



## Effected Proteins in Apple and *Erwinia amylovora* Interactions<sup>#</sup>

Ayşegül Gedük<sup>1,a</sup>, Kubilay Kurtuluş Baştaş<sup>1,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Selcuk University, 42130 Konya, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><sup>#</sup>This study was presented as an oral presentation at the 5th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Tokat, TARGID 2020)</p> <p>Review Article</p> <p>Received : 24/09/2020 Accepted : 20/11/2020</p> <p>Keywords: Protein Fire blight Apple <i>Erwinia amylovora</i> Virulence</p>	<p>Fire blight disease caused by <i>Erwinia amylovora</i> can infect almost 140 plants of the <i>Rosaceae</i> family and poses a great threat to pome fruits growing all over the world. It needs amylovoran and Type III secretion systems (T3SS) to cause disease in host plants. AmsB, AmsD, AmsE, AmsF, AmsG, AmsJ, AmsI and AmsK proteins are involved in the binding of different galactose, glucuronic acid and pyruvyl subunits to the lipid carrier to form an amylovoran unit. T3SS proteins secreted by <i>E. amylovora</i> are HrpA HrpN, HrpW, AvrRpt2<sub>EA</sub>, HopC1 and DspA/E. DspA/E, the sole effector of <i>E. amylovora</i>, is secreted by during the formation of pilus T3SS. The chaperone protein of <i>E. amylovora</i> is DsB/F, which is in the IA class. EopB (outer membrane protein) has been characterized as one of the secretory proteins of <i>E. amylovora</i>. In addition to the harpins, the pathogenicity protein DspE and OrfB proteins are secreted via the Hrp-secretory system of <i>E. amylovora</i>. <i>E. amylovora</i> forms a Hrp pilus, which is produced by the structural protein HrpA. Genes encoding antimicrobial proteins cloned and expressed in apples and pears for impart resistance to the pathogen, attacin E are cecropins and lysozymes. The expression of PR2, PR5 and PR8 proteins is increased with <i>E. amylovora</i> infection in apple. Again, the HIPM protein in apples interacts with the <i>E. amylovora</i> HrpN protein, and the HIPM protein is found in higher amounts in flowers than leaves and shoots. In addition, four apple proteins (DIPMs) that interact with <i>E. amylovora</i> effector protein DspA/E have an effective role in endurance. In order to understand the interaction between the plant and the pathogen, it will be possible to understand the proteins that recognize the pathogen in the host, as well as the signal system and plant defense mechanism resulting from the infection. In this study, the roles of proteins associated with pathogenesis as a result of infection of <i>E. amylovora</i> in apples were tried to be revealed.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(sp1): 215-225, 2020

## Elma ve *Erwinia amylovora* İnteraksiyonlarında Etkili Proteinler

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Derleme Makale</p> <p>Geliş : 24/09/2020 Kabul : 20/11/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: Protein Ateş yanıklığı Elma <i>Erwinia amylovora</i> Virülens</p>	<p><i>Erwinia amylovora</i>'nın neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı, <i>Rosaceae</i> familyasından yaklaşık 140 bitkide enfeksiyon yapabilmekte ve tüm dünyada yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. <i>E. amylovora</i>, konukçularında hastalığa neden olabilmesi için amylovoran ve Tip III salgı sistemlerine (T3SS) ihtiyaç duymaktadır. AmsB, AmsD, AmsE, AmsF, AmsG, AmsJ, AmsI ve AmsK proteinleri, bir amylovoran birimi oluşturmak için farklı galaktoz, glukuronik asit ve piruvil alt birimlerinin lipit taşıyıcıya bağlanmasında rol oynarlar. <i>E. amylovora</i> tarafından salgılanan T3SS proteinleri, HrpA HrpN, HrpW, AvrRpt2<sub>EA</sub>, HopC1 ve DspA/E' dir. <i>E. amylovora</i>'nın tek efektörü olan DspA/E, pilusun oluşumu sırasında T3SS yoluyla salgılanmaktadır. <i>E. amylovora</i>'nın şaperon proteini ise IA sınıfı içerisinde yer alan DsB/F'dir. Eop1 (dış membran proteini), <i>E. amylovora</i> salgı proteinlerinden biri olarak karakterize edilmiştir. Harpinlere ek olarak, <i>E. amylovora</i>'nın Hrp-salgı sistemi yoluyla patojenite proteini DspE ve OrfB proteinleri salgılanmaktadır. <i>E. amylovora</i>, bir Hrp pilusu oluşturmaktadır ve bu da yapısal bir protein olan HrpA, tarafından meydana gelmektedir. Patojene karşı direnç kazandırmak amacıyla elma ve armutta klonlanan ve eksprese edilen antimikrobiyal proteinleri kodlayan genler; attacin E, cecropins ve lizozimlerdir. Elmada, <i>E. amylovora</i> enfeksiyonu ile PR2, PR5 ve PR8 proteinlerinin ifadesi artmaktadır. Yine elmalardaki HIPM proteini, <i>E. amylovora</i> HrpN proteini ile etkileşim göstermekte olup HIPM proteini çiçeklerde, yapraklarda ve sürgünlerde olduğundan daha fazla miktarda bulunmaktadır. Ayrıca <i>E. amylovora</i> efektör proteini DspA/E ile etkileşime giren dört elma proteini (DIPMs) dayanıklılıkta etkili role sahiptirler. Bitki ve patojen arasındaki etkileşimin anlaşılabilmesi için konukçuda patojeni tanıyan proteinlerin yanı sıra enfeksiyon sonucu oluşan sinyal sistemi ve bitki savunma mekanizmasının da anlaşılması ile mümkün olacaktır. Bu çalışmada <i>E. amylovora</i>'nın elmalarda enfeksiyonu sonucu patojenle ilişkili proteinlerin rolleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.</p>



## Giriş

Elma (*Malus domestica* L.), dünya genelinde muz ve üzümünden sonra en fazla üretilen üçüncü meyvedir (FAO, 2018). Ülkemiz 3,6 milyon ton ile dünya elma üretiminin yaklaşık %4'ünü gerçekleştirmektedir (Anonim, 2020). Elma yetiştiriciliğinde hastalık ve zararlılardan dolayı önemli kalite ve verim kayıpları meydana gelmektedir. *Erwinia amylovora* neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı, *Rosaceae* familyası bitkilerinin çoğunu enfekte edebilmekte ve dünyanın birçok yerinde başta elma ve armut olmak üzere yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan yerlerde büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Hastalık bitkilerde, sürgün, yaprak ve meyve yanıklığı belirtilerinin yansira solgunluk ve kanser belirtilerine de neden olmaktadır. Ateş yanıklığı nedeniyle dünya genelinde önemli ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Örneğin ABD'de, hastalık nedeniyle meyve endüstrisinin yıllık 100 milyon dolarlık ekonomik zarar gerçekleştiği bildirilmiştir (Norelli ve ark., 2003). Günümüzde hastalıkla mücadelede kalıcı ve etkili bir yöntem tespit edilememiş olmakla beraber her yıl, karantina önlemleri nedeniyle enfekteli elma ve armut bahçelerinin büyüklüğü azalmaktadır (Deckers ve Schoofs, 2008).

Son zamanlarda, ateş yanıklığına dirençli çeşitlerin geliştirilmesi için, bu etmenin genetik kontrolünü anlamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Elmalarda farklı seviyelerde ateş yanıklığı direncinin varlığına dair raporlar bulunmaktadır (Calenge ve ark., 2005; Khan ve ark., 2006, 2007; Peil ve ark., 2008; Kellerhals ve ark., 2009; Durel ve ark., 2009; Le Roux ve ark., 2010; Parravicini ve ark., 2011).

Elma dayanıklılık genlerinin ürünü olan proteinler, patojenin avirülenslik (Avr) proteinlerini tanıma yeteneğine sahiptir. Bu tanıma işlemi bitki savunma sisteminin harekete geçirilmesini sağlamaktadır. Bu mekanizmanın uyarılması antimikrobiyal etkiye sahip birçok proteinin bitkide ifadesine neden olmaktadır. *E. amylovora*'nın virülensliğinde etkili proteinler; AmsB, AmsD, AmsE, AmsF, AmsG, AmsJ, AmsI ve AmsK, HrpA HrpN, HrpW, AvrRpt2EA, HopC1 ve DspA/E, DsB/F olarak bilinmektedir. Elmada ise *E. amylovora* enfeksiyonu ile PR2, PR5 ve PR8, HIPM ve DIPM proteinlerinin ifadesi arttığı bildirilmektedir (Eastgate, 2000; Langlotz ve ark., 2011; Meng ve ark., 2006; Oh ve Beer, 2007).

Bitki ve patojen arasındaki etkileşimin anlaşılabilmesi için konukçuda patojeni tanıyan proteinlerin yanı sıra patojen enfeksiyonu sonucu oluşan sinyal sistemi ve bitki savunma mekanizmasında etkili olan proteinlerin anlaşılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, *E. amylovora* ve elmalarda varlığı belirlenen, patojenitesi ve konukçu dayanıklılığında rol oynayan proteinlerin etkililik durumlarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

### *Erwinia amylovora*'nın Virülenslik Faktörleri

*E. amylovora*'nın patojenitesi ve virülensliği farklı faktörlere bağlıdır. Ekzopolisakkarit (EPS) Amylovan ve Levan, Tip 3 salgı sistemi (T3SS), biyofilm oluşumu, motilite, demir siderofor üretiminin yanı sıra

metaloproteazlar, plazmidler, iki bileşenli sinyal transdüksiyon sistemleri ve histon benzeri proteinler gibi diğer virülenslik faktörlerinin varlığı da patogeneze önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, farklı *E. amylovora* strainleri arasındaki virülenslik farklılıklarının en önemli nedenlerinin, ekzopolisakkaritlerin sentezi ve T3SS'deki ilgili proteinlerin mekanizmasındaki değişiklikten kaynaklandığı bilinmektedir (Dellagi ve ark., 1998; Expert, 1999; Smits ve Duffy, 2011; Llop ve ark., 2011, 2012; Mohammadi, 2010; Wang ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2009; Hildebrand ve ark., 2006; Mann ve ark., 2013).

### *Ekzopolisakkaritler (EPS)*

EPS özellikle kurak koşullarda bakteriyi su ve besin kaybına karşı koruduğu, bitkinin vasküler sisteminde iletimi engellediği bitkinin savunma sistemini aşmada anahtar rol oynadığı ve biyofilm oluşumunda önemli bir madde olduğu bildirilmiştir (Bellemann ve ark., 1994; Ramey ve ark., 2004; Koczan ve ark., 2009; Ordax ve ark., 2010; Koczan ve ark., 2011; Vrancken ve ark., 2013). Levan, virülenslik derecesi ile doğru orantılı olan ve *E. amylovora* strainleri tarafından üretilen amylovanın miktarına katkı sağlayan bir faktördür. Levan sentezinin olmaması, konukçu bitkide semptomların yavaş gelişmesine neden olabilmektedir (Geier ve Geider, 1993). Amylovan biyofilm oluşumu için gerekli bir EPS'dir (Koczan ve ark., 2009; Vrancken ve ark., 2013; Maes ve ark., 2001) ve amylovan üretme yeteneğine sahip olmayan *E. amylovora* strainleri bitki içerisinde yayılamazlar (Vrancken ve ark., 2013; Bellemann ve Geider, 1992). On iki *ams* geni (AmsA-AmsL'ye) tarafından kodlanan amylovan, bitki savunmasını baskılamaktadır (Geider, 2000; Koczan ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009). Bunlardan AmsC, AmsH ve AmsL'nin oligosakkarit taşıma ve yerleştirmede rol oynadığına inanılırken, AmsA'nın bir tirozin kinaz aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir. AmsB, AmsD, AmsE, AmsG, AmsJ ve AmsK proteinleri, bir amylovan birimi oluşturmak için farklı galaktoz, glukuronik asit ve pyruvyl alt birimlerinin lipit taşıyıcıya bağlanmasında rol oynarlar. AmsF, yeni sentezlenen tekrar eden birimleri ekleyebilir ve/veya mevcut bir amylovan zincirine ekleyerek polimerizasyonlarına dahil olabilmektedir. AmsI ise sentezlenen tekrarlamaya biriminin serbest bırakılmasından sonra difosforilize olan lipit taşıyıcının geri dönüştürülmesinde rol oynamaktadır (Eastgate, 2000; Langlotz ve ark., 2011).

### *Tip 3 Salgı Sistemi (T3SS)*

T3SS konukçularında başarılı bir enfeksiyon için *E. amylovora* tarafından kullanılan önemli virülenslik faktörlerindedir (Vrancken ve ark., 2013). Etmenin patojenitesi T3SS salgı sistemine ve AvrE efektör ailesinden olan DspA/E'ye dayanır (Jin ve ark., 2001).

T3SS'nin sadece Hrp pilus bölgesinde meydana geldiği ve pilusun efektör proteinleri bakteri hücrenin dışına yönlendirdiği ve bir iletim modelini desteklediği gösterilmiştir (Jin ve ark., 2001). T3SS proteinlerin salgılanması ve bitki hücresi içerisindeki etkinliği, sadece protein sinyallerine bağlı değil aynı zamanda bu proteinlerin bağlandıkları spesifik sitoplazmik şaperonlara

da bağlıdır. T3SS şaperonları tipik olarak küçük, Leucine'ce zengin ve bağlandıkları moleküllere özelleşmiş proteinlerdir. Birkaç gruba ayrılabilirler; IA sınıfı şaperonları bir veya birkaç homolog efektörle etkileşimde bulunurken, IB sınıfı şaperonları geniş bir efektör protein grubuna bağlanabilir. *E. amylovora*'nın şaperon proteini ise IA sınıfı içerisinde yer alan DsB/F'dir (Losada ve Hutcheson, 2005; Büttner ve Bonas, 2006).

## Hrp Proteinleri

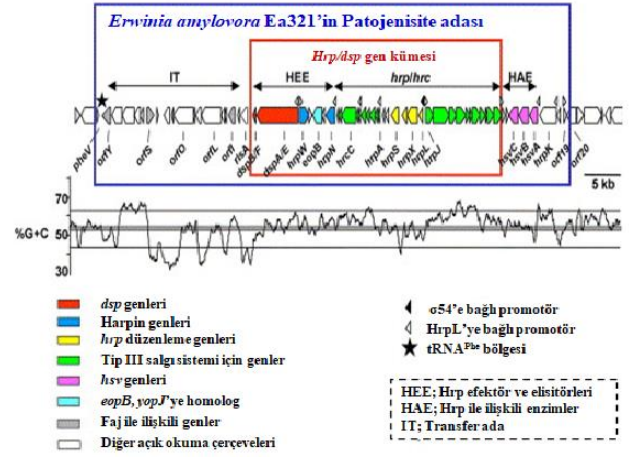
Oh ve Beer (2005), *E. amylovora* str. Ea321'in Hrp patojenite bölgesini (PAI) karakterize etmişlerdir (Şekil 1). Bu bölge yaklaşık 60 kb genomik DNA büyüklüğüne sahip olup yaklaşık 60 gen içermektedir. Bunlar: hrp/hrc bölgeleri, hrp efektör ve elisitör (HEE) bölgeleri, Hrp ile ilişkili enzim bölgeleri ve transfer ada bölgesi (IT)'dir (Oh and Beer, 2005). Hrp/hrc bölgesi 25 geni içermektedir ve bu genler hrpL, hrpS, hrpX ve hrpY olmak üzere 4 düzenleyici gen içerir. HEE bölgesi 7 gene sahiptir. Bu genler; iki harpin geni (hrpN ve hrpW), iki dsp geni (dsp A/E ve dsp B/F), 1 yopJ homologu (eopB) ve iki varsayılan homologu (OrfA ve OrfC) kodlar (Oh ve Beer, 2005).

*E. amylovora* tarafından salgılanan T3SS proteinleri, HrpA HrpN, HrpW, AvrRpt2<sub>EA</sub>, HopC1 ve DspA/E' dir (Çizelge 1, Şekil 2) (Oh ve Beer, 2005; Zhao ve ark., 2005). Zhao ve ark. (2006), konukçu bitkilerin enfeksiyonu sonucu uyarılan genleri tanımlayarak varsayılan efektör geni olan avrRpt2<sub>EA</sub> ve HopC1'i belirlenmişlerdir. DspA/E ise *E. amylovora* patojenitesi için salgılanan efektör proteinlerini kodlayan bir genidir (Boureau ve ark., 2006). HrpA, pilus oluşumunda görev almaktadır (Kim ve ark., 1997). HrpN, HR açığa çıkarabilen 44 kDa büyüklüğünde bir protein olarak karakterize edilmiştir. HrpW'nin ise virülenslik fonksiyonu olmadığı belirlenmiştir (Wei ve ark., 1992a, 1992b).

*E. amylovora*'nın Hrp patojenite adası, hrp / hrc bölgesi, Hrp efektörleri ve elisitörler bölgesi, Hrp ile ilişkili enzimler bölgesi ve transfer ada bölgesinden oluşan yaklaşık 60 gen içermektedir. Hrp / hrc bölgesi, diğer hrp genlerinin ifadesini kontrol eden dört düzenleyici gen, hrpL, hrpS ve hrpX/Y dahil olmak üzere 25 gen ve dokuz hrc (HR ve korunmuş) geni içermektedir. Hrp efektörleri ve elisitörleri bölgesinde yedi gen bulunmaktadır. Bunlar; iki (hrpN ve hrpW) harpin geni, ikisi dsp geni (dspA / E ve dspB / F), eopB ve iki şaperon (orfA ve orfC) genidir. HrpL, bilinen tüm hrp ve hrc genlerinin ifadesini kontrol eder ayrıca sensör proteini olarak varsayılan HrpX ve birlikte iki bileşenli bir düzenleyici sistem oluşturan potansiyel bir yanıt düzenleyici olarak görev alan HrpY, hrpL geninin ekspresyonunda rol oynar (Şekil 1) (Oh ve Beer, 2005).

HrpN, tütün bitkilerinin hücreler arası boşluklarına inokule edildiklerinde HR açığa çıkarabilen bir hücre zarı ile ilişkili 44 kDa büyüklüğünde bir protein olarak karakterize edilmiştir (Wei ve ark., 1992a, 1992b). Bu proteinin bitkilerde *E. amylovora*'nın virülensliği için gerekli olduğu bildirilmiştir (Wei ve ark., 1992a; Barny, 1995; Barny ve ark., 1999; Gaudriault ve Borny, 1999).

HrpW'nin virülenslik fonksiyonu olmadığı belirlenmiş ve III sınıfı pektat liyaz için C-terminal bölgesinde homolog olan varsayılan liyaz domain'ine sahiptir (Kim ve ark., 1997; Kim ve Beer, 1998).



Şekil 1. *E. amylovora* strain Ea321'in Hrp patojenite adası ve hrp / dsp gen kümesi (Oh ve Beer, 2005)

Figure 1. Hrp pathogenicity island of *E. amylovora* Ea 321 and hrp/dsp gene cluster

Çizelge 1. *Erwinia amylovora*'nın Tip 3 salgı sistemine aracılık eden proteinler ve sınıflandırılmaları

Table 1. Proteins related with Type 3 secretion system and their classification

Protein	Sınıf	Referans
HrpJ	Düzenleme	Bogdanove ve ark. (1996); Forsberg ve ark. (1991)
HrcQ	Salgı	Bogdanove ve ark. (1996)
HrpA	Hrp pilus	Kim ve ark. (1997)
HrpN	Harpin	Wei ve ark. (1992a)
HrpW	Harpin	Kim ve Beer (1998)
DspE	Avr benzeri	Bogdanove ve ark. (1998);
Eop 1	Avr benzeri	Kim (1997); Galyov ve ark. (1994); Mills ve ark. (1997); Hardt ve Galan (1997)

Wei ve Beer (1995) harpin proteinlerinin salgılanması için gerekli olan pozitif düzenleme geni olan hrpL'yi karakterize etmişlerdir. *Erwinia amylovora* str. Ea321'in hrpL geni, eubakteriyel RNA polimeraz faktörlerinin ECF (ekstra sitoplazmik fonksiyonlar) alt familyası üyelerine benzer 21,7-kDa'lık düzenleyici proteini kodlamaktadır. Ayrıca HrpL'nin belirlenen aminoasit sekansı, *Pseudomonas syringae*'nin HrpL'yi kapsayan bölgesinin aminoasit sekansı ile benzerlik göstermektedir. ECF familyasının üyeleri, ekstrastoplazmik fonksiyonların düzenlenmesini sağlamaktadır.

Harpinler sadece HR'i uyarmakla kalmaz aynı zamanda bitki metabolizması içinde reaktif oksijen türleri (ROS)'nin açığa çıkması gibi diğer metabolik etkilere sahiptir (Baker ve ark., 1993; He ve ark., 1994). Ayrıca Wei ve Beer (1993, 1996), *E. amylovora*'nın 78 kDa'lık bir proteini olan HrpI'yi belirlemişlerdir. HrpI, harpin proteinlerinin salgılanmasında görev almaktadır (Wei ve Beer, 1993).

*E. amylovora*, bir Hrp pilusu oluşturabilmektedir ve Hrp pilusu için yapısal bir protein HrpA'dır. Hrp pilu'nin rolü, bakteriyel sitoplazmadan bitki hücrelerine efektör



*amylovora*'nın dış membran proteini IcsP/SopA, proteazların Enterobakterial omptin ailesinin bir üyesidir ve proteinin virülenslikle ilgili her hangi bir işlevi tanımlanmamıştır (Steinhauer ve ark., 1999).

OmpA, Enterobacteriaceae familyasının önemli dış membran proteinlerinden biridir. Bakterinin hücre yüzeyinde yapısal sağlamlıkta önemli bir fonksiyona sahiptir (Koebnik ve ark., 2000). TolC, *E. amylovora*'nın bir dış membran proteindir. Bitkilerin ürettiği fitoaleksine karşı dirençte etkin rol oynar (Al-Karablieh ve ark., 2009).

Porin proteinleri, gram negatif bakterilerin dış membranında 600 kDa dan küçük hidrofilik moleküllerin geçişini kontrol eden, su dolu kanalları olarak tanımlanır. Porinler dış membranda kanal oluşturan proteinlerdir (Darcan ve Özkanca, 2007). *E. amylovora*'nın bilinen porin proteinleri OmpC ve OmpF'dir (Darcan ve Özkanca, 2007).

HrcC, J ve T bakterinin dış membranında bulunan proteinlerdir. HrcC proteini, dış membrandan karşı tarafa proteinlerin taşınmasında rol oynar. HrcJ proteini bir ekstrasellüler sensör olarak hareket eder. Temasa bağlı olarak virülens faktörlerin salgılanmasında önemlidir (Bogdanove ve ark., 1996).

