A-PDF Merger DEMO : Purchase from www.A-PDF.com to remove the watermark

**T.C.**

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# ATEŞ YANIKLIĞI HASTALIK ETMENİ *Erwinia amylovora'* NIN LNA PROBE KULLANILARAK KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE TANISI ve TESPİTİ

**GÖZDE BOZAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**2011**

**T.C.**

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# ATEŞ YANIKLIĞI HASTALIK ETMENİ *Erwinia amylovora'* NIN LNA PROBE KULLANILARAK KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE TANISI ve TESPİTİ

**GÖZDE BOZAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**2011**

# ATEŞ YANIKLIĞI HASTALIK ETMENİ *Erwinia amylovora'* NIN LNA PROBE KULLANILARAK KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE TANISI ve TESPİTİ

**GÖZDE BOZAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2011.02.0121.042 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**2011**

**T.C.**

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# ATEŞ YANIKLIĞI HASTALIK ETMENİ *Erwinia amylovora'* NIN LNA PROBE KULLANILARAK KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE TANISI ve TESPİTİ

**GÖZDE BOZAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu tez … /… /2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (…..) not takdir edilerek Oybirliği/ Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman)……..

Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU…….

Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN……..

## ÖZET

**ATEŞ YANIKLIĞI HASTALIK ETMENİ *Erwinia amylovora'* NIN LNA PROBE KULLANILARAK KANTİTATİF REAL-TIME PCR İLE TANISI ve TESPİTİ**

**Gözde BOZAN**

**Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı**
**Danışman: Prof. Dr. Hüseyin BASIM**
**Kasım 2011, 92 sayfa**

Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında önemli kayıplara neden olan Ateş Yanıklığı Hastalık etmeni *Erwinia amylovora'* nın LNA prob kullanılarak Kantitatif Real-Time PCR ile hassas ve kısa sürede tanısı ve tespiti yapılmıştır.

Bakteriyel patojen, *Erwinia amylovora'* nın Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için, patojenik bakterinin polisakkarit üretiminden sorumlu ve kromozomal *ams* gen' inin 1,6 kb' lik internal diziliminden prob ve primerler dizayn edilmiştir. Geliştirilen prob ve primerler ile *Erwinia amylovora* genomundan, planlandığı gibi 63 bp' lik PCR ürünü çoğaltılmıştır. Prob ve primerlerin spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla farklı *Erwinia amylovora* strainleri ve farklı türlere ait bakteriyel izolatlar kullanılmıştır. Farklı bitki patojeni bakterilerin genomlarından hiçbir amplifikasyon tespit edilememesine rağmen, test edilen tüm yerli ve yabancı farklı *Erwinia amylovora* strainlerinden 63 bp' lik amplifikasyon elde edilmiştir. Geliştirilen primer ve probun hassasiyet limiti direkt bakteriyel süspansiyondan 6 cfu/2µ, genomik DNA' dan 10 pg olarak belirlenmiştir. Bu

çalışmada geliştirilen prob ve primer kullanılarak gerçekleştirilen Kantitatif Real-Time PCR metoduyla, hastalıklı ve sağlıklı yaprak, sürgün ve çiçeği içeren bitki materyallerinden *E. amylovora*' nın tespiti yapılarak, hastalık etmeninin çiçeklenme döneminden üretim sezonunun sonuna kadar epifitik populasyonlarının değişimlerinin tespit edilmesine olanak sağlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Kantitatif Real-Time PCR, LNA probu, *Erwinia amylovora,* tanı, tespit

JÜRİ: Prof. Dr. Hüseyin BASIM
Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

## ABSTRACT

**IDENTIFICATION AND DETECTION BY QUANTITATIVE REAL-TIME PCR OF *Erwinia amylovora,* CAUSAL AGENT OF THE FIRE BLIGHT DISEASE**

**GÖZDE BOZAN**

**M.Sc. Thesis in Plant Protection**
**Adviser: Prof. Dr. Hüseyin BASIM**
**November 2011, 92 pages**

*Erwinia amylovora,* causal agent of Fire Blight Disease which causes significant losses in pomaceous plants, was sensitively identified and detected in short time by Quantitative Real-Time PCR method using LNA probe.

Probe and primers for identification of the bacterium by Real-Time PCR were designed from internal sequence of chromosomal 1.6 kb-*ams* gene which is responsible for the polysaccharide production of the pathogenic bacteria. 63 bp PCR product from genome of *Erwinia amylovora* was amplified by the primer and probe as designed. Different *Erwinia amylovora* strains and bacterial species were used to determine the specificity of the probe and primers. Although no amplication was detected from genome of different species of pathogenic bacteria, the 63 bp-amplifications were detected from different strains of *E. amylovora.* While sensitivity limit of the prob and primers from direct bacterial suspension was found to be 6 cfu/2μ, the genomic DNA detection limit was 10 pg. Quantitative Real-Time PCR method using probe and primers developed in this study gave an oppurtunity for

detection of epiphytic population of *E. amylovora* on diseased and healthy plant materials including leaf, shoot and flower in early stage.

KEY WORDS: Quantitative Real-Time PCR, LNA probe, *Erwinia amylovora*, detection, identification

COMMITTEE: Prof. Dr. Hüseyin BASIM
Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada, yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ekonomik yönden önemli kayıplara neden olan bakteriyel bitki patojeni *Erwinia amylovora*' nın, kısa ve etkili sonuca ulaşmamızı sağlayan moleküler metotlardan biri olan Kantitatif Real-Time PCR ile hastalıklı bitki materyallerinden tanısının ve tespitinin yapılması sağlanmıştır.

Bu tez çalışmasında araştırmalar ve laboratuar çalışmalarının tümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Bitki Bakteriyolojisi Laboratuarları' nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan tüm teknikleri ve gerekli donanımı sağlayan Sayın hocam Prof. Dr. Hüseyin BASIM' a göstermiş olduğu destek ve sabrından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu' na, çalışma imkanlarını sunan Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Başkanlığına, çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen bütün bölüm arkadaşlarıma ve bana yüksek lisans döneminde her türlü desteği esirgemeyen değerli aileme yaptıkları tüm fedakarlıklardan dolayı teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

**İÇİNDEKİLER**

ÖZET ..... i
ABSTRACT ..... iii
ÖNSÖZ ..... v
İÇİNDEKİLER ..... vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... x
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... xiii
1. GİRİŞ ..... 1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI ..... 6
3. MATERYAL VE METOT ..... 27
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler ..... 27
3.2. Real-Time PCR Optimizasyonu ..... 28
3.3. Primer ve Prob Dizaynı ..... 29
3.4. Primer ve Probun *Erwinia amylovora* Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi ..... 32
3.5. Primer ve Probun Saf DNA' dan Hassasiyetinin Belirlenmesi ..... 32
3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primer ve Probun Hassasiyetinin Belirlenmesi ..... 32
3.7. Primer ve Probun Seçiciliğinin Belirlenmesi ..... 33
3.8. Bakteriyel Patojenin Çiçekten Tespiti ..... 33
3.9. Bakteriyel Patojenin Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti ..... 34
3.10. Real-Time Bio-PCR ..... 34
3.11. Kantitatif Real-Time PCR ile Bitki Materyallerindeki Bakteri Populasyon Değişimlerinin Belirlenmesi ..... 35
4. BULGULAR ..... 37
4.1. *Erwinia amylovora'* nın Real-Time PCR İle Tanısı ..... 37
4.2. *Erwinia amylovora'* nın Tüm Strainlerinin Real-Time PCR İle Tanısı ..... 38
4.3. Primerler ve Probun Saf DNA' dan Hassasiyeti ..... 40

4.4. Direkt Bakteriden Primerler ve Probun Hassasiyeti.....41
4.5. Primerler ve Probun Seçiciliği .....43
4.6. Bakteriyel Patojen *Erwinia amylovora*' nın Çiçekten Tespiti .....44
4.7. Real-Time Bio-PCR.....45
4.8. Hastalıklı Bitki Dokularından Bakteriyel Patojen
*Erwinia amylovora*' nın Tespiti .....46
4.9. Kantitatif Real-Time PCR ile Bakteri Sayısının Belirlenmesi.....49
4.9.1. Mayıs ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki
materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....50
4.9.2. Haziran ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki
materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....55
4.9.3. Temmuz ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki
materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....60
4.9.4. Ağustos ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki
materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....65
4.9.5. Eylül ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki
materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....69
4.9.6. Aylara bağlı populasyon dinamiğinin belirlenmesi ve
verilerin analizi.....71
5. TARTIŞMA.....75
6. SONUÇ.....82
7. KAYNAKLAR .....85
ÖZGEÇMİŞ

**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

**Simgeler**

| | |
|---|---|
| °C | Santigrad Derece |
| µl | mikrolitre |
| kg | kilogram |
| ml | mililitre |
| pg | picogram |
| bp | baz çifti |
| Kb | Kilo baz (1000 baz çifti) |
| dk | dakika |
| sn | saniye |

**Kısaltmalar**

| | |
|---|---|
| Cfu | Canlı hücre sayısı |
| cfu/2µ | 2 mikrolitredeki canlı hücre sayısı |
| Ct | Cycle threshold PCR |
| DNA | Deoksribonükleik Asit |
| dNTPs | Adenin, Guanin, Sitozin ve Timinden oluşan nükleotid çözeltisi |
| ELISA | Enzym Linked Immuno Sorbent Assay |
| FAO | Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü |
| King's B | Besi ortamı |
| LNA | Locked Nucleic Acid |
| NA | Nutrient Agar |
| NSA | Nutrient Sucrose Agar |
| MGB | Minor-Groove-Binder Probe |
| MS | Murashige and Skoog medium |
| MQ | Milli Q |

| | |
|---|---|
| NSA | Nutrient Sucrose Agar |
| ORFs | Open Reading Frames |
| PE | Phosphate Buffer |
| PFGE | Pulsed Field Gel Electrophoresis |
| pv. | patovar |
| RAPD | Random Amplified Polymorphic DNA |
| RFLP | Restriction Fragment Lenght Polymorphism |
| rpm | Revolutions per minute |
| PCR | Polimerase Chain Reaction ( Polimeraz Zincir Reaksiyonu) |
| R-T PCR | Real-Time PCR |
| SSR | Short-Sequence DNA Repeats |
| var. | Varyete |
| vd | ve diğerleri |
| *Cmm* | *Clavibacter michingenensis* sub. sp*. michingenensis* |
| *E. amylovora* | *Erwinia amylovora* |
| *Xav* | *Xanthomonas axonopodis vesicatoria* |
| UV | Ultra Viyole |

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

Şekil 2.1. *Erwinia amylovora'* nın koloni gelişimi ..... 7
Şekil 2.2. a) Elmada bakteriyel akıntılar (ooze)
b) Armutta bakteriyel akıntılar (ooze) ..... 8
Şekil 2.3. Arılar polen toplarken abdomen kısımları stigma ile temas eder. Şekide armut çiçeğinden polen toplayan arının stigma ile teması gözlenmektedir. Bu yolla enfekteli çiçeklerden sağlam çiçeklere *Erwinia amylovora* taşınabilmektedir. ..... 9
Şekil 2.4. *Erwinia amylovora'* nın elma ağacının yapraklarındaki ve meyvelerindeki belirtisi (Antalya, Döşemealtı 2010) ..... 10
Şekil 2.5. *Erwinia amylovora'* nın armut ağacının yapraklarındaki ve meyvelerindeki belirtisi (Antalya, Korkuteli 2011) ..... 10
Şekil 2.6. *Erwinia amylovora'* nın ayva ağacının yapraklarındaki ve meyvelerindeki belirtisi (Antalya, Korkuteli 2011) ..... 11
Şekil 3.1. *Erwinia amylovora'* ya ait kromozomal DNA' nın patojenisiteden sorumlu *amsB ve amsC'* nin oluşturduğu 1,6 kb' lik gen bölgesininde içinde yer aldığı *ams* geninin fiziksel haritası. Bu bölgede tanımlanan 12 ORFs (open reading frames) bölgesi bulunmaktadır ..... 30
Şekil 3.2. *Erwinia amylovora'* ya ait *amsB* ve *amsC' nin* (1,6 kb), *AMSbL* ve *AMSbR* primerleri (Bereswill vd 1995) ile çoğaltılması (M: Marker (1kb), 1;2;3;4: PCR ürünü, 5: Negatif kontrol) ..... 30
Şekil 4.1. *Erwinia amylovora* strainine spesifik primer ve prob ile *Erwinia amylovora*' nın tespiti ..... 37
Şekil 4.2. *Erwinia amylovora'* nın SYBR-melt grafiği ..... 38
Şekil 4.3. *Erwinia amylovora'* nın yerli strainlerinin tespiti ..... 39
Şekil 4.4. *Erwinia amylovora'* nın yabancı strainlerinin tespiti ..... 40
Şekil 4.5. Primerler ve probun saf DNA' dan hassasiyeti ..... 41
Şekil 4.6. NSA kültür besi ortamında en az bakterinin tespiti ..... 42
Şekil 4.7. Primer prob setinin bakteri hassasiyeti ..... 43
Şekil 4.8. Farklı bakteriler denenerek *Erwinia amylovora'* ya özel dizayn edilen primerler ve probun spesifikliğinin belirlenmesi ..... 44
Şekil 4.9. Williams çeşidi armut ağaçlarından elde edilen çiçeklerde *Erwinia amylovora'* nın tespiti ..... 45
Şekil 4.10. Hastalıklı bitki materyallerine ait kısımlardan yalnız canlı bakterilerin tespiti ..... 46
Şekil 4.11. Antalya, Döşemealtı' ndaki elma ağaçlarına ait enfekteli kısımlarda *Erwinia amylovora'* nın tanısı ve tespiti ..... 47
Şekil 4.12. Antalya, Döşemealtı' ndaki enfektesiz elma yapraklarında *Erwinia amylovora'* nın tanısı ve tespiti ..... 48
Şekil 4.13. Bursa' daki Granny Smith çeşidi elma ağaçlarına ait hastalıklı bitki kısımlarında *Erwinia amylovora'* nın tanısı ve tespiti ..... 48
Şekil 4.14. Bursa' daki Summer Red çeşidi elma ağaçlarına ait hastalıklı bitki kısımlarında *Erwinia amylovora'* nın tanısı ve tespiti ..... 49
Şekil 4.15. Kantitatif Real-Time PCR ile referans standart eğrinin oluşturulması ..... 50

Şekil 4.16. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfekteli ve enfektesiz armut çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 51
Şekil 4.17. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 52
Şekil 4.18. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfekteli ve enfektesiz armut çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 52
Şekil 4.19. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 53
Şekil 4.20. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfekteli ve enfektesiz ayva çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 53
Şekil 4.21. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfekteli elma çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 54
Şekil 4.22. Mayıs ayında enfekteli ve enfektesiz çiçeklerinde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik ..... 54
Şekil 4.23. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz armut yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 56
Şekil 4.24. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut yaprağındaki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 56
Şekil 4.25. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 57
Şekil 4.26. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfektesiz armut yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 57
Şekil 4.27. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva yaprağındaki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 58
Şekil 4.28. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 58
Şekil 4.29. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz elma yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 59
Şekil 4.30. Haziran ayında enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyvelerde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik ..... 59
Şekil 4.31. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz armut yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 61
Şekil 4.32. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut yaprağındaki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 61
Şekil 4.33. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 62
Şekil 4.34. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfektesiz armut yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 62
Şekil 4.35. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva yaprağındaki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 63
Şekil 4.36. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 63
Şekil 4.37. Antalya, Korkuteli, Yazır I' de enfektesiz elma yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi ..... 64
Şekil 4.38. Temmuz ayında enfekteli ve enfektesiz yaprak ve

meyvelerde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik .....64
Şekil 4.39. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz armut yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi .....66
Şekil 4.40. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli armut yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi .....66
Şekil 4.41. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfektesiz armut yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi .....67
Şekil 4.42. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ayva yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi .....67
Şekil 4.43. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz elma yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi .....68
Şekil 4.44. Ağustos ayında enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyvelede tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik.....68
Şekil 4.45. Antalya, Korkuteli, Merkez' deki enfekteli armut yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi .....70
Şekil 4.46. Antalya, Korkuteli, Merkez' deki enfekteli ayva yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi .....70
Şekil 4.47. Eylül ayında enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyvelerde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik .....71
Şekil 4.48. Korkuteli Bölgesindeki armut, elma ve ayva ağaçlarında epifitik olarak bulunan *Erwinia amylovora'* nın aylara bağlı populasyon dinamiği.....72
Şekil 4.49. Korkuteli Bölgesindeki *Erwinia amylovora'* nın aylara bağlı populasyon dinamiği.....72
Şekil 5.1. Sıcaklığa bağlı oluşturulan Ateş Yanıklığı Hastalığının önceden tahmin modeli.....80

## ÇİZELGELER DİZİNİ

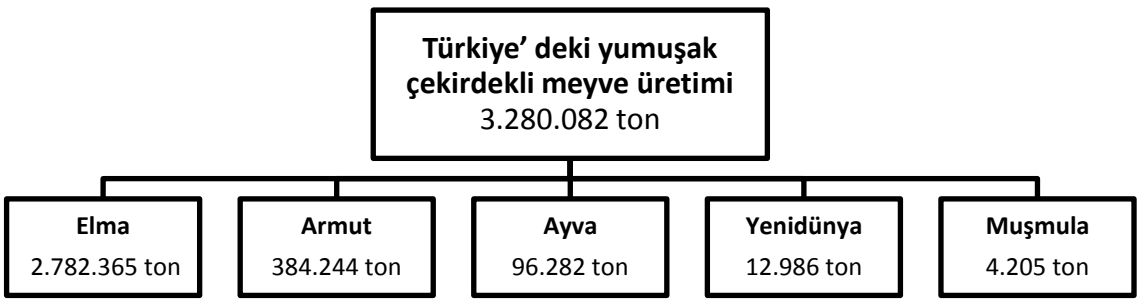
Çizelge 1.1. Yumuşak çekirdekli meyvelerin üretim miktarı bakımından Türkiye' deki dağılımı ..... 1
Çizelge 1.2. *Erwinia amylovora'* nın bilimsel sınıflandırılması ..... 4
Çizelge 3.1. Türkiye' nin farklı bölgelerinden elde edilen ve Real-Time PCR' da test edilen *Erwinia amylovora* strainleri ..... 27
Çizelge 3.2. Değişik ülkelerden elde edilen ve Real-Time PCR' da test edilen *Erwinia amylovora* strainleri ..... 28
Çizelge 3.3. Real-Time PCR' da kullanılan farklı bitki patojeni bakteriler ..... 28
Çizelge 3.4. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *Erwinia amylovora* için oluşturulan Real-Time PCR programı ..... 29
Çizelge 3.5. Real-Time PCR' da *Erwinia amylovora'* nın tanısı için kullanılan polisakkarit üretiminden sorumlu kromozomal 1,6 kb' lik *amsB* ve *amsC*' nin de içinde bulunduğu bölgenin dizilimi ..... 31
Çizelge 4.1. Real- Time PCR ile *Erwinia amylovora*' nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi ..... 42
Çizelge 4.2. Korkuteli Bölgesinden Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül ayları süresince tespit edilen *Erwinia amylovora* populasyonuna ait varyans analiz sonuçları ..... 73
Çizelge 4.3. Korkuteli Bölgesinden %100 çiçeklenme döneminde elde edilen çiçeklerde tespit edilen *Erwinia amylovora* patojeninin Kantitatif Real-Time PCR' dan ve kültür ortamındaki gelişiminden elde edilen sayısal değerlere ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ..... 74
Çizelge 4.4. Korkuteli Bölgesinden elde edilen sürgünün kısımlarından tespit edilen *Erwinia amylovora* patojeninin Kantitatif Real-Time PCR' dan ve kültür ortamındaki gelişiminden elde edilen sayısal değerlere ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ..... 74

## 1. GİRİŞ

Ülkemiz tarım sektörünün önemli bir bölümünü meyvecilik oluşturmaktadır. Dünya üzerinde üretimi gerçekleştirilen birçok meyve türünün ülkemizde de yetiştirilebilmesi, Türkiye' nin iklimi ve toprak yapısının uygunluğu ile ilgilidir. Ülkemizin birçok yöresinde elma, armut, ayva, muşmula, üvez, erik, vişne, kiraz, kızılcık, fındık, fıstık, badem, ceviz, kestane, zeytin, incir, nar vb. meyve türleri yetişmektedir. Bunlardan başka, anavatanları ülkemiz olan ancak yabanilerinden yararlanılan; alıç, kuşburnu, böğürtlen, karayemiş, melengiç, mahlep, sumak vb. birçok meyve türü de bulunmaktadır (Anonim 2007).

Türkiye' de meyvecilik alanında yumuşak çekirdekliler (elma, armut, ayva, muşmula, yenidünya) üretim miktarı bakımından üzümsü meyvelerden sonra ikinci sırada yer almakta ve önemli bir meyve grubunu oluşturmaktadır. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının Türkiye' deki meyve üretimi 3.280.082 ton' dur. Bu üretimin 2.782.365 tonu Elma, 384.244 tonu Armut, 96.282 tonu Ayva, 4.205 tonu Muşmula, 12.986 tonu Yenidünya' dan oluşmaktadır (Anonim 2009). Yumuşak çekirdekli meyvelerin üretim miktarı bakımından Türkiye' deki dağılımı Çizelge 1.1' de belirtilmektedir.

Çizelge 1.1. Yumuşak çekirdekli meyvelerin üretim miktarı bakımından Türkiye' deki dağılımı (Anonim 2009)



Rosaceae familyasından kültürü yapılan bir meyve türü olan elmanın (*Malus domestica*), ilk olarak Kuzey Anadolu' da, Güney Kafkaslar, Rusya' nın güneybatısında kalan bölgeler ve Kazakistan' nın doğusu dolaylarında ortaya çıktığı sanılmaktadır (Gibson 2008). Dünya' da 64 255 520 ton elma üretilmekte ve bu üretimin 27 507 000 tonu Çin Halk Cumhuriyet' inde yapılmaktadır. Türkiye, Dünya ülkeleri arasında elma yetiştiriciliğinde dördüncü sırada yer almaktadır ve %3.5' lik bir paya sahiptir. Türkiye' de 2008 yılında miktar olarak 8.324.348 ton, değer olarak ise yaklaşık 6,5 milyar $ elma ihracatı gerçekleştirilmiştir (FAO 2008). Elma üretimi Türkiye' ye iyi bir gelir sağlamaktadır. Türkiye' de elma tüketimi kişi başına 20 kg civarında olup, Dünya' da en fazla elma tüketenler arasında yer almaktadır. Besin değeri çok yüksek olan bu meyve diğer birçok meyve gibi yüksek miktarda C vitaminine eşdeğer olan fenolik bileşenler ve kanser riskini, DNA hasarını azaltan değerli antioksidantlar içermektedir (Boyer ve Liu 2004).

Rosaceae familyasına ait diğer bir meyve türü olan armut *(Pyrus communis)* ise, her iki yarıkürenin ılıman iklim kuşağı ülkelerinde yetiştirilmektedir. Dünya' da 20 105 683 ton armut üretilmekte ve bu üretimin 12 625 000 tonu Çin Halk Cumhuriyet' inde yapılmaktadır. Türkiye, Dünya ülkeleri arasında armut üretiminde yedinci sırada yer almaktadır ve %1.7' lik bir paya sahiptir. Türkiye' de 2008 yılında miktar olarak 2.512.355 ton, değer olarak ise yaklaşık 2,4 milyar $ armut ihracatı gerçekleştirilmiştir (FAO 2008). Besin değeri yüksek olan armut iyi bir gelir kaynağıdır.

*Erwinia amylovora*' nın neden olduğu Ateş Yanıklığı Hastalığı yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ve diğer Rosaceae familyasına ait bitkilerde zarar yaparak önemli ölçüde ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Van der Zwet ve Keil 1979). Dünya' nın birçok bölgesinde bu hastalık yaygın olup Türkiye' de de İç Anadolu Bölgesi başta olmak üzere, tüm bölgelerde ortaya çıkmaktadır. Hastalık, ilk olarak 1780' de New York eyaletinde tespit edilmiş, 1884' de re-inokulasyon denemeleri sonucunda, hastalığa neden olan bakterinin, *Erwinia amylovora* olduğu saptanmıştır (Van der Zwet ve Keil 1979). Avrupa kıtasında ise ilk kez 1958 yılında İngiltere' de görülmüştür. Türkiye' de

ise ilk defa 1985 yılında Sultandağ ve Afyon' da, 1987' de Isparta ve Burdur' da saptanmış olup günümüzde ülkemizin hemen her bölgesine yayılmış durumdadır (Öktem ve Benlioğlu 1988).

Ateş Yanıklığı Hastalığı epidemi oluşturan bir hastalıktır. Hastalığın etmeni olan *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow vd 1920, Gram (-), peritrik kamçılı fakültatif anaerob bir bakteridir. *Erwinia amylovora*' nın bilimsel sınıflandırmadaki yeri ise Çizelge 1.2' de belirtilmiştir (Martinec ve Kocur 1964). Hastalık, özellikle armut ve elma ağaçlarına zarar vererek, önemli derecede ürün kayıplarına neden olmaktadır (Van der Zwet ve Beer 1995). İlk simptom çiçeklerde ortaya çıkar, nekroz ve siyahlaşmalar çiçek enfeksiyonu ile tüm bitkiye yayılır, geniş dal ve gövdeleri etkileyerek ağaç ölümlerine sebep olabilir. Enfekteli çiçek sulu bir görünüm alır, sonra hızla kıvrılarak, aşağıya doğru asılır ve genellikle yanmış sürgünler ortaya çıkar. Uç sürgünler ve filizler doğrudan etkilenir (Van der Zwet ve Keil 1979). Enfekteli sürgünlerin kabukları kahverenginden siyaha döner ve uç kısımları baston şeklini alır. Enfekteli sürgünlerde bulunan yapraklar kıvrık ve aşağıya doğru sarkık görünür. Belirtiler sürgünlerde alt dallara doğru iner. Enfekteli sürgünlerin etrafındaki dalların kabuğu önce sulu görünümlü daha sonra kuru, çökmüş görünür. Bu tip durumlarda enfeksiyon dalı çevrelerse enfeksiyonun yakınındaki dallar beslenemediği için ölür. Enfekteli meyvelerde enfeksiyon meyve sapından bakterinin yayılmasıyla oluşur. Olgunlaşmamış küçük meyveler sulumsu bir görünüş alır ve sonra kahverengileşir, buruşur, mumyalaşır, sonuçta da siyaha dönerek ölür. Bu tip meyvelerde bakteriyel akıntılar yapışkan damlacıklar şeklinde ortaya çıkar (Van der Zwet ve Beer 1995). Bakteriyel eksudat (ooze) bitkinin vejetatif ve generatif aksamı üzerinde, ilk çiçekler açıldığında görülebilir (Van der Zwet ve Keil 1979). *Erwinia amylovora*, kalın dallarda kışın da canlılığını sürdürebilir. Baharda bu kısımlarda bulunan *E. amylovora* aktif hale gelerek çoğalır ve sağlıklı dokularda yayılmaya başlar. Özellikle nemli havalar bakterinin yayılması için elverişlidir (Van der Zwet ve Beer 1995).

Çizelge 1.2. *Erwinia amylovora*' nın bilimsel sınıflandırılması

| | |
|---|---|
| **Alem:** | Bacteria |
| **Bölüm:** | Proteobacteria |
| **Sınıf:** | Gamma Proteobacteria |
| **Takım:** | Enterobacteriales |
| **Familya:** | Enterobacteriaceae |
| **Cins:** | *Erwinia* |
| **Tür:** | ***Erwinia amylovora*** (Burrill 1882) Winslow vd 1920 |

Patojenin, elverişli şartlarda bitkideki ilerleyişi çok hızlıdır. Patojen, konukçu bitkinin çiçek tomurcuklarında, sürgünlerinde, ana dallarında ve gövdesinde yaptığı enfeksiyon ile bitkiyi hastalandırarak kısa sürede, çok önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ateş Yanıklığı Hastalığının, 1976 yılında Kaliforniya' da, sadece armutlarda, 4.700.000 dolarlık kayba neden olduğu bildirilmiştir (Van der Zwet ve Beer 1995). Günümüzde de bu hastalık Santa Maria çeşidi armutların üretimini büyük ölçüde sınırlamaktadır.

Bakteriyel patojenlerin tanılanmasında geçmişten günümüze kadar geliştirilen birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar; hastalıklı bitki materyallerinden besi ortamlarına izolasyon, fidelerde belirti izleme yöntemi, test bitkilerine inokulasyon yöntemi, bakteriyofaj yöntemi, serolojik yöntemler (aglütinasyon, presipitasyon, ELISA gibi), biyokimyasal yöntemler ve günümüz modern moleküler tekniklerden olan klasik PCR ve Real-Time PCR yöntemleridir.

