sonraki 24 ve 36. saatlerde kontrol bitkilere oranla her iki ayva çeşidinde de sayısal olarak artış ve 72. saatte düşüşler belirlenmiştir (Çizelge 11).

Toplam protein miktarı bakımından çeşitler arasında istatistiki açıdan farklılıklar  $p<0,01$  seviyesinde önemli bulunmuş, Eşme çeşidinin daha yüksek protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 12). Örnekleme zamanları arasında istatistiki olarak farklılık belirlenmemiştir.

Ea240-3 izolatu ile enfeksiyon sonrası, ayva çeşitlerinde örnekleme zamanına bağlı total protein miktarları ve çeşitlerdeki toplam protein miktarları istatistiki olarak farklılık göstermemiştir. Örnekleme zamanları arasındaki istatistiki farklılıklar  $p<0,05$  seviyesinde belirlenmiş, kontrol bitkilere oranla 24. ve 36. saatte alınan örneklerin protein miktarında düşüş, 72. saatte alınan örneklerin protein miktarında artış belirlenmiştir (Çizelge 13).

Konukçu patojen interaksiyonları sonucu özellikle *E. amylovora* enfeksiyon sonrası bitkilerdeki protein çalışmaları sınırlı sayıda olup bunlarda elma üzerinde yoğunlaşmaktadır. Ateş yanıklığı hastalığının önemli iki konukçusu olan armut ve ayvalarda yapılan bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu yönüyle çalışmamız, her üç konukçuyu kapsamı ve total proteinlerin belirlenmesi, SDS-PAGE analizi ile spesifik protein ifadelerinin belirlenmesi ve tüm bu verilerin birbirleriyle kıyaslanması açısından önem arz etmektedir.

Çalışmamıza paralellik gösteren bazı araştırmalar, bulgularımızı doğrular yönde sonuçlara ulaşmıştır.

Venisse ve ark. (2002)'nin yaptığı çalışmada, iki elma çeşidinde *E. amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* ve *E. amylovora hrp* mutanti patojenlerin inokulasyonundan sonraki 6. ve 72. saat arasında protein miktarlarındaki değişimleri Bradford (1976) metodunu kullanarak gözlemlemiştir. PR protein ailesinden kitinaz,  $\beta$ -1,3-glukanaz ve peroksidaz aktivitelerinin 48. saatte maksimum seviyeye ulaştığı ve daha sonrasında yavaş yavaş azaldığı saptanmıştır.

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

Ponciano ve ark. (2007), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ile çeltik yapraklarının enfeksiyonundan sonra 72. saatte PR proteinleri OsPR1a, OsPR1b ve OsPR10a ifadelerinin arttığını belirlemiştir. Hou ve ark. (2012), ise *X. o. pv. oryzae* ile enfeksiyondan sonra çeltikte 10 PR proteininden 6'sının (PR1, PR2, PR3, PR4b, PR8 ve PR-pha) ifadesinin arttığı, 4' ün (PR5, PR6, PR15 ve PR16) ifadelerinde değişiklik göstermediğini ifade etmişlerdir.

Venture ve Baby Gold5 isimli iki şeftali çeşidinin *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* ile inokulasyonundan sonraki ilk 48 saat içinde PR protein ailesinden iki PR1 (Pp-PR1a, Pp-PR1b) ve üç PR5 (Pp-TLP1, Pp-TLP2 ve Pp-TLP3) proteinlerinin ifadeleri gözlemlenmiş, inokulasyondan sonraki 8. saatte her iki çeşitte de PR proteinlerin ifadesi azaldığı, 24. saatte maksimum seviyeye ulaştığı ve 48. saatte azalmaya başladığı görülmüştür. Pp-PR1a hariç bütün PR proteinlerin dirençli çeşitte (Venture) daha yüksek seviyede ifade edildiği saptanmıştır (Sherif ve ark., 2012).