### Elma-*Erwinia amylovora* Etkileşiminde Rol Alan Proteinler

Ateş yanıklığı hastalığına karşı konukçunun direnci arttırmak için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi ile patojenlere karşı direncini artırma stratejileri, enfeksiyondan sonra bitki içindeki patojenin çoğalmasını kısıtlayarak bitki ve patojen arasında uyumsuz etkileşimler üretmeyi amaçlamaktadır. Günümüzde bu hastalığa karşı; (1) konukçu bitkide antimikrobiyal proteinlerin üretimi, (2) bakteriyel patojenite faktörlerinin engellenmesi ve (3) doğal bitki savunmasının geliştirilmesi yönünde stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

#### Antimikrobiyal Proteinlerin Üretimi

Antibakteriyel proteinler, eklembacaklılar, amfibiler ve memeliler de dahil olmak üzere birçok hayvan grubunun genel antimikrobiyal savunma mekanizmalarının önemli bileşenleridir (Mourgues ve ark., 1998). Ateş yanıklığına karşı direnç kazandırmak amacıyla elma ve armutta klonlanan ve eksprese edilen antimikrobiyal proteinleri kodlayan genler *Attacin E*, *cecropins* ve *lizozimler*dir. *Attacin*ler ve *cecropin*ler, bakteriyel enfeksiyona yanıt vermeyen *Hyalophora cecropia*'nın hemolenfinde bulunan antimikrobiyal peptitlerdir (Şekil 3 ve Çizelge 2) (Hultmark ve ark., 1980).

*Attacin* dış zarın geçirgenliğinde bir artışa neden olur, buda bakteri hücrelerinin ölümüyle sonuçlanır (Carlsson ve ark., 1991; Flink ve ark., 1989). *Attacin E* ve indüklenebilir (*Pin2*) ve yapıcı (*CaMV35S*) promotörlerin kontrolü altında sentetik *Cecropin* (*SB-37*, *Shiva 1*, and *MB39*) analogları, *E. amylovora* karşı direnci arttırmak için çeşitli elma genotiplerine eklenmiştir (Çizelge 2). Bu genlerin ateş yanıklığına karşı kısmi dirence neden olduğu bildirilmiştir. Sera ve arazi koşullarındaki elma

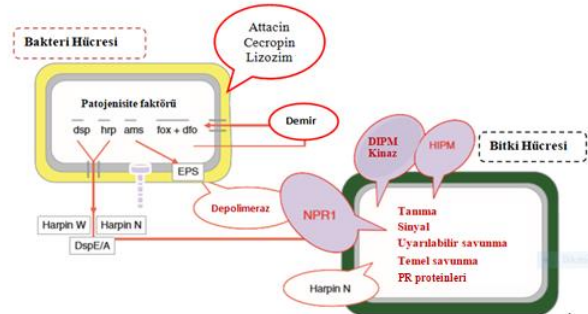
ağaçlarındaki *Attacin* ekspresyonu, ateş yanıklığına karşı direnç seviyesini önemli ölçüde arttırmıştır (Aldwinckle ve ark., 1998, 2003; Hanke ve ark., 2000; Ko ve ark., 2000). *Cecropin SB-37* transgenini içeren 13 *Royal Gala* transgenik hattı *E. amylovora* karşı direnç açısından değerlendirilmiş ve transgenik hatların birçoğunda kontrol bitkilerden daha az hastalık semptom gözlenirken sadece transgenik T245 hattı (sürgünlerin %12'si enfekteli) kontrol *Royal Gala*'dan (%67) önemli ölçüde daha dirençli belirlenmiştir (Liu ve ark., 1998).

*Lizozimler*; faj, bakteri, fungus, bitki ve hayvanlardan karakterize edilen bakteriyolitik enzimlerdir (Jolles ve Jolles, 1984; Doring, 1996). Diğer antimikrobiyal peptitlerle (*cecropin* veya *attacin*) sinerji içinde hareket ederek aktivite gösterirler (Boman ve Hultmark, 1987). Hanke ve ark. (2000) pSR8-36 kullanarak T4 *lizozim* genini *Pinova* çeşidi elmalara aktarmışlardır. Bu gen, seradaki bazı transgenik hatlarda direnci arttırmıştır.

Ko ve ark. (1998) ayrıca bu kimerik T4 *lizozim* genini *Pin* promotörünün kontrolü altında *attacin E* ile birleştirmişlerdir. Bu iki yapı *Galaxy* elma çeşidine eklenmiştir (Aldwinckle ve ark., 1998; Ko ve ark., 1998). *Galaxy*'nin bazı T4 *lizozim* transgenikleri, ön denemelerde ateş yanıklığı direncinde artışlar göstermiştir (Ko ve ark., 2002).

#### PR Proteinleri

Sistemik direnç sırasında fitoaleksinin ve yüksek konsantrasyonlarda PR proteinlerinin üretimi gerçekleşmektedir (De Wit ve Bakker, 1980; Gianinazzi ve ark., 1980; Ahl ve ark., 1981; Camacho Henriquez ve Sönger, 1982). PR proteinleri düşük molekül ağırlığına sahip (6-43kDa) proteinlerdir ve apoplast PR proteinlerin biriktiği temel alanı oluşturur (Van Loon, 1999). Çeşitli PR proteini grupları fonksiyonlarına, serolojik ilişkilerine, amino asit sekansına, molekül ağırlığına ve diğer belli özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. İyi bilinen PR proteinleri; PR1 proteinleri,  $\beta$ -1,3-glukanazlar (PR2), kitinazlar (PR3, PR4), *lizozimler* (PR8), *ozmotin* ve *taumatin* benzeri proteinler (PR5), lipid transfer proteinleri (PR14), proteinaz inhibitörleri (PR6), endoproteinazlar (PR7), peroksidazlar (PR9), sistince zengin proteinler, glisince zengin proteinler ve kitosanazlar'dır. Birçok bitkide genelde her PR proteininin çeşitli izoformları vardır (Agrios, 1997; Van Loon ve ark., 2006).



Şekil 3. *Erwinia amylovora*'ya karşı direnci arttırmak için elmada var olan mekanizmalar (Malnoy ve Aldwinckle, 2009).

Figure 3. Mechanisms existing in apple increase resistance against *E. amylovora*

Çizelge 2. Transgenik elma çeşitlerinde *E. amylovora*'ya karşı gen ifadeleriTable 2. Gene expressions against *E. amylovora* in transgenic apple varieties

Elma Çeşitleri	Gen Tanımı	Gen Kökeni	Promotor	Temel Sonuçlar	Kaynaklar
Gala	SB (+/- sp) Shiva1(-sp)	Sentetik peptid	Pin 2, CaMV35S	Meyve bahçesinde, kısmi dirençli bazı SB37transgenik hatlar	Norelli ve ark., 1999;
Royal Gala	MB39 (+sp)	modifiye çekropin	Osmatin	Meyve bahçesinde, yedi transgenik hattın 3' ü kısmi direnç gösterdi	Liu ve ark., 2001
M 26	<i>Attacin E</i>	<i>Hyalophora cecropia</i>	Pin 2, CaMV35S	Bazı transgenik hatlar, serada ve meyve bahçesinde kısmi direnç gösterdi	Norelli ve ark., 1994; Ko ve ark., 2000; Aldwinckle ve ark., 1998, 2003
Pinova, Pilot, Piral, Pingo, Elstar, Remo, Liberty, Reka, Pi-AU 5683	<i>Attacin E</i> (-sp) T4 lizozim	<i>Hyalophora cecropia</i> , T4 Bakteriyofaj	Pin 2, CaMV35S	Seralarda bazı transgenik hatlar kısmi dayanıklılık gösterdi	Hanke ve ark., 2000
Gala	Tek başına T4 lizozimi veya ekli <i>Attacin E</i>	<i>Hyalophora cecropia</i> , T4 Bakteriyofaj	Pin 2 ( <i>AttacinE</i> ), CaMV35S (T4 Lyz)	Seralarda bazı transgenik hatlar kısmi dayanıklılık gösterdi <i>Attacin</i> geni ile kombine edildiğinde dayanıklılık artmadı	Ko ve ark., 1998, 2002; Aldwinckle ve ark., 1998, 2003

*E. amylovora* enfeksiyonu ile elmada farklı PR proteinlerin biriktiği belirlenmiştir (Venisse ve ark., 2002; Malnoy ve ark., 2007a; Norelli ve ark., 2009). Bonusera ve ark. (2006) elmada, *E. amylovora* ile inokulasyondan sonra PR1 protein ifadesinde artış olmadığını bunun aksine PR2, PR5 ve PR8 proteinlerinin ifadesinin arttığını belirlemişlerdir. Ancak elmada PR1 proteinlerin ifadesinin patojen tarafından baskılandığı belirlenmiş bunun yanında patojen saldırısına karşı PR1 benzeri proteinlerin ifade edildiği belirlenmiştir (Bonusera ve ark., 2006; Milčevićová ve ark., 2010).