Ateş Yanıklığı Hastalığı tüm Dünya' da karantinaya tabi olup, mücadelesi pahalı ve insan sağlığına zararlıdır. Bu nedenle, mücadele uygulamaları giderek azalmaktadır. Kesin çözümünün bulunmaması yanında, dayanıklı çeşit, anaç ve ara anaçların kullanımı, hastalığın kontrolünde birinci derecede önem kazanmaktadır. Bakteriyel patojen *Erwinia amylovora*, sadece o yılın ürününü etkilemekle kalmayıp, ağaçlarda

sürgün, ana dal ve gövdeyi de hastalandırarak gelecek yıllardaki ürüne de etki edip ağacı kurutabilmektedir. Bu derece önemli olan bir hastalığın, modern biyoteknolojik yöntemler kullanılarak erken tanısı, tespiti ve hastalıklı bitki materyallerinden bakteri populasyonunun belirlenmesi kapsamında çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmada amaç erken enfeksiyon döneminde hastalıklı ve hastalıksız bitki materyallerinden *Erwinia amylovora'* nın kesin ve güvenilir bir şekilde tanısına, tespitine ve bakterinin erken dönemde populasyonun belirlenmesine olanak sağlayacak bir Kantitatif Real-Time PCR metodu geliştirmektir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

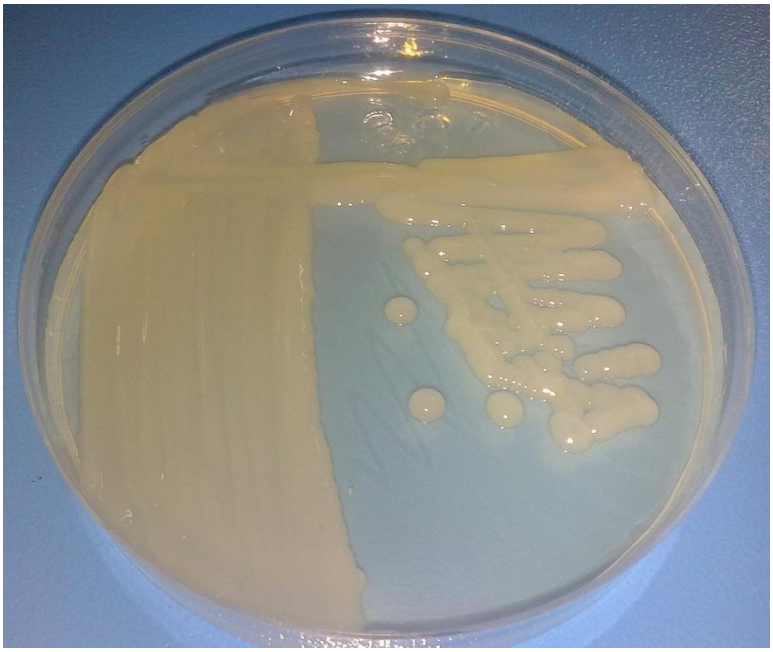
Ateş Yanıklığı Hastalık etmeni *Erwinia amylovora'* nın armut, ayva, elma, yenidünya gibi yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ciddi zararlanmalara neden olduğu bildirilmiştir (Van der Zwet ve Keil 1979). Bu konuda çalışmalarını sürdüren Van der Zwet ve Beer (1995) yaptıkları araştırma sonucu bu hastalığın Rosaceae familyasının 40 cinsinde görüldüğünü ve bunların içinden *Cotoneaster*, *Crateageus*, *Cydonia*, *Malus*, *Pyrus*, *Pyracantha*, *Sorbus*, *Stranvaesia* cinslerinde önemli zararlanmalar oluşturduğunu bildirmişlerdir.

18. yüzyılda Ateş Yanıklığı Hastalığının nedeni olarak böcek ve funguslar olmak üzere iki farklı teori ortaya atılmış, ancak Burrill (1882) tarafından patojenin ilk bakteriyel tanımlanması yapılarak patojen *Micrococcus amylovorus* olarak isimlendirilmiştir. İsimlendirmede *Bacillus amylovorus* (Burr.) Irevisan, *Bacterium amylovorus* (Burr.) Chester, *Bacterium amylovorum* (Burr.) Serbinof gibi isimler alan etmene en son 1920 yılında Winslow vd tarafından *Erwinia* cinsi içinde yer verilerek *Erwinia amylovora* ismi verilmiştir (Martinec ve Kocur 1964).

Van der Zwet ve Beer (1995) tarafından bildirildiğine göre; *Erwinia amylovora'* nın neden olduğu Ateş Yanıklığı Hastalığı ilk kez 1780 yılında ABD' de rapor edilmiştir. Daha sonra hastalığa Kanada' da rastlanmış ve 1888 yılında ABD' nin hemen her bölgesinde saptanmıştır. Yıllar geçtikçe *Erwinia amylovora'* nın yayılışı devam etmiş ve varlığı sırasıyla Meksika ve Şili' de belirlenmiştir. Ateş Yanıklığı Hastalığı Avrupa kıtasında ilk kez 1958 yılında İngiltere' de görülmüştür. Araştırmacılar hastalığın daha sonra Polonya, Hollanda, Danimarka, Almanya, Fransa, Belçika, İtalya, İsveç, Norveç, Yunanistan, Lüksemburg, İrlanda, Çekoslovakya, İsviçre, Yugoslovya, Bulgaristan, Kıbrıs, Lübnan, İsrail, Mısır, Ermenistan ve Yeni Zelanda' ya bulaştığını belirlemişlerdir.

Enterobacteriaceae familyasında *Erwinia* cinsi içinde yer alan *Erwinia amylovora* Nutrient Agar besi ortamına %5 oranında sukroz eklenerek hazırlanan besi yerine

inoküle edildiğinde, 27°C' de 2-3 gün inkübasyona bırakılmış ve parlak, merkezden kabarık, kubbemsi, krem renkli koloniler (Şekil 2.1), meydana gelmiştir (Lelliott 1967). NSA ortamında meydana gelen bu koloni yapısı, ortamda sukrozun varlığı nedeniyle bakteri tarafından hücre dışına levan sentezinin yapılması ile oluşmaktadır. Levan sentezi ile meydana gelen bu kubbemsi yapı koloni morfolojisine göre yapılan testlerde *Erwinia amylovora'* nın tanılanmasına olanak sağlamaktadır (Geider 2000). Gram negatif, fakültatif anaerob, kısa çubuk şeklinde ve peritrik kamçılı olan *Erwinia amylovora'* nın termal ölüm noktası 45-50°C, optimum gelişme pH' sı 6,0-7,5' dur. *Erwinia amylovora* sürgün, meyve, ağaç kabuğu gibi çeşitli bitki dokularında damlacıklar halinde "ooze" adı verilen bakteriyel akıntılar (Şekil 2.2) ve "strand" adı verilen bakteriyel iplikçikler oluşturmaktadır. Ooze içindeki bakteriler genellikle virulent olup 2 yıl veya daha uzun bir süre patojenitelerini sürdürmektedir. Sert yapıda olan ve zamanla kırılabilen strand' ın %20' sini bakteriyel hücreler oluşturmaktadır (Van der Zwet ve Keil 1979).



Şekil 2.1. *Erwinia amylovora'* nın koloni gelişimi



a. b.

Şekil 2.2. a) Elmada bakteriyel akıntılar (ooze) (Utah State University)
b) Armutta bakteriyel akıntılar (ooze) (British Columbia)

*Erwinia amylovora,* bir önceki gelişme sezonunda meydana gelen ve enfeksiyonlar tarafından oluşturulan hastalıklı bölgelerin kenar kısımlarında kışlar, baharda ise bu bölgelerde çoğalır. Patojen böcekler, göçmen kuşlar, insanlar, rüzgar ve yağmur aracılığıyla çiçeklere ve vejetatif sürgünlere yayılır. Konukçu dokularına yaralar veya doğal açıklıklardan (nektartod, hidatot, lentisel), bol nemin varlığında giriş yaparlar. Uygun çevre ve konukçu şartları altında bakteri hızla çoğalır ve konukçu dokularında ilerler. Enfekteli dokular önce su kaybetmiş gibi görünür, sonra kıvrılır, kurur ve yapışkan damlacıklar halinde olan "ooze" u salgılar, uygun koşullarda patojen; vejetatif sürgünler, ikincil çiçekler ve meyvelerde gelişebilir. *Erwinia amylovora'* nın yayılış şekilleri patojeni kısa ve uzun mesafelere yaymada ve hastalık döngüsünün tamamlanmasında çok önemlidir. Bazen patojenin yayılmasında farklı taşıma faktörleri birlikte etkili olabilmektedir. Enfekteli çiçeklerden sağlam çiçeklere *Erwinia amylovora'* nın taşınmasında tozlama yapan arı gibi böcekler çok önemli bir rol oynamaktadır (Thomson 2000) (Şekil 2.3). Aynı zamanda çiçek döneminde arıların (*Aphis mellifera*) bu bakterinin yayılımındaki rolünün önemli olduğu saptanmıştır (Tokgönül 1991). *Sturnus vulgaris* (sığırcık), *Phylloscapus trochilus* (bülbül) gibi göçmen kuşların bu bakteriyi ülkeler arasında yaydıkları da bildirilmektedir (Van der Zwet ve Keil 1979).



Şekil 2.3. Arılar polen toplarken abdomen kısımları stigma ile temas eder. Şekilde armut çiçeğinden polen toplayan arının stigma ile teması gözlenmektedir. Bu yolla enfekteli çiçeklerden sağlam çiçeklere *Erwinia amylovora* taşınabilmektedir (Sherman V. Thomson- Utah State University)

Patojen yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarının çiçek, yaprak, meyve ve gövdelerini etkileyerek şiddetli enfeksiyon durumlarında ağaç ölümlerine sebep olabilir. Çiçeklerde ortaya çıkan ilk simptom daha sonra ilerleyerek sürgünü sarar. Sürgünler hızla kıvrılır, aşağıya doğru asılır ve baston şeklini alır. Bitkinin genellikle uç sürgün ve filizleri doğrudan etkilenir. Yanmış görünümlü bu sürgünlerin kabukları kahverenginden siyaha döner. Bu tip sürgünlerde yapraklar kıvrık ve aşağıya doğru sarkık görünür. Meyve enfeksiyonu meyve sapından girerek enfeksiyon yapar. Küçük ham meyveler kahverengileşir, buruşur, mumyalaşır ve siyaha dönerek ölür (Şekil 2.4, Şekil 2.5, Şekil 2.6) (Van der Zwet ve Keil 1979).



Şekil 2.4. *Erwinia amylovora'* nın elma ağacının yapraklarındaki ve meyvelerindeki belirtisi (Antalya, Döşemealtı 2010)



Şekil 2.5. *Erwinia amylovora'* nın armut ağacının yapraklarındaki ve meyvelerindeki belirtisi (Antalya, Korkuteli 2011)



Şekil 2.6. *Erwinia amylovora'* nın ayva ağacının yapraklarındaki ve meyvelerindeki belirtisi (Antalya, Korkuteli 2011)

Batı Anadolu' da Aydın, Balıkesir, Çanakkale, Denizli, İzmir ve Manisa illerindeki Ateş Yanıklığı Hastalığının dağılımı ve tarla koşullarında değişik armut çeşitlerinin toleransı tespit edilmiştir. Sonuç olarak yaklaşık 70 yerli armut çeşidi tanımlanmıştır. Tüm bu çeşitler hastalığa karşı değişik toleranslar göstermiştir. Genellikle geç sezon çeşitleri erken veya orta sezon çeşitlerine göre daha dayanıklıdır. Bunun yanında Ateş Yanıklığı Hastalığının yükseklerde fazla zarar vermediği gözlenmiştir (Hepaksoy vd 1998).

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

Zhang ve Geider (1997) tarafından, Pulsed- Field Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemi kullanılarak, farklı ülkelerden farklı yıllarda izole edilen *Erwinia amylovora* strainlerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Amerika ve İngiltere' den elde edilen Ateş Yanıklığı Hastalık simptomu taşıyan bitki materyallerinden izole edilen patojen bakteriler

incelendiğinde *Erwinia amylovora'* ya ait genomik DNA' ya benzer olmayan sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu yöntemle çalışmalar doğrultusunda strainlerin gruplandırılması yapılmıştır.

Manulis vd (1998) tarafından, İsrail' de yetişen elma, armut, ayva ve yenidünyadan izole edilen 205 farklı *Erwinia amylovora* strainin karakterizasyonu için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın yürütülmesinde bu farklı strainlerin farklı konukçular üzerindeki virülenslik derecesi incelenmiş, bunun yanında serolojik testler yapılmış ve moleküler karakterleri ortaya konmuştur. Yapılan ELISA ve İmmunoflourensans deneyler sonucu İsrail strainlerinde serotipik gruplar ortaya çıkmamıştır. Genomik çeşitlilik çalışmaları Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analizi kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada da rastlantısal olarak 10 bazlık 24 primer belirlenmiştir. Tüm strainlerde uygulanan bu çalışma sonucunda İsrail' deki *Erwinia amylovora* populasyonunun benzerliği ortaya konulmuştur.

Ünlü ve Basım (2002), ilk defa Ateş Yanıklığı Hastalık etmeni *Erwinia amylovora'* nın moleküler açıdan tanısını ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Türkiye' nin farklı coğrafik bölgelerinden elde ettikleri enfekteli bitki materyallerinden izole edilen patojenlerin tanısında ham armut, tütünde hipersensitif reaksiyon ve sürgün inokulasyonları testlerini içeren patojenisite testleri yapmışlar. Patojenin kimyasal olarak tanılanmasında ise katalaz testi, oksidaz testi, nitrattan nitrit üretimi testi, asetoin oluşumu testi, indol üretimi testi, hidrojen sülfit testi, nişastanın parçalanması testi, sakkarozdan indirgenen maddeler testi, sıcaklığa hassasiyet testi, %5 NaCl' ye tolerans testi, pektinaz aktivitesi testi, King's B besi ortamının kullanımı, KOH testi ve jelatinin hidrolizi testini uygulamışlardır. Elde edilen sonuçların da 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ile paralellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bitkilerden elde edilen *Erwinia amylovora* izolatlarına patolojik ve biyokimyasal testler uyguladıktan sonra moleküler düzeyde kesin tanılarının yapılması amacıyla PCR yöntemini kullanmışlardır.

Türkiye' nin altı farklı coğrafik bölgesinden ve elli iki farklı yerinden ve Dünya' nın farklı yerlerinden elde edilen *E. amylovora* strainlerinin patolojik, biyokimyasal ve kromozomal 1.6 kb' lik *ams* geninin PCR ile çoğaltılması ile kesin tanıları yapılmıştır. Strainlerin genetik farklılıkları, RAPD-PCR, BOX-PCR, PFGE ve Protein Elektroforezis teknikleri kullanılarak belirlenmiş. Ayrıca strainlerin streptomycin, oxytetracyclin ve bakır sulfata dayanıklılıkları ve plazmid profilleri de tespit edilmiştir (Basım vd 2004).

Barionovi vd (2006) tarafından, farklı konukçu bitkilerden izole edilen *Erwinia amylovora'* nın ve strainlerinin karakterizasyonunda Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve Short-Sequence DNA Repeats (SSR) DNA dizi analizleri kullanılmıştır. 12 farklı cins ve farklı coğrafik bölgeden elde edilen 93 *E. amylovora* straini; Enterobacterial Repetitive Intergenic Consesus, BOX ve Repetitive Extragenic Palindromic primer setleri kullanılarak repetitive-sequences PCR ile incelenmiştir. Amplified ribosomal DNA restriction analizleri (ARDRA) ve 16S rDNA geninin dizi analizleri yapılmıştır. *E. amylovora* ve strainlerinin 16S genlerinde %99 benzerlik görülmüş ve aynı sonuçlar ARDRA analizleri ile de desteklenmiştir.

Türkiye' nin Batı Akdeniz Bölgesinde armutlarda Ateş Yanıklık Hastalığı tespit edilmiş ve basit bir yöntemle modifiye edilmiş MS ortamında etmenin tanısı yapılmıştır (Momol vd 1992).

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

negatif vermiştir. Bu çalışmayla tüm *Erwinia amylovora* strainlerinin bu tür aglütinasyon testlerinde aynı sonucu verdiği belirlenmiştir (Momol ve Zeller 1992).

Benlioğlu ve Özakman (1998) tarafından yapılan Ateş Yanıklık Hastalığı ile ilgili survey çalışmalarında hastalığın armut, ayva ve muşmula ağaçlarında şiddetli düzeyde olduğu, fakat elma ve yenidünyada düşük seviyede olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar tarafından surveyler boyunca Türkiye' nin yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan 27 değişik alanında yetişen hastalıklı elma, ayva, armut, muşmula ve yenidünya' dan *Erwinia amylovora'* ya ait 56 patojenik ırk izole edilmiştir. Bu 56 Türkiye izolatının NSA' da ve selektif ortamlar (CCI, TTN ve MMS)' da koloni morfolojisi ve bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiş, bakır ve streptomycine hassasiyetleri tespit edilmiştir.

Yumuşak çekirdekli meyve dokularında epifitik ve endofitik olarak bulunan *E. amylovora'* ya karşı spesifik monoklonal antibodiler (MAM1F10) kullanarak, ELISA yöntemi ile patojenin tanısı ve tespiti yapılmıştır. Bu yöntemle Türkiye' nin değişik konukçu ve coğrafik bölgelerinden elde edilen 58 *E. amylovora* izolatı test edilmiştir (Yücel 1998).

Ateş Yanıklığı patojeni, *E. amylovora'* nın tespiti ve tanımlanması PCR çalışmalarıyla 6 saatten az sürede yapılmıştır. Tüm *E. amylovora* hücrelerinde bulunan 29 kb' lik plazmidden elde edilen iki oligomerle, 0.9 kb' lik fragment kullanıldığında 100' ün üzerinde *E. amylovora* hücresinde gözlenebilir bant ortaya çıkmıştır. Patojenin enfekteli bitki materyallerinden tespitinde ve tanısının yapılmasında bu tekniğin kullanılabileceği bildirilmiştir (Bereswill vd 1992).

Bereswill vd (1995) tarafından, Ateş Yanıklığı Hastalık etmeni *Erwinia amylovora*' nın tanısında PCR yöntemi kullanılmıştır. PCR denemelerinde *Erwinia amylovora* izolatı ve 7 farklı strainini, *E. caratovora* subsp. *caratovora*, *E. caratovora* subsp. *atroseptica*, *E. chrysanthemi*, *E. herbicola* subsp. *herbicola*, *E. herbicola* subsp. *synvitivora, E.*

*stewartii, Pseudomonas syringae* pv. *syringae, E.coli* K-12 *ve Bacillus subtilis* izolatlarını kullanmışlardır. Yapılan PCR' da plazmid pEA29' dan elde edilen 0.9 kb' lik *Pst*I fragmenti, bakteri kromozomundan elde edilen *ams* genine ait 1.6 kb' lik kromozomal DNA, 16S rRNA' ya ait 1.5 kb' lik DNA fragmenti, transpozon *Tn5*' den üretilen RPT1 primerleri ile PCR çalışmaları yapıldığında *ams* geni ve *Pst*I fragmentine ait *E. amylovora* strainlerinde amplifikasyon görülürken 16S rRNA ve RPT1 primerlerinde ise PCR sonucunda amplifikasyon olmamıştır.

Guilford vd (1996) tarafından bildirildiğine göre; *Erwinia amylovora* elma ve armut ağaçlarının çiçeğinde, yaprağında, sürgününde ve ham meyvesinde epifitik olarak uzun süre simptom oluşturmadan yaşayabilmektedir. Klasik tespit metotlarını kullanarak az sayıdaki *E. amylovora* populasyonlarının tespit edilemeyebileceği düşüncesiyle hassas ve özel PCR' a dayalı metodlar geliştirmişlerdir. *E. amylovora*' ya özgü 187 bp' lik DNA fragmentinin çoğaltılmasında PCR yöntemini uygulamışlardır. 69 *E. amylovora* kültürü 10 konukçu türden ve 5 ayrı ülkedeki uluslararası koleksiyondan elde edilmiş ve diziye özel primerler de kullanılarak PCR yöntemi ile kültürlerin başarılı bir şekilde tanıları yapılmıştır. Aynı zamanda 29 farklı *E. amylovora* strainde tanısı yapılmıştır. Kontrol amaçlı 4 farklı tür bitki patojeni bakteri de PCR işlemine tabi tutulmuş fakat hiçbir amplifikasyon meydana gelmemiştir. Tanı çalışmalarından sonra PCR esaslı bu metot bitki dokusundaki *E. amylovora'* nın tespitinde de kullanılmıştır. Bu çalışmaya benzer bir çalışma da Brown vd (1996) tarafından yapılmıştır. *Erwinia amylovora'* ya ait 13 konukçu ve 21 ülkeden gelen *Erwinia amylovora* kültürlerinin pEA29 plazmidinden dizayn edilen Ea71 primerleri kullanılarak 187 bp' lik DNA parçası PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır.

Lecomte vd (1997), pEA29 plazmidinden dizayn edilen primerleri kullanarak *Erwinia amylovora'* nın kültür koleksiyonundan alınan 127 strainin PCR yöntemiyle tanısını yapmışlardır. DNA *MspI* ve *Sau3A* restriksiyon enzimiyle kesilmiş ve DNA fragmentlerinin uzunluğunda değişkenlikler gözlenmiştir. Strainlere ait DNA ürünlerinin uzunluğuna göre strainler üç gruba ayrılmıştır. Analiz edilen türlerin çoğu birinci ve

ikinci gruba yerleştirilmiş. Türlerin coğrafi kökeni ile bağlantılı olan üçüncü grup ise Avusturya ve Almanya' nın güneyindeki Bavyera Bölgesi' ndeki Ateş Yanıklığı Hastalığı olan yerlerden elde edilen bitki materyallerinden izole edilen bakteriyel strainlerden oluşmaktadır. Amplifiye olan parçanın uzunluğundaki değişimin DNA parçasının içine bir ekleme olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Bobev vd (1998) tarafından, Bulgaristan' ın Plovdiv bölgesindeki ayva ağaçlarından elde edilen bitki materyallerinde *Erwinia amylovora* patojeninin tespiti ve tanısı yapılmıştır. Aynı zamanda ortak bakteriyolojik metotlar olan morfolojik, kültürel ve fizyolojik testler de kullanılarak; armut, elma, muşmula ve ayva ağaçlarından elde edilen bitki materyallerinden izole ettikleri *E. amylovora'* nın karakterizasyonunu yapmışlardır. Tüm bu izolatların çoğu *Erwinia amylovora'* ya spesifik PCR ve AFLP genom analizi gibi moleküler metolarla da test edilmiştir.

*Erwinia amylovora'* nın moleküler teşhis tekniği (PCR-ELISA); PCR ürünlerinin immunoenzimatik tespiti üzerine dayandırılarak geliştirilmiştir. Farklı coğrafik alanlardan ve konukçu bitkilerden elde edilen *E. amylovora* izolatları ve farklı bitki patojeni bakteriler kullanılarak yöntemin hassasiyeti test edilmiştir. Çalışmanın hassasiyetine bağlı olarak chemiluminescent PCR-ELISA protokolü kurularak doğal olarak enfekteli bitki organlarından patojenin tespiti yapılmıştır. Elde edilen bu sonuçlar standart PCR uygulamalarıyla karşılaştırılmıştır (Merighi vd 1998).

Jeng vd (1998), 16S ve 23S genleri arasındaki bölgenin amplifikasyonu için PCR yöntemini kullanmışlardır. *Erwinia amylovora* izolatları, *E. herbicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Agrobacterium tumefaciens'* in 23S DNA fragmentinin amplifikasyonundaki farklılıklar ortaya konmuş ve bunların *Ecor*RI enzimi ile kesilmeleri sonucunda bu bakterilerin tür teşhisi yapılarak ayırımları yapılmıştır. Enfekteli ahudududan elde edilen *E. amylovora* izolatları 4 PCR fragmenti oluştururken enfekteli elma ve armutlara ait izolatlarda 6 DNA bandı gözlenmiştir. Bu veriler 16s/23s rRNA

geninin PCR ile basit amplifikasyonu sonucu *E. amylovora'* nın alt gruplarının tanımlanmasında kullanılmıştır.

Taylor ve Hale (1998), Avusturalya' da yetiştirilen *Cotoneaster spp*.' den izole ettikleri *Erwinia amylovora* izolatlarıyla, İngiltere ve Yeni Zelanda' da yetişen *Pyrus communis*, *Malus spp., Crateagus monogyna* ve *Cotoneaster melanacarpus* konukçularından izole ettikleri *Erwinia amylovora* izolatlarını moleküler düzeyde incelemişlerdir. İzolatlar Ea71 primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile test edilmiş ve sonucunda 187 bp' lik bant oluşumu gözlenmiştir. Fakat kontrollerde spesifik bant oluşumu gözlenmemiştir.

Crepel vd (1998) tarafından, *E. amylovora'* nın elma, armut ağaçlarında ve Malaceae familyası süs bitkilerinde Ateş Yanıklığı Hastalığına sebep olduğu bildirilmiştir. Araştırmada meyve bahçesindeki çiçeklerdeki *E. amylovora* populasyonunu tayin etmek hedeflenmiş ve özel koşullardaki moleküler tanılamanın hassasiyetini göstermek için örnekleme stratejileri yapılmıştır. Avrupa Birliğine üye ülkelerde karantinaya tabi olan patojenin bahçe içinde epifitik olarak yayıldığı bildirilmiş ve epifitik *E. amylovora* yoğunluğu ile enfeksiyon riski arasındaki korelasyon düşünülmüştür. Araştırmada o zamana kadar Ateş Yanıklığı riskinin bahçe çevresindeki klimatolojik ve fenolojik risk oluşumlarına bağlı olarak uyarı sistemleri ile tahmin edildiği belirtilmiştir. Her iki faktörün de patojenin gelişimine etkili olduğu bilinmesine rağmen gerçek patojen konsantrasyonunun ölçülemediği ve bazı Avrupa Birliği ülkelerinde antibiyotik formulasyonlarının engelleyici uygulamalarına izin verildiği belirtilmiştir. Bunun da yoğun kimyasal uygulamasını engellediği ve bu kimyasal uygulamaların ileride etkili epifitik patojen populasyonunun ortaya çıkarılmasıyla azalacağı ortaya konulmuştur. PCR'a dayalı metodların çevredeki epifitik Ateş Yanıklığı populasyonunun hızlı bir şekilde tanılanmasına olanak sağlayacağı da önemle vurgulanmıştır.

Merighi vd (2000), *Erwinia amylovora'* nın tanısında PCR-ELISA yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemin prensibi PCR ürünlerinin immünoenzimatik tanısının yapılmasıdır. *In vitro* koşullarda amplifikasyon işlemi için plazmid pEA29' den dizayn edilen primerler kullanılmıştır. Amplikonlar amplifikasyon boyunca 11-digoxigenin (DIG)-dUTP ile işaretlenmiştir, streptavidin kaplı ELISA mikroplakalarda hibridizasyon için oligonükleotid ile kaplanmış ve anti-DIG-Fab-peroxidase ile konjuge antibodiler tespit edilmiştir. Bu spesifik yöntem farklı konukçu bitkilerden izole edilen *Erwinia amylovora* strainleri ve *Pseudomonas*, *Agrobacterium* cins bakteriler üzerinde denenmiştir. Saf kültürlerin tanısında sırasıyla ABTS (colorimetric) ve ECL (chemiluminestic) tanı denemeleri kullanılmıştır. Chemiluminesent tanı ile PCR-ELISA yöntemi kullanılarak enfekteli armut dallarındaki $4x10^{2}$ cfu/g gibi oldukça az bakterinin bile tespit edilebildiği bildirilmiştir.

Llop vd (2000) tarafından, *Erwinia amylovora'* nın bitki materyalinden hassas tespiti için tek kapalı tüp nested PCR yöntemi geliştirilmiştir. 83 enfekteli bitki materyelinde yapılan tespit çalışmasında, klasik PCR yöntemi ile tespitte %55, iki tüplü nested PCR yönteminde %71, tek tüp kapalı nested PCR yönteminde %78 oranında başarılı tespit yapılabilmiştir. Enfektesiz bitki materyallerinden patojenin tespitinde de diğer yöntemlere göre bu yöntemin daha yüksek oranda tespit yapabildiği belirlenmiştir. Patojene spesifik primer çiftlerinin kullanıldığı yöntemin klasik PCR yöntemine göre daha yüksek duyarlılıkta, özgüllülükte ve hızda çalıştığı ortaya konulmuştur.

Taylor vd (2001), *Erwinia amylovora'* nın tespiti için hızlı ve hassas bir yöntem olan PCR yöntemini kullanmışlardır. 187 bp' lik kromozamal DNA fragmentinin çoğaltılmasıyla yapılan tespit çalışmasında 5 ülkeden ve 10 farklı konukçu bitkiden izole ettikleri 69 farklı straindeki *Erwinia amylovora'* nın tespitini yapmışlardır. Fakat 29 farklı *Erwinia* türünün, 20 farklı bitki patojeni bakterinin ve saprofitik bakterilerin *Erwinia amylovora'* nın tanısı için kullanılan spesifik primerlerle çalışmadığı, amplifikasyonun meydana gelmediği, bildirilmiştir. Çalışma sonucunda PCR

yönteminde kullanılan uygun primerler ile *Erwinia amylovora* ve strainlerinin hızlı ve güvenilir tanısının yapılabileceği ortaya konulmuştur.

Stöger vd (2006) tarafından, REDExtract-N-Amp$^{TM}$ PCR kiti kullanarak PCR yöntemiyle Avusturalya' dan elde edilen 951 enfekteli ve enfektesiz bitki materyallerinden patojenin tespiti yapılmıştır. Çalışmaları sonucu yöntemin, diğer klasik yöntemlere göre daha hızlı ve hassas çalıştığını belirlemişlerdir.

Chokeberry ve çilekten izole edilen yedi farklı Bulgar *Erwinia amylovora* strainin, pEA29 plazmidinden ve kromozomal DNA' nın *ams* gen bölgesinden elde edilen primerler kullanılarak multiplex PCR yöntemiyle tanıları yapılmıştır. Bu yöntem hızlı ve az zaman alan bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Aynı zamanda da *Erwinia pyrifoliae* türlerinin *Erwinia amylovora'* dan ayrılmasında kullanılabilecek bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Hristova vd 2006).

Obradovic ve Kevresan (2010) tarafından, *Erwinia amylovora'* nın PCR ile tanısında iki yaklaşımın olduğu bunlardan birinin plazmidlere bağlı tanının ve diğerinin de Kromozomal DNA dizilerine bağlı tanının olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarında ise Kromozomal DNA dizisine bağlı tanın daha spesifik olduğu belirlenmiş ve PCR yöntemi için *Erwinia amylovora'* nın kromozomal DNA' sından bu bakteriye spesifik *FER1-F* ve *FER1-R* primerleri dizayn edilmiştir. PCR yöntemi uygulamasında yüksek sıcaklığa dayanıklı Taq DNA polimerazı kullanarak Taq DNA polimerazın çalışabileceği uygulanabilir PCR programı oluşturulmuştur. Başarılı bir optimizasyon sonrasında yüksek duyarlılıkta ve patojene spesifik tanı yöntemi oluşturulmuştur.

Salm ve Geider (2004), Ateş Yanıklığı Hastalığına sebep olan *Erwinia amylovora* patojeninin hastalıklı bitki materyallerinden tespitinde kantitatif sonuç veren Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Yapılan çalışmada pEA29 plazmidinden dizayn edilen *Erwinia amylovora'* ya spesifik *P29TF/ P29TR* primerleri ile *P29TM* Taqman probe kullanılmıştır. Yöntem *E. amylovora* ve strainleri üzerinde denenmiş ve kısa sürede

başarılı sonuçlar alınmıştır. Bitki materyallerinden patojenin tespitinde ise enfekteli elma yaprak ve çiçek dokuları kullanılmıştır. Hastalıklı dokularda kısa sürede *E. amylovora'* nın tespiti yapılmıştır. Çalışma SYBR Green I ve *P29TF/ P29TR* primerleri kullanılarak tekrar denenmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bellis vd (2007) tarafından, *Erwinia amylovora'* nın tanısı ve tespitinde pEA29 plazmidinin 111bp DNA fragmentinin çoğaltılması için *Erwinia amylovora'* ya spesifik dizayn edilmiş E3/E4 primer setinin kullanıldığı Real-Time Scorpion PCR Yöntemi geliştirilmiştir. Armut yaprak ve çiçeklerinden yıkama sonucu hazırladıkları epifitik populasyonu içeren solüsyonlardaki patojenin populasyonunun belirlenmesi için Real-Time PCR sistemi ile kombine çalışma yapılmıştır.