Çizelge 11 Ea234-1 izolatu enfeksiyondan sonra ayva çeşitleri ve zamanlar arasındaki interaksiyona bağlı olarak belirlenen toplam protein miktarları

Çeşit*	Örnekleme Zamanları					
	24. saat		36. saat		72. saat	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Ekmek	0,50±0,10e	0,87±0,29cde	1,40±0,10ab	1,60±0,10a	1,00±0,10bcd	0,83±0,21cde
Eşme	1,20±0,10abc	1,32±0,10ab	0,60±0,10de	1,57±0,40a	1,40±0,10ab	1,00±0,36bcd

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki, Kontrol: Su inokule edilmiş bitki, \*Çeşit ve örnekleme zamanları arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p<0,01$ )

Çizelge 12 Ea234-1 izolatu ile enfeksiyondan sonra ayva çeşitlerinin toplam protein miktarı bakımından değerlendirilmesi

Çeşit	Ekmek	Eşme
Ortalama	0,87±0,33b*	1,13±0,38a

\*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p<0,01$ )

Çizelge 13 Toplam protein miktarı bakımından zamanlar arasındaki değerlendirme

Zaman	24. Saat		36. Saat		72. Saat	
	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek	Kontrol	Örnek
Ortalama	0,90±0,14c*	0,82±0,26c	1,30±0,34a	0,88±0,47c	0,80±0,09c	1,10±0,26b

Örnek: *Erwinia amylovora* inokule edilmiş bitki, Kontrol: Su inokule edilmiş bitki, \*Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemlidir ( $p<0,05$ )

Yürütülen çalışmamızda, iki adet yüksek virulent *E. amylovora* izolatu ile enfeksiyon sonrası elma çeşitlerinde genel olarak 24. saatte protein miktarının arttığı, 36. ve 72. saatte azaldığı belirlenmiştir. Armut ve ayva çeşitlerinde ise enfeksiyondan sonraki 24. ve 36. saatte protein miktarının arttığı, 72. saatte protein miktarının azaldığı belirlenmiştir. Bu veriler, arazi koşulları ve farklı çeşitler üzerinde karşılaştırmalı olarak incelenmelidir. Elma çeşitleri içerisinde Braeburn, armut çeşitlerinde Santa Maria ve ayva çeşitlerinde Eşme çeşidinin toplam protein miktarlarının örnekleme zamanına bağlı olarak diğerlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Burum bitkilerin *E. amylovora*'ya karşı dayanıklılık düzeyleri ile ilişkilendirildiğinde, Braeburn elma çeşidinin elma çeşitleri içinde yüksek hassas olduğu ayrıca Santa Maria çeşidi armudun Williams çeşidine kıyasla daha hassas olduğu önceki çalışmalarda bildirilmektedir (Momol ve ark., 1993; Baştaş ve Maden, 2004). Bu durum, toplam protein miktarı ile birlikte, farklı bazı bitki savunma mekanizmalarının aktivasyonu ile bitkinin hassasiyet ya da dayanıklılıkla ilişkilendirilebileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. Bu sebeple, *E. amylovora*'ya karşı PR proteinlerinin ifadesi (özellikle armut ve ayva gibi konukçularda) devam eden çalışmalarımızda ele alınmıştır.

#### *Erwinia amylovora*'nın Re-izolasyonu ve Tanılaması

Koch postulatları gereği, *E. amylovora*'nın re-izolasyonundan sonra, izolatlar biyokimyasal ve fizyolojik testlere; 36°C' de gelişim, indol üretimi, King B besi yerinde fluoresan pigment oluşumu, maltose, glyserol ve mannitol'den asit üretimi için negatif sonuç verirken, oksidatif/fermantaif test, aesculin ve jelatinin hidrolizi, sorbitol'den asit üretimine pozitif reaksiyon göstermişlerdir. PCR amplikonları ise 1kb'lik değere sahip olmuşlar (Şekil 2), yapılan tüm testlere göre izolatlar *E. amylovora* olarak tanılanmıştır.

#### Virulent *E. amylovora* İzolatlarının Enfeksiyonu Sonrasında Elma, Armut ve Ayva Çeşitlerinden Saflaştırılan Proteinlerin SDS-PAGE Analiz Sonuçları

*E. amylovora* izolatları Ea234-1 ve Ea240-3 ve saf su inokulasyonu sonrası zamana (24, 36, ve 72. sa) bağlı olarak elma, armut ve ayva fidanlarından alınan yaprak örneklerine ait protein ekstraktları SDS-PAGE (Laemmli, 1970) analizine tabi tutulmuştur. Farklı molekül ağırlıklarına sahip protein fraksiyonları elde edilmiştir. Elma çeşitlerinde yaklaşık 100, 70, 55 ve 35 kDa, armut çeşitlerinde yaklaşık 55-35 kDa ve ayva çeşitlerinde yaklaşık 250, 130, 100, 70, 55 ve 35 kDa molekül ağırlığında protein bantları belirlenmiştir (Şekil 2).

*E. amylovora*'nın en önemli patojenite faktörleri ekzopolisakkarit amylovan ve *hrp-dsp* gen bölgesinden kodlanan proteinlerdir (Bugert ve Geider, 1995; Bogdanove ve ark., 1998). *E. amylovora* tarafından salgılanan Tip Üç Salgılama (TTSS) proteinleri, HrpA HrpN, HrpW, AvrRpt2EA, HopC1 ve DspA/E' dir (Oh ve Beer, 2005; Zhao ve ark., 2005). HrpN ve HrpW harpin familyasına ait proteinlerdir. HrpN ve HrpW proteinleri

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

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

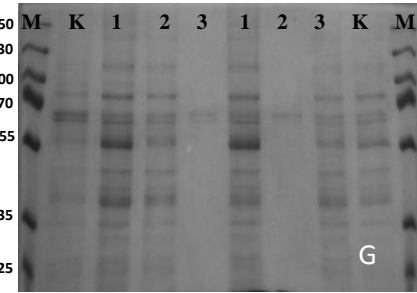
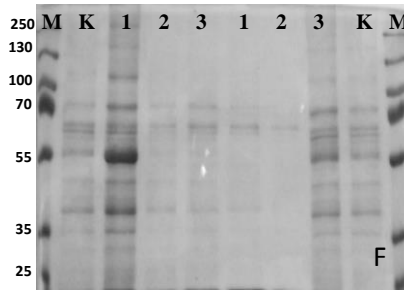
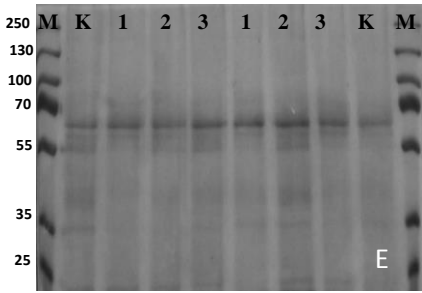
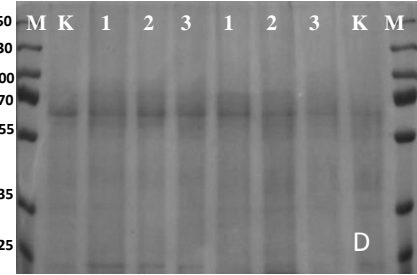
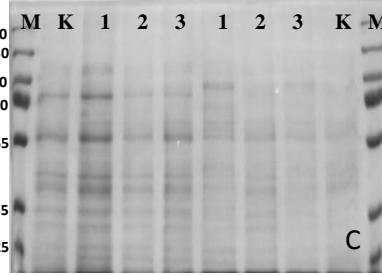
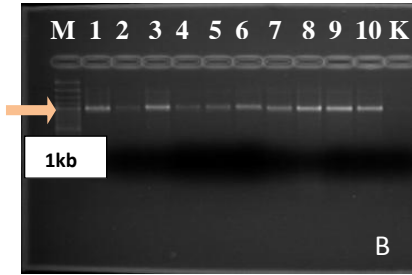
Borejsza-Wysocka ve ark. (2006), Elmada DIPM proteinlerini kodlayan genleri susturarak *E. amylovora*'nın DspA/E proteinleriyle etkileşimini ve hasatlık gelişimini engellemişlerdir. Bu genlerin susturulmasıyla bitkide hastalığa karşı direnç sağlanmıştır.

Oh ve Beer (2007), maya ikili hibrit sistemini kullanarak elmada *E. amylovora* HrpN proteinin etkileşim gösterdiği HIPM proteinini bulmuşlardır. HIPM plasma membranıyla ilişkili ve sinyal peptit fonksiyonu göstermektedir. HIPM konukçu bitkide hassasiyeti arttırmaktadır.

Çalışmamızda, daha önce elmalarda belirlenen DIPM proteinlerinin (Meng ve ark., 2006), molekül ağırlıklarına paralel sonuçlar elde edilirken daha önce üzerinde literatür belirleyemediğimiz iki konukçu armut ve ayva için ise sırasıyla yaklaşık 55-35 kDa ve 250-35 kDa molekül ağırlığında protein bantları elde edilmiştir. Bu oluşan bantların hangilerinin PR protein olabileceği konusundaki çalışmalarımız devam etmektedir. Muhtemel bulgular literatür için yeni kayıt niteliği taşıyabilecektir.

Bu çalışma ile elma, armut ve ayva bitkilerinde *E. amylovora*'nın oluşturduğu biyotik stresin bitki savunma mekanizmasındaki ve hastalık oluşumundaki proteinlerin miktarı araştırılmıştır. Elde edilen bulgular farklı konukçu ve bunların çeşitleri arasındaki toplam protein miktarının bitki savunma sistemindeki etkinliklerinin belirlenmesine, konukçu patojen arasındaki etkileşimin anlaşılmasına ve hastalık yönetiminde etkili stratejilerin geliştirilmesi gibi konular da çalışmalara örnek ve bilgi verici olabileceği düşünülmektedir. Bitkinin *E. amylovora*'dan kaynaklanan biyotik stres reaksiyonlarına karşı savunmasından sorumlu proteinlerin özel olarak incelenebilmesi ve bunların bitki savunmasındaki rollerinin ortaya konması ile hastalıkla mücadele stratejilerinin geliştirilmesinde önemli sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir.





Şekil 2 A; *Erwinia amylovora* inokulasyonundan 20 gün sonra görülen tipik belirtiler A1: Santa Maria armudunda, A2: Gala elma çeşidinde, A3: Ekmek ayva çeşidi, B; *Erwinia amylovora* izolatlarının PCR sonuçları, M: Marker, 1-5: Ea234-1, 6-10: Ea240-3, K: Kontrol, C; Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Braeburn çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Braeburn çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa, D; Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş S. Maria çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş S. Maria çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa., E; Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Williams çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Williams çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa., F; Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Ekmek çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Ekmek çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa., G; Örneklerin SDS-PAGE ile belirlenen protein bantları, *Erwinia amylovora* Ea234-1 ile inokule edilmiş Eşme çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 24.sa, 2: 36.sa, 3: 72.sa, *Erwinia amylovora* Ea240-3 ile inokule edilmiş Eşme çeşidinden belirli zaman aralıklarında alınmış protein profili; M: Marker, K: Kontrol, 1: 72.sa, 2: 36.sa, 3: 24.sa.

## Kaynaklar

- Ahl P, Benjoma A, Samson R, Gianinazzi S. 1981. Induction chez le tabac par *Pseudomonas syringae* nouvelles proteines associees au developpement d'une resistance non specifique a une deuxieme infection. *Phytopath. Z.*, 102: 201-212.
- Arda N, Ertan H. 2004. Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması, Temizkan, G., ve Arda, N. (ed.), *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Tıp Kitabevleri, 177-273.
- Anonim, 2012. TÜİK İstatistikleri (<http://www.tuik.gov.tr>)
- Baştaş KK, Maden S. 2004. Control of Fire Blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) by Prohexadione-Ca (BAS 125 10 W) and Benzothiadiazole + Metalaxyl (BION MX 44 WG). *Selcuk University Journal of Agriculture Faculty 1*: 49-58.
- Barny MA. 1995. *Erwinia amylovora hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. *Eur. J. Plant Pathol.*, 101: 333-340.