#### DIPM Proteinleri

Meng ve ark. (2006), maya ikili hibrit sistemini kullanarak *E. amylovora* efektör proteini DspA/E ile etkileşime giren dört elma proteinini (DIPMs) belirlemişlerdir. Elmadaki dört DIPM proteinin molekül ağırlıkları sırasıyla 72,9, 73,1, 73,2 ve 74,4 kDa olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda DIPM 1, 2, 3 ve 4 sırasıyla 666, 676, 665 ve 682 amino asitlik polipeptitleri kodlamaktadırlar. 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 diken ve çilekte bu dört genin varlığı doğrulanmıştır. *E. amylovora*, elmayı enfeksiyonu sonucu patojenisite efektörü DspA/E, konukçu hücrelerine yerleştiğinde, hedef DIPM'lerle etkileşime girer. Meydana gelen efektör-konukçu kompleksini algılamak için karşılık gelen bir R geni olmadığından, dirençle ilişkili savunma mekanizmasını tetikleme olasılığı düşüktür. Böylece DspA/E, DIPM sinyal iletimini bloke ederek savunma tepkisini bastırabilmektedir. İlâveten DIPM'lerin, *E. amylovora*

tarafından elmanın enfekte olup olmadığını kısmen belirleyen duyarlılık faktörleri olarak hareket edebildiği görülmektedir (Meng ve ark., 2006; Cetin ve Bastas, 2015).

#### HIPM Proteinleri

Elmadan elde edilen HIPM geni, 60 amino asit içeren yaklaşık 6,5 kDa'lık bir proteini kodlamaktadır. Oh ve Beer (2007), elmada *E. amylovora* HrpN proteininin etkileşim gösterdiği HIPM proteinini belirlemişlerdir. HIPM plasma membranıyla ilişkili ve sinyal peptid fonksiyonu göstermektedir ve konukçu bitkide hassasiyeti arttırmaktadır. HrpN 198 amino asitlik amino ucunun, HIPM proteini ile etkileşim göstermesi için gerekli olmasına rağmen ham armut meyvelerinde virülenslik için yeterli olmadığı görülmüştür.

HIPM'in elma çiçeklerinde yapraklarda ve sürgünlerde olduğundan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Oh ve Beer, 2007). HIPM, enfeksiyon için gerekli olan önemli *E. amylovora* efektörü HrpN için gerekli bir transmembran reseptörü olarak varsayılır. Bu nedenle, HIPM, mevcut terminolojide bir "S geni" tarafından kodlanmış kabul edilebilir (van Schie ve Takken, 2014).

Transgenik elma hatlarında yapılan denemeler göstermiştir ki HIPM ekspresyonu azaltılmış bitkilerin *E. amylovora* enfeksiyonuna duyarlılığı azalmıştır. Malnoy ve ark. (2008), RNAi teknolojisini kullanarak elmadaki HIPM genini susturmuş ve HIPM'nin hastalık gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Bazı hatların *E. amylovora*'ya duyarlılığı "Galaxy" çeşidine göre %50 oranında azalmıştır. Campa ve ark. (2019) transgenik elmada (cv. Galaxy) HIPM'i susturmuşlar böylece elmanın *E. amylovora*'ya karşı duyarlılığı önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, elmada HIPM ile etkileşime giren, oksijen oluşumunu artırıcı proteini (MdOEE) tanımlamışlardır.

## Elma- *Erwinia amylovora* Proteinlerinin Etkileşimi

Elmada ateş yanıklığının direncine yönelik yeni mekanizmalar oluşturmak için, promotör *gstl* veya konstitütif promotör CaMV 35S ile *E. amylovora*'dan elde edilen elisitör harpin<sub>Ea</sub>'yı içeren bir yapı ile oluşturulmuş bazı transgenik elma hatları üretilmiştir (Abdul-Kader ve ark., 1999). Harpin<sub>Ea</sub>'nın konstitütif CaMV 35S promoteri ile entegrasyonu, transgenik elmada herhangi bir tespit edilebilir olumsuzluğa neden olmamıştır (Abdul-Kader ve ark., 1999). *Gst1* promotörü ile harpin<sub>Ea</sub> genini içeren M26 transgenikhatlı bitkilerin iki yıllık arazi denemeleri, ateş yanıklığına duyarlılıkta önemli bir azalma göstermiştir.

Bazı araştırmacılar elmadan bir NPR1 ortologu olan MpNPR1'i klonlamışlardır. Bu gen, ateş yanıklığına dayanıklılığı arttırmak amacıyla Galaxy ve M26'da pin2 veya CaMV35 S promotör'ların kontrolü altında ifade edilmiştir (Malnoy ve ark., 2007b). MpNPR1'in aşırı ifadesi, bazı PR proteinlerinin (PR2, PR5 PR8) ifadesinin ve ateş yanıklığına karşı direnci arttırmıştır. Kontrole oranla simptomlarda yaklaşık %40'luk bir azalmaya sahip olduğu belirlenmiştir (Malnoy ve ark., 2007b).

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

Acimovic ve ark. (2015), acibenzolar-S-methyl ve potasyum fosfit uygulamasından sonra, elma yapraklarında PR-1, PR-2 ve PR-8 protein genlerinin sistemik kazanılmış dayanıklılığı (SAR) uyarıldığını ve ateş yanıklığı hastalığının kontrol edildiğini belirlemişlerdir.

Beer ve ark. (2006), *E. amylovora*'nın HrpN elisitör faktörü ile etkileşime giren bir proteini tanımlayabilmiştir. Bu küçük protein (60 aa) fonksiyonel bir sinyal peptidine sahiptir ve bitki plazmembranları ile ilişkilidir. Campa ve ark. (2019), Malus'un HrpN ile etkileşime giren proteini (HIPM) kodlayan genin ifadesinin % 50'den fazlası susturulmuştur.

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

Boureau ve ark. (2006) ve Bonasera ve ark. (2006), elmadaki DspE/A ile etkileşime giren bir öncü ferredokini (Pre-Fd) tanımlamış ve karakterize etmişlerdir. Pre-Fd dizisi birçok bitki Pre-Fd proteinininkine benzerdir. Kloroplastlardan alındıktan sonra Pre-Fd, fotosistem I'de bir elektron taşıyıcısı olarak işlev gören ferredoksin (Fd) dönüştürülür. Bonasera ve ark. (2006), DspE/A'nın genç yapraklarda Pre-Fd'nin gelişmekte olan kloroplastlara alınımını engelleyerek fotosentezi engellediğini ve gelişmekte olan yapraklarda fotosentezi sınırlandırarak hastalık oluşumunu kolaylaştırabildiğini belirtmişlerdir.

## Sonuç ve Tartışma

*E. amylovora*'nın enfeksiyon sürecindeki, avirulenslik genlerinin işlevi, patojenisite faktörlerinin miktarı ve T3SS sisteminin patojen için özel mekanizması henüz tam olarak anlaşılabilmiştir. Bununla birlikte, sadece patojeni tanımak bu hastalık ile mücadele etmek için yeterli değildir. Bu nedenle konukçuyu tanımaya yönelik moleküler markerların mevcudiyeti ve konukçunun genetik haritası, direnç genlerinin ve hastalığa özgü lokusların belirlenmesine olanak sağlayacaktır.

Ayrıca ateş yanıklığına karşı konukçunun direnci arttırmak için farklı mekanizmalar mevcuttur. Bunlar enfeksiyondan sonra bitki içindeki patojenin gelişimini engelleyerek bitki ve patojen arasında uyumsuz etkileşimler üretmeyi amaçlamaktadır. Bitkide dayanıklılığı arttırmak için Attacin, cecropin ve lizozim, konukçu bitkide antimikrobiyal proteinlerin üretimini, depolimeraz geni bakteriyel patojenisite faktörlerinin engellenmesini ve PR, DIPM, HIPM ve HarpN gibi proteinler doğal bitki savunmasının geliştirilmesinde rol oynamaktadır.

Bitki patojen arasındaki etkileşimin anlaşılabilmesi için konukçuda patojeni tanıyan proteinlerin yanı sıra patojen enfeksiyonu sonucu oluşan sinyal sistemi ve bitki savunma mekanizmasında etkili olan proteinlerin çalışması gerekmektedir (Çetin ve Bastas, 2015). Bu bilgiler ışığında da ateş yanıklığına karşı konukçunun direncini arttırmak için farklı stratejiler geliştirilerek, dayanıklı/toleranslı elmaların geliştirilmesine imkan sağlayacaktır.

## Kaynaklar

- Abdul-Kader AM, Bauer DW, Beer SV, Norelli JL, Aldwinckle HS. 1999. Evaluation of the *hrpN* gene for increasing resistance to fire blight in transgenic apple. *Acta Horticulturae* 489: 247–250. DOI: 10.17660/ActaHortic.1999.489.40
- Acimović SG, Zeng Q, McGhee GC, Sundin G, Wise J. 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science*, 6. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00016>
- Agrios GN. 1997. *Plant Pathology*, Fourth Edition, Academic Press., San Diego, CA USA, 93-112, 192-193.
- Ahl P, Benjoma A, Samson R, Gianinazzi S. 1981. *Phytopath. Z.*, 102:201- 212. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1981.tb03381.x>
- Aldwinckle H, Ko K, Norelli JL, Brown SK, During K. 1998. Enhanced resistance to fire blight of apple lines transgenic for *attacin E* and *T4 lysozyme* genes. In: 7th International Congress of Plant Pathology. ICPP, Edinburgh, Vol. 3, p. 5. 3. 17.
- Aldwinckle HS, Borejsza-Wysocka EE, Malnoy M, Brown SK, Norelli JL, Beer SV, Meng X, He SY, Jin QL. 2003. Development of fire blight resistant apple cultivars by genetic engineering. *Acta Horticulturae* 622: 105–111. DOI: 10.17660/ActaHortic.2003.622.7
- Al-Karablieh N, Weingart H, Ullrich MS. 2009. The outer membrane protein TolC is required for phytoalexin resistance and virulence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbial biotechnology*, 2(4): 465-475. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00095.x>
- Anonim, 2020. Tarım Ürünleri Piyasaları, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr>. Erişim tarihi: 10. 11. 2020.

- Baker CJ, Orlandi EW, Mock NM. 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* 102: 1341-1344. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.102.4.1341>
- Barny M A, Gaudriault S, Brisset MN, Paulin JP. 1999. Hrp secreted proteins: Their role in pathogenicity and HR elicitation. *Acta Hort.* 489: 353-357.
- 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.
- Beer SV, Meng X, Oh CS, Kim WS, Bonasera JM. 2006. Apple proteins that interact with proteins of *Erwinia amylovora*. *Plant and Animal Genome 14th Conference.* January 14–18, 2006, San Diego, CA, USA.
- Bellemann P, Bereswill S, Berger S, Geider K. 1994. Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 16: 290–296. DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90058-2)
- Bellemann P, Geider K. 1992. Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 931–940. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-138-5-931>
- Bogdanove AJ, Beer SV, Bonas U, Boucher CA, Collmer A, Coplin DL, Van Gijsegem F. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular microbiology*, 20 (3): 681-683. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5731077.x>
- Bogdanove AJ, Kim JF, Wei Z, Kolchinsky P, Charkowski AO, Conlin AK, Colimer A, Beer SV. 1998. Homology and functional similarity of an hrp-linked pathogenicity locus, dspEF, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus avrE of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1325-1330. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1325>
- Boman J, Hultmark D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Annual Review of Microbiology* 41: 103–126. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.000535>
- Bonasera JM, Meng X, Beer SV. 2006. Interaction of DspE/A, a pathogenicity/avirulence protein of *Erwinia amylovora*, with pre-ferredoxin from apple and its relationship to photosynthetic efficiency. *Acta Hort.* 704: 473-477. DOI: [10.17660/ActaHortic.2006.704.74](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.704.74)
- Boureau T, El Maarouf-Bouteau H, Garnier A, Brisset MN, Perino C, Pucheu I, Barny MA. 2006. DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and nonhost tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 16-24.
- Büttner D, Bonas U. 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* 9: 193–200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.006>
- Calenge F, Drouet D, Denancé C, Van de Weg WE, Brisset MN, Paulin JP, Durel CE. 2005. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theor Appl Genet* 111(1): 128–135. DOI: [10.1007/s00122-005-2002-z](https://doi.org/10.1007/s00122-005-2002-z)
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01995265>
- Campa M, Piazza S, Righetti L, Oh CS, Conterno L, Borejsza-Wysocka E, Malnoy M. 2019. HIPM is a susceptibility gene of *Malus* spp.: reduced expression reduces susceptibility to *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(2): 167-175. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-18-0120-R>
- Carlsson A, Engstrom P, Palva ET, Bennich H. 1991. Attacin an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia* inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. *Infection Immunity* 59: 3040–3045.
- Çetin Ş, Bastas KK. 2015. *Erwinia amylovora* Enfeksiyonu Sonrası Elma, Armut ve Ayva Çeşitlerinde Konukçu Protein Miktarlarının Belirlenmesi, *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(3): 154-163. DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v3i3.154-163.246>
- Darcan Ö, Özkanca R. 2007. OmpC-OmpF porin proteins expression of *Escherichia coli* in nutrient broth and the role of EnvZ, OmpR, H-NS, AcP and RpoS on this expression. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, ISSN 1302-3055.
- De Maayer P, Venter SN, Kamber T, Duffy B, Coutinho TA, Smits THM. 2011. Comparative genomics of the type VI secretion systems of *Pantoea* and *Erwinia* species reveals the presence of putative effector islands that may be translocated by the VgrG and Hcp proteins. *BMC Genomics* 12: 576.
- De Wit PJGM, Bakker JD. 1980. Differential changes in soluble tomato leaf proteins after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiological plant pathology*, 17(2): 121-130. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(80\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0048-4059(80)90045-4)
- Deckers T, Schoofs H. 2008. Status of the pear production in Europe. *Acta Hort.* 800: 95–105. DOI: [10.17660/ActaHortic.2008.800.8](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.800.8)
- Dellagi A, Brisset MN, Paulin JP, Expert D. 1998. Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 734–742. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.8.734>
- Durel CE, Denancé C, Brisset M. N. 2009. Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes 'Evereste' and *Malus floribunda* clone 821. *Genome* 52: 139–147. DOI: <https://doi.org/10.1139/G08-111>
- During K. 1996. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. *Molecular Breeding* 2: 297–305.
- Eastgate JA. 2000. *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease. *Molecular plant pathology*, 1(6): 325-329. DOI: [10.1046/j.1364-3703.2000.00044.x](https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00044.x) *Euphytica* 77, 123–8.
- Expert D. 1999. Withholding and exchanging iron: Interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annu Rev Phytopathol* 37: 307–334. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.307>
- FAO, 2018. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat>, Erişim tarihi 11.01.2018.
- Flink J, Boman A, Boman H, Merrifield RB. 1989. Design, synthesis and antibacterial activity of cecropin like model peptides. *International Journal of Peptide Protein Research* 33: 412–421. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1989.tb00217.x>
- Forsberg PJ. 1991. U.S. Patent Application No. 07/280,301.
- Galyov EE, Hakansson S, Wolf-Watz H. 1994. Characterization of the operon encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 176: 4543–4548. DOI: [10.1128/jb.176.15.4543-4548.1994](https://doi.org/10.1128/jb.176.15.4543-4548.1994)
- Gaudriault S, Barny MA. 1999. Detection of Hrp-secreted proteins in strain CFBP1430 of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* 489: 345. DOI: [10.17660/ActaHortic.1999.489.60](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.489.60)
- Geider K. 2000. Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. In Vanneste J. L. (ed), *Fire Blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, CABI, New York, 117-140.