*Erwinia amylovora* ve *Erwinia pyrifoliae* patojenlerinin armut çiçeklerindeki rekabeti Duplex Real-Time PCR yöntemi ile ortaya koyulmuştur. İki patojen aynı konukçu bitkide bulunabilmektedir. Bu çalışmada Duplex Real-Time PCR yöntemi kullanılarak Bartlett çeşidi armut (*Pyrus communis*) çiçeklerindeki patojen bakterilerin populasyon dinamikleri incelenmiştir. Bakteriyel hücreler çiçeklerden yıkanarak DNA ektraksiyonu yapılmadan PCR' da test edilmiştir. Çalışmanın yürütülmesinde bakterilere spesifik genlerden *Erwinia amylovora* için levan sucrase geninin (GenBank X75079) *Erwinia pyrifoliae* için *hrpW* geninin (GenBank AY237642) internal diziliminden TaqMan problar ve primerler dizayn edilmiştir. Çalışma sonucunda *Erwinia amylovora'* nın rekabet gücünün daha fazla olduğu populasyon dinamiği sonuçlarına göre belirlenmiştir (Lehman vd 2008).

Pirc vd (2008) tarafından bildirildiğine göre; Ateş Yanıklığı Hastalığı Avrupa' nın yetiştiricilik yapılan birçok alanında görülmektedir ve etmeni olan *Erwinia amylovora* enfektesiz bitki materyallerinde düşük oranda dahi olsa bulunmaktadır. Çalışmalarında simptom bulunmayan bitki mateyallerinden hazırladıkları solüsyonları pEA29 plazmidinden dizayn edilen primerleri kullanarak Real-Time PCR ile test etmişlerdir. Aynı zamanda da King's B besi ortamında patojen bakteri gelişimi incelenmiş ve

örnekler CCT tarama testine tabi tutulmuştur. Çalışmalarının sonucunda da Real-Time PCR yönteminin uyguladıkları diğer yöntemlere göre kısa sürede daha güvenilir sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir.

Pirc vd (2009) tarafından, Taqman prob kullanılarak uygulanan Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Hokkaido' dan elde edilen *Erwinia amylovora'* ya ait farklı strainlerin ve İspanya' dan elde edilen enfekteli armut çiçeklerinden izole edilen *Erwinia pyrifoliae* ve *Erwinia amylovora* strainlerinin Real-Time PCR yöntemiyle tespitleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere *Erwinia amylovora'* nın kromozomal DNA' sının *ams*C gen bölgesinden, ITS bölgesinden ve plazmidinden spesifik TaqMan probe geliştirilmiştir. Geliştirilen problardan en güvenilir ve kesin sonucu verenin *ams* gen bölgesinden dizayn edilen prob olduğu belirlenmiştir.

Mohammadi vd (2009), *Erwinia amylovora'* nın taşıdığı 29 kb pEA29 plazmidinden ve kromozomal DNA' sına ait *ams* gen bölgesinden dizayn edilen primerler ve TaqMan probu kullanarak Real-Time PCR yöntemi ile *Erwinia amylovora'* nın tanısını ve tespitini yapmışlardır. Bir strain İran' dan, iki strain Mısır' dan, bir strain İspanya' dan ve 123 strain Almanya' dan olmak üzere Ateş Yanıklığı Hastalık simptomu bulunan enfekteli dokulardan izole ettikleri *Erwinia amylovora* strainlerini Real-Time PCR' da test etmişlerdir. Plazmidi içermeyen bakterilerin tanısında kromozomdan dizayn edilen primerler ve prob kullanılmıştır. Bu çalışma ile hem *Erwinia amylovora* strainlerinin plazmid içerip içermemesi bakımından karakterizasyonu yapılmış hem de kullanılan yöntemin tanı ve tespitteki güvenilirliği ortaya konulmuştur.

Gottsberger (2010) tarafından, *Erwinia amylovora'* nın 113 farklı strainin tanısında ve tespitinde Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada TaqMan Prob olarak kullanılan MGB (minor-groove-binder) prob ve primerlerin spesifikliğini belirlemek için ise farklı türde bakteriler test edilmiştir. Yöntemin ve kullanılan primer-prob setinin hassasiyetinin belirlenmesi için farklı seyreltmeler test edilmiştir. Daha önceki yıllarda araştırmacılar tarafından yapılan klasik PCR denemeleriyle karşılaştırılan

sonuçlarda klasik PCR ile test edilemeyen düşük miktardaki bakteri yoğunluğunun bu yöntem ile tespit edilebildiği ortaya çıkarılmıştır.

Voegele vd (2010) tarafından, sıcaklık ve nem gibi fiziksel faktörlerin yanı sıra *E. amylovora* patojeninin yeterli miktarda varlığının enfeksiyonun oluşması açısından önemli bir etken olduğu, oluşan Ateş Yanıklığı Hastalığının yayılması sonucu yetiştiricilik yapılan alanlarda yıkıcı sonuçların meydana geldiği bildirilmiştir. Bu durumu değerlendirerek çalışmalarında, çeşitli alanlardan elde ettikleri bitki materyallerindeki *Erwinia amylovora* populasyonunun kantittatif olarak belirlenebilmesi için Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntemin özellikle çiçeklenme döneminde patojenin populasyonun belirlenmesine olanak sağladığı belirlenmiş, patojen miktarına ait veriler incelendiğinde elde edilen logaritmik değerlerin önceden tahmin modellerinin oluşturulmasında kullanılabileceği ortaya konulmuştur. Yöntemin, aynı zamanda yıl boyunca ya da uzun vadede patojenin populasyonunun farklı bitki doku ya da organlarında incelenmesinde önemli sonuçlar verebileceği bildirilmiştir.

Ateş yanıklığı hastalığının önceden tahmin modellerinden olan MARYBLYT 4.3 (Steiner vd 1996), Billing Intergrated System (BIS95) (Billing 1996), Cougarblight 98C (Smith 1999) ve Fire Blight Control Advisory (FBCA) (Shtienberg vd 1999) sistemleri çalışılan bölgenin enfeksiyon risk günlerinin önceden belirlenmesinde kullanılan önemli sistemlerdir. Enfeksiyon riski taşıyan günlerin önceden tahmin edilebilmesi sonucunda o bölgede görülen hastalığın erken müdahele ile kontrol altına alınabildiği bildirilmiştir (Shtienberg vd 2003).

Real-Time PCR yönteminin bitki patojenlerinin tanısında ve tespitinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Schaad ve Frederick 2002). Yöntemde patojene özel dizayn edilen primerler ve floresan probların sonuçlardaki doğruluğu arttırdığı belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada ise Amerika' nın Güney Bölgesinde ve Kaliforniya' da önemli derece ürün kayıplarına sebep olan *Xylella fastidiosa* patojeninin bitki dokusundan tespiti yapılmıştır (Schaad vd 2002). Klasik yöntemlere göre daha kısa

sürede sonuç veren Real-Time PCR yönteminin diğer yöntemlere göre daha güvenilir, hassas ve patojene spesifik olduğu bildirilmiştir. Yöntemin bakteriyel, fungal ve viral bitki patojenlerinin tanısında kullanımının avantaj ve dezavantajlarından da bahsedilmiştir (Schaad ve Frederick 2002).

Transgenik buğdaylarda, transfer edilen genin tespitinde araştırmacılar tarafından kullanılan Southern Blot analizlerinin çok zaman alması nedeniyle kısa süre sayısal sonuçlar veren Kantitatif Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada kantitatif sonuçların elde edilmesinde Housekeeping gen (referans alınan gen) olarak *puroindoline-b* kullanılmıştır. Gün içinde çok sayıda örnekle çalışabilen bu yöntem sayesinde kısa sürede güvenilir sonuçlar alınmıştır (Li vd 2004).

Yılmaz ve Basım (2006) tarafından, Batı Akdeniz Bölgesinde domates bakteriyel nekroz hastalığına neden olan *Pseudomonas corrugata* ve *Pseudomonas mediternea* izolatlarının Real-Time PCR ile tanılama çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada primer ve SYBR Green I ile her iki patojenin Real-Time PCR' da kısa sürede tanısı yapılmıştır.

Torres vd (2005), Real-Time PCR, Klasik PCR ve Nested PCR yöntemlerini kullanarak karantinaya tabi elma, armut ve farklı taş çekirdekli meyvelerden izole edilmiş 16SrX grup fitoplazmaların tespitini yapmışlardır. Uygulamalar sonucu elde edilen sonuçları karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, Nested PCR ve Real-Time PCR sonuçları benzer çıkmış fakat Real-Time PCR' ın daha hassas çalıştığı belirlenmiştir. Klasik PCR sonuçlarının farklı çıkmasının nedeni olarak ise kullanılan primerlerin tespiti yapılan fitoplazmalarla uyumluluk göstermesi tam spesifik olmaması olarak düşünülmüştür.

Atallah ve Stevenson (2006), patates yumrularında patojen olan *Phytophthora infestans, Pythium ultimum, Phytophthora erythroseptica, Fusarium sambucinum, Erwinia carotovora* ve farklı strainlerinin tanısı için Real-Time PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Bakterilerinin patojenisitelerinden sorumlu özel gen bölgelerinden

dizayn edilen primerler ve SYBR Green I kullanılarak tanı çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmada hasat zamanı boyunca patates yumrularında patojenlerin tespitinde yöntemin kullanılabilirliğini göstermek amaçlanmıştır.

Pujol vd (2006), elma çiçek ve yapraklarında kolonize olan *Pseudomonas fluorecens* EPS62e strainin sera ve açık tarlada Real-Time PCR yöntemiyle populasyon dinamiğini incelemişlerdir. Populasyonda zamana bağlı artış çiçeklerde düzenli olarak devam ederken, yapraklarda Real-Time PCR sonuçları ile kültürde geliştirilen bakteri sayısında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durumun yapraklarda var olan ama ölmüş bakteriyel hücreler ya da ortamda canlı bulunan kültürde geliştirilemeyen (viable but nonculturable (VBNC) evresinde olan) bakterilerden kaynaklı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada sonuç olarak EPS62' e strainin populasyonu uygun koşullarda çiçeklerde artarken, yapraklarda stres ve fakir yaşam nedeniyle azalmalar görülebildiği ortaya konulmuştur. Strainin biyolojik kontrolü için hem kültür ortamında geliştirme işleminin, hem de Real-Time PCR işleminin eş zamanlı olarak yapılması gerektiği bu çalışmayla bildirilmiştir.

Basım ve Basım (2007), tohum kökenli domates bakteriyel benek hastalık etmeni *Pseudomonas tomato (syringae)* pv. *tomato*' nun direkt hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki dokularından tanısı ve tespitini, patojene spesifik primerler ve probu kullanarak Real-Time PCR ve Real-Time Bio PCR yöntemleriyle gerçekleştirmişlerdir.

Hren vd (2007), Real-Time PCR yöntemini kullanarak asmalarda bulunan fitoplazmalardan *Flavescence doree* ve *Flavesence bois'* in Taqman prob ve fitoplazmalara spesifik primer setlerini kullanarak Real-Time PCR' da tanısını yapmışlardır. Fitoplazmaların tanısında ve tespitinde yöntemin çok duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Dreo vd (2007), bağlarda Bakteriyel Yanıklık Hastalık etmeni *Xylophilus ampelinus'* un tanısı için MGB-pobun kullanıldığı Real-Time PCR yöntemini

geliştirmişlerdir. Farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *X. ampelinus* ve strainleri, bağlarda hastalığa sebep olan farklı bitki patojeni bakteriler ve fitoplazmalar YPGA veya NA besi ortamında 24-25°C' de geliştirilmişlerdir. Gelişen kolonilerden hazılanan bakteriyel süspansiyon *X. ampelinus* için dizayn edilen primerler ve probe kullanılarak Real-Time PCR yöntemiyle test edilmiştir. Tanı çalışmaları sonucu farklı bitki patojeni bakteriler ve fitoplazmalarda hiçbir amplifikasyon görülmezken, *X. ampelinus* ve strainlerinde amplifikasyon meydana gelmiştir. Primerler ve probun patojene spesifikliği belirlendikten sonra hassasiyet çalışması yapılmıştır. *X. ampelinus* patojenine ait hazırlanan stok solüsyondan $10^{-1}$' den $10^{-8}$' e kadar seyreltmeler hazırlanmış, Nested PCR ve Real-Time PCR' da test edilmiştir. Hassasiyet çalışması ile Real-Time PCR yönteminin Nested PCR' a benzer hassasiyette çalıştığı belirlenmiş. Fakat bitki materyallerinden tespitte yapılan çalışmada ise enfekteli kök, gövde ve yaprak kısımlarından hazırlanan solüsyonların tüm seyreltmelerinde Real-Time PCR ile *X. ampelinus'* un tespiti yapılırken, Nested PCR yönteminde bazı seyreltmeler çalışmamıştır. Bu da Real-Time PCR' ın patojenin tanısında ve bitki materyalinden tespitinde daha hassas ve güvenilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur.

Basım ve Basım (2009), Asma'da Pierce's Hastalık etmeni *Xylella fastidiosa* için geliştirdikleri *EBXY1-EBXY2* primer çifti ve Taqman probu kullanarak, oldukça kısa sürede direkt bakteriyel hücreden ve hastalıklı asma dokusundan patojenin tanısını ve tespitini yapmışlardır.

Basım ve Çaplık (2009) tarafından, domates bakteriyel kanser etmeni *Clavibacter michiganensis subsp. michinganensis* ve domates bakteriyel yaprak lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria'* nın tanısı ve tespiti için *Cmm'* ye ait *pat-1* gen dizisi ve *Xav*' ye ait *hrp* gen dizisini kullanarak hassas ve seçici bir Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir.

Basım ve Öztürk (2011) tarafından, Bakteriyel Hale Yanıklık etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve Bakteriyel Yaprak Yanıklık Hastalık etmeni *Xanthomonas*

*axonopodis* pv. *phaseoli* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* patojenlerinin patojenisiteden sorumlu özel gen bölgelerinden dizayn edilen primeler ve LNA prob kullanılarak Real-Time PCR ile tanıları ve tespitleri yapılmıştır. Geliştirilen primer ve probların spesifikliği; farklı bitki patojeni bakteriler kullanılarak test edilmiştir. Bu yöntemle bakteriyel hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki materyallerinden patojenlerin hızlı ve hassas bir şekilde tanısının ve tespitinin yapılabildiği ortaya çıkarılmıştır.

# 3. MATERYAL ve METOT

## 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler

Bu çalışma kapsamında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji, Bakteriyoloji Laboratuarında Prof. Dr. Hüseyin BASIM' a ait kültür stoklarında yer alan yerli ve yabancı *Erwinia amylovora* strainleri ve farklı cins ve türlere ait bitki patojeni bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3).

Çizelge 3.1. Türkiye' nin farklı bölgelerinden elde edilen ve Real-Time PCR' da test edilen *Erwinia amylovora* strainleri

| İzolat Numarası | Origin | | Konukçu Bitki | Referans |
|---|---|---|---|---|
| **9** | Gökpınar/ANTALYA | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **26** | İmamoğlu/ADANA | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **30** | Korucuk/DENİZLİ | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **31** | Kadıkalesi/AYDIN | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **39** | Dalbahçe/MANİSA | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **43** | Polatlı/ANKARA | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **46** | PiriReis/KARAMAN | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **52** | Dereağzı/VAN | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **60** | Kaleköy/AMASYA | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **64** | Ağaköy/BURSA | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **71** | Saray/TEKİRDAĞ | ARMUT | *Pyrus communis cult. Santa Maria* | H. Basım |
| **16** | Ağılköy/ISPARTA | ARMUT | *Pyrus communis cult. Williams* | H. Basım |
| **42** | Elmadağ/ANKARA | ARMUT | *Pyrus communis cult. Ankara* | H. Basım |
| **33** | Acıpayam/DENİZLİ | ATEŞDİKENİ | *Pyracantha* | H. Basım |
| **10** | Finike/ANTALYA | YENİDÜNYA | *Eriobotrica japonica* | H. Basım |
| **67** | İnegöl/BURSA | MUŞMULA | *Mespilus germanica* | H. Basım |
| **07** | Yazır/ANTALYA | AYVA | *Cydonia vulgaris* | H. Basım |
| **17** | Ağılköy/ISPARTA | AYVA | *Cydonia vulgaris* | H. Basım |
| **37** | Horsunlu/AYDIN | AYVA | *Cydonia vulgaris* | H. Basım |
| **44** | Sultandağı/AFYON | AYVA | *Cydonia vulgaris* | H. Basım |
| **48** | Merkez/ERZİNCAN | AYVA | *Cydonia vulgaris* | H. Basım |
| **56** | Suluova/AMASYA | AYVA | *Cydonia vulgaris* | H. Basım |
| **74** | Pamukova/SAKARYA | AYVA | *Cydonia vulgaris* | H. Basım |
| **58** | Harmanağılı/AMASYA | ELMA | *Malus communis* | H. Basım |
| **49** | Merkez/ERZİNCAN | ELMA | *Malus communis cult. Golden* | H. Basım |
| **68** | Saray/TEKİRDAĞ | ELMA | *Malus communis cult. Golden* | H. Basım |

Çizelge 3.2. Değişik ülkelerden elde edilen ve Real-Time PCR' da test edilen *Erwinia amylovora* strainleri

| İzolat Numarası | Origin | Konukçu Bitki | | Referans |
|---|---|---|---|---|
| **238** | İsrail | | | H. Basım |
| **2016** | Belçika | ÜVEZ | *Sorbus* | H. Basım |
| **1906** | Belçika | ADİ ALIÇ | *Crataegus monogyna* | H. Basım |
| **1901** | Belçika | DAĞ MUŞMULASI | *Cotoneaster salicifolius var. Floccosu* | H. Basım |
| **2085** | Belçika | AHUDUDU | *Rubus ideaus* | H. Basım |
| **554** | USA | ARMUT | *Pyrus communis* | H. Basım |
| **130** | USA | BÖĞÜRTLEN | *Rubus spp.* | H. Basım |
| **219** | USA | ELMA | *Malus communis* | H. Basım |
| **140** | Hollanda | ELMA | *Malus communis* | H. Basım |
| **229** | Hollanda | ARMUT | *Pyrus communis* | H. Basım |
| **322** | Hollanda | DAĞ MUŞMULASI | *Cotoneaster dammeri* | H. Basım |
| **326** | Hollanda | ATEŞDİKENİ | *Pyracantha* | H. Basım |
| **553** | Hollanda | AYVA | *Cydonia vulgaris* | H. Basım |

Çizelge 3.3. Real-Time PCR' da kullanılan farklı bitki patojeni bakteriler

| Bakteri İsmi | Origin | Konukçu Bitki | Referans |
|---|---|---|---|
| ***Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*** | Amerika | Karpuz | N.Schaad |
| ***Rhizobium vitis*** | Türkiye | Asma | H.Basım |
| ***Bacillus subtilis*** | Türkiye | Toprak, Toz | H.Basım |
| ***Clavibacter michiganensis subp. Michiganensis*** | Türkiye | Domates | H. Basım |
| ***Pectobacterium caratovorum* pv. *caratovorum*** | Türkiye | Domates | H.Basım |
| ***Pseudomonas corrugata*** | Türkiye | Domates | H.Basım |
| ***Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*** | Türkiye | Zeytin | H.Basım |
| ***Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*** | Türkiye | Fasulye | H.Basım |
| ***Pseudomonas fluorescens*** | Almanya | Toprak | W.Zeller |
| ***Pseudomonas tomato* pv. *tomato*** | Türkiye | Domates | H.Basım |
| ***Pseudomonas syringae pv. syringae*** | Türkiye | Turunçgil | H.Basım |
| ***Xanthomonas campestris* pv. *campestris*** | Almanya | Lahanagiller | W.Zeller |
| ***Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria*** | Türkiye | Domates | H.Basım |
| ***Xylella fastidiosa*** | Türkiye | Asma | H.Basım |

### 3.2. Real-Time PCR Optimizasyonu

Bu çalışmada Smart Cycler II (Cepheid) Real-Time PCR cihazı kullanılmıştır. *Erwinia amylovora*' nın Real-Time PCR ile kısa sürede tanılarının gerçekleştirilmesi amacıyla Real-Time PCR programı, 95 °C' de 1 döngü (2 dakika), 94 °C' de (15 sn.), 58 °C' de (20 sn.), 72 °C' de (15 sn.) toplamda 35 döngü ve 72 °C' de 1 döngü (2 dakika) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4). Her Real-Time PCR işleminde kullanılan master mix

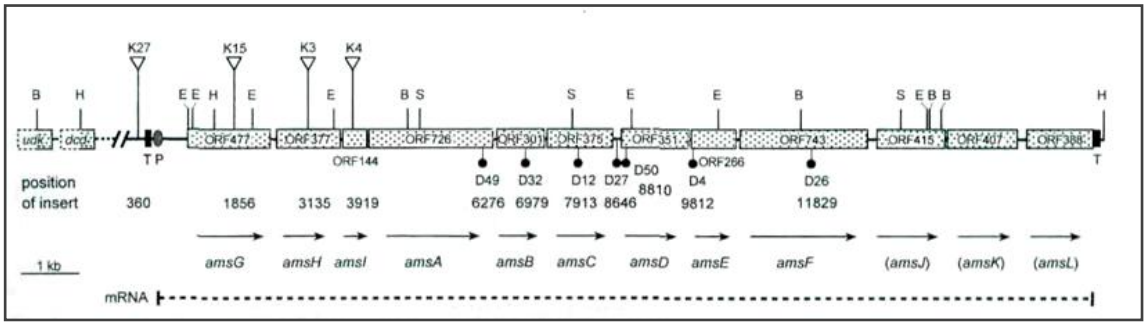
ise; toplam volume 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon ya da template DNA, Forward ve Reverse primerlerin herbirinden 1,2 µl, 0,3 µl Taqman prob, 4,8 µl dNTP karışımı, 3 µl 10X Buffer, 7,2 µl $MgCl_2$ , 0,36 µl Taq polimerase ve 9,54 µl Milli Q (MQ) su şeklindedir.

Çizelge 3.4. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *Erwinia amylovora* için oluşturulan Real-Time PCR programı

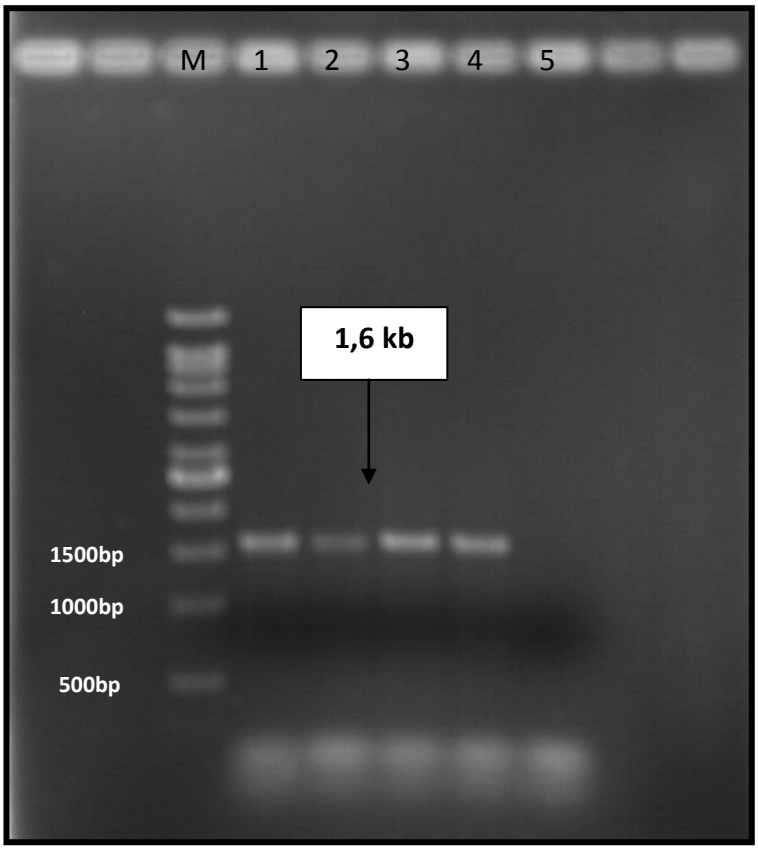
| | ***Erwinia amylovora*** | | |
|---|---|---|---|
| | **Sıcaklık (°C)** | **Süre (Sn)** | **Döngü Sayısı** |
| **Ön Ayrılma (Initial Denaturation)** | 95 | 120 | 1 |
| **Ayrılma (Denaturation)** | 94 | 15 | 35 |
| **Bağlanma (Anneling)** | 58 | 20 | |
| **Uzama (Extention)** | 72 | 15 | |
| **Son Uzama (Final Extention)** | 72 | 120 | 1 |

### 3.3. Primer ve Prob Dizaynı

*Erwinia amylovora'* nın Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için, patojenik bakterinin polisakkarit üretiminden sorumlu ve kromozomal *ams* gen' inin 1,6 kb' lik (Şekil 3.1) internal diziliminden prob ve primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 3.5). Öncelikle klasik PCR yöntemi ile patojenisiteden sorumlu 1,6 kb' lik *amsB* ve *amsC*, *AMSbL* ve *AMSbR* primerleri (Bereswill vd 1995) ile çoğaltılmıştır (Şekil 3.2). Daha sonra çoğaltılan kısmın dizi analizi yapılarak bu kısma özel primerler ve prob dizayn edilmiştir. Geliştirilen prob ve primerler ile *Erwinia amylovora* genomundan, planlandığı gibi 63 bp' lik PCR ürünü çoğaltılmıştır.




Şekil 3.1. *Erwinia amylovora'* ya ait kromozomal DNA' nın patojenisiteden sorumlu *amsB ve amsC*' nin oluşturduğu 1,6 kb' lik gen bölgesininde içinde yer aldığı *ams* geninin fiziksel haritası. Bu bölgede tanımlanan 12 ORFs (open reading frames) bölgesi bulunmaktadır (Bugert ve Geider 1995)




Şekil 3.2. *Erwinia amylovora*' ya ait *amsB* ve *amsC*' *nin* (1,6 kb), *AMSbL* ve *AMSbR* primerleri (Bereswill vd 1995) ile çoğaltılması (M: Marker (1kb), 1;2;3;4: PCR ürünü, 5: Negatif kontrol)

Primer ve probların belirlenmesinde insan gen transkriptlerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi için oluşturulan LNA (Locked Nucleic Acid) sistemi kullanılmıştır (Petersen vd 2003). Çalışmada kullanılan LNA prob, bugün Real-Time PCR sistemleri için sıklıkla kullanılan 25-30 nükleotidlik uzun problardan farklılık göstermektedir. LNA problar 8-9 nükleotid uzunluğunda fakat sahip olduğu son teknolojik özellikler nedeniyle uzun dizilere sahip problar kadar güvenilir ve hassas sonuçlar elde edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan problar için Reporter boya Flourescin (FAM), Quencher boya ise TAMRA' dır.

Çizelge 3.5. Real-Time PCR' da *Erwinia amylovora'* nın tanısı için kullanlan polisakkarit üretiminden sorumlu kromozomal 1,6 kb' lik *amsB* ve *amsC*' nin de içinde bulunduğu bölgenin dizilimi

TCAATGCCGTAGTGCGTAAGTCAGCCAATAACTATGGTTATGGTTATGACTATTACGACTACAGCTACCA
GCAGGGTGAGAAAAGCTAGCTGCCGTGCGGAACCTTTTGACACCCGTCGAAAGGTTCCCTGATGCCGGCT
AGTATGAGTTTGTGAATGTTTAATAAGGTGCCTGGTAATGAAGGACATTTCCTTTTCGGTTGTCATACCT
GCATATAATGCATCAGAATCAATTATCACCACGCTTGATTGTCTGAACGAACAAAGCTATAAAAATTTTG
ACGTCATTATTGTCGA**TGACAAATCTGCCGATGC**GCAAAAACT**GGCAGAAG**TTGTGAGC**AGTGAACGCTA**
**CAGCGGACT**AAAAATCAATTTAGTACTCTCTGAGACAAAACTGAACGGTGCGGGGGCCAGAAACCGCGGT
ATCGACCTGGCAACCGGGGACTACGTCTGTTTTCTCGACGCCGACGATGAATGGCATAAAGACAAGCTAC
AACAGAATTTGAGCCTGATTGAACGGCTGGAAGGGCAGGGCGATCGGCGCTTTATTATTTATAGTCAGGT
CAATATTATTCAGGATGGCAGCTTCCTCAAAGTCATGCCATTAAAGCCGGTCGGTGAACATGAATCAATA
GCCGAATATCTTTTTGGCTGCTACGGGTTTATCCAGACCAGTACCATCGTGCTGAAGCGTGAAGATGCGG
CTGAAATCCGTTTTGATGAAAGATACATCCGCCATCAGGATTACGATTTATGCATCCGTGCCGACAAGCT
GGGCTTTAAGTTTGTCATGATTGCTCAGCCGCTGGCTAATTATCATATGGTGACTCGATTTGGTTCGCAG
CATAAAGGTGAATCGGTTAAGTATTCTCTGTTCTGGCTGGACGCAATGAAGCCGCATCTCACCAGACGCG
ACGTTTATACCTACAAAGCCTATAAATTACCGCTGCGTTATAAGATGGATGGTAAATCATTGCAGGCCAG
CCTTAGCTTTGCCCGCTACTTTTTCTTGACCAATAAAGATAACCGCAATGACTTCCTTAAGCGCCTGATG
AATAAATTACGGACGCGTTTAACAGGAAAGTAGCCGTCGAGCAGAATAATAACGGGTAAATATATGGCTA
TATATTGGATAGTTAGCTACAGTATTCTCGTTTTTTGCTTTTTTGAACTGGCGATGATTAATCAGGCCAG
CGAAGCTAAAACGAAAATTTTGATTAACTACTTTTTCCTGATAGGGGTATTTGCGCTAATTTTATTCGCC
GGTATACGCGGGCCAGATTCTGGCATGGATGATTCACAGTATGTGGGATTTTTCCATGATTTTTCCCGTC
AAACTGGCATGACTGGTTATCAGGCGGTAGCGAACATCTACCGCTATGAGAATTTTTTCATGGTGCTGGC
CTGGGTGGCCTCGTGTTTCACCCATGAGAGCTACTTCTTCCTGTTGTTTATCAGTTTTATCGCCGTGTCG
ACCAATGCCTGGGTTTATAAAAAATATTCCCCGTTGATCTTGTGCTCGCTGTGTCTCTATTCGGCGCACC
TGTTTATCAACAAGGATATGAATCAAATCCGTTTCGGGTTATGCAGTGCCTTTGCCATTGCCTTCATATG
CAGTTTGGTGGCGCGTAATTATCTACTGGCTTTACTTTTTATCGTATTAAGTACCCAGTCTCATTCCACC
GGCTACACCATCGTGATGATTATCCCTTTCTTTTTTATTCGGGAGCGTAAGTACCTGCCGCTGGTACTGG

- ***amsB*** ve ***amsC*** bölgesi ( altı çizili kısım)
- Turuncu renkle işaretli kısımlar bu çalışmada *ams* genin internal dizilimi kullanılarak geliştirilen ***EAHBL*** ve ***EAHBR*** primerlerini, yeşil işaretli kısım ise probu göstermektedir.

### 3.4. Primer ve Probun *Erwinia amylovora* Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi

*Erwinia amylovora'* ya özel dizayn edilen primerler ve prob ile kültür koleksiyonunda yer alan tüm *E. amylovora* strainlerinin tespiti yapılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2). Çalışmada kullanılan yerli ve yabancı tüm *E. amylovora* strainleri NSA (Nutrient Sucrose Agar) besi ortamlarında geliştirilmiştir. Gelişen bakteri kolonilerinden bakteriyel süspansiyonlar elde edilmiştir. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2' şer µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.5. Primer ve Probun Saf DNA' dan Hassasiyetinin Belirlenmesi

*Erwinia amylovora'* nın Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük DNA miktarının tespiti için saf DNA' dan hassasiyet çalışması yapılmıştır. Çalışma için kültür kolleksiyonunda yer alan *E. amylovora'* nın *I2* straininden faydalanılmıştır. Bu amaçla öncelikle *E. amylovora'* nın DNA' ları, Thermo FastPrep FP 120A-230 multi tüp homozenizatör ve Qubiogene/Bio 101 Fast DNA moleküler izolasyon Kit' ine göre izole edilerek DNA miktarları hassas spektrofotometrelerle (Thermo Nanodrop ND-1000 ve Qubit (Qubiogene, Amerika)) ölçülmüştür. Çalışmada tespit edilebilecek en düşük DNA miktarı hedeflendiğinden pikogram (pg) düzeyine kadar seyreltmeler Qubit ile yapılmıştır.

Real-Time PCR yönteminin hassasiyetinin belirlenmesinde 50 pg, 40 pg, 30 pg, 20 pg ve 10 pg DNA seviyeleri test edilmiştir. Elde edilen her bir seviyedeki DNA' lardan 2' şer µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primer ve Probun Hassasiyetinin Belirlenmesi

Bakteriyel patojen *Erwinia amylovora'* nın Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti için, patojen kültür koleksiyonundan alınıp NSA besi ortamında geliştirilmiş, gelişen kolonilerden yoğun bir stok çözelti hazırlanmıştır.

Oluşturulan stok çözeltiden $10^{-1'}$ den $10^{-10'}$ a kadar 10' un katları şeklinde seyreltmeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve bunlar ayrı ayrı tüplere konulmuştur. Elde edilen her bir solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır.

Bu aşamada Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti hedeflendiğinden $10^{-1,}$ den $10^{-10,}$ a kadar seyreltilen ve ayrı tüplere alınan süspansiyonlardan 2 µl alınıp 50 µl deiyonize su içerisinde karıştırılmış ve NSA besi ortamlarına steril yayma çubuk ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra besi ortamlarında gelişen bakteri sayılarını tespit etmek için petriler 2 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.7. Primer ve Probun Seçiciliğinin Belirlenmesi

*Erwinia amylovora* için geliştirilen primerler ve probun spesifitesini belirlemek için farklı bakteri türleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Kültür koleksiyonundan geliştirilen farklı bakterilere ait tek koloniler, her birinde 500 µl steril deiyonize su bulunan mikrofüj tüplerine alınmış, bu tüplerdeki sıvılardan 2' şer µl alınıp Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.8. Bakteriyel Patojenin Çiçekten Tespiti

Bakteriyel patojen *Erwinia amylovora*' nın çiçekten tanı ve tespitinde; Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, Bayat, İmrahor Köyleri ve Korkuteli Merkezdeki armut, kapama bahçelerinden elde edilen çiçek örnekleri kullanılmıştır. Santa Maria, Margarita, Ankara ve Williams çeşidi armut ağaçlarına ait çiçek materyalleri, tüm ağacı temsil edecek şekilde ağacın dört tarafından elde edilmiştir.

Armut ağaçlarına ait çiçek materyalleri 100 ml fosfat buffer içinde 20-30 dk 100 *rpm* hızındaki çalkalayıcıda bırakılmıştır. Bu işlemden sonra oluşan süspansiyondan 10

ml alınıp 3000x*g*'de 10 dk santrifüjlenerek, oluşan pelet PE Buffer (85 gr NaCl, 0,2 KCl, 1,15 gr NaHPO ve 0,2 gr $KH_2PO_4$) içerisinde iyice çözdürülmüş ve stok bir çözelti oluşturulmuştur. Stok çözelti $10^{-1}$'den $10^{-3}$'e kadar seyreltilip, bu seyreltmelerden hem NSA (Nutrient Sucrose Agar) besi ortamına yayma yapılmıştır hem de patojenin Real-Time PCR' da tanısı ve tespiti yapılmıştır. Elde edilen herbir solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır.

### 3.9. Bakteriyel Patojenin Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti

Hastalıklı bitki dokularından *Erwinia amylovora' nın* doğrudan tespiti içinde Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için enfekteli elma ve armut ağaçlarından bitki materyalleri elde edilmiştir.

Bitki materyalleri (sürgün, meyve, yaprak) laboratuar ortamına getirilerek önce bu materyallere yüzey sterilizasyonu yapılmış, daha sonra steril ortamda ezme işlemi uygulanarak bakteri izolasyonu yapılmıştır. Bu işlem sonrasında hazırlanan çözeltiden $10^{-1}$' den $10^{-3}$' e kadar seyreltmeler yapılıp, elde edilen herbir solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi uygulanmıştır. Buna eş zamanlı olarak da NSA besi ortamına inokulasyon yapılmıştır.

### 3.10. Real-Time Bio-PCR

Real-Time PCR işlemi nükleik asit temelli çalışan bir yöntem olduğundan hastalıklı bitki materyalinde var olan ölü bakterilerin de tespiti mümkün olabilmektedir. Real-Time Bio-PCR yöntemi sadece canlı bakteriyi test etmeyi hedefleyen bir yöntemdir.

Bu amaçla öncelikle, bir bakteriyel süspansiyon hazırlanmış ve bu solüsyon $10^{-1}$' den $10^{-3}$' e kadar 10' un katları şeklinde seyreltilmiştir. Tüplerdeki örneklerden 2' şer µl alınıp 50 µl deiyonize su içerisinde karıştırılarak NSA besi ortamlarına steril yayma

çubuk ile inokule edilmiş ve 8 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petrilere 1 ml steril deiyonize su eklenerek canlı olan bakterilerin suya geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen stok bakteriyel süspansiyon $10^{-1'}$ den $10^{-3'}$ e kadar seyreltilmiştir. Her seyreltmeden 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.11. Kantitatif Real-Time PCR ile Bitki Materyallerindeki Bakteri Populasyon Değişimlerinin Belirlenmesi

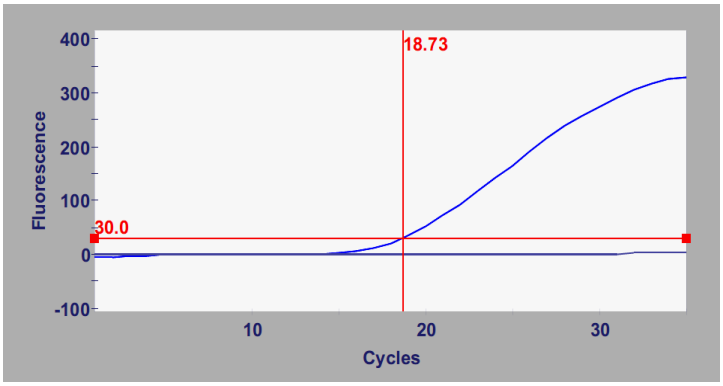
Hastalıklı bitki materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR yöntemi uygulanmıştır. İlk aşamada kültür kolleksiyonundan alınan *Erwinia amylovora'* nın *I2* straini NSA içeren besi ortamında geliştirilmiş, gelişen kolonilerden yoğun bir stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden $10^{-1'}$ den $10^{-10'}$ a kadar 10' un katları şeklinde seyreltme uygulanarak solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok ve her bir seyreltilmiş solüsyondan 2 µl alınıp Kantitatif Real-Time PCR işlemi uygulanmıştır. Bu işleme eş zamanlı olarak da hazırlanan solüsyonlardan 2 µl alınıp, 50 µl saf su ile karıştırılarak, 90 mm çaplı petri kaplarında NSA içeren besi ortamlarına yayma yapılmıştır. Yayma sonucu oluşan koloni sayılarını görmek için 2 gün beklenilmiştir. Real-Time PCR' da en düşük yoğunlukta amplifikasyonun gerçekleştiği süspansiyondan yayma yapılan petride 2 gün sonra meydana gelen bakteri gelişimine bakılarak, bakteriyel koloniler sayılmıştır. Sayım sonrası elde edilen veriler Kantitatif Real-Time PCR işlemi için programa kaydedilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR işlemi sonrası oluşan amplifikasyon değerine bağlı olarak bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğride verilerin güvenilir değerlerde olabilmesi için regrasyon değerinin 1'e yakın olması gerekmektedir. Oluşturulan bu referans bilgi, sağlıklı veya hastalıklı bitki materyallerinden hazırlanmış bir bakteriyel solüsyonun 2µl' sindeki bakteri sayısının belirlenmesinde kullanılabilecek düzeye getirilmiştir. İşlem sonrası oluşan standart eğri üzerinde de bakteri sayısına bağlı olarak örneğin yeri otomatik olarak belirlenebilmektedir. Sonuçta sağlıklı ve hastalıklı bir bitki materyalinden alınan örnekte Ateş Yanıklığı Hastalığına neden olan patojenin yoğunluğunu tespit edebilecek referans bilgi elde edilmiştir.

İkinci aşamada *E. amylovora*, bitkinin sağlıklı ve hastalıklı kısımlarında epifitik olarak bulunabileceğinden, çalışmalar hem hastalıklı hem de sağlıklı bitki materyalleri kullanılarak yürütülmüştür. Bu materyaller, Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, İmrahor Köyleri ve Korkuteli Merkezdeki armut, elma ve ayva kapama bahçelerinden elde edilmiştir. Bitki materyalleri; elma, armut, ayva ağaçlarından en az birine ait olacak şekilde, ağacın dört tarafından, Mayıs ayında ağaçların çiçeklerinden, Haziran, Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında genç sürgün, meyve ve genç yapraklardan elde edilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmek üzere laboratuar koşullarına getirilen bitki materyallerinden, epifitik populasyonu içeren solüsyonlar hazırlanmıştır. Tek bir bitki materyalindeki epifitik populasyonunun belirlenmesi amacıyla; 5 tekerrürlü olacak şekilde, bitki materyalleri PE (Phosphate Buffer) tampon çözeltisinde 20 dk 100 *rpm* hızındaki çalkalayıcıya bırakılmıştır. Bu işlemi takiben hazırlanan solüsyonlar 3000x*g*' de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hazırlanan solüsyonlar Kantitatif Real-time PCR' da test edilmiştir ve buna eş zamanlı olarak da NSA içeren besi ortamlarına yayma yapılmıştır. Kantitatif Real-Time PCR sonucu, referans verisi ile karşılaştırılarak bakteriyel populasyona ait sayısal veriler elde edilmiş, patojen bakteri sayısı otomatik olarak belirlenmiştir. Sayısal verilerin doğruluğunu tespit etmek için petrilerde geliştirilen bakteri sayısı ile karşılaştırma yapılmıştır. Elde edilen veriler kullanılarak *Erwinia amylovora'* nın aylara göre populayon dinamiği oluşturulmuştur. Aynı zamanda aylara bağlı belirlenen populasyon değerleri varyans analizine tabi tutulmuş ve aylarda elde edilen farklı sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır.

# 4. BULGULAR

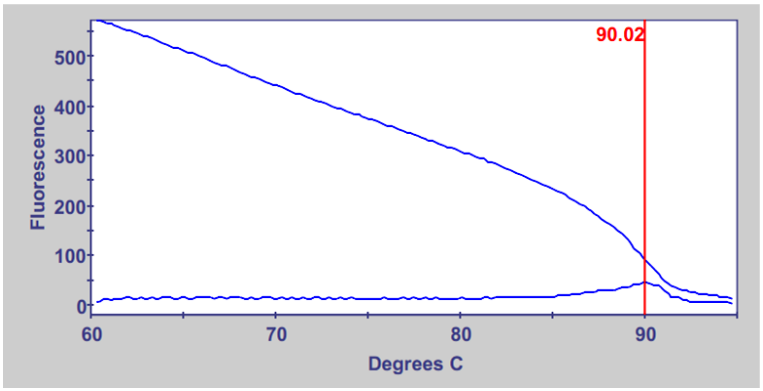
## 4.1. *Erwinia amylovora'* nın Real-Time PCR İle Tanısı

*Erwinia amylovora'* nın *I2* straininden yararlanılarak primerlerin, probun ve Real-Time PCR programının kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.1). *Erwinia amylovora'* nın tanısında kullanılan primerlerin ve Real-Time PCR yönteminin doğruluğunu ispatlamak ve Real-Time PCR ile tek bir pik eğrisinin elde edildiğini göstermek amacıyla SYBR Green ile karşılaştırılmalı Thermal Melting (Erime Eğrisi) eğrisi elde edilmiştir. *Erwinia amylovora* için kullanılan primerlerin maximum erime sıcaklığı 90.02 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).




| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | E.amy | 18.73 | E. amylovora |
| A2 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.1. *Erwinia amylovora* strainine spesifik primer ve prob ile *Erwinia amylovora'* nın tespiti

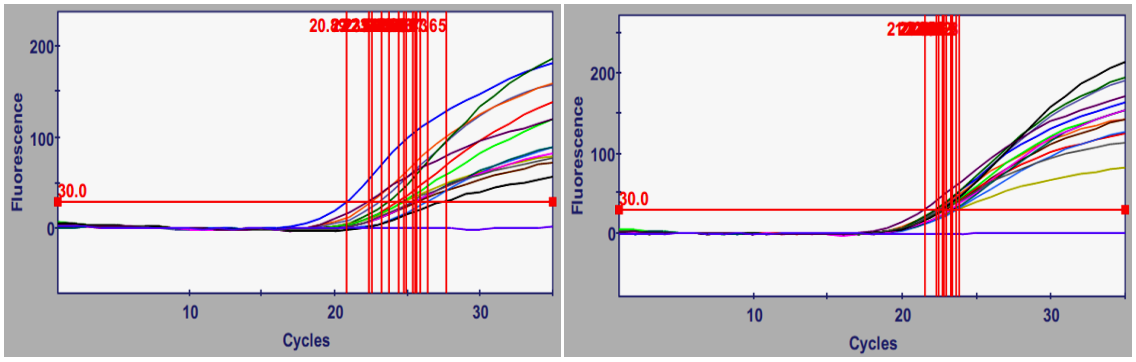



| Site ID | Sample ID | Melt Peak1 | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | | 90.02 | E. amylovora sybr-melt |

Şekil 4.2. *Erwinia amylovora'* nın SYBR-melt grafiği

### 4.2. *Erwinia amylovora'* nın Tüm Strainlerinin Real-Time PCR İle Tanısı

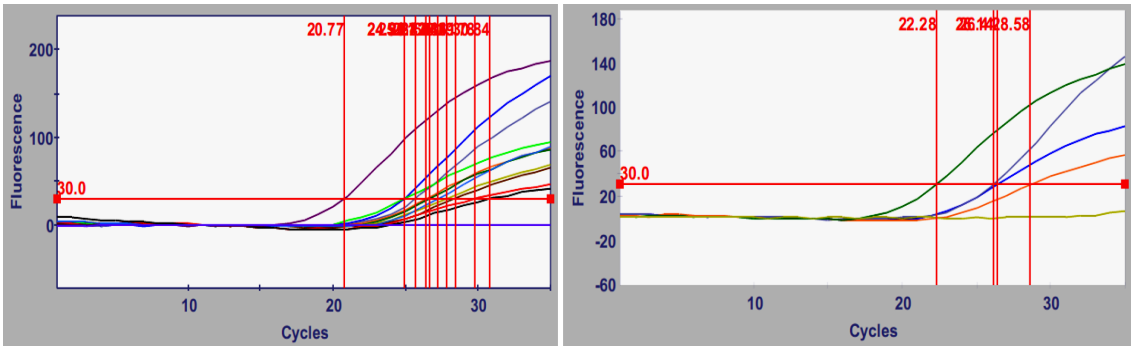
*Erwinia amylovora'* nın Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için kültür koleksiyonunda yer alan tüm yerli ve yabancı *Erwinia amylovora* strainleri kullanılarak primer ve probun strainlere spesifikliği test edilmiştir. Dizayn edilen primerler ve probun *E. amylovora'* nın farklı strainlerine de spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4).




| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | 9 ANTALYA Armut | 20.89 | E. amylovora |
| A2 | 26 ADANA Armut | 23.21 | E. amylovora |
| A3 | 30 DENIZLI Armut | 22.60 | E. amylovora |
| A5 | 31 AYDIN Armut | 23.73 | E. amylovora |
| A6 | 39 MANISA Armut | 24.93 | E. amylovora |
| A7 | 46 KARAMAN Armut | 25.87 | E. amylovora |
| A8 | 52 VAN Armut | 24.47 | E. amylovora |
| A9 | 71 TEKIRDAG Armut | 24.76 | E. amylovora |
| A10 | 16 ISPARTA Armut | 26.43 | E. amylovora |
| A11 | 37 AYDIN Ayva | 25.62 | E. amylovora |
| A12 | 44 AFYON Ayva | 25.57 | E. amylovora |
| A13 | 74 SAKARYA Ayva | 27.65 | E. amylovora |
| A14 | 68 TEKIRDAG Elma | 25.36 | E. amylovora |
| A15 | PK-E. amy | 22.35 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | 43 ANKARA Armut | 22.34 | E. amylovora |
| A2 | 60 AMASYA Armut | 22.51 | E. amylovora |
| A3 | 64 BURSA Armut | 22.31 | E. amylovora |
| A5 | 42 ANKARA Armut | 22.29 | E. amylovora |
| A6 | 33 DENIZLI Atesdikeni | 23.80 | E. amylovora |
| A7 | 10 ANTALYA Yenidunya | 22.94 | E. amylovora |
| A8 | 67 BURSA Musmula | 22.81 | E. amylovora |
| A9 | 07 ANTALYA Ayva | 22.82 | E. amylovora |
| A10 | 17 ISPARTA Ayva | 23.69 | E. amylovora |
| A11 | 48 ERZINCAN Ayva | 23.43 | E. amylovora |
| A12 | 56 AMASYA Ayva | 23.32 | E. amylovora |
| A13 | 58 AMASYA Elma | 22.74 | E. amylovora |
| A14 | 49 ERZINCAN Elma | 22.81 | E. amylovora |
| A15 | PK-E. amy | 21.54 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.3. *Erwinia amylovora'* nın yerli strainlerinin tespiti




| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | 238 Israil | 24.91 | E. amylovora |
| A2 | 2016 Belcika | 25.71 | E. amylovora |
| A3 | 1906 Belcika | 26.42 | E. amylovora |
| A5 | 1901 Belcika | 26.66 | E. amylovora |
| A6 | 2085 Belcika | 27.86 | E. amylovora |
| A7 | 554 USA | 28.41 | E. amylovora |
| A8 | 130 USA | 29.78 | E. amylovora |
| A9 | 219 USA | 24.95 | E. amylovora |
| A10 | 140 Hollanda | 27.24 | E. amylovora |
| A13 | 326 Hollanda | 30.84 | E. amylovora |
| A15 | PK-E. amy | 20.77 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

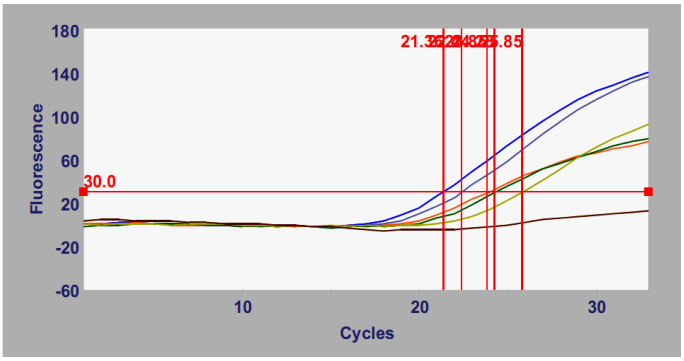
| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | 229 Hollanda | 26.41 | E. amylovora |
| A2 | 322 Hollanda | 26.14 | E. amylovora |
| A3 | 553 Hollanda | 28.58 | E. amylovora |
| A5 | PK-E.amy | 22.28 | E. amylovora |
| A6 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.4. *Erwinia amylovora'* nın yabancı strainlerinin tespiti

### 4.3. Primerler ve Probun Saf DNA' dan Hassasiyeti

Real-Time PCR ile primerler ve probun genomik DNA' dan hassasiyetini belirlemek için *Erwinia amylovora'* dan izole edilen saf genomik DNA' nın önce nanogram düzeyinde devamında pikogram düzeyinde ölçümü yapılmıştır. Pikogram düzeyindeki ölçümünde 50 picogram (pg), 40 pg, 30 pg, 20 pg ve 10 pg olacak şekilde

seyreltmeler yapılmış ve bakteriyel patojenin genomik DNA' dan tespit limiti 10 pg olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).




| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | 50 pg | 21.36 | E. amylovora |
| A2 | 40 pg | 22.40 | E. amylovora |
| A3 | 30 pg | 23.85 | E. amylovora |
| A5 | 20 pg | 24.28 | E. amylovora |
| A6 | 10 pg | 25.85 | E. amylovora |
| A7 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.5. Primerler ve probun saf DNA' dan hassasiyeti

### 4.4. Direkt Bakteriden Primerler ve Probun Hassasiyeti

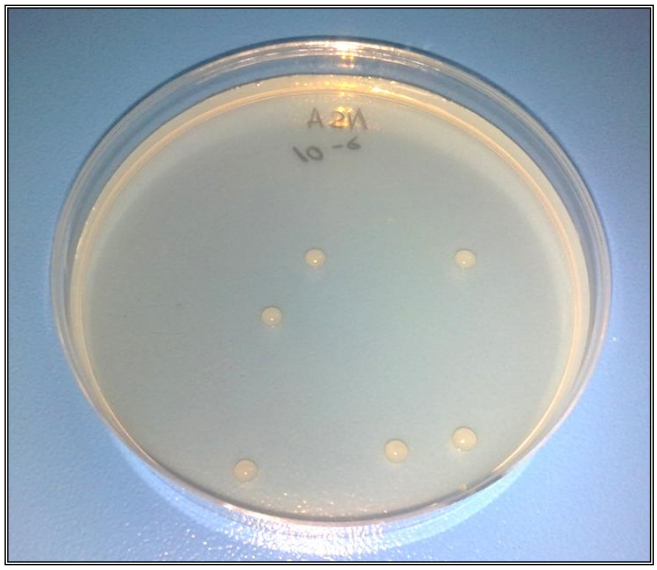
Real-Time PCR ile *Erwinia amylovora'* nın direkt bakteriyel hücreden tespit limiti 6 cfu/2µl (Çizelge 4.1) olarak tespit edilmiştir. Bu işleme eş zamanlı olarak NSA kültür besi ortamına yapılan inokülasyon sonrası *Erwinia amylovora'* nın tespit limiti 2 mikrolitrede 6 canlı bakteri hücresi olarak bulunmuştur (Şekil 4.6, Şekil 4.7).

Çizelge 4.1. Real-Time PCR ile *Erwinia amylovora'* nın direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

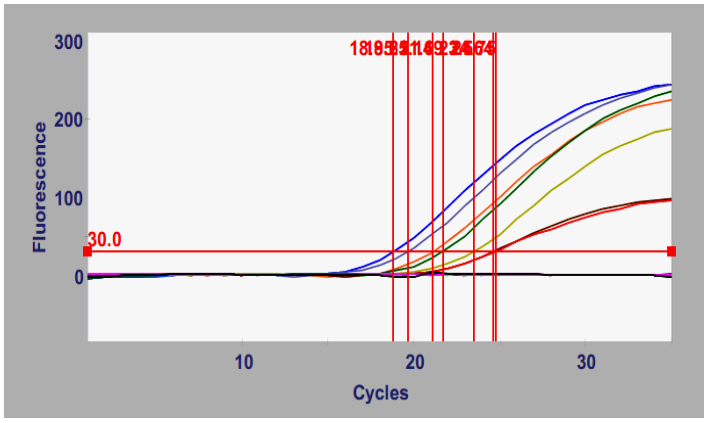
| Konsantrasyon | RT-PCR Sonucu *(Ct)* | Bakteri Sayıları (*cfu/2μ*) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***Erwinia amylovora*** | ***Erwinia amylovora*** | | | ***x*** | ***D*** | **P/N** |
| **Stok** | 21.79 | * | * | * | - | - | + |
| **$10^{-1}$** | 23.15 | * | * | * | - | - | + |
| **$10^{-2}$** | 23.80 | * | * | * | - | - | + |
| **$10^{-3}$** | 24.36 | * | * | * | - | - | + |
| **$10^{-4}$** | 27.78 | 617 | 610 | 619 | 615.3 | 4.72 | + |
| **$10^{-5}$** | 25.51 | 55 | 59 | 61 | 58.3 | 3.05 | + |
| **$10^{-6}$** | 25.45 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0 | + |
| **$10^{-7}$** | 0.00 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| **$10^{-8}$** | 0.00 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| **$10^{-9}$** | 0.00 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| **$10^{-10}$** | 0.00 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |
| **Negatif Kontrol** | 0.00 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |

*d: Standart sapma* x: Aritmetik Ortalama P/N : Pozitif/ Negatif

***** Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı



Şekil 4.6. NSA kültür besi ortamında en az bakterinin tespiti

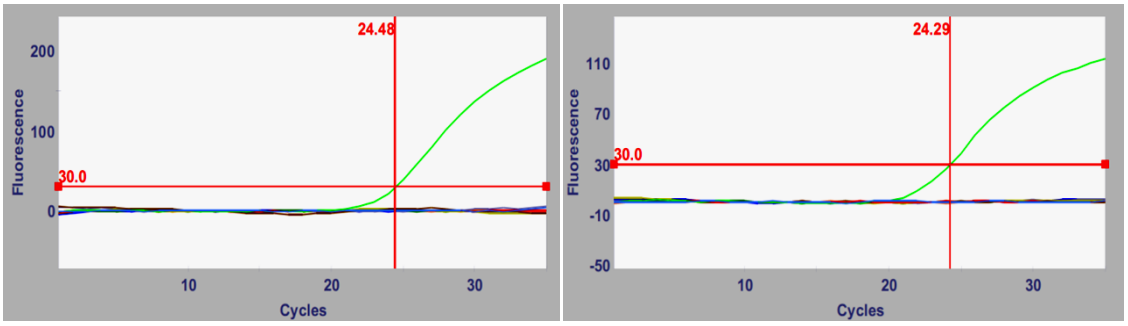



| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | Stok | 18.85 | E. amylovora |
| A2 | 10-1 | 19.65 | E. amylovora |
| A3 | 10-2 | 21.14 | E. amylovora |
| A5 | 10-3 | 21.69 | E. amylovora |
| A6 | 10-4 | 23.50 | E. amylovora |
| A7 | 10-5 | 24.64 | E. amylovora |
| A8 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A9 | 10-7 | 0.00 | E. amylovora |
| A10 | 10-8 | 0.00 | E. amylovora |
| A11 | 10-9 | 0.00 | E. amylovora |
| A12 | 10-10 | 0.00 | E. amylovora |
| A13 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.7. Primer prob setinin bakteri hassasiyeti

### 4.5. Primerler ve Probun Seçiciliği

*Erwinia amylovora'* nın tanı ve tespiti için dizayn edilen primerler ve probun seçiciliğini test etmek amacıyla, Çizelge 3.1.3' de verilen farklı cins ve türlere ait bitki patojeni bakteriler ile Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonucunda *Erwinia amylovora* için tasarlanan primer-prob setinin sadece *Erwinia amylovora'* ya spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).



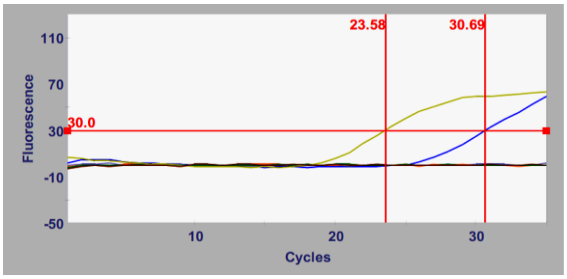

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A5 | A.citrulli | 0.00 | E. amylovora |
| A6 | A.vitis | 0.00 | E. amylovora |
| A7 | B.subtilis | 0.00 | E. amylovora |
| A8 | Cmm | 0.00 | E. amylovora |
| A9 | E.caratovora | 0.00 | E. amylovora |
| A10 | P.corrugata | 0.00 | E. amylovora |
| A11 | P.s.pv.savastonia | 0.00 | E. amylovora |
| A12 | PK-E.amy | 24.48 | E. amylovora |
| A13 | NK | 0.00 | E. amylovora |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A5 | P.s.pv.phaseolicola | 0.00 | E. amylovora |
| A6 | P.flourecens | 0.00 | E. amylovora |
| A7 | Ptt | 0.00 | E. amylovora |
| A8 | Xcc | 0.00 | E. amylovora |
| A9 | P.s.pv.syringae | 0.00 | E. amylovora |
| A10 | Xav | 0.00 | E. amylovora |
| A11 | Xylella fastidiosa | 0.00 | E. amylovora |
| A12 | PK-E.amy | 24.29 | E. amylovora |
| A13 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.8. Farklı bakteriler denenerek *Erwinia amylovora'* ya özel dizayn edilen primerler ve probun spesifikliğinin belirlenmesi

### 4.6. Bakteriyel Patojen *Erwinia amylovora'* nın Çiçekten Tespiti

*Erwinia amylovora'* nın ilk simptomu çiçeklerde göstermesi ve çiçeklerde epifitik olarak bulunan patojenin erken tanı ve tespitinin yapılması, mücadele açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla geliştirilen yöntem ile *Erwinia amylovora'* nın çiçekten erken tanı ve tespitleri gerçekleştirilmiştir. Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, Bayat, İmrahor köylerinden ve Korkuteli merkezden elde edilen Santa Maria, Margarita, Ankara ve Williams çeşidi armut ağaçlarına ait çiçeklerde *Erwinia amylovora'* nın tespitinin çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda sadece Yazır Köyünden elde edilen Williams çeşidi armut ağaçlarına ait çiçeklerde *Erwinia amylovora* tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

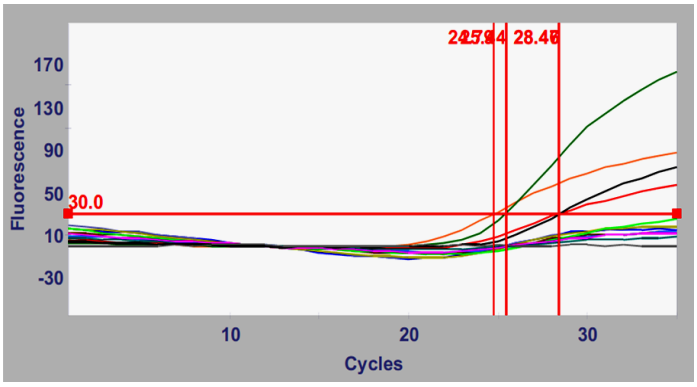



| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A5 | W stok | 30.69 | E. amylovora |
| A6 | W 10-1 | 0.00 | E. amylovora |
| A7 | W 10-2 | 0.00 | E. amylovora |
| A8 | W 10-3 | 0.00 | E. amylovora |
| A9 | PK (E.amy) | 23.58 | E. amylovora |
| A10 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.9. Williams çeşidi armut ağaçlarından elde edilen çiçeklerde *Erwinia amylovora'* nın tespiti

### 4.7. Real-Time Bio-PCR

Real-Time PCR yöntemi ile hastalıklı bitki materyali üzerinde bulunan canlı ve ölü bakterilerin tespiti mümkün olabilmektedir. Yalnız canlı bakterilerin tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla bu çalışmada hastalıklı bitki materyalinin sürgün meyve ve yaprak kısımlarından hazırlanan solüsyonlarla Real-Time Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Herbir kısım için hazırlanan stok, $10^{-1}$, $10^{-2}$ ve $10^{-3}$ seviyeleri ile yapılan Real-Time Bio-PCR işlemi sonucunda sürgünlerden hazırlanan solüsyonda stok ve $10^{-1}$ seviyelerinde yoğunluk nedeniyle amplifikasyon görülmezken, $10^{-2}$ ve $10^{-3}$ seviyelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmiştir. Meyvelerden hazırlanan solüsyonda stok, $10^{-1}$ ve $10^{-3}$ seviyelerinde amplifikasyon görülmezken, $10^{-2}$ seviyesinde tespit edilmiştir. Yapraklardan hazırlanan solüsyonda ise stok, $10^{-1}$ ve $10^{-2}$ seviyelerinde amplifikasyon oluşmazken, $10^{-3}$ seviyesinde *Erwinia amylovora* tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Farklı seviyelerde tespit edilmesinin nedeni hazırlanan solüsyonun içeriğindeki bakteri populasyonunun yoğunluğuna ve bitki materyalinden kaynaklı birtakım fenoliklerin okumayı engellemesine bağlıdır.



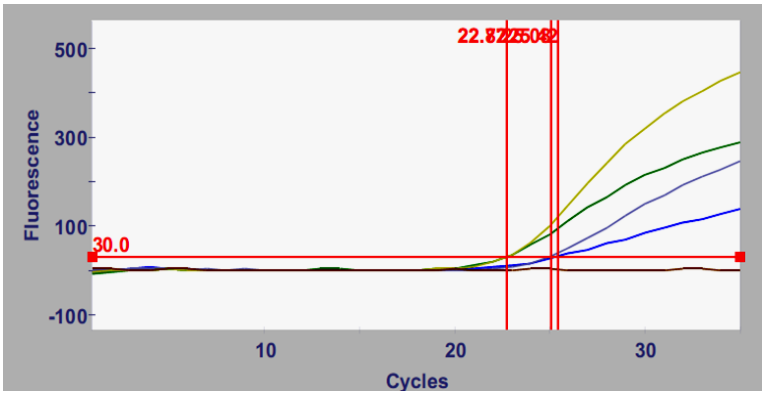

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A1 | surgun stok | 0.00 | E. amylovora |
| A2 | surgun 10-1 | 0.00 | E. amylovora |
| A3 | surgun 10-2 | 24.79 | E. amylovora |
| A5 | surgun 10-3 | 25.44 | E. amylovora |
| A6 | meyve stok | 0.00 | E. amylovora |
| A7 | meyve 10-1 | 0.00 | E. amylovora |
| A8 | meyve 10-2 | 28.46 | E. amylovora |
| A9 | meyve 10-3 | 0.00 | E. amylovora |
| A10 | yaprak stok | 0.00 | E. amylovora |
| A11 | yaprak 10-1 | 0.00 | E. amylovora |
| A12 | yaprak 10-2 | 0.00 | E. amylovora |
| A13 | yaprak 10-3 | 28.47 | E. amylovora |
| A14 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.10. Hastalıklı bitki materyaline ait kısımlardan yalnız canlı bakterilerin tespiti

### 4.8. Hastalıklı Bitki Dokularından Bakteriyel Patojen *Erwinia amylovora'* nın Tespiti

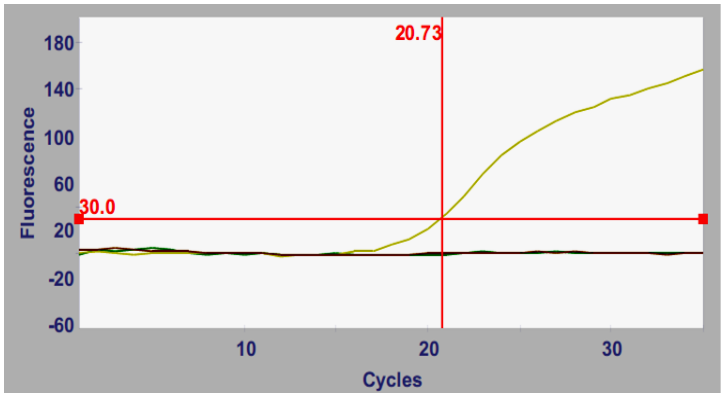
Yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde ürün ve kalite kayıplarına neden olan *Erwinia amylovora'* nın hastalıklı bitki dokularından tanısı ve tespiti için Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Antalya' nın merkez ilçesi Döşemealtı' ndaki Elma kapama bahçesinden elde edilen hastalıklı bitki kısımlarında *Erwinia amylovora'* nın

tanısı ve tespiti yapılmıştır (Şekil 4.11). Fakat aynı bölgeden elde edilen enfektesiz bitki yapraklarında *Erwinia amylovora* tespit edilememiştir. (Şekil 4.12). Aynı zamanda Bursa ilindeki elma kapama bahçesinden elde edilen Granny Smith çeşidi ve Summer Red çeşidi elma ağaçlarına ait hastalıklı bitki kısımlarında da *Erwinia amylovora*'nın tanısı ve tespiti yapılmıştır (Şekil 4.13, Şekil 4.14).



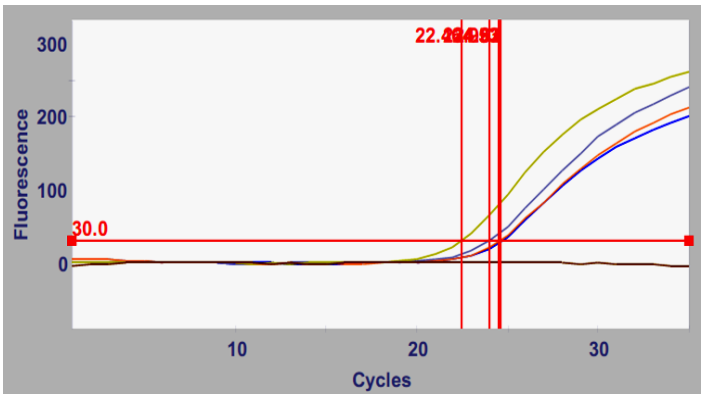

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A5 | Enfekteli Surgun | 25.42 | E. amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve | 25.08 | E. amylovora |
| A8 | Enfekteli Yaprak | 22.77 | E. amylovora |
| A9 | PK-E. amy | 22.82 | E. amylovora |
| A10 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.11. Antalya, Döşemealtı' ndaki elma ağaçlarına ait enfekteli kısımlarda *Erwinia amylovora*' nın tanısı ve tespiti



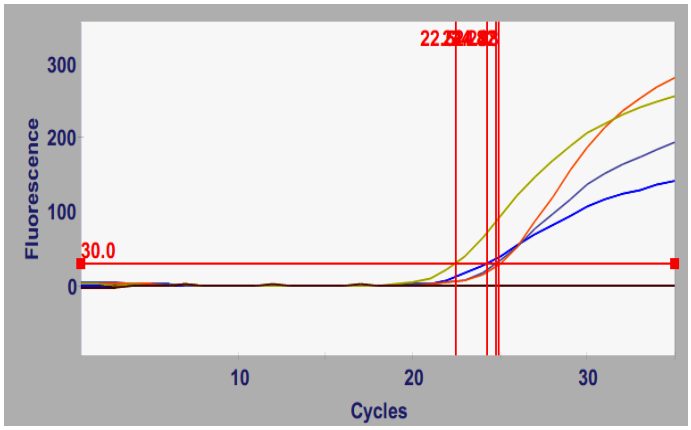

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A12 | Day.Cesit Yaprak | 0.00 | E. amylovora |
| A13 | PK-E.amy | 20.73 | E. amylovora |
| A14 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.12. Antalya, Döşemealtı' ndaki enfektesiz elma yapraklarında *Erwinia amylovora'* nın tanısı ve tespiti




| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A11 | Enfekteli Surgun (G.S.) | 24.62 | E. amylovora |
| A12 | Enfekteli Meyve (G.S.) | 23.99 | E. amylovora |
| A13 | Enfekteli Yaprak (G.S) | 24.53 | E. amylovora |
| A15 | PK- E.amy | 22.46 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.13. Bursa' daki Granny Smith çeşidi elma ağaçlarına ait hastalıklı bitki kısımlarında *Erwinia amylovora*' nın tanısı ve tespiti




| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A11 | Enfekteli Surgun (S.R.) | 24.24 | E. amylovora |
| A12 | Enfekteli Meyve (S.R.) | 24.82 | E. amylovora |
| A13 | Enfekteli Yaprak (S.R.) | 24.98 | E. amylovora |
| A15 | PK- E.amy | 22.50 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

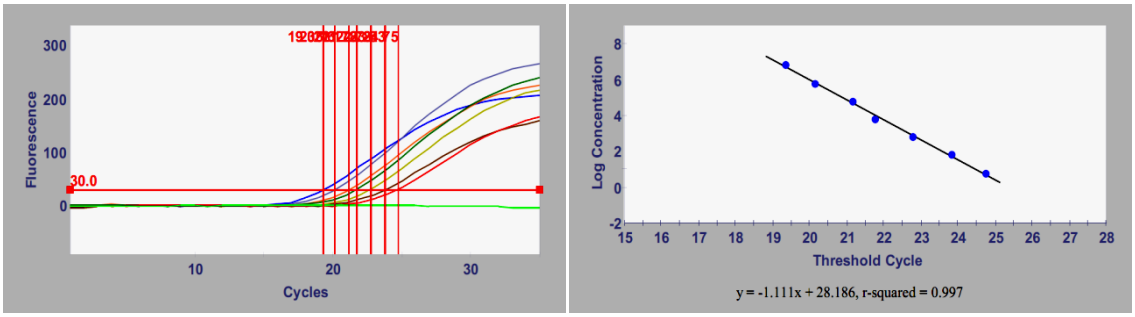
Şekil 4.14. Bursa' daki Summer Red çeşidi elma ağaçlarına ait hastalıklı bitki kısımlarında *Erwinia amylovora*' nın tanısı ve tespiti

### 4.9. Kantitatif Real-Time PCR ile Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Erken dönemde bitki materyallerinde bulunan epifitik bakterilerin sayısının belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR işlemi ile referans standart eğri oluşturulmuştur. Bunun için hazırlanan stok çözeltiden $10^{-1'}$ den $10^{-10'}$ a kadar 10' un katları şeklinde seyreltme yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmeler uygun besi ortamına yayılmış ve gelişen koloniler sayılmıştır. Sayım sonrası elde edilen veriler Kantitatif Real-Time PCR işlemi için *Erwinia amylovora* programına kaydedilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR işleminde oluşacak amplifikasyon değerine bağlı olarak referans bir standart eğri oluşturulmuştur (Şekil. 4.15).

Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, İmrahor Köyleri ve Korkuteli Merkezdeki armut, elma ve ayva kapama bahçelerinden elde edilen hastalıklı ve sağlıklı

bitki materyalleri Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmek üzere laboratuar koşullarına getirilmiş ve bitki materyallerinden epifitik populasyonu içeren solüsyonlar hazırlanmıştır. Yıkama ve santrifüj işlemlerini takiben hazırlanan solüsyonlar Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmiş ve buna eş zamanlı olarak da NSA içeren besi ortamlarına yayma yapılmıştır. Referans verisi ile karşılaştırılarak elde edilen bakteri populasyonuna ait sayısal veriler kullanılarak aylara bağlı populasyon dinamiği oluşturulmuştur.




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

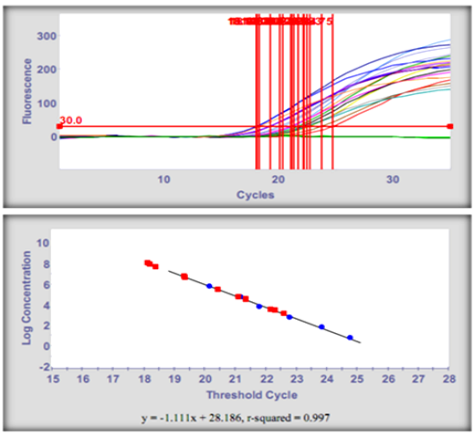
y: Bakteri sayısının logaritmik değeri x: Real-Time PCR sonrası saptanan Ct değeri

Şekil 4.15. Kantitatif Real-Time PCR ile referans standart eğrinin oluşturulması

### 4.9.1. Mayıs ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Mayıs ayında Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, İmrahor Köyleri ve Korkuteli Merkezdeki armut, elma ve ayva kapama bahçelerinden elde edilen enfekteli ve enfektesiz çiçek materyalleri Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmiştir. Sonuçlar,

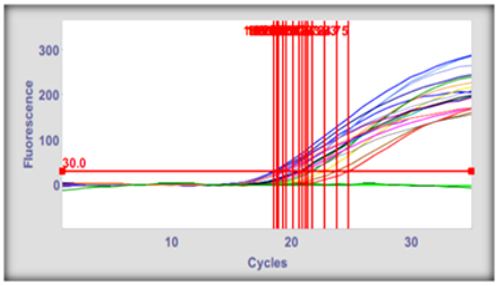
referans verisi ile karşılaştırılarak Mayıs ayında çiçeklerdeki *Erwinia amylovora'* ya ait bakteriyel populasyon belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, Yazır köyünden elde edilen enfekteli tek bir armut çiçeğinde $2{,}2x10^8$, enfektesiz armut çiçeğinde $1x10^6$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Korkuteli merkezden elde edilen enfekteli tek bir armut çiçeğinde $3{,}3x10^8$, enfektesiz armut çiçeğinde $1x10^7$ bakteri, yine Korkuteli Merkezden fakat farklı bir armut bahçesinden elde edilen enfekteli tek bir armut çiçeğinde $2x10^8$, enfektesiz armut çiçeğinde $7x10^6$ bakteri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Bunların yanında İmrahor köyünden ve Korkuteli Merkezde diğerlerinden farklı bir armut bahçesinden elde edilen armut çiçeklerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Korkuteli Merkezden elde edilen enfekteli tek bir ayva çiçeğinde $1{,}3x10^8$, enfektesiz ayva çiçeğinde $8x10^4$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Yine merkezden fakat farklı bir ayva bahçesinden elde edilen enfekteli tek bir ayva çiçeğinde $1x10^6$, enfektesiz ayva çiçeğinde $1{,}1x10^4$ bakteri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20). Yazır köyünden elde edilen enfekteli tek bir elma çiçeğinde $1x10^6$ bakteri tespit edilirken (Şekil 4.21), enfektesiz elma çiçeğinde tespit edilmemiştir. Bunun yanında İmrahor köyünden ve Korkuteli Merkezden elde edilen elma çiçeklerinde de *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Mayıs ayında çiçeklerdeki bakteriyel populasyona ait grafik Şekil 4.22' de verilmiştir.

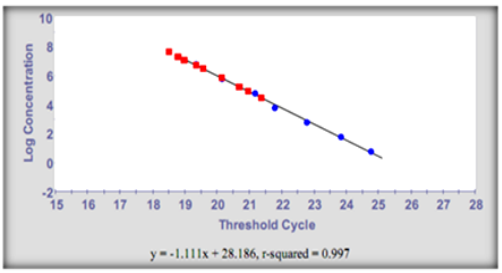



| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | 1 Enfektesiz | 21.33 | E. amylovora |
| A6 | 2 Enfektesiz | 22.58 | E. amylovora |
| A7 | 3 Enfektesiz | 21.12 | E. amylovora |
| A8 | 4 Enfektesiz | 22.18 | E. amylovora |
| A9 | 5 Enfektesiz | 22.30 | E. amylovora |
| A10 | 6 Enfekteli | 19.34 | E. amylovora |
| A11 | 7 Enfekteli | 19.33 | E. amylovora |
| A12 | 8 Enfekteli | 18.14 | E. amylovora |
| A13 | 9 Enfekteli | 18.19 | E. amylovora |
| A14 | 10 Enfekteli | 20.44 | E. amylovora |
| A15 | PK (E.amy) | 18.41 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.16. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfekteli ve enfektesiz armut çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi

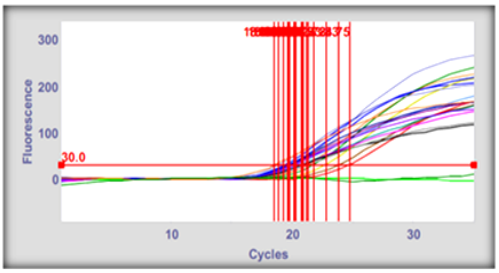


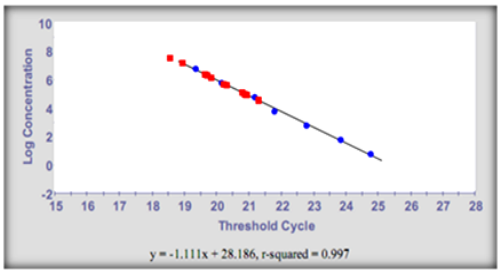




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | 1 Enfektesiz | 20.15 | E. amylovora |
| A6 | 2 Enfektesiz | 20.69 | E. amylovora |
| A7 | 3 Enfektesiz | 20.97 | E. amylovora |
| A8 | 4 Enfektesiz | 20.67 | E. amylovora |
| A9 | 5 Enfektesiz | 21.36 | E. amylovora |
| A10 | 6 Enfekteli | 18.98 | E. amylovora |
| A11 | 7 Enfekteli | 19.57 | E. amylovora |
| A12 | 8 Enfekteli | 18.80 | E. amylovora |
| A13 | 9 Enfekteli | 18.51 | E. amylovora |
| A14 | 10 Enfekteli | 18.79 | E. amylovora |
| A15 | PK (E.amy) | 19.35 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.17. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi

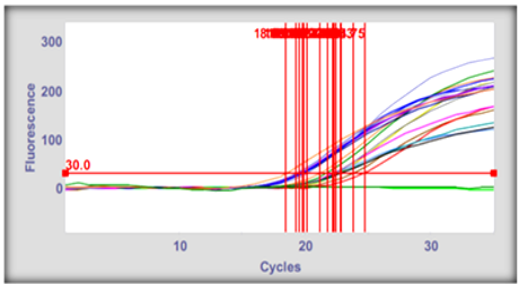


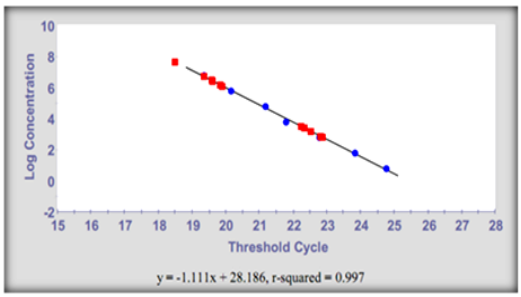




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | 1 Enfektesiz | 20.31 | E. amylovora |
| A6 | 2 Enfektesiz | 20.87 | E. amylovora |
| A7 | 3 Enfektesiz | 20.91 | E. amylovora |
| A8 | 4 Enfektesiz | 20.81 | E. amylovora |
| A9 | 5 Enfektesiz | 21.32 | E. amylovora |
| A10 | 6 Enfekteli | 19.85 | E. amylovora |
| A11 | 7 Enfekteli | 20.22 | E. amylovora |
| A12 | 8 Enfekteli | 19.71 | E. amylovora |
| A13 | 9 Enfekteli | 19.65 | E. amylovora |
| A14 | 10 Enfekteli | 18.93 | E. amylovora |
| A15 | PK (E.amy) | 18.57 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.18. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfekteli ve enfektesiz armut çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi

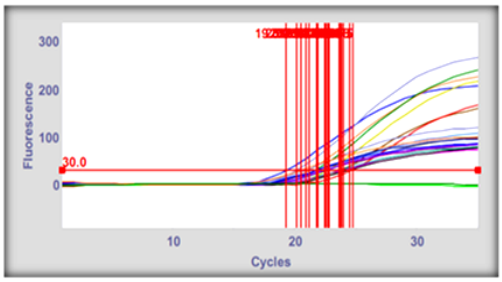


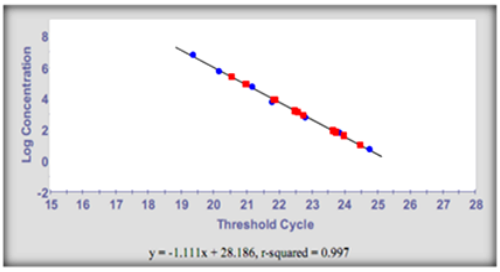




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | 1 Enfektesiz | 22.51 | E. amylovora |
| A6 | 2 Enfektesiz | 22.89 | E. amylovora |
| A7 | 3 Enfektesiz | 22.24 | E. amylovora |
| A8 | 4 Enfektesiz | 22.81 | E. amylovora |
| A9 | 5 Enfektesiz | 22.33 | E. amylovora |
| A10 | 6 Enfekteli | 19.58 | E. amylovora |
| A11 | 7 Enfekteli | 19.60 | E. amylovora |
| A12 | 8 Enfekteli | 19.85 | E. amylovora |
| A13 | 9 Enfekteli | 19.91 | E. amylovora |
| A14 | 10 Enfekteli | 19.34 | E. amylovora |
| A15 | PK (E.amy) | 18.49 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.19. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi

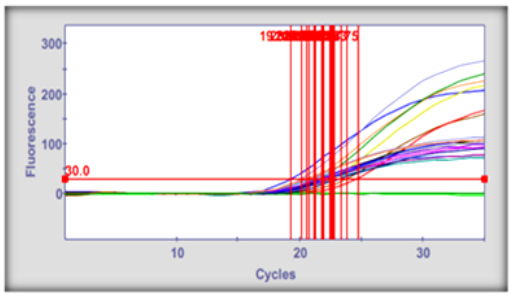


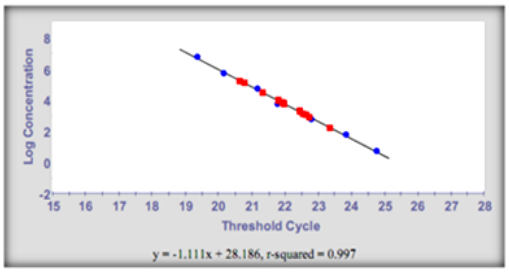




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | 1 Enfektesiz | 22.71 | E. amylovora |
| A6 | 2 Enfektesiz | 23.73 | E. amylovora |
| A7 | 3 Enfektesiz | 23.97 | E. amylovora |
| A8 | 4 Enfektesiz | 24.48 | E. amylovora |
| A9 | 5 Enfektesiz | 23.64 | E. amylovora |
| A10 | 6 Enfekteli | 22.56 | E. amylovora |
| A11 | 7 Enfekteli | 22.46 | E. amylovora |
| A12 | 8 Enfekteli | 21.82 | E. amylovora |
| A13 | 9 Enfekteli | 21.87 | E. amylovora |
| A14 | 10 Enfekteli | 20.97 | E. amylovora |
| A15 | PK (E.amy) | 20.54 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

Şekil 4.20. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfekteli ve enfektesiz ayva çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi

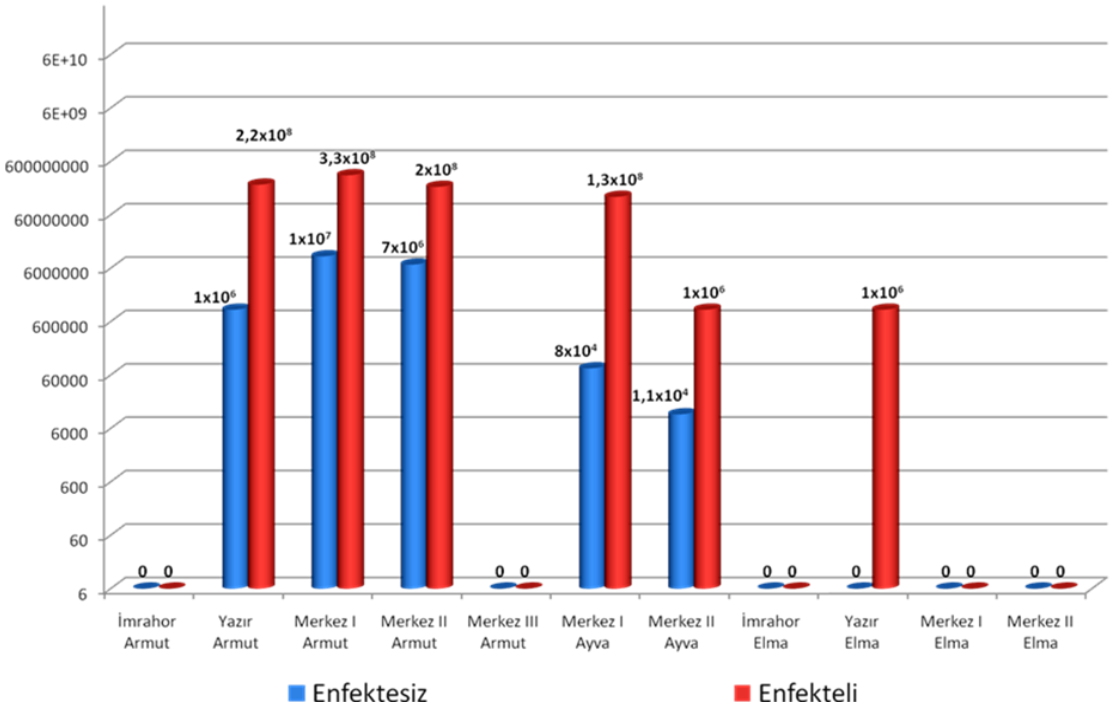



| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | 1 Enfekteli | 21.32 | E. amylovora |
| A6 | 2 Enfekteli | 22.63 | E. amylovora |
| A7 | 3 Enfekteli | 22.52 | E. amylovora |
| A8 | 4 Enfekteli | 21.95 | E. amylovora |
| A9 | 5 Enfekteli | 22.71 | E. amylovora |
| A10 | 6 Enfekteli | 21.92 | E. amylovora |
| A11 | 7 Enfekteli | 21.79 | E. amylovora |
| A12 | 8 Enfekteli | 23.37 | E. amylovora |
| A13 | 9 Enfekteli | 22.44 | E. amylovora |
| A14 | 10 Enfekteli | 20.80 | E. amylovora |
| A15 | PK (E.amy) | 20.62 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |

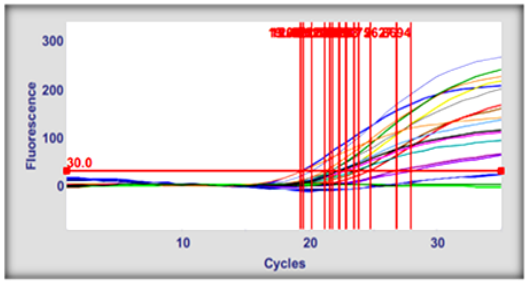
Şekil 4.21. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfekteli elma çiçeklerinde bakteriyel populasyonun belirlenmesi

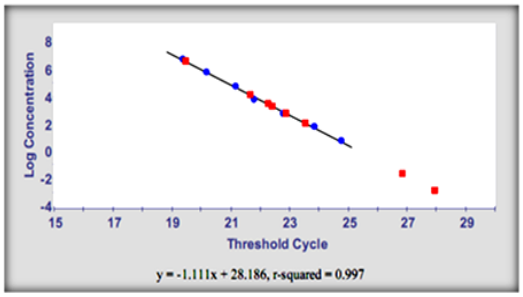



Şekil 4.22. Mayıs ayında enfekteli ve enfektesiz çiçeklerde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik

### 4.9.2. Haziran ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Haziran ayında Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, İmrahor Köyleri ve Korkuteli Merkezdeki armut, elma ve ayva kapama bahçelerinden elde edilen enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyve materyalleri Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmiştir. Sonuçlar, referans verisi ile karşılaştırılarak, Haziran ayında yaprak ve meyvelerdeki *Erwinia amylovora'* ya ait bakteriyel populasyon belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, Yazır Köyünden elde edilen enfektesiz tek bir armut yaprağında $1,5x10^6$, meyvesinde ise $6,5x10^6$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Korkuteli Merkezden elde edilen enfekteli tek bir armut yaprağında $5x10^6$ ve meyvesinde $6,5x10^{10}$, enfektesiz armut yaprağında $2,5x10^3$ ve meyvesinde $1,25x10^6$ bakteri belirlenmiştir (Şekil 4.24, Şekil 4.25). Yine Korkuteli Merkezden fakat farklı bir armut bahçesinden elde edilen enfektesiz tek bir armut yaprağında $5x10^5$, meyvesinde ise $5x10^4$ bakteri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.26). Bunların yanında İmrahor Köyünden ve Yazır Köyünden, fakat farklı bir armut bahçesinden, elde edilen enfektesiz armut yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Korkuteli Merkezden elde edilen enfekteli tek bir ayva yaprağında $2x10^{10}$ ve meyvesinde $3x10^{10}$, enfektesiz ayva yaprağında $2,5x10^5$ ve meyvesinde $1x10^6$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.27, Şekil 4.28). Yine merkezden, fakat farklı bir ayva bahçesinden elde edilen ve Yazır Köyünden elde edilen enfektesiz ayva yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Yazır köyünden elde edilen enfektesiz tek bir elma yaprağında $4,5x10^6$ ve meyvesinde $7,5x10^5$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.29). Yazır Köyünden, fakat farklı bir elma bahçesinden, elde edilen enfektesiz elma yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Haziran ayında yaprak ve meyvelerdeki bakteriyel populasyona ait grafik Şekil 4.30' da verilmiştir.

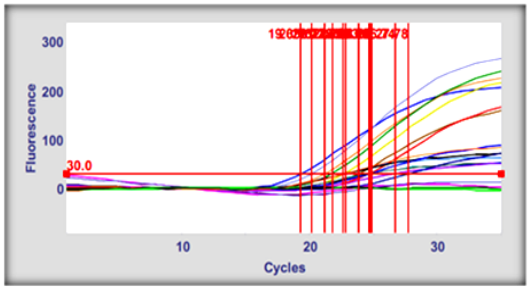


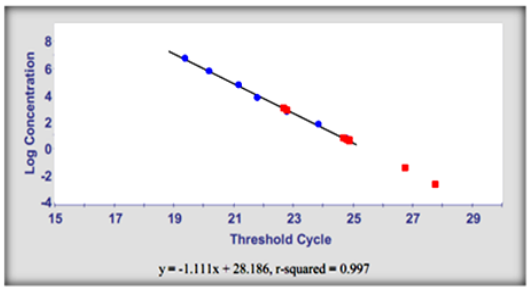




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.27 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 23.54 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.88 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.40 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 21.66 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 26.86 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 27.94 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.48 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.23. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz armut yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

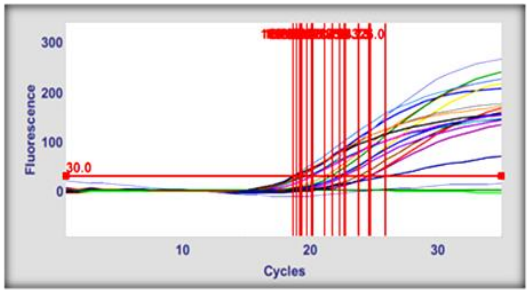


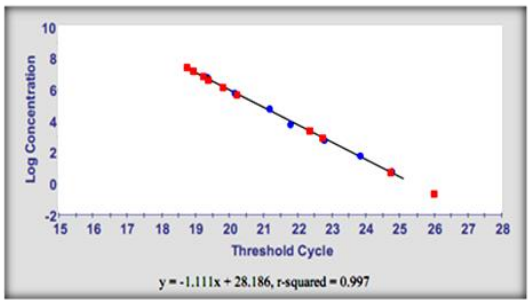




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 22.65 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 24.88 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 22.78 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 24.79 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 26.74 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 27.78 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 24.69 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 22.68 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.24. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut yaprağındaki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

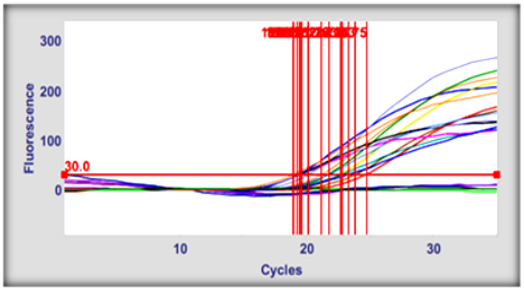


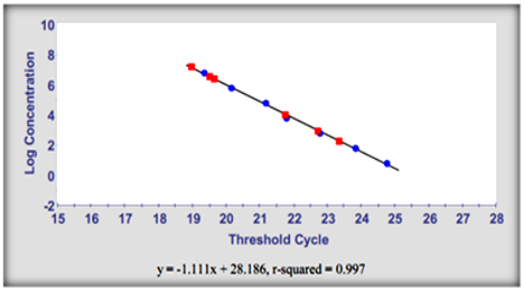




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Meyve 10-2 | 18.76 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve 10-2 | 19.81 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Meyve 10-2 | 20.22 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Meyve 10-2 | 18.95 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Meyve 10-2 | 19.39 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 24.73 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.76 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 26.00 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.35 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.24 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.25. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

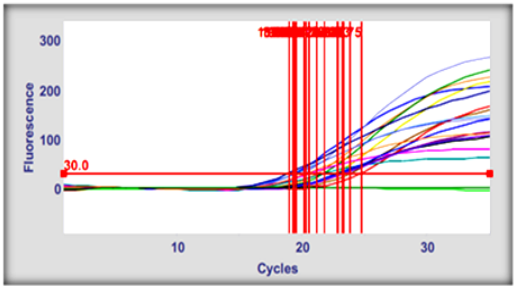


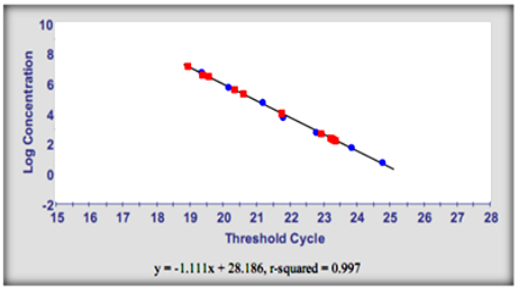




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 21.76 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.73 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 19.50 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 19.51 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 23.35 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 19.63 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 18.97 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.26. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfektesiz armut yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

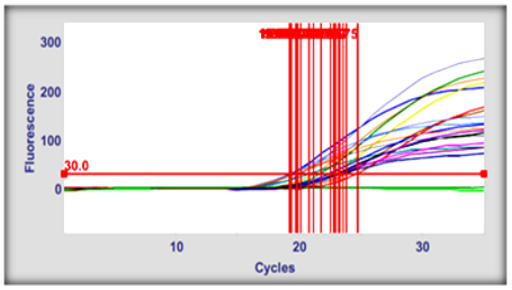


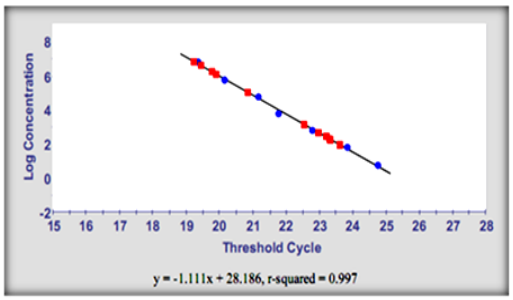




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 19.40 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 21.76 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 20.61 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 22.94 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Yaprak 10-2 | 23.23 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 23.36 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 23.29 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 18.94 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.94 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 19.58 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 20.34 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.27. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva yaprağındaki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

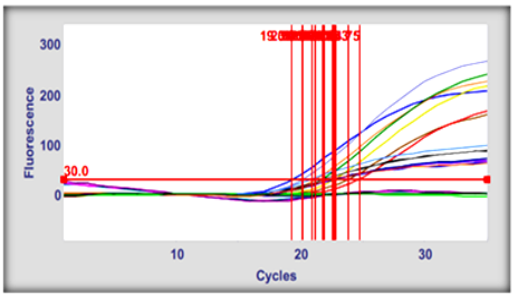


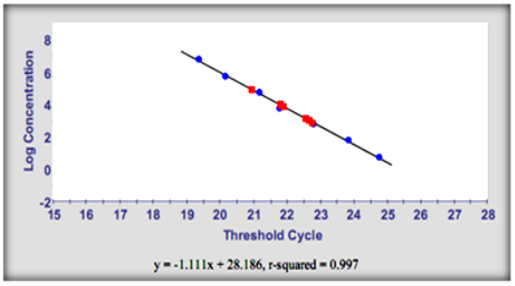




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Meyve 10-2 | 19.23 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve 10-2 | 20.84 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Meyve 10-2 | 23.34 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Meyve 10-2 | 22.98 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Meyveli 10-2 | 19.90 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 23.28 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 23.21 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 23.60 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.53 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 19.44 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.76 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.28. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

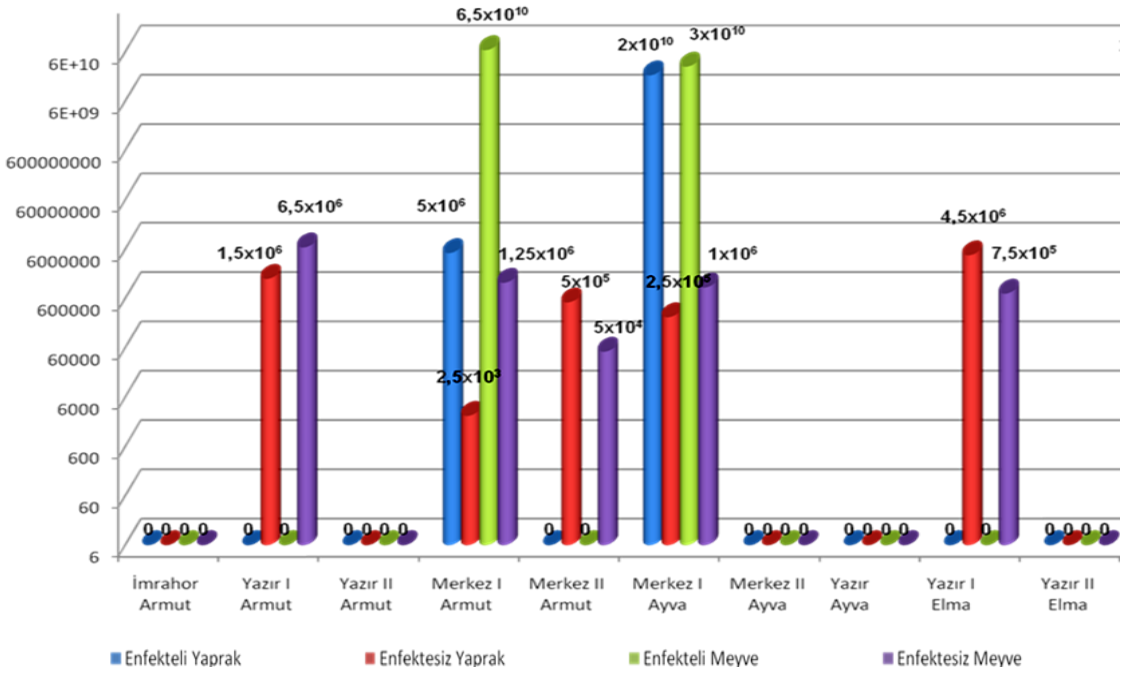



| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 20.94 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 21.80 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 21.90 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.66 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.66 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.77 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 22.55 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

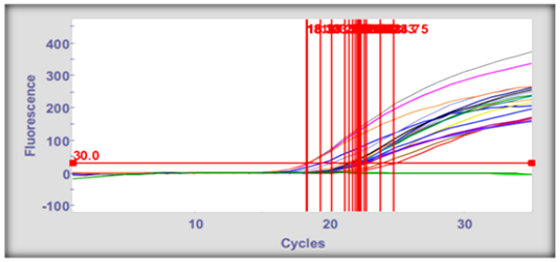
Şekil 4.29. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz elma yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

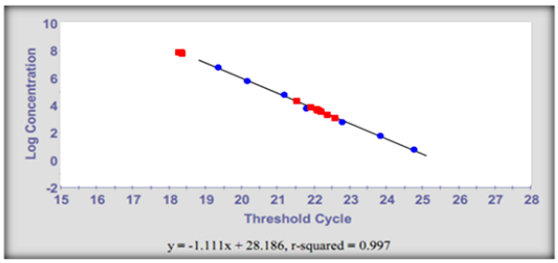



Şekil 4.30. Haziran ayında enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyvelerde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik

### 4.9.3. Temmuz ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Temmuz ayında Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, İmrahor Köyleri ve Korkuteli Merkezdeki armut, elma ve ayva kapama bahçelerinden elde edilen enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyve materyalleri Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmiştir. Sonuçlar, referans verisi ile karşılaştırılarak, Temmuz ayında yaprak ve meyvelerdeki *Erwinia amylovora'* ya ait bakteriyel populasyon belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, Yazır Köyünden elde edilen enfektesiz tek bir armut yaprağında $1x10^6$, meyvesinde ise $3x10^6$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.31). Korkuteli Merkezden elde edilen enfekteli tek bir armut yaprağında $5x10^8$ ve meyvesinde $1x10^9$, enfektesiz armut yaprağında $1x10^5$ ve meyvesinde $3x10^5$ bakteri belirlenmiştir (Şekil 4.32, Şekil 4.33). Yine Korkuteli Merkezden fakat farklı bir armut bahçesinden elde edilen enfektesiz tek bir armut yaprağında $3,5x10^6$, meyvesinde ise $1,5x10^6$ bakteri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.34). Bunların yanında İmrahor Köyünden ve Yazır Köyünden, fakat farklı bir armut bahçesinden, elde edilen enfektesiz armut yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Korkuteli Merkezden elde edilen enfekteli tek bir ayva yaprağında $2,5x10^8$ ve meyvesinde $3x10^8$, enfektesiz ayva yaprağında $2,5x10^4$ ve meyvesinde $3,5x10^5$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.35, Şekil 4.36). Yine merkezden, fakat farklı bir ayva bahçesinden, elde edilen ve Yazır Köyünden elde edilen enfektesiz ayva yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Yazır köyünden elde edilen enfektesiz tek bir elma yaprağında $2,5x10^5$ ve meyvesinde $5x10^7$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.37). Yazır Köyünden fakat farklı bir elma bahçesinden ve Korkuteli Merkezden elde edilen enfektesiz elma yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Temmuz ayında yaprak ve meyvelerdeki bakteriyel populasyona ait grafik Şekil 4.38' de verilmiştir.

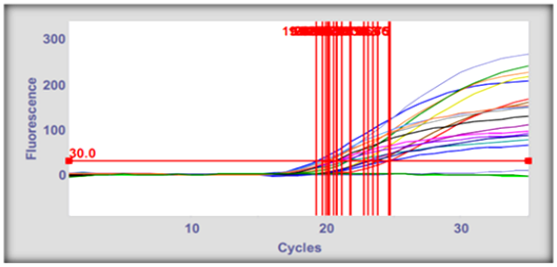


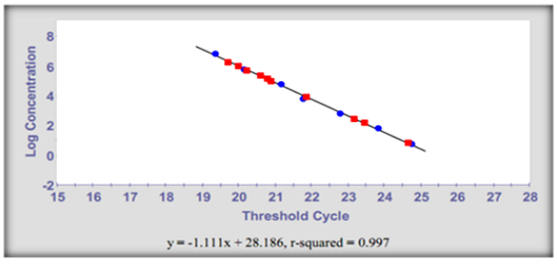




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 21.92 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.12 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 18.37 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 21.53 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 18.28 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.38 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.59 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.13 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.22 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.07 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 18.33 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.31. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz armut yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

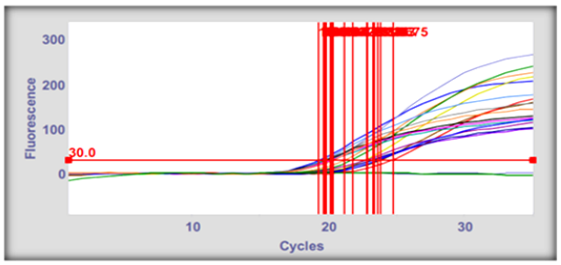


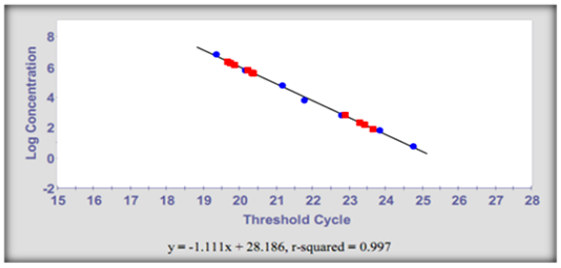




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 19.72 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 21.87 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 20.80 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 20.61 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 19.99 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 23.17 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 20.87 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 23.46 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 24.66 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 20.22 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.32. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut yaprağındaki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

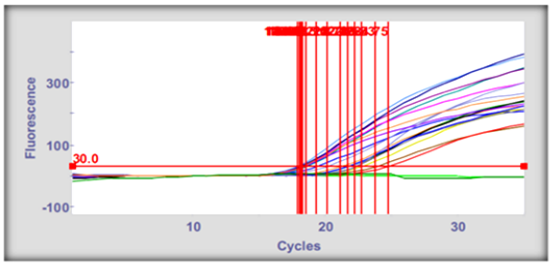


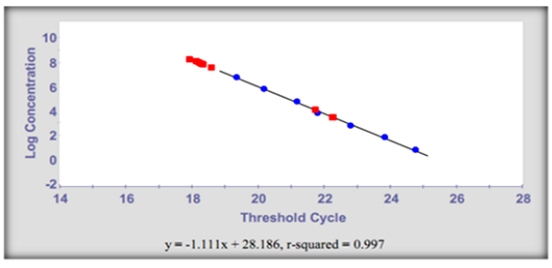




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Meyve 10-1 | 19.66 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve 10-1 | 20.34 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Meyve 10-1 | 20.22 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Meyve 10-1 | 19.86 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Meyve 10-1 | 19.75 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.87 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 23.41 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 23.31 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 23.66 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 20.37 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.33. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz armut meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

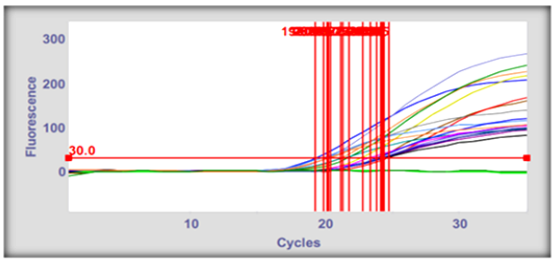


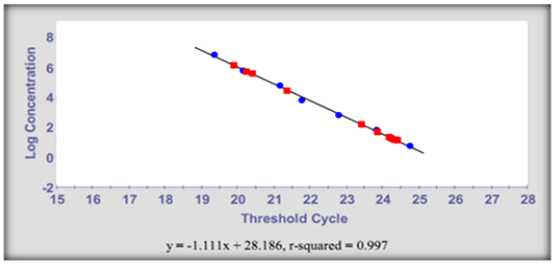




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 17.94 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 18.59 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 18.20 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.27 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.26 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 18.14 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 18.33 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 18.15 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 21.74 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.23 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 18.29 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.34. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfektesiz armut yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

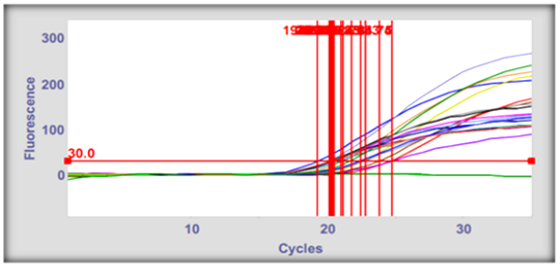


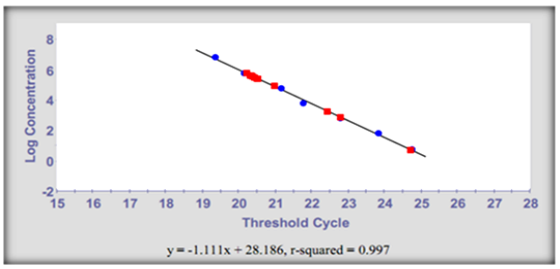




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 19.88 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 21.37 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 23.42 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 24.41 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Yaprak 10-1 | 20.25 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 24.36 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 24.25 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 24.32 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 23.88 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 24.18 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 20.39 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.35. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva yaprağındaki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

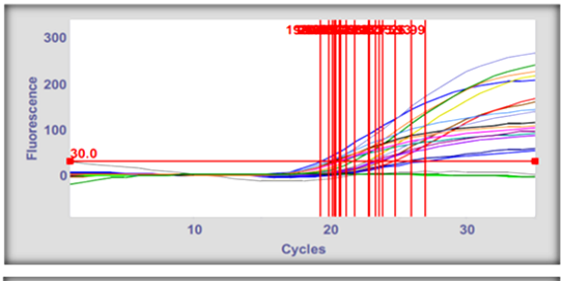


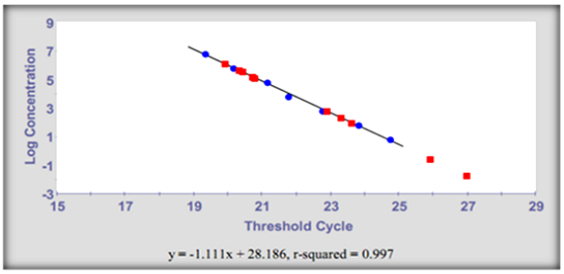




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Meyve 10-1 | 20.22 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve 10-1 | 20.98 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Meyve 10-1 | 20.37 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Meyve 10-1 | 20.33 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Meyve 10-1 | 20.44 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 20.52 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 24.74 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 20.49 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.45 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 22.80 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 20.31 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.36. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ve enfektesiz ayva meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

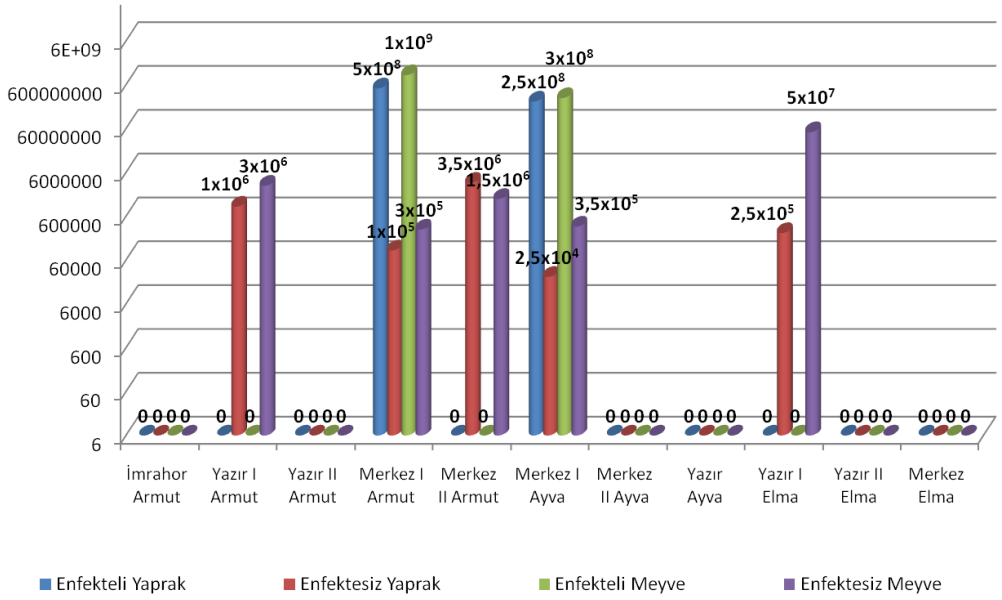



| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 19.93 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 20.80 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 20.71 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 20.33 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Meyve 10-1 | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 23.33 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 23.62 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 25.93 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 26.99 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak 10-1 | 22.89 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 20.43 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

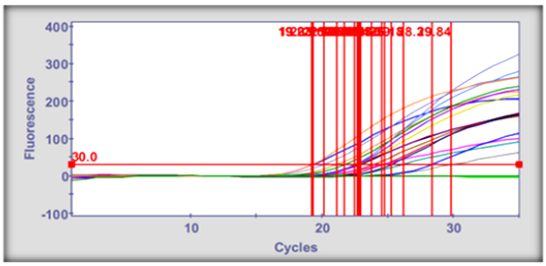
Şekil 4.37. Antalya, Korkuteli, Yazır I' de enfektesiz elma yaprağı ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

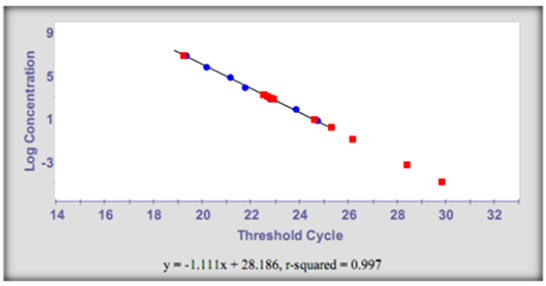



Şekil 4.38. Temmuz ayında enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyvelerde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik

### 4.9.4. Ağustos ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Ağustos ayında Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, İmrahor Köyleri ve Korkuteli Merkezdeki armut, elma ve ayva kapama bahçelerinden elde edilen enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyve materyalleri Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmiştir. Sonuçlar, referans verisi ile karşılaştırılarak, Ağustos ayında yaprak ve meyvelerdeki *Erwinia amylovora'* ya ait bakteriyel populasyon belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, Yazır Köyünden elde edilen enfektesiz tek bir armut yaprağında $3x10^4$, meyvesinde ise $2x10^4$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.39). Korkuteli Merkezden elde edilen enfekteli tek bir armut yaprağında $4x10^5$ ve meyvesinde $6,5x10^5$ bakteri belirlenmiştir (Şekil 4.40). Yine Korkuteli Merkezden fakat farklı bir armut bahçesinden elde edilen enfektesiz tek bir armut yaprağında $9,5x10^3$, meyvesinde ise $3x10^4$ bakteri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.41). Bunların yanında İmrahor Köyünden ve Yazır Köyünden, fakat farklı bir armut bahçesinden, elde edilen enfektesiz armut yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Korkuteli Merkezden elde edilen enfekteli tek bir ayva yaprağında $4x10^5$ ve meyvesinde $6x10^5$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.42). Yine merkezden, fakat farklı bir ayva bahçesinden, elde edilen ve Yazır Köyünden elde edilen enfektesiz ayva yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Yazır köyünden elde edilen enfektesiz tek bir elma yaprağında $3x10^4$ ve meyvesinde $9x10^4$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.43). Yazır Köyünden fakat farklı bir elma bahçesinden elde edilen enfektesiz elma yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Ağustos ayında yaprak ve meyvelerdeki bakteriyel populasyona ait grafik Şekil 4.44' de verilmiştir.

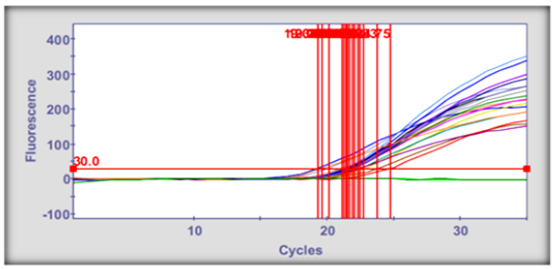


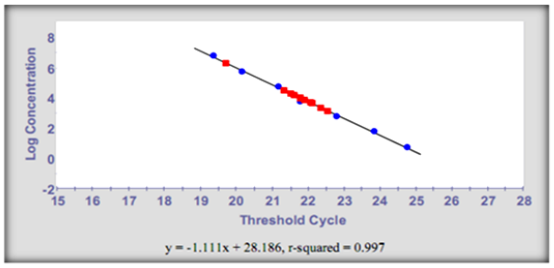




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | |
| Standard | |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Meyve | 22.53 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Meyve | 26.18 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Meyve | 24.60 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Meyve | 22.83 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Meyve | 29.84 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak | 22.93 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak | 22.67 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak | 25.29 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak | 28.39 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak | 22.48 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.23 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.39. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz armut yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

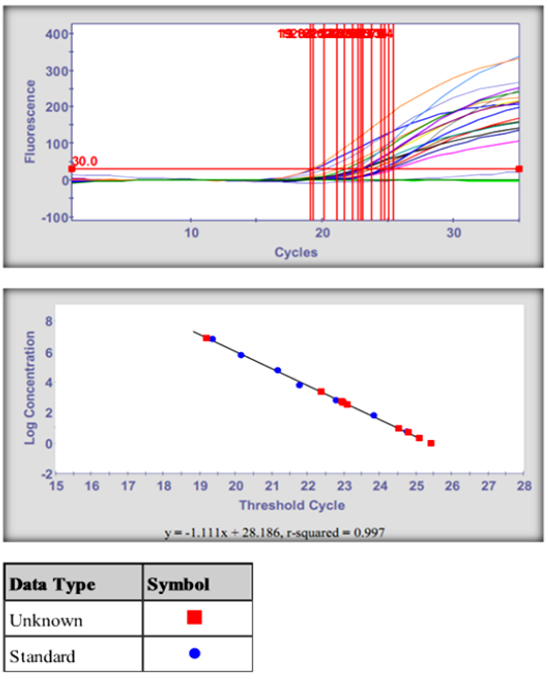



| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | |
| Standard | |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Meyve | 21.33 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve | 22.35 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Meyve | 21.89 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Meyve | 21.61 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Meyve | 21.90 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfekteli Yaprak | 22.54 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfekteli Yaprak | 21.76 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfekteli Yaprak | 22.11 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfekteli Yaprak | 21.52 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfekteli Yaprak | 22.06 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.71 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

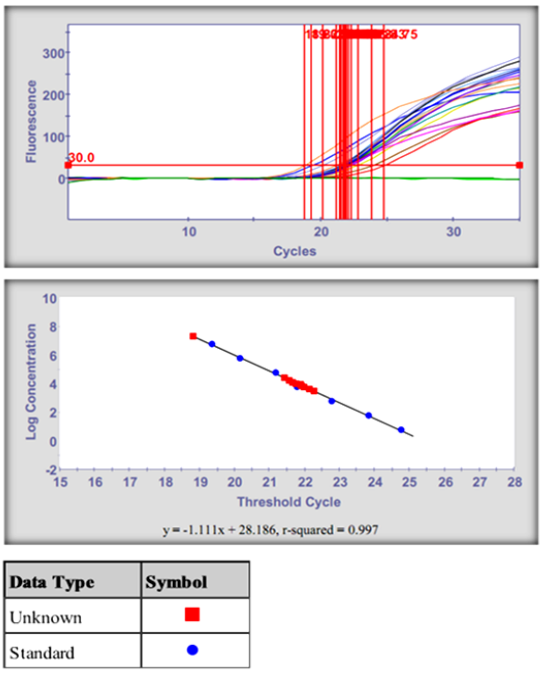
Şekil 4.40. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli armut yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi




| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Meyve | 22.38 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Meyve | 23.12 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Meyve | 25.44 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Meyve | 22.94 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Meyve | 24.78 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak | 22.97 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak | 22.98 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak | 25.11 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak | 24.53 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.18 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

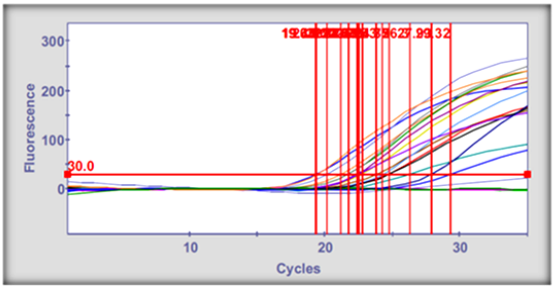
Şekil 4.41. Antalya, Korkuteli, Merkez II' de enfektesiz armut yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

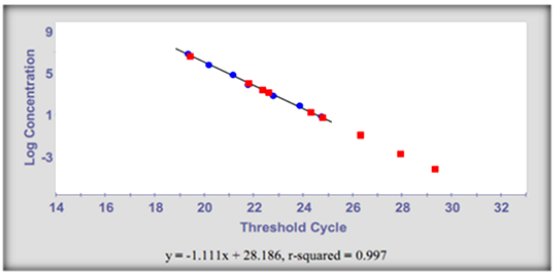



| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Meyve | 21.44 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve | 22.13 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Meyve | 21.99 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Meyve | 21.55 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Meyve | 21.77 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfekteli Yaprak | 21.88 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfekteli Yaprak | 22.27 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfekteli Yaprak | 21.91 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfekteli Yaprak | 21.77 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfekteli Yaprak | 21.67 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 18.82 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.42. Antalya, Korkuteli, Merkez I' de enfekteli ayva yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi

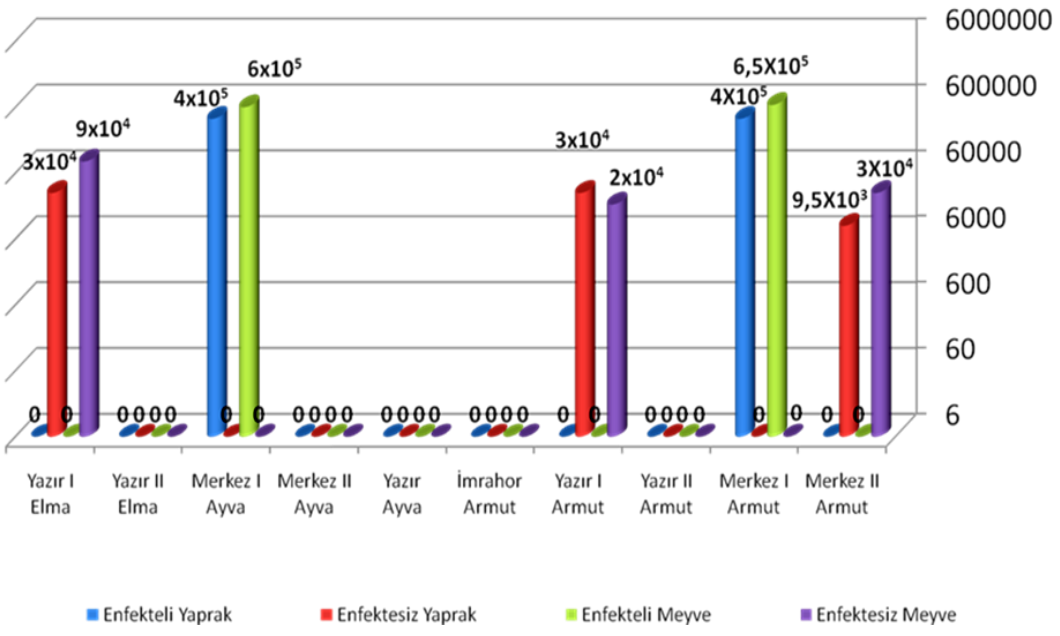



| Data Type | Symbol |
|---|---|
| Unknown | ■ |
| Standard | ● |

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfektesiz Meyve | 24.30 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfektesiz Meyve | 26.30 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfektesiz Meyve | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfektesiz Meyve | 24.77 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfektesiz Meyve | 21.80 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfektesiz Yaprak | 22.38 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfektesiz Yaprak | 22.58 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfektesiz Yaprak | 27.93 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfektesiz Yaprak | 29.32 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfektesiz Yaprak | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.42 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

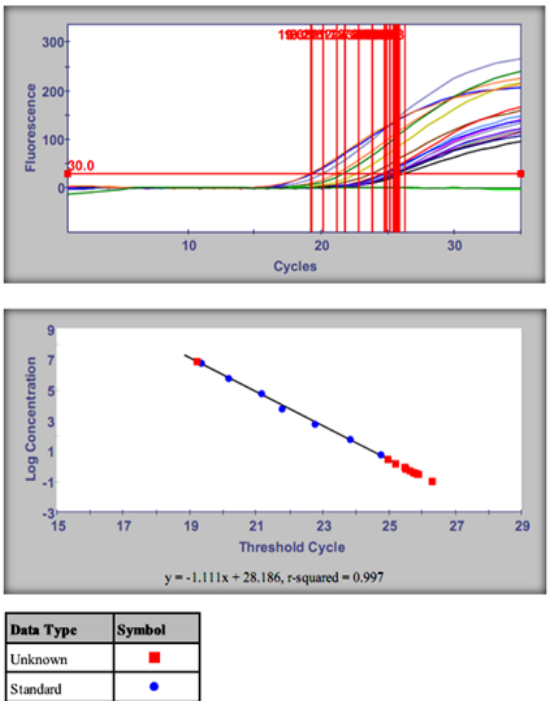
Şekil 4.43. Antalya, Korkuteli, Yazır' da enfektesiz elma yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi




Şekil 4.44. Ağustos ayında enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyvelerde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik

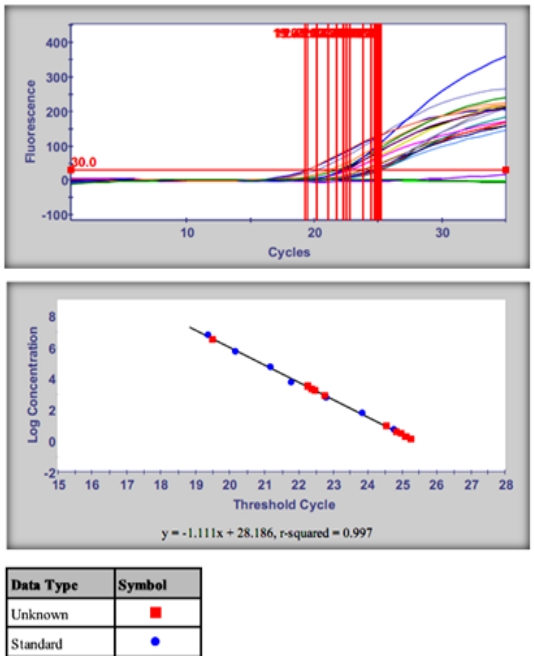
### 4.9.5. Eylül ayında Kantitatif Real-Time PCR ile bitki materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Eylül ayında Antalya' nın Korkuteli ilçesine bağlı Yazır, İmrahor Köyleri ve Korkuteli Merkezdeki armut, elma ve ayva kapama bahçelerinden elde edilen enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyve materyalleri Kantitatif Real-Time PCR' da test edilmiştir. Sonuçlar, referans verisi ile karşılaştırılarak, Eylül ayında yaprak ve meyvelerdeki *Erwinia amylovora'* ya ait bakteriyel populasyon belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, Korkuteli Merkez' den elde edilen enfektesiz tek bir armut yaprağında 6x10, meyvesinde ise 5x10 bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.45). Bunun yanında İmrahor Köyünden, Yazır Köyünden ve Korkuteli Merkezden fakat farklı bir armut bahçesinden, elde edilen enfektesiz armut yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Korkuteli Merkezden elde edilen enfekteli tek bir ayva yaprağında $4x10^4$ ve meyvesinde $2,8x10^4$ bakteri tespit edilmiştir (Şekil 4.46). Yine merkezden, fakat farklı bir ayva bahçesinden, elde edilen ve Yazır Köyünden elde edilen enfektesiz ayva yaprak ve meyvelerinde *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Yazır Köyünden ve Korkuteli Merkezden elde edilen enfektesiz elma yaprak ve meyvelerinde de *Erwinia amylovora* tespit edilmemiştir. Eylül ayında yaprak ve meyvelerdeki bakteriyel populasyona ait grafik Şekil 4.47' de verilmiştir.



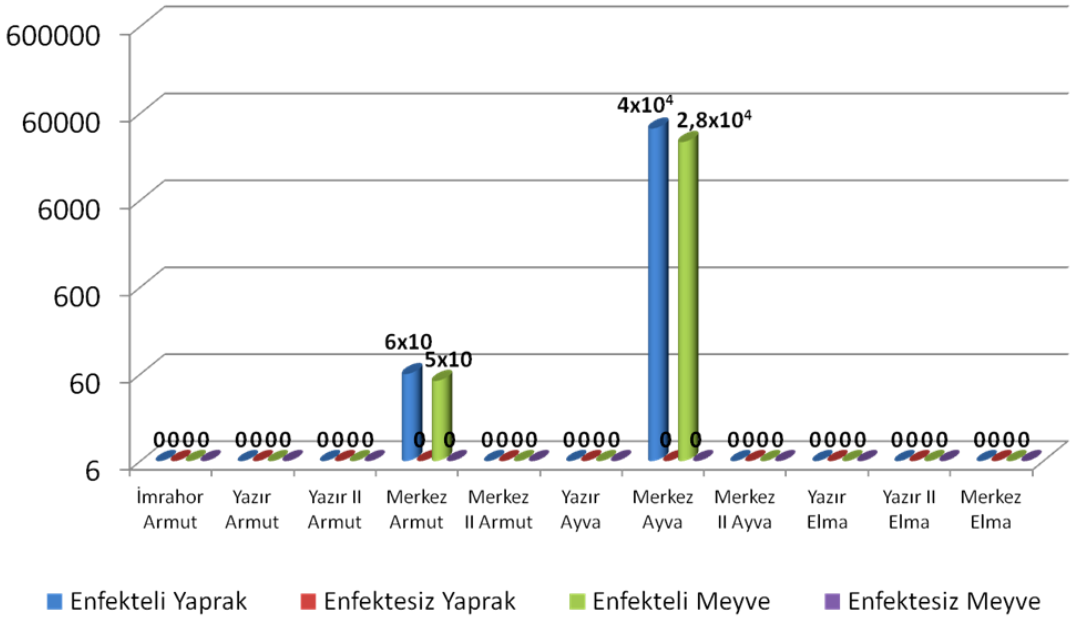

| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Meyve | 25.21 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve | 25.81 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Meyve | 25.50 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Meyve | 26.30 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Meyve | 25.87 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfekteli Yaprak | 25.64 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfekteli Yaprak | 25.74 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfekteli Yaprak | 25.66 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfekteli Yaprak | 24.95 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfekteli Yaprak | 25.46 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.20 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

Şekil 4.45. Antalya, Korkuteli, Merkez' deki enfekteli armut yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi




| Site ID | Sample ID | FAM Ct | Protocol |
|---|---|---|---|
| A9 | Stok | 19.35 | E. amylovora |
| A10 | 10-1 | 20.16 | E. amylovora |
| A11 | 10-2 | 21.17 | E. amylovora |
| A12 | 10-3 | 21.78 | E. amylovora |
| A13 | 10-4 | 22.78 | E. amylovora |
| A14 | 10-5 | 23.83 | E. amylovora |
| A15 | 10-6 | 24.75 | E. amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | E. amylovora |
| A5 | Enfekteli Meyve | 24.98 | Erwinia amylovora |
| A6 | Enfekteli Meyve | 25.28 | Erwinia amylovora |
| A7 | Enfekteli Meyve | 22.74 | Erwinia amylovora |
| A8 | Enfekteli Meyve | 22.38 | Erwinia amylovora |
| A9 | Enfekteli Meyve | 25.12 | Erwinia amylovora |
| A10 | Enfekteli Yaprak | 22.48 | Erwinia amylovora |
| A11 | Enfekteli Yaprak | 0.00 | Erwinia amylovora |
| A12 | Enfekteli Yaprak | 24.53 | Erwinia amylovora |
| A13 | Enfekteli Yaprak | 22.24 | Erwinia amylovora |
| A14 | Enfekteli Yaprak | 24.81 | Erwinia amylovora |
| A15 | PK | 19.48 | Erwinia amylovora |
| A16 | NK | 0.00 | Erwinia amylovora |

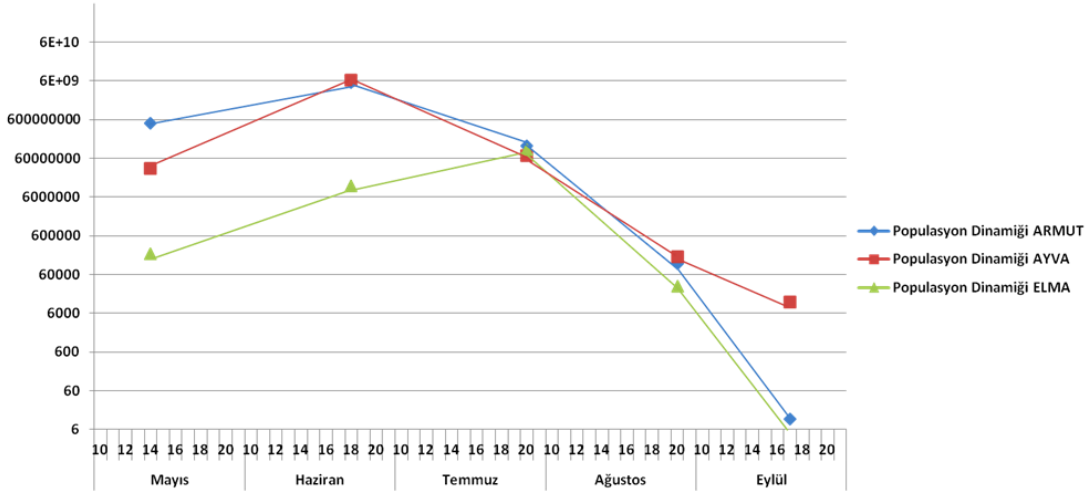
Şekil 4.46. Antalya, Korkuteli, Merkez' deki enfekteli ayva yaprak ve meyvesindeki bakteriyel populasyonun belirlenmesi



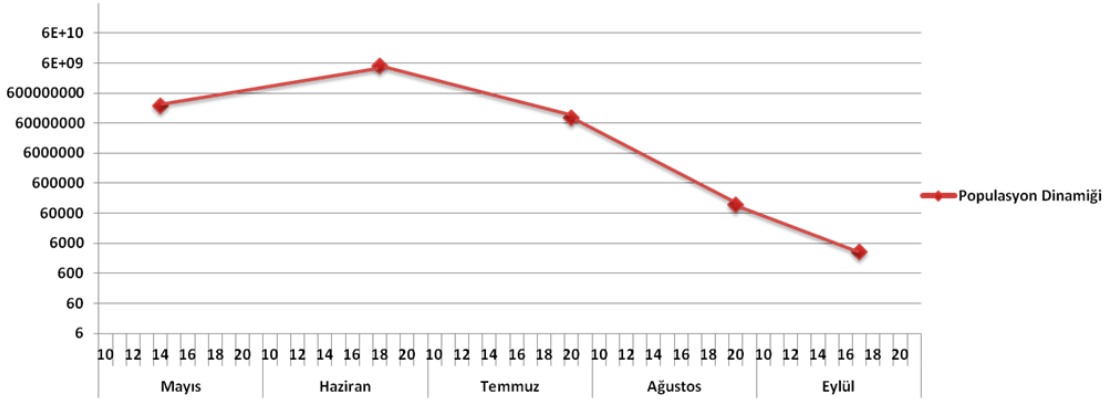

Şekil 4.47. Eylül ayında enfekteli ve enfektesiz yaprak ve meyvelerde tespit edilen bakteriyel populasyona ait grafik

### 4.9.6. Aylara bağlı populasyon dinamiğinin belirlenmesi ve verilerin analizi

Kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile Korkuteli Bölgesindeki populasyonu sayısal olarak belirlenen *Erwinia amylovora* patojeninin Excel programına veri girişi yapılarak bölgedeki ortalama populasyon dinamiği belirlenmiştir. Şekil 4.48' de armut, elma, ayva ağaçlarından elde edilen bitki materyallerinde tespit edilen *Erwinia amylovora*' ya ait aylara bağlı populasyon dinamiği verilmiştir. Şekil 4.49' da ise aylara bağlı populasyon değerleri tek bir eğride belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre populasyonun Haziran ayının 18' ne kadar yükseldiği o tarihten sonra populasyonda düşmelerin olduğu belirlenmiştir. Fakat Eylül ayı sonuçlarına bakıldığında elmalarda sıfır düzeyine ulaşan populasyonun, armut ve ayvalarda ulaşamadığı belirlenmiştir.




Şekil 4.48. Korkuteli Bölgesindeki armut, elma ve ayva ağaçlarında epifitik olarak bulunan *Erwinia amylovora'* nın aylara bağlı populasyon dinamiği




Şekil 4.49. Korkuteli Bölgesindeki *Erwinia amylovora'* nın aylara bağlı populasyon dinamiği

Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül aylarında Korkuteli Bölgesinden elde edilen bitki materyallerinde tespit edilen *Erwinia amylovora* patojeninin; Real-Time PCR ile ve kültür ortamında geliştirilerek populasyonu sayısal olarak belirlenmiştir. Sonuçlar varyans analizine tabi tutulmuş ve aylar arasında bulunan farklı sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır. Sıcaklık ve nem düzeylerinin aylara göre farklılık göstermesi, populasyon değerlerindeki farklılığı ortaya çıkarmaktadır. Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4' de Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile

hesaplanan, farklı sıcaklık ve nem değerlerine sahip aylarda elde edilen bakteriyel populasyona ait logaritmik değerler ve standart sapma değerleri verilmiştir. Çizelgelerde logaritmik değerler üzerinde verilen a,b,c,d ve e harfleri sonuçların birbirinden farklı olduğunu ifade etmektedir. Çizelge 4.2' de ise sıcaklık ve neme bağlı 5 aydaki populasyon değerlerindeki varyasyon yani farklılık ve bu farklılığın önem derecesi belirtilmektedir. Yapılan varyasyon analizi sonucu serbestlik derecesi; 5 ay dikkate alındığı için bir eksiği 4 olarak belirlenmiş ve SAS programına girilen aylara bağlı populasyon değerlerinin logaritmalarının kareleri ortalaması program tarafından 12,88437500 olarak hesaplanmıştır. Serbestlik derecesi ve Kareler ortalaması kullanılarak SAS programı tarafından hesaplanan F değerinin büyüklüğü varyasyonun önemli derecede fazla olduğunu belirtmekte ve F değerinin üstünde belirtilen üç yıldız (***) varyasyondaki önem derecesini ifade etmektedir. Program tarafından F değeri dikkate alınarak hesaplanan P değeri 0.001' den küçük çıktığı için istatistiksel sonuçlara göre bölgenin sıcaklık ve nem değerlerinin patojenin populasyonuna P <0.001 önem düzeyinde etkili olduğu ortaya konulmuştur. Sonuç olarak sıcaklık ve nem değerlerinin patojenin populasyon miktarını önemli derecede etkilediği bu çalışmayla belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Korkuteli Bölgesinden Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül ayları süresince tespit edilen *Erwinia amylovora* populasyonuna ait varyans analiz sonuçları

| **Varyasyon Kaynakları** | **Serbestlik Derecesi** | **Kareler Ortalaması (bakteri (log))** | **F** |
|---|---|---|---|
| **SICAKLIK-NEM** | 4 | 12,88437500 | 9073,5*** |

***P<0.001 düzeyinde önemli

Çizelge 4.3. Korkuteli Bölgesinden %100 çiçeklenme döneminde elde edilen çiçeklerde tespit edilen *Erwinia amylovora* patojeninin Kantitatif Real-Time PCR' dan ve kültür ortamındaki gelişiminden elde edilen sayısal değerlere ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

| **AY** | **SICAKLIK (°C)** | | | **NEM** | | | ***Erwinia amylovora* sayısı log ± d /çiçek** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Min. | Ort. | Max. | Min. | Ort. | Max. | |
| **Mayıs** | 4,10 | 10,69 | 17,21 | 64 | 90 | 99 | $8,33^{a}$±0,04 |

log: logaritmik değer
d: standart sapma

Çizelge 4.4. Korkuteli Bölgesinden elde edilen sürgünün kısımlarından tespit edilen *Erwinia amylovora* patojeninin Kantitatif Real-Time PCR' dan ve kültür ortamındaki gelişiminden elde edilen sayısal değerlere ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

| **AYLAR** | **SICAKLIK (°C)** | | | **NEM** | | | ***Erwinia amylovora* sayısı log±d /sürgün** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Min.** | Ort. | Max. | Min. | Ort. | Max. | |
| **Haziran** | **10,12** | 17,56 | 26,71 | 50 | 85 | 99 | $9,64^{b}$±0,05 |
| **Temmuz** | **13,21** | 24,29 | 35,42 | 24 | 59 | 94 | $7,92^{c}$±0,03 |
| **Ağustos** | **10,60** | 20,27 | 31,12 | 33 | 71 | 99 | $5,025^{d}$±0,04 |
| **Eylül** | **9,17** | 18,57 | 30,16 | 30 | 66 | 99 | $3,48^{e}$±0,009 |

log: logaritmik değer
$log^{a}$, $log^{b}$, $log^{c}$, $log^{d}$, $log^{e}$: logaritmik değerlerdeki farklılığı ifade etmektedir
d: standart sapma

## 5. TARTIŞMA

Ülkemiz ve Dünya genelinde yapılan surveyler sonucunda, yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelerde çeşitli yaygınlık oranlarında Ateş Yanıklığı tespit edilmiş olup hastalık çok yerde ciddi boyutlardadır. Ekonomik kayıplar anlamında yapılan arazi incelemeleri göstermektedir ki; pek çok üretici yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliğinden vazgeçer duruma gelmiştir. Bu da özellikle bazı yerli armut ve elma çeşitlerimizi kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya bırakmaktadır.

Hastalığın etmeni olan *Erwinia amylovora*; çiçek enfeksiyonu ile tüm bitkiye yayılıp, geniş dal ve gövdeleri etkileyerek, özellikle armut, elma ve ayva ağaçlarına zarar vermektedir. Patojenin uygun koşullarda yayılması ve bitki içindeki ilerleyişi çok hızlıdır. Bu derece hızlı yayılan patojenin yarattığı hastalıkla mücadele çok zor ve pahalıdır. Dünya ülkelerinde, yoğun bir şekilde ve en yeni teknolojik gelişmeler ışığında hastalıkla mücadele olanakları aranmaktadır. Hastalığa karşı kesin çözüm sağlayacak yöntem tespit edilinceye kadar hastalık etmeninin hızlı, güvenilir ve erken dönemde tanı ve tespitlerinin yapılması önemlidir. Erken ve hızlı tanısının ve tespitinin yapılması sonucunda ise yapılacak erken mücadele hastalığın zararını en aza indirecektir. Böylece ürün kayıplarında azalmalar olduğu görülecektir. Hastalıkla erken mücadelede, hastalığın bulaşma yolları, sağlıklı bitki yetiştirme yöntemleri, fiziksel, biyolojik ve kimyasal mücadele olanakları dikkate alınarak çok yönlü bir mücadele programı düşünülmelidir.

Günümüze kadar patojenlerin tanısı ve tespiti için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında seçici ve yarı seçici besi ortamı kullanılarak morfolojik açıdan patojenin karakterizasyonu, çeşitli serolojik testler (ELISA, Aglütinasyon testi vb.), fizyolojik ve biyokimyasal testler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu gibi yöntemler yer almaktadır. Araştırmacılar tarafından bu yöntemler kullanılarak *Erwinia amylovora* patojeninin tanısı yapılmış ve karakterizasyonu sağlanmıştır. Psallidas ve Dimova (1986) armut elma ve alıçtan elde ettikleri 10 tane izolatın morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve serolojik testlerle karakterizasyonunu sağlamışlardır. Momol vd (1992) Türkiye' nin

Batı Akdeniz Bölgesinde armutlarda Ateş Yanıklığı Hastalığını tespit etmişler ve basit bir yöntemle modifiye edilmiş MS ortamında etmenin tanısını yapmışlardır. Gorris vd (1996) hastalık etmeninin izolasyonunu yaptıktan sonra biyokimyasal testler, patojenisite testleri, serolojik teknikler ve fatty asit profilleri' ne dayanan moleküler tekniklerle patojenin karakterizasyonunu sağlamışlardır. Bobev vd (1998) ortak bakteriyolojik metotlardan morfolojik, kültürel ve fizyolojik testler kullanılarak armut, elma, muşmula ve ayvada patojen olan bakterilerin karakterizasyonunu yapmışlardır.

Araştırmacılar tarafından yıllardır uygulanan bu klasik testlerin dezavantajı oldukça uzun zaman alması ve bazı durumlarda kesin sonuç vermemesidir. Aynı zamanda kontaminasyon riskinin de yüksek olmasıdır. İlk kez 1985 yılında bilim dünyasına sunulmuş olan nükleik asit temelli çalışan PCR sistemlerinin, organizmalar ile ilgili en kesin bilgileri hızlı ve doğru bir şekilde verdiği ortaya konmuştur. Breswill vd (1992) yaptıkları PCR çalışmalarıyla 6 saatten az sürede tanımlamanın gerçekleşebileceğini saptamışlardır. Farklı bitki patojenlerinin tanısında ve tespitinde güvenilir, hızlı sonuç vermesinden ve tekrarlanabilirliği yüksek olmasından dolayı PCR yöntemleri araştırmacılar tarafından tercih edilen bir sistem olmuştur. Bu sistem geliştirilerek günümüze kadar ileri düzeyde yaygınlaşmıştır. Guilford vd (1996) Cotoneaster' in yaprak ve filizlerinden izole edilen, Ateş Yanıklığı Hastalığına neden olan patojenin tanısı ve tespiti için PCR ve DNA hibridizasyon metotlarını kullanmışlardır. Brown vd (1996) 13 konukçu ve 21 ülkeden gelen *Erwinia amylovora* örneklerinin, genetik olarak *pEA29* plazmidinden dizayn edilen primerleri kullanarak PCR yöntemiyle tanımlamalarını yapmışlardır. Taylor vd (2001) PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada 5 ülkeden ve 10 farklı konukçu bitkiden izole edilen 69 farklı straindeki *Erwinia amylovora'* nın tanısı kısa sürede yapılmıştır.

Hastalık etmenlerinin tanı ve tespitleri için kullanılan nükleik asit temelli çalışan bu PCR yöntemi diğer metotlara oranla daha güvenilir ve kesin sonuçlar vermektedir. Fakat Klasik PCR yönteminde, PCR sonunda agaroz jel elektroforezi cihazında DNA fragmentlerinin yürütülmesi ve jelin ethidium bromide ile boyanıp, DNA bantlarının

ultraviole (UV) ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanması gerekir. Bu nedenle analiz işlemleri zaman almaktadır. Ayrıca Klasik PCR yönteminde kontaminasyon riski vardır ve işlem kalitatif sonuç vermektedir. Bu nedenle son yıllarda patojenlerin erken tanı ve tespitleri için 20-30 dk gibi kısa zamanda ve kesin sonuç elde edebileceğimiz, PCR sistemlerinin en gelişmiş hali olan Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. PCR ürününün özgün, hassas ve diğer metotlara göre daha kolay tespit edilebildiği bu yöntemde, her bir PCR döngüsünde oluşan flouresan ışınımı aracılığı ile son ürün miktarı eş zamanlı olarak tespit edilebilmektedir (Li vd 2004). Kantitatif sonuç veren bu yöntemde tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski de düşüktür. Ayrıca sistemin duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği yüksektir.

Çalışmada yumuşak çekirdeklilerde Ateş Yanıklığına neden olan patojenin, tanısı ve tespitinde, Smart Cycler II olan Real-Time PCR cihazı kullanılmıştır. Diğer Real-Time PCR cihazlarından farklı olarak bu cihaz bakterileri çok kısa sürede tanısını yapabilmekte, arazi koşullarında kullanılabilmekde ve kantitatif sonuçlarıyla patojenin populasyon yoğunluğu hakkında bilgi verebilmektedir.

Dünya' da karantinaya tabi olan Ateş Yanıklığı Hastalığı ekonomik açıdan önemli kayıplara neden olduğu için yetiştiriciler açısından çok önemlidir. Hastalığı ortadan kaldırmanın kesin çözümü dayanıklı çeşit, anaç ve ara anaçların kullanımıdır. Bununla ilgili çalışmalar melezleme yolu ile Ateş Yanıklığına dayanıklı armut çeşitlerinin geliştirilmesi amacı ile 2004 yılında Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü ve Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü işbirliği ile başlatılmıştır ve çalışmalar sürdürülmektedir (Öztürk vd 2007). Yapılan dayanıklı çeşit geliştirme çalışmaları sonuçlanana kadar bu hastalığı engellemek veya zararı en aza indirebilmek için bugün yapılabilecek en faydalı yöntem erken dönemde hastalığın tespit edilip, populasyon yoğunlunun belirlenmesi ve duruma uygun mücadele programının oluşturulmasıdır. Bu amaçla, bu çalışmada *Erwinia amylovora'* nın çiçekten, bakteriyel hücreden, hastalıklı bitki dokularından direkt tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek ve

populasyon yoğunluğunu kantitatif olarak belirlemek için Kantitatif Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir.