- Bereswill S, Pahl A, Bellemann P, Zeller W, Geider K. 1992. Sensitive and species specific-detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction. Appl. and Env. Mic., 58: 3522-3526.
- Bogdanove AJ, Bauer DW, Beer SV. 1998. *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. J. Bacteriol., 180: 2244-2247.
- Bonasera JM, Kim JF, Beer SV. 2006. PR genes of apple: identification and expression in response elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. BMC Plant Biol. 2229-6-23.
- Borejsza-Wysocka EE, Malnoy M, Aldwinckle HS, Meng X, Bonasera JM, Nissinen RM, Kim JF, Beer SV. 2006. Fire blight resistance of apple clones in which DspE-interacting proteins are silenced. Acta Hort., 704: 509-513.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Bugert P, Geider K. 1995. Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. Mol. Microbiol. 15: 917-933.
- Camacho Henriquez A, Sanger HL. 1982. Analysis of acid-extractable tomato leaf proteins after infection with a viroid, two viruses and a fungus and partial purification of the pathogenesis-related protein p14, Arch. Virol., 74: 181-196.
- De Wit PJGM, Bakker J. 1980. Differential changes in soluble tomato leaf proteins after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*. Phsiol. Plant Pathol., 17: 121-130.
- Dickey RS, Kelman A. 1988. *Erwinia* the “*caratovora*” Group. Laboratory Guide for The Identification of Plant Pathogenic Bacteria, II. Edition N. W. Schaad, APS Pres, St. Paul, Minnesota, 44-49 pp.
- Dixon RA, Lamb CJ. 1990. Molecular communications in interactions between plants and microbial pathogens. Ann. Rev. Plant. Physiol. and Plant Mol. Biol., 41: 339-367.
- Fahy PC, Persley GJ. 1983. Plant Bacterial Diseases A Diagnostic Guide, Academic Press.
- Gaudriault S, Brisset MN, Barny MA. 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. FEBS Lett., 428: 224-228.
- Gianinazzi S, Ahl P, Cornu A, Scalla R, Cassini R. 1980 First report of host P. protein appearance in response to fungal infection in tobacco. Physiol. Plant Pathol., 16: 337-342.
- Hou M, Xu W, Bai H, Liu Y, Li L, Liu L, Liu B, Liu G. 2012. Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant Cell Reports, Vol. 31: 895-904.
- Kacar B, Katkat V. 1999. Gubreler ve Gubreleme tekniđi. Vipař, Bursa, 531s.
- Khaled BL, Perez-Gilabert M, Morte A, Dreyer B, Oihabi A, Honrubia M, 2002. Peroxidase study in date palm inoculated with *Trichoderma horzianum* and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Plant Peroxidases, 267-270.
- Kim JF, Beer SV. 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. J. Bacteriol. 180: 5203-5210.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. Nature, 227: 680-685.
- Lamb CJ. 1994. Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. Cell, 76: 419-422.
- Lecomte P, Manceau C, Paulin JP, Keck M. 1997. Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of Isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. European Journal of Plant Pathology, 103: 91-98.
- Lelliott RA, Stead DE. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Meng XD, Bonasera JM, Kim J, Nissinen RM, Beer SV. 2006. Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. Mol. Plant Microbe Interact., 19: 53-61.
- Momol MT, Yeđen O. 1993. Fire blight in Turkey: 1985-1992. Acta Hort., No: 338: 37-39.
- Milcevicova R, Gosch C, Halbwirth H, Stich K, Hanke MV, Peil A, Flachowsky H, Rozhon W, Jonak C, Oufir M. 2010. *Erwinia amylovora* induced defense mechanisms of two apple species that differ in susceptibility to fire blight. Plant Science, 179: 60-67.