- Geier G, Geider K. 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42(6): 387-404. DOI: <https://doi.org/10.1006/pmpp.1993.1029>
- Gianinazzi S, Ahl P, Cornu A, Scalla R, Cassini R. 1980. First report of host b-protein appearance in response to a fungal infection in tobacco. *Physiological Plant Pathology*, 16(3), 337-342. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(80\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(80)80005-1)
- Hanke V, Hiller I, Klotzsche G, Richter K, Norelli JL, Aldwinckle HS. 2000. Transformation in apple for increased disease resistance. *Acta Horticulturae* 538: 611–616. DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.538.107
- Hardt WD, Galan JE. 1997. A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 9887–9892. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9887>
- He SY, Bauer DW, Collmer A, Beer SV. 1994. Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 289-292.
- Hildebrand M, Aldridge P, Geider K. 2006. Characterization of hns genes from *Erwinia amylovora*. *Mol. Genetic Genomics* 275: 310–319. DOI: 10.1007/s00438-005-0085-5
- Holtappels M, Vrancken K, Noben JP, Remans T, Schoofs H, Deckers T, Valcke R. 2016. The *in planta* proteome of wild type strains of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Journal of Proteomics* 139: 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.018>
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* 106: 7–16. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x>
- Jin Q, Hu W, Brown I, McGhee G, Hart P, Jones AL, He SY. 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* 40: 1129-1139. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02455.x>
- Jollès P, Jollès J. 1984. What's new in lysozyme research? A review. *Molecular and Cellular Biochemistry* 63: 165–189.
- Kellerhals M, Spuhler M, Patocchi A, Frey J. 2009. Selection efficiency in apple breeding. *Acta Hort* 814: 177–183. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.814.22
- Khan MA, Duffy B, Gessler C, Patocchi A. 2006. QTL mapping of fire blight resistance in apple. *Mol Breed* 17: 299–306. DOI: DOI 10.1007/s11032-006-9000-y
- Khan MA, Durel CE, Duffy B, Drouet D, Kellerhals M, Gessler C, Patocchi A. 2007. Development of molecular markers linked to the 'Fiesta' linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. *Genome* 50: 568–577. DOI: <https://doi.org/10.1139/G07-033>
- Kim JF, Beer SV. 2000. hrp Genes and Harpins of *Erwinia amylovora*: a Decade of Discovery, in: J.L. Vanneste. *Fire Blight: the Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*, CABI Publishing, pp. 153. ISBN 0 85199 294 3.
- 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. DOI: 10.1128/JB.180.19.5203-5210.1998
- Kim JF, Wei ZM, Beer SV. 1997. The hrpA and hrpC operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. *Journal of bacteriology*, 179(5): 1690-1697. DOI: 10.1128/jb.179.5.1690-1697.1997
- Kim JF. 1997. Molecular characterization of a novel harpin and two hrp secretory operons of *Erwinia amylovora*, and a hrp operon of *E. chrysanthemi*. Ph.D. Cornell University, Ithaca, NY. DOI: 10.1128/jb.179.5.1690-1697.1997
- Ko K, Brown S, Norelli JL, Aldwinckle HS. 1998. Alteration in nptII and gus expression following micropropagation of transgenic M.7 apple rootstock lines. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 123: 11–18. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.1.11>
- Ko K, Norelli JL, Reynoird JP, Aldwinckle HS, Brown SK. 2002. T4 lysozyme and attacin genes enhance resistance of transgenic galaxy apple against *Erwinia amylovora*. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 127: 515–519. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.127.4.515>
- Ko K, Norelli JL, Reynoird JP, Boresjza-Wysocka EE, Brown S, Aldwinckle HS. 2000. Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. *Biotechnology Letter* 22: 373–381.
- Koczan JM, Lenneman BR, McGrath MJ, Sundin GW. 2011. Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 7031–7039. DOI: 10.1128/AEM.05138-11
- Koczan JM, McGrath MJ, Zhao Y, Sundin GW. 2009. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovanan and levan to biofilm formation: Implications in pathogenicity. *Phytopathology*, 99: 1237–1244. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHTO-99-11-1237>
- Koebnik R, Locher K, P Van Gelder P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology* 37(2): 239-253. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x>
- Langlotz C, Schollmeyer M, Coplin DL, Nimtz M, Geider K. 2011. Biosynthesis of the repeating units of the exopolysaccharides amylovanan from *Erwinia amylovora* and stewartan from *Pantoea stewartii*. *Physiological and molecular plant pathology*, 75(4), 163-169. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.04.001>
- Le Roux PM, Khan MA, Duffy B, Patocchi A, Broggin GAL, Gessler C. 2010. Quantitative trait loci mapping of fire blight resistance in the apple cultivars 'Florina' and 'NovaEasygro'. *Genome* 53: 710–722. DOI: <https://doi.org/10.1139/G10-047>
- Liu Q, Ingersoll J, Owens L, Salih S, Meng R, Hammerschlag F. 2001. Response of transgenic Royal Gala apple (*Malus domestica* Borkh.) shoots carrying a modified cecropin MB39 gene, to *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Reports*, 20(4): 306-312. DOI: 10.1007/s002990100333
- Liu Q, Salih S, Hammerschlag F. 1998. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus domestica* Borkh.) shoots promotes high frequency shoot organogenesis and enhanced  $\beta$ -glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Reports* 18: 32–36.
- Llop P, Barbe S, Lopez MM. 2012. Functions and origin of plasmids in *Erwinia* species that are pathogenic to or epiphytically associated with pome fruit trees. *Trees-Structure and Function* 26: 31– 46. DOI: 10.1007/s00468-011-0630-2
- Llop P, Cabrefiga J, Smits THM, Dreo T, Barbe S, Pulawska J, Bultreys A, Blom J, Duffy B, Montesinos E, Lopez MM. 2011. *Erwinia amylovora* novel plasmid pEI70: complete sequence, biogeography, and role in aggressiveness in the fire blight phytopathogen. *PLoS ONE* 6, e28651. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028651>
- Losada LC, Hutcheson SW. 2005. Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Molecular microbiology*, 55(3): 941-953. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04438.x>
- Maes M, Orye K, Bobev S, Devreese B, van Beeumen J, de Bruyn A, Busson R, Herdewijn P, Morreel K, Messens E. 2001. Influence of amylovanan production on virulence of *Erwinia amylovora* and a different amylovanan structure in *E. amylovora* isolates from Rubus. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107: 839–844.