*Erwinia amylovora'* nın Real-Time PCR ile tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla primerler ve prob dizayn edilmiştir. Geliştirilen bu primerler ve prob seti ile *Erwinia amylovora'* nın hastalıklı bitki dokularından tespiti yapılmıştır. Salm ve Geider (2004) yaptıkları çalışmada *Erwinia amylovora'* nın hastalıklı bitki materyallerinden tespitinde Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Denemede *pEA29* plazmidinden dizayn edilen *Erwinia amylovora'* ya spesifik primer ve prob kullanılmıştır. Salm ve Geider' in çalışmalarında kullanmak üzere plazmidden dizayn ettikleri primerler ve probun aksine çalışmamızda patojenik bakterinin polisakkarit üretiminden sorumlu ve kromozomal *ams* gen' inin 1,6 kb' lik internal diziliminden prob ve primerler dizayn edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan primer ve prob seti Salm ve Geider' in çalışmasında kullanılan ya da buna benzer çalışmalarda kullanılan primer ve prob setlerinden daha spesifik ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Çünkü çalışmamızda *Erwinia amylovora'* ya özel dizayn edilmiş primerlerin yanında özel dizayn edilmiş LNA prob kullanılmıştır. Bu proba ait dizi, Real-Time PCR ile yapılan diğer çalışmalarda kullanılan probların dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Böylece prob dizisinin kendi içinde bağlanması olasılığı ortadan kalkmış olmaktadır. Prob dizisinin kısa olması aynı zamanda amplifkasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine neden olmaktadır. Sonuçta bu özel dizayn edilen probe daha spesifik olarak çalışılmasını sağlar ve alınan sonuç dolayısıyla daha güvenilir olmaktadır.

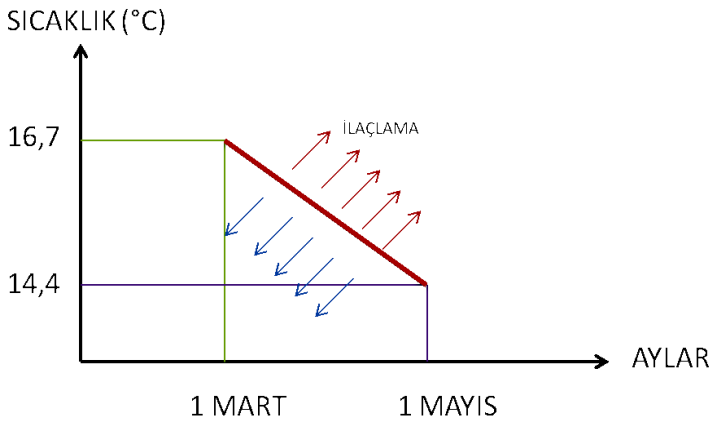
Primerler ve probun sadece *Erwinia amylovora* ve farklı strainlerine spesifik olduğunu belirlemek için; primer ve prob seti farklı bitki patojeni bakteriler üzerinde test edilmiş ve sonuçta herhangi bir amplifikasyon görülmemiştir. Pirc vd (2009) Real-Time PCR yöntemiyle *Erwinia amylovora'* nın, Hokkaido' dan ve İspanya'dan elde edilen farklı strainlerinin tanısını, *Erwinia amylovora'* nın kromozomal DNA' sının *ams*C gen ve ITS bölgesinden geliştirilen spesifik TaqMan probe yapmışlardır. Yine buna benzer bir çalışma Gottsberger (2010) tarafından yapılmıştır. Çalışmasında *Erwinia*

*amylovora'* nın farklı strainlarinin tanısında ve tespitinde Real-Time PCR yöntemini kullanmıştır. Kullandığı probe ve primerin spesifikliğini test etmek için ise farklı türde bakteriler test etmiştir. Çalışmada TaqMan Prob olarak MGB (minor-groove-binder) prob kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda kullanılan primerler ve probların yanında çalışmamızda kullanılan özel dizayn edilen primer ve prob seti, farklı strainlerin tanısının yapılmasında avantajları yönünden daha güvenilir sonuçlar vermektedir.

Real-Time PCR yönteminin *Erwinia amylovora* için hassasiyet çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Yöntemin tespit edebileceği en düşük bakteri sayısı 6 cfu/2µ olarak belirlenmiştir. Saf genomik DNA' dan hassasiyette ise çeşitli seyreltmeler yapılarak 10 pg da bile patojenin tanısının mümkün olduğu ortaya konulmuştur. Bu uygulamayla da yöntemin ve primer prob setinin ne derece hasssas çalıştığı vurgulanmıştır.

Real-Time PCR yönteminde, bitkisel materyali üzerinde sadece canlı olarak bulunan bakteriyel patojenlerin tespiti için Real-Time Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bilindiği üzere hastalıklı bitki materyalleri üzerinde hem canlı hem de ölü bakteriler birarada bulunabilmektedir. Bu yöntem nükleik asit temelli çalışan bir sistem olduğu için ölü bakterilerin de tespitini yapabilmektedir. Yapılan Real-Time Bio-PCR çalışmasında sadece canlı bakterilerin tespiti amaçlanmıştır. Bu uygulamayla da sadece canlı bakterilerin tespit edilebilirliği belirlenmiştir. Hastalıklı bitki materyallerindeki epifitik bakteri populasyonun belirlenmesinde de Kantitatif Real-Time PCR yöntemi uygulanmıştır. Li vd (2004) Kantitatif Real-Time PCR yöntemini transgenik buğdaylarda trasfer edilen gen sayısını belirlemek için kullanmışlardır. Fakat çalışmalarında daha önceki yıllarda araştırmacılar tarafından referans olarak oluşturulmuş *puroindoline-b* housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda ise bitki materyalleri üzerinde bulunan epifitik bakterilerin sayısının belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR işlemi ile referans standart eğri kendi uygulamalarımız sonucu bulunmuştur. Bu yöntem uygulanırken bitki materyali üzerinde bulunabilecek ölü bakterilerin uygulamanın sonucunu yanıltabileceği düşünüldüğünden buna eş zamalı olarak besi ortamındaki bakteri gelişimine de bakılmıştır. Sonuçlar varyans analizine

tabi tutulmuş ve aylar arasında bulunan farklı sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır. Populasyon değerlerindeki farklılığın, sıcaklık ve nem düzeylerinin aylara göre farklılık göstermesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bölgemize benzer bir iklime sahip olan Kaliforniya' nın pasifik sahillerindeki üretim alanlarında yapılan gözlemler sonucunda Ateş Yanıklığı Hastalığı için önceden tahmin modeli geliştirmiştir. Bu modele göre y ekseninde; sıcaklığın, x ekseninde; 1 Marttan 1 Mayıs' a kadar olan zamanın yer aldığı bir grafik çizilmiştir. 1 Mart' ta ölçülen ortalama sıcaklık 16,7 °C, 1 Mayıs' ta ölçülen ortalama sıcaklık 14,4 °C olarak belirlenmiş ve bu sıcaklık değerleri kritik sıcaklık noktaları olarak alınmıştır. Grafikte oluşan sıcaklık eğrisinin altında ilaçlama yapmanın gerekmediği ancak sıcaklığın, sıcaklık eğrisini aşması durumuda *Erwinia amylovora'* nın epifitik populasyonun arttığı, yağışlar ve sulama ile ciddi boyutlarda epidemilerin meydana geldiği belirtilmiştir (Agrios 1988). Çalışmamız, sıcaklık derecesinin 10,69°C olduğu ve %100 çiçeklenmenin görüldüğü 14 Mayıs tarihinde Korkuteli Bölgesinde çiçeklerde *Erwinia amylovora*' nın tespit edilmesi fakat enfeksiyonun görülmemesi veya görülen yerlerde ciddi boyutta olmaması, bunu takiben Haziran ayının 18' inde ortalama sıcaklık derecesinin 17,56 °C' ye yükseldiği bölgede Şekil 4.49' da görüldüğü gibi *Erwinia amylovora* populasyonun ciddi boyutlarda en yüksek düzeye ulaşması Kaliforniya için geliştirilen sıcaklığa bağlı önceden tahmin modelini desteklemektedir.




Şekil 5.1. Sıcaklığa bağlı oluşturulan Ateş Yanıklığı Hastalığının önceden tahmin modeli (Agrios 1988)

Aylara bağlı patojen bakteri populasyonun belirlendiği bu yöntem, populasyon yoğunluğuna bağlı olarak uygun mücadele programının hazırlanmasına olanak sağlayabilecektir. Bu da mücadele yöntemlerini uygularken daha bilinçli, çevreye ve insan sağlığına zarar vermeyecek düzeyde davranmamıza olanak sağlayabilecektir.

Real-Time PCR yönteminin kolaylığı; tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitki dokularından tespit yapılabilmesi, kantitatif sonuçlar verebilmesi bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır.

# 6. **SONUÇ**

Ülkemiz konumu itibari ile birçok tarım ürününün doğal yetişme alanıdır. Yetiştirilen tarım ürünlerinin ise büyük bir kısmını meyve oluşturmaktadır. Meyvecilikte ikinci sırada yumuşak çekirdekli meyveler yer almaktadır. Bu meyveler içinde en çok yetiştiriciliği yapılan elma ve armut en çok tüketilen meyvelerdendir. Türkiye' nin hemen her bölgesinde farklı çeşitlerinin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Elma ve armut yetiştiriciliğinden elde edilen gelir daha fazla olduğu için en fazla verimi elde etmek çok önemlidir. Yetiştiricilik yapılırken verimi etkileyebilecek her türlü problem önceden düşünülmeli ve önlemler önceden alınmalıdır.

Ülkemizin ve diğer dünya ülkelerinin birçok bölgesinde yaygın olan Ateş Yanıklığı Hastalığı yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ve diğer Rosaceae familyasına ait bitkilerde ciddi ürün ve kalite kayıplarına sebebiyet vermektedir. Kalite kayıpları nedeniyle ürünlerin pazar değerleri düşmekte ve ekonomik açıdan da kayıplar oluşmaktadır.

Hastalık, hem o yılın hem de gelecekteki yılların ürününe etki edip ağacı kurutabildiği için ülkemiz ve diğer ülkelerde de karantinaya tabidir. Bu hastalığın kimyasal mücadelesi çevreye ve insan sağlığına zararlı olduğu için dayanıklı çeşitlerin kullanımı en kökten çözüm yoludur. Dayanıklı çeşitlerin tespiti ile ilgili çalışmalar halen sürerken, bu çalışma ile hastalığı en az zararla önleyebilmek amaçlanmıştır. Bu doğrultuda da hastalığın erken tanısının ve teşhisinin yapılması için Real-Time PCR sistemi kullanılmıştır.

Real-Time PCR' da hastalığın etmeni olan *Erwinia amylovora' ya* özel primerler ve prob dizayn edilmiştir. Prob ve primerlerin sadece *Erwinia amylovora'* ya ait DNA dizisine uygun olduğu için farklı strainlerin test edilmesi sırasında amplifikasyonun meydana geldiği, diğer farklı bakterilerin DNA dizisiyle uyuşmadığı için amplifikasyonun meydana gelmediği ortaya konmuştur. Bu uygulamanın amacı primer ve probun

sadece *Erwinia amylovora'* ya spesifik olduğunu ortaya koymaktır. Böylece hastalıklı bir bitki materyalinin analizi yapılırken materyal başka bir bakteriyle bulaşık dahi olsa amplifikasyon oluşumunun meydana gelmeyeceği belirlenmiştir. Bu primer ve probun *Erwinia amylovora'* nın diğer strainleriyle de uyuştuğunu ortaya koymak için ise Türkiye' nin ve diğer ülkelerin farklı bölgelerinden toplanan hastalıklı bitki örneklerinden izole edilmiş olan ve şu an Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji, Bakteriyoloji Laboratuarında Prof. Dr. Hüseyin BASIM' a ait kültür stoklarında yer alan *Erwinia amylovora* strainleri üzerinde test edilmiştir. Test sonucunda meydana gelen amplifikasyonla farklı strainlerinde tespitinin yapılabileceği belirlenmiştir.

Patojen bakterinin bitkideki populasyonu ilk aşamada az sayıda olabilir. Az sayıdaki bakteri populasyonun bile tespit edilebildiğini ortaya koymak için ise farklı seyreltmeler hazırlanarak, bu seyreltmeler *Erwinia amylovora'* ya spesifik primer ve prob kullanılarak Real-Time PCR' da test edilmiştir. Yöntemin tespit edebildiği en az bakteri sayısı 6 cfu/2$\mu$ olarak belirlenmiştir. Bunun yanında genomik DNA' dan hassasiyet çalışması ile de 10 pg da bile patojenin tanısının mümkün olduğu ortaya konulmuştur.

Real-Time PCR yöntemi nükleik asit temelli çalışan bir yöntem olduğundan hastalıklı bitki dokularında ölü bakteriler de olsa tespiti yapılabilmektedir. Bio-PCR uygulamasıyla bitki materyali üzerinde bulunan canlı bakteriyel patojenlerin tespitinin de yapılabildiği ortaya konmuştur.

Hastalıklı bitki materyalindeki bakteri yoğunluğu hastalığın derecesini bilmemiz ve ona göre bir mücadele programı hazırlamamız açısından önemlidir. Bu hastalığa neden olan patojen bakteri çiçeklerde epifitik olarak bulunur daha sonra yayılarak sürgünlere geçer ve hastalığın belirtileri oluşmaya başlar. Hastalık kendini göstermeden çiçekler açınca çiçeklerden hazırlanan solüsyon Real-Time PCR' da test edildiğinde o bitkide patojen bakteri *Erwinia amylovora* var ise amplifikasyon meydana

gelir. Bu durumda sadece o bitkide patojenin olduğunu tespit etmiş ve o patojene spesifik primer prob kullandığımız için o patojenin tanısını yapmış oluruz. Patojenin o bitkideki populasyonu hakkında bilgi vermez. Bu durum da yapılacak mücadelede ilaç düzeyinin fazla veya yetersiz olmasına neden olabilir. Uygulanacak doz fazla olursa bu hem çevreye hem de insan sağlığına zararlı bir durumdur. Aynı zamanda da çok masraflıdır. Uygulanacak doz yetersiz olursa da hastalığı engelleyemeyiz. Bu sorunların önüne geçmek için Real-Time PCR ile hastalığa neden olan bakteri populasyonunun kantitatif olarak belirlenebildiği ortaya konmuştur. Kantitatif Real-Time PCR yöntem ile populasyon yoğunluğuna bağlı olarak hazırlanacak uygun mücadele programı ile olabilecek en sağlıklı ve güvenilir mücadelenin yapılabileceği belirlenmiştir.

Real-Time PCR yönteminin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitki dokularından tespit yapılabilmesi, bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirebilmesi, bitki materyalindeki bakteri yoğunluğunu kantitatif olarak belirleyebilmesi, bu yöntemin son yıllarda kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamıştır. Bu çalışma ile Real-Time PCR yönteminin önemi ve hassaslığı bir kez daha ortaya konulmuştur.

## 7. KAYNAKLAR


AGRIOS, G.N. 1988. Plant Pathology; Bacterial vascular wilts. Academic Press, INC., p. 538-544.

ANONİM, 2009. TUİK, T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu.

ANONİM, 2007. MEGEP, T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Ankara.

ATALLAH, Z. K. and STEVENSON, W. R. 2006. A Methodology to Detect and Quantify Five Pathogens Causing Potato Tuber Decay Using Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. The American Phytopathological Society, vol. 96, no. 9, p. 1037-1045.

BARIONOVI, D., GIORGI, S., STOEGER, A.R., RUPPITSCH, W. and SCORTICHINI, M. 2006. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using Repetitive-Sequences PCR analysis, and Restriction Fragment Length Polymorphism and Short-Sequence DNA Repeats of plasmid pEA29. Journal of Applied Microbiology, vol.100, p. 1084-1094.

BASIM, E. ve BASIM, H. 2009. Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki bağ alanlarında Pierce Hastalığı etmeni *Xylella fastidiosa*' nın tanısı, tespiti ve moleküler karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, Van, 156.

BASIM, H. ve BASIM, E. 2007. "TaqMan Real-Time PCR ile *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*' nun tanısı ve tespiti", II. Bitki Koruma Kongresi, Isparta, 104.

BASIM, H., BASIM, E., YEĞEN, O., ÜNLÜ, A. ve YILMAZ, S. 2004. Türkiye'deki *Erwinia amylovora* strainlerinin moleküler karakterizasyonu, Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi, 8-10 Eylül, 145, Samsun.

BASIM, H. ve ÇAPLIK, D. 2009. Domates Bakteriyel Kanser etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve Domates Bakteriyel Yaprak Lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*' nın LNA probe' a dayalı Real-Time PCR ile tanısı ve saptanması. Türkiye III. Fitopatoloji Kongresi, Van, 138.

BASIM, H. ve ÖZTÜRK, N. 2011. Fasulye Bakteriyel Yaprak Yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) ve Bakteriyel Hale Lekesi (*Pseudomonas syringae* pv.

*phaseolicola*) etmenlerinin LNA probu kullanılarak Real-Time PCR ile tespiti ve tanılanması. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, Kahramanmaraş, 59.

BELLIS, P.D., SCHENA, L. and CARIDDI, C. 2007. Real-Time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *Eur. J. Plant Pathol.*, 118:11–22.

BENLİOĞLU, K. ve ÖZAKMAN, M. 1998. Characterization of Turkish isolates of *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et.al. Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 127-131 pp., Kuşadası, Turkey.

BERESWILL, S., BUGERT, P., BRUCHMULLER, I. and GEIDER, K. 1995. Identification of the Fire Blight Pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with Chromosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology, vol.61, no.7, p. 2636- 2642.

BERESWILL, S., PAHL, A., BELLEMANN, P., ZELLER, W. and GEIDER, K. 1992. Sensitive and species-detection of *Erwinia amylovora* by Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology, vol.58, no.11, p.3522-3526.

BILLING, E. 1996. BIS95, an improved approach to fire blight risk assessment. Acta Hortic. 411:121-126.

BOBEV, S., GARBEVA, P., CREPEL, C., MAES, M. and HAUBEN, L. 1998. Fire blight in Bulgaria-Characteristics of *E. amylovora* isolates. Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 121-126 pp., Kuşadası, Turkey.

BOYER, J. and LIU, R. H. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. Department of Food Science and Institute of Comparative and Environmental Toxicology, Cornell University, Ithaca, New York 14853-7201 USA.

BRITISH COLUMBIA, 2010. Fire Blight of Apple and Pear. http://www.agf.gov.bc.ca /cropprot/tfipm/fireblyt.htm.

BROWN, E.W., JANISIEWICZ, W. and VAN DER ZWET, T. 1996. Preliminary phenotypic and genetic differentiation of the fire blight bacterium, *Erwinia amylovora* Acta Horticulture, 411:199-210.

BUGERT, P. and GEIDER, K. 1995. Molecular analysis of *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora.* Molecular Microbiology vol.15(5), p. 917-933.

CREPEL,C., DAEMEN, E., DECKERES, T. and MAES, M. 1998. Monitoring of the epiphytic population of the fire blight pathojen *E. amylovora* in pear orchard for preventive control. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., 63/4b:1717-1719.

DREO, T., GRUDEN, K., MANCEAU, C., JANSE, J. D. and RAVNIKAR, M. 2007. Development of a Real-Time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus.* Plant Pathology vol. 56, p. 9–16.

FAOstat, 2008. Food and Agricultural Organization of United Nations: Economic and Social Department: The Statistical Devision

GEIDER, K. 2000. Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. J.L. Vanneste, Fire Blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. pp. 117-140. Wallingford, UK: CABI Publishing.

GIBSON, 2008. Apple - *Malus domestica*/Natural England. http://www.plantpress.com /wildlife/o523-apple.php.

GORRIS, M., CAMBRA, P., LIOP, P., LOPEZ, M., LECOMTE, P., CHARTIER, R. and PAULIN, J. P., 1996. A sensitive and spesific detection *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. Acta Horticulture, 411: 41-46.

GOTTSBERGER, R. A. 2010. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora.* Applied Microbiology, 51: 285-292.

GUILFORD, P.J., TAYLOR, R.K., CLARK, R.G., HALE, J.N. and FORSTER, R.L.S. 1996. PCR based techniques for the detection of *Erwinia amylovora* Acta Horticulturae, 411: 53-56.

HEPAKSOY, S., ÜNAL, A., CAN, H.Z., SAYGILI, H. and TÜRKÜSAY, H. 1998. Distribution of fire blight (*Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al.) diseases in Western Anatolia Region in Turkey. Eight İnternational Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 193-195 pp., Kuşadası, Turkey.

HREN, M., BOBENA, J., ROTTER, A., KRALJ, P., GRUDENA, K. and RAVNIKAR, M. 2007. Real-Time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir

phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. Plant Pathology, 56, 785–796.

HRISTOVA, P. K., ATANASOVA, I., DOUSSET, X. and MONCHEVA, P. 2006. Multiplex PCR Assay For Identification of *Erwinia amylovora* - The Causative Agent Of Fire Blight. Biotechnol. & Biotechnol. Eq.

JENG, R. S., BELIAEVA, L., HUBBES, M., SVIRCEV, A. M. and MYERS, A. L. 1998. The use of 16s and 16s-23s rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *Erwinia amylovora*. Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 49-54 pp., Kuşadası, Turkey.

LECOMTE, P., MANCEAU, C., PAULIN, J. P. and KECK, M. 1997. Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. European Journal of Plant Pathology vol. 103, p. 91–98.

LEHMAN, S. M., KIM, W.S., CASTLE, A. J. and SVIRCEV, A. M. 2008. Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms. The American Phytopathological Society, Vol. 98, No. 6, p. 673-679.

LELLIOTT, R.A. 1967. The diagnosis of fire blight (*Erwinia amylovora*) and some diseases caused by *Pseudomonas syringae*. EPPO Bulletin 45, 27–34.

LI, Z., HANSEN, J. L., LIU Y., ZEMETRA, R. S. and BERGER, P. H. 2004. Using Real-Time PCR to determine transgene copy number in Wheat. Plant Molecular Biology Reporter 22: 179–188.

LLOP, P., BONATERRA, A., PENALVER, J., and LOPEZ, M. M. 2000. Development of a highly sensitive Nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied and Environmental Microbiology vol. 66, p. 2071–2078.

MANULIS, S., KLEITMAN, F., DROR, O., DAVID, I. and ZUTRA, D. 1998. Characterization of the *Erwinia amylovora* Population in Israel. Phytoparasitica 26(1):39-46.

MARTINEC, T. and KOCUR, M. 1964. A Taxonomic study of *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et. al. 1920. international Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy. Vol. 14, No. 1, pp. 5-14.

MERIGHI, M., MALAGUTI, S., BAZZI, C., SANDRINA, A., LANDINI, S., GHINI, S. and GIROTTI, S. 1998. Spesific detection of *Erwinia amylovora* by Chemiluminescent immunoenzymatic determination of PCR Eighth International Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 39-42 pp., Kuşadası, Turkey.

MERIGHI, M., SANDRINI, A., LANDINI, S., GHINI, S., GIROTTI, S., MALAGUTI, S. and BAZZI, C. 2000. Chemiluminescent and colorimetric detection of *Erwinia amylovora* by immunoenzymatic determination of PCR amplicons from plasmid pEA29. The American Phytopathological Society, Plant Dis. 84:49-54.

MOHAMMADI, M., MOLTMANN, E., ZELLER, W. and GEIDER, K. 2009. Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with Real-Time PCR. Eur. J. Plant Pathology 124:293–302.

MOMOL, M. T., YEĞEN, O., BASIM, H. and RUDOLPH, K. 1992. Identification of *Erwinia amylovora* and the occurrence of Fire Blight of pear in Western Mediterranean region of Turkey. J. Turk. Phytopath., Vol. 21, No. 1, 41-47.

MOMOL, M.T. and ZELLER, W. 1992. Identification and spread of *Erwinia amylovora* on pear in Turkey. Plant Disease Vol. 76, No. 11, p.1114-1116.

OBRADOVIC, D. and KEVRESAN, S. 2010. Optimization of PCR in Application of Hot Start *Taq* DNA Polymerase for detection of *Erwinia amylovora* with primers FER1-F and FER1-R. Microbiology, Vol. 79, No. 6, pp. 816–821.

ÖKTEM, Y.E. ve BENLİOĞLU, K. 1988. Studies on fire blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et. al.) of pome fruits, 41-47, Identification of *Erwinia amylovora* and the occurrence of fire blight of pear in Western Mediterranean region of Turkey, M.T. Momol, O. Yeğen, H. Basım, K. Rudolph (Eds.), Journal of Turkish Phytopathology, vol. 21, No.1.

ÖZTÜRK, G., BASIM, E., BASIM, H., ATAY, A.N ve SARISU, H. C. 2007. Kontrollü melezleme yoluyla Ateş Yanıklığı Hastalık etmeni *Erwinia amylovora'* ya karşı

dayanıklı yeni armut çeşitlerinin geliştirilmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, Isparta.

PETERSEN, M. and WENGEL, J. 2003. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. Trends Biotechnol. 21, 74-81.

PIRC, M., DREO, T. and RAVNIKAR, M. 2008. Real-Time PCR for testing of symptomless fire blight samples. Acta Horticulture vol. 793, p. 533-538.

PIRC, M., RAVNIKAR, M., TOMLINSON, J. and DREO, T. 2009. Improved fireblight diagnostics using Quantitative Real-Time PCR detection of *Erwinia amylovora* Chromosomal DNA. Plant Pathology, 58: 872-881.

PSALLIDAS, P.G. and DIMOVA, M. 1986. Occurence of the disease fire blight of Pomaceous trees in Cyprus characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora.* Annls. Inst. Phytopat. Benaki., (N.S.), 15: 61-70.

PUJOL, M., BADOSA, E., MANCEAU, C. and MONTESINOS, E. 2006. Assessment of the environmental fate of the biological control agent of Fire Blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and Real-Time PCR methods. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, no.4, p. 2421–2427.

SALM, H. and GEIDER, K. 2004. Real-Time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. Plant Pathology vol. 53, p. 602–610.

SCHAAD, N. W. and FREDERICK, R. D. 2002. Real-Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. Can. J. Plant Pathol. vol.24, p. 250-258.

SCHAAD, N. W., OPGENORTH, D. and GAUSH, P. 2002. Real-Time Polymerase Chain Reaction for one-hour on-site diagnosis of pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. The American Phytopathological Society, Vol. 92, No. 7, p. 721-728.

SHTIENBERG, D., KRITZMAN, G., HERZOG, Z., OPPENHEIM, D., ZILBERSTAINE, M. and BLATCHINSKY, D. 1999. Development and evaluation of a decision support system for management of fire blight in pears. Acta Hortic. 489:385-392.

SHTIENBERG, D., SHWARTZ, H., OPPENHEIM, D., ZILBERSTAINE, M., HERZOG, Z., MANULIS, S. and KRITZMAN, G. 2003. Evaluation of Local and Imported Fire Blight Warning Systems in Israel. Phytopathology vol. 93, no. 3, pp. 356-363.

SMITH, T. J. 1999. Report on the development and use of Cougarblight 98C–A situation specific fire blight risk assessment model for apple and pear. Acta Hortic. 489:429-436.

STEINER, P. W. and LIGHTNER, G. W. 1996. MARYBLYT 4.3. A predictive program for forecasting fire blight disease in apples and pears. University of Maryland, College Park, MD.

STOGER, A., SCHAFFER, J. and RUPPITSCH, W. 2006. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by Polymerase Chain Reaction. J. Phytopathology vol. 154, p. 469–473.

TAYLOR, R.K., GUILFORD, P.J., CLARK, R.G., HALE, C.N. and FORSTER, R.L.S. 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel Polymerase Chain Reaction (PCR) primers. New Zealand J. Crop Horticultural Sci., vol. 29, pp. 35–43.

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

THOMSON, S. V. 2000. Epidemiology of fire blight. In J. L. Vanneste (Ed.), Fire Blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* (pp. 9-36). Wallingford, UK: CABI Publishing.

TOKGÖNÜL, S. 1991. Doğu Akdeniz Bölgesinde armutlarda Ateş Yanıklığı Hastalığı (*Erwinia amylovora* Burr. Winslow et. al.)' nın tanısı ve yaygınlık durumu üzerine araştırmalar. Araştırma Yayınları Serisi Yayın No: 74, 49 p. Ankara.

TORRES, E., BERTOLINI, E., CAMBRAB, M., MONTON, C. and MARTIN, M. P. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. Molecular and Cellular Probes vol.19, p. 334-340.

UTAH STATE UNIVERSITY, 2011. Tree Fruit IPM Advisory http://utahpests.usu.edu/ipm/htm/advisories/treefruit/articleID=8226

ÜNLÜ, A. ve BASIM, H. 2002. Türkiye' deki *Erwinia amylovora* izolatlarının elde edilmesi ve bu izolatların, patolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu. Akdeniz Üniversitesi Doktora Tezi.

VAN DER ZWET, T. and BEER, S.V. 1995. Fire Blight-Its Nature, Preventation and Control. Agriculture Information Bulletin, No: 631, 83pp.

VAN DER ZWET, T. and KEIL, H. L. 1979. Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants. Agriculture handbook no. 510. U.S.Depertment of Agriculture, 200p. Washington, D.C.

VOEGELE, R.T., KUNZ, S., OLBRECHT, L., HINZE, M., WEİßHAUPT, S., SCHMID, A., ERNST, M., JOOS, M., MATSCHINSKY, M. and MENDGEN, K. 2010. Monitoring *E. amylovora* using Real-Time PCR. Reviewed Papers p. 110-117.

YILMAZ, S. ve BASIM, H. 2006. Identification and detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* by Multiplex-PCR and Real-Time PCR. *Phytopathology* 96, S128, 2006.

YÜCEL, F., BENLİOĞLU, K. ve ÇIRAKOĞLU, B. 1998. A simple and quick way for diagnosis of *Erwinia amylovora*. Eighth İnternational Workshop on Fire Blight. 12-15 October, 33-38 pp., Kuşadası, Turkey.

ZHANG, Y. and GEIDER, K. 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Applied and Envıronmental Mıcrobiology, p. 4421–4426, Vol. 63, No. 11.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Eskişehir merkezde doğdu. İlkokul, orta ve lise öğrenimini Manavgat' da tamamladı. 2004 yılında girdiği üniversite sınavında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Mühendisliğini kazandı. Ziraat Mühendisliği 3. sınıfında Bitki Koruma Bölümünü seçerek 2009 yılında Ziraat Mühendisliği programı Bitki Koruma bölümünden mezun oldu. 09 Eylül 2009 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Fitopatoloji Bilim dalında Yüksek Lisans' a başladı ve halen aynı bölümde Yüksek Lisans' a devam etmektedir.