

## ***Erwinia amylovora* Strainlerinin Streptomisin Sülfata Karşı Duyarlılıkları ve Strainlerin Yağ Asidi Metil Esterleri ile Antibiyotiğe Duyarlılıkları Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi**

**Recep KOTAN      Kenan KARAGÖZ**

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 25240, Erzurum ([rkotan@atauni.edu.tr](mailto:rkotan@atauni.edu.tr))

**Fikretin ŞAHİN**

Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 34755, İstanbul

**Geliş Tarihi : 27.05.2008**

**ÖZET:** Bu çalışmada; Erzurum, Erzincan, Artvin, Kars ve Iğdır illerinde yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen ateş yanıklığı hastalığının etmeni *Erwinia amylovora*'nın toplam 41 straininin streptomisin sülfata karşı duyarlılıkları test edilmiş; mikrobiyal tanı sistemi (MIS) ile strainlerin yağ asidi metil ester (FAME) grupları belirlenerek, patojenin yağ asitleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre strainlerin % 31,7'sinde dayanıklılık tespit edilmiştir. Yağ asidi metil esterleri bakımından patojenin 4 farklı grubunun olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklılığın ise % 8 ile % 24 arasında değiştiği görülmüştür. Ayrıca dayanıklılık oranının 2. grupta en yüksek düzeyde (% 83.3) olduğu tespit edilmiştir. Bu oran 1. grup için % 27.6 bulunurken 3. ve 4. grupta dayanıklı straine rastlanmıştır. İkinci grubun farkı; 18:1 w7c yağ asidinin diğer gruplara göre çok yüksek düzeyde olması (% 30.96-43.8) ve diğer grupların hiç birisinde bulunmayan 16:0 3OH (% 3.27-4.14) ve 16:1 2OH (% 1.08-2.18) yağ asitlerinin bu grupta bulunmasıdır. Sonuç olarak; Doğu Anadolu Bölgesi'nde *Erwinia amylovora*'nın streptomisin sülfata karşı dayanıklı strainlerinin geliştiği ilk olarak bu çalışmada tespit edilmiştir. İlave olarak, bu bakterinin FAME grupları ile streptomisin sülfata karşı dayanıklılığının arasında bir ilişkinin olmasından dolayı; bakterilerin FAME profillerinin laboratuvar şartlarında antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde yeni bir yöntem olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Erwinia amylovora*, FAME, MIS, streptomisin sülfat, yağ asidi

### **Determination of Relationship between Streptomycin Sulphate Susceptibility of *Erwinia amylovora* Strains Isolated from Pome Fruits and Their Fatty Acid Methyl Ester Profiles**

**ABSTRACT:** In this study; a total of 41 *Erwinia amylovora* strains, isolated from pome fruits grown in Erzurum, Erzincan, Artvin, Kars and Iğdır province, were tested for susceptibilities to streptomycin sulphate. In addition; it was determined to fatty acid methyl esters (FAME) group of the strains, and investigated of relationship between streptomycin susceptibility of them and their FAME group. According to these results, resistance to streptomycin of tested strains was 31.7%. It was determined four different FAMEs groups of strains by using microbial identification system (MIS) system. The difference between groups was changed from 8% to 24%. The highest rate of resistance was in second group (83.3%) and first group (27.6%), and there was not any resistance strains in other groups.. Different of second group from others was that 18:1 w7c fatty acid was the highest level (30.96-43.8%), and there was 16:0 3OH (30.96-43.8%) and 16:1 2OH (1.08-2.18%) fatty acids in only this group. Consequently, this is the first report demonstrating resistance of strains *Erwinia amylovora* to streptomycin sulphate in Eastern Anatolia Region. In addition, because of the fact that there is a relationship between resistance of bacterial strains to streptomycin sulphate and their FAME profiles, we think that FAME profiles of this bacterium can be used as a new method for determination of bacterial antibiotic resistance in laboratory conditions.