- Tör M. 1998. Recent Developments In Molecular Plant-Microbe Interactions. Turkish Journal of Biology, 22(3): 271-286.
- Malnoy M, Aldwinckle HS. 2009. Apple: c Translational Genomics (Gene function validated in models/models in crops, transgenics, RNAi, over-expression) in Folta K and Gardiner S.E. (eds.). "Genetics and Genomics of Rosaceae" Springer publishing, USA, pp 143-162.
- Malnoy M, Borejsza-Wysocka E, Pascal-Omeñaca L, Beer SV. 2008. Silencing of HIPM, the apple protein that interacts with HrpN of *Erwinia amylovora*. Acta horticulturae 793(793): 261-264. DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.793.38
- Malnoy M, Borejsza-Wysocka EE, Jin QL, He SY, Aldwinckle HS. 2007b. Over-expression of the apple gene MpNPR1 causes increased disease resistance in *Malus domestica*. Acta Horticulturae (in press).
- Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka EE, He SY, Aldwinckle H. S. 2007a. Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*, Mol Plant Microbe Interact, 20: 1568–1580. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.704.82
- Mann RA, Blom J, Buhlmann A, Plummer KM, Beer SV, Luck JE, Goesmann A, Frey JE, Rodoni BC, Duffy B, Smits TH. M. 2012. Comparative analysis of the Hrp pathogenicity island of *Rubus*- and *Spiraeoideae*-infecting *Erwinia amylovora* strains identifies the IT region as a remnant of an integrative conjugative element. Gene 504: 6-12. DOI: https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.05.002
- Mann RA, Smits TH, Buhlmann A, Blom J, Goesmann A, Frey JE, Plummer KM, Beer SV, Luck J, Duffy B. 2013. Comparative genomics of 12 strains of *Erwinia amylovora* identifies a pan-genome with a large conserved core. PLoS ONE 8, e55644. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055644
- 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. DOI: https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0053
- Milčevićová 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(1-2): 60-67. DOI: https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.013
- Mills SD, Boland A, Sory MP, van der Smissen P, Kerbouch C, Finlay BB, Cornelis GR. 1997. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 12638–12643. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12638
- Mohammadi M. 2010. Enhanced colonization and pathogenicity of *Erwinia amylovora* strains transformed with the near-ubiquitous pEA29 plasmid on pear and apple. Plant Pathol 59: 252–261. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02182.x
- Mourgues F, Brisset MN, Chevreau E. 1998. Activity of different antibacterial peptides on *Erwinia amylovora* growth, and evaluation of the phytotoxicity and stability of cecropins. Plant Science 139: 83–91. DOI: https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00178-2
- Norelli JL, Aldwinckle H, Destefano-Beltran L, Jaynes JM. 1994. Transgenic Malling 26 apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. Euphytica 77: 123–8.
- Norelli JL, Bolar JP, Harman GE, Aldwinckle HS. 1999. Transgenic apple plants expressing chitinases from *Trichoderma* have increased resistance to scab (*Venturia inaequalis*). Abstract, Eucarpia Symp. on fruit breeding & genetics, Dresden, Sept. 1999. DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.538.108
- 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. DOI: 10.1007/s11295-008-0164-y
- Norelli JL, Jones AL, Aldwinckle HS. 2003. Fire blight management in the twenty-first century. Plant Dis 87: 756–765.
- Oh CS, Beer SV, 2007. AtHIPM, an ortholog of the apple HrpN-interacting protein, is a negative regulator of plant growth and mediates the growthenhancing effect of HrpN in Arabidopsis, Plant Physiol, 145: 426-436. DOI: DOI: https://doi.org/10.1104/pp.107.103432
- Oh CS, Kim JF, Beer SV. 2005. The Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection. Mol. Plant Pathol. 6: 125-138. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00269.x
- Ordax M, Marco-Noales E, Lopez MM, Biosca EG. 2010. Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. Res. Microbiol. 161: 549–555. DOI: https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.05.003
- Parravicini G, Gessler C, Denance C, Lasserre-Zuber P, Vergne E, Brisset MN, Patocchi A, Durel CE, Broggin GAL. 2011. Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar 'Evereste'. Mol Plant Pathol. doi: 10.1111/J.1364-3703.2010.00690.X.
- Peil A, Richter K, Garcia-Libreros T, Hanke V, Flachowsky H, Celton JM, Horner M, Gardiner S, Bus V. 2008. Confirmation of the fire blight QTL of *Malus x robusta* 5 on linkage group 3. Acta Hort 793: 297–303. DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.793.44
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C. 2004. Biofilm formation in plant-microbe associations. Curr. Opin. Microbiol., 7: 602–609. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.014
- Singh DK, Maximova SN, Jensen PJ, Lehman BL, Ngugi HK, McNellis TW. 2010. FIBRILLIN4 is required for plastoglobule development and stress resistance in apple and Arabidopsis. Plant Physiology, 154(3): 1281-1293. DOI: DOI: https://doi.org/10.1104/pp.110.164095
- Smits TH, Duffy B. 2011. Genomics of iron acquisition in the plant pathogen *Erwinia amylovora*: insights in the biosynthetic pathway of the siderophore desferrioxamine E. Archives of microbiology, 193(10): 693. DOI 10.1007/s00203-011-0739-0
- Smits THM, Rezzonico F, Kamber T, Blom J, Goesmann A, Frey JE, Duffy B. 2010. Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. Mol Plant Microbe Interact 23: 384–393. DOP: https://doi.org/10.1094/MPMI-23-4-0384
- Song X, Fan H, Wei ZM, 2002. Receptors for hypersensitive response elicitors and uses thereof, U.S. Patent Application No. 20020007501.
- Staskawicz BJ, Mudgett MB, Dangl JL, Galan JE. 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. Science 292: 2285–2289. DOI: 10.1126/science.1062013
- Steinhauer J, Agha R, Pham T, Varga AW, Goldberg MB. 1999. The unipolar Shigella surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. Mol Microbiol., 32: 367-377. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01356.x
- 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.

- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ, 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, *Annu Rev Phytopathol*, 44: 135-162. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Van Schie CC, Takken FL. 2014. Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annual review of phytopathology*, 52: 551-581. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.12.1204>
- Vrancken K, Holtappels M, Schoofs H, Deckers T, Valcke R. 2013. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art. *Microbiology*, 159: 823-832. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>
- Wang D, Korban SS, Zhao YF, 2009. The Rcs phosphorelay system is essential for pathogenicity in *Erwinia amylovora*, *Mol. Plant Pathol.*, 10: 277-290. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00531.x>
- Wei ZM, Beer SV, 1996. Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance. *Acta Hort.* 411: 223-225. DOI: 10.17660/ActaHortic.1996.411.45
- Wei ZM, Beer SV. 1993. Harpin of *Erwinia amylovora* functions in secretions of harpin and is a member of a new protein family. *J. Bacteriol.* 175: 7958-7967. DOI: 10.1128/jb.175.24.7958-7967.1993
- Wei ZM, Beer SV. 1995. hrpI activates *Erwinia amylovora* hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J. Bacteriol.* 177: 6201-6210. DOI: 10.1128/jb.177.21.6201-6210.1995
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV. 1992a. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257: 85-88. DOI: 10.1126/science.1621099
- Wei ZM, Sneath BJ, Beer SV. 1992b. Expression of *Erwinia amylovora* hrp genes in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* 174: 1875-1882. DOI: 10.1128/jb.174.6.1875-1882.1992
- Zhao Y, He SY, Sundin GW. 2006. The *Erwinia amylovora* avrRpt2<sup>EA</sup> gene contributes to virulence on pear and AvrRpt2<sup>EA</sup> is recognized by Arabidopsis RPS2 when expressed in *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(6): 644-654. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0644>
- Zhao YF, Blumer SE, Sundin GW. 2005. Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J Bacteriol* 187: 8088-8103. DOI: 10.1128/JB.187.23.8088-8103.2005
- Zhao YF, Sundin GW, Wang DP. 2009. Construction and analysis of pathogenicity island deletion mutants in *Erwinia amylovora*. *Can J Microbiol* 55: 457-464. DOI: <https://doi.org/10.1139/W08-147>