- Norelli JL, Aldwinckle HS, Beer SV. 1984. Differential host x pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*. Phytopathology 74: 136-139.
- Norelli JL, Aldwinckle HS, Beer SV. 1986. Differential Susceptibility of *Malus* spp. cultivars Robusta 5, Novole, and Ottawa 523 to *Erwinia amylovora*. Plant Disease 70: 1017-1019.
- Norelli JL, Aldwinckle HS, Beer SV. 1988. Virulence of *Erwinia amylovora* strains to *Malus* sp. Novole plants grown *in vitro* and in the greenhouse. Phytopathol., 78: 1292-1297.
- Norelli JL, Jones AL, Aldwinckle HS. 2003. Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. Plant Disease, 87: 756-765.
- Norelli JL, Farrell RE, Bassett CL, Baldo AM, Lalli DA, Aldwinckle HS, Wisniewski ME. 2009. Rapid transcriptional response of apple to fire blight disease revealed by cDNA suppression subtractive hybridization analysis. Tree Genet. Genomes 5: 27-40.
- Oh CS, Beer SV. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight, FEMS Microbiol. Lett., 253: 185-192.
- Oh CS, Beer SV. 2007. AtHIPM, an ortholog of the apple HrpN-interacting protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growth enhancing effect of HrpN in *Arabidopsis*. Plant Physiol., 145: 426-436.
- Öktem Y, Benlioğlu K. 1988. Studies on fire blight (*Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et al.) of pome fruits. Journal of Turkish Phytopathol., 5th. Turkish Phytopathological Congress., Antalya, Turkey, 17: 3.
- Özbek S. 1978. Özel Meyvecilik (Kışım Yaprağını Döken Meyve Türleri), Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders kitabı, Adana, No: 128: 11.
- Ponciano G, Yoshikawa M, Lee JL, Ronald PC, Whalen MC. 2007. Pathogenesis-related gene expression in rice is correlated with developmentally controlled *Xa21*-mediated resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 69: 9.
- Saygılı H. 1995. Fitobakteriyoloji. Dođruluk Matbaası, İzmir, 201s.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.
- Scheer C. 2009. Feuerbrandsituation im Bodenseeraum und Ergebnisse der Feuerbrandversuche des KOB 2008, Obstbau, 3: 168-172.
- Sherif S, Paliyath G, Jayasankar S. 2012. Molecular characterization of peach PR genes and their induction kinetics in response to bacterial infection and signaling molecules, Plant Cell Rep., 31, 697-711.
- Temizkan G, Arda N. 2004. Molekler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Yayınları, İstanbul.
- Ülkmen L. 1938. Malatya'nın Mhim Meyve eřitleri Üzerinde Morfolojik, Fizyolojik ve Biyolojik Araştırmalar, Yüksek Ziraat Enstitüsü alışmaları, Sayı: 65, Ankara.

- Van Loon LC. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Pathogenesis-related proteins in plants. Eds. S.K. Datta, S. Muthukrishnan, CRC Press LLC, Boca Raton, 1-19.
- Venisse JS, Malnoy M, Faize M, Paulin JP, Brisset MN. 2002. Modulation of defence responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. Mol. Plant Microbe Interact., 15: 1204-1212.
- Wei ZM, Sneath BJ, Beer SV. 1992. Expression of *Erwinia amylovora hrp* genes in response to environmental stimuli. J. Bacteriol., 174: 1875-1882.
- Zhao YF, Blumer SE, Sundin GW. 2005. Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. J. Bacteriol., 187: 8088-8103.
- Zwet T, Keil L. 1979. Fire Blight, A Bacterial Disease of Rosaceous Plants, Agriculturae Handbook, U.S.A, Number: 510, 199pp.
- Zwet T, Beer SV. 1995. Fire Blight – Its Nature, Prevention, and Control. A Practical Guide to Integrated Disease Management, US Department of Agriculture, Agriculture Information Bulletin, No. 631, Washington DC, 97pp.
- Zwet T. 2006. Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases. Acta Hort., 704: 35–39.