**Keywords:** *Erwinia amylovora*, FAME, fatty acid, MIS, streptomycin sulphate

### **GİRİŞ**

*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*'nin sebep olduğu ateş yanıklığı hastalığı, bakteriyel bir etmen tarafından meydana getirildiği saptanan ilk bitki hastalığıdır (Smith, 1920; Beer and Opgenorth, 1976). Rosaceae familyasına ait 39 farklı cins ve 128 türe ait bitkilerde hastalık yapmaktadır (Smith, 1920; Beer and Opgenorth 1976). Elma, armut ve ayva başta olmak üzere yenedünya, muşmula gibi birçok yumuşak çekirdekli meyve ağaçları dışında, dağ muşmulası, ateş diken, üvez ve birçok süs bitkisi ile orman florasının da bu patojenin konukçuları arasında olduğu bilinmektedir (Van der Zwet and Keil, 1979; Van der Zwet *et al.*, 1988).

Bu hastalık Avrupa'da ilk defa 1957 yılında İngiltere'de görülmüş ve çok kısa sürede diğer birçok

Avrupa ülkesine yayılmıştır (Van der Zwet and Keil, 1979). Türkiye'de ise ilk kez 1985 yılında Orta Anadolu bölgesinde, Afyon ili Sultandağ İlçesi'nde armut ağaçlarında gözlemlendiği bildirilmektedir (Öktem and Benlioğlu 1988). Günümüzde ateş yanıklığının Türkiye'de yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan hemen her bahçede bulunduğu ve zaman zaman önemli epidemik boyutlara ulaştığı belirtilmektedir (Beer, S. V., 1990; Momol, 1990; Momol *et al.*, 1991; Demir ve Gündoğdu, 1991; Tokgönül, 1991; Turan ve Tokgönül, 1993; Mirik, 2000; Kotan, 2002; Kotan *et al.*, 2006).

Bitki hastalıklarına bağlı olarak tarım ürünlerindeki nicelik ve nitelikteki azalmayı ortadan kaldırmak için, etkili zirai mücadele metotlarının

uygulanması zorunludur. Streptomisin antibiyotiği bitki bakteriyel hastalıklarının kontrolünde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ateş yanıklığı ile mücadelede bakır terkipli fungusitlerin ve streptomisin uygulamasının etkili bir kontrol sağladığı belirtilmektedir (Watkins, 1992). Türkiye’de yapılan bir çalışmada; ateş yanıklığı hastalığına karşı bazı kimyasalların etkinlikleri test edilmiş ve en iyi aktiviteyi streptomisin sülfatın sağladığı belirlenmiştir (Saygılı and Üstün, 1996).

Kimyasal pestisitler kullanılarak kısa vadeli uygulamalarda bazı bitki hastalıklarına karşı etkili ve başarılı sonuçlar alınabilmesine rağmen; virüs, viroid ve bakteri gibi bitki patojenlerine karşı sürekli olarak kullanılan kimyasallara karşı patojenlerin direnç kazanması söz konusudur (Sobieczewski, 1991). *Erwinia amylovora*’nın streptomisine karşı dayanıklılık geliştirdiği ilk olarak 1971 yılında ABD’de tespit edilmiştir (Schroth et al., 1971). Ancak, günümüzde artık *Erwinia amylovora*’nın streptomisin antibiyotiğine karşı dayanıklılık geliştirdiği pek çok bölgede yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Chiou and Jones, 1991; Sobieczewski et al., 1991; Burr et al., 1993; Manulis et al., 1998; Sholberg et al., 2001; Aysan et al., 2006). Doğu Anadolu Bölgesi’nde meyvecilik yapılan alanlarda zaman zaman şiddetli enfeksiyonlara sebep olan bu patojenin dayanıklı strainlerinin varlığına yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu bölgede çok yoğun bir bahçe tarımı yapılmadığı ve bahçeler genellikle aile işletmesi şeklinde olduğundan streptomisin kullanımının olmadığı düşünülmektedir. Ancak, bahçe tesisinde kullanılan fidanların tamamına yakını başka bölgelerden gelmektedir.

Bitki patojeni mikroorganizmalarla mücadelede en önemli konulardan birisi enfeksiyona sebep olan patojenin doğru tanılanması ve karakterizasyonudur. Yağ asidi profillerindeki farklılıklar genetiksel akrabalıkların dolaylı bir göstergesi olup; bu profiller kullanılarak bakterilerin tanılanmasına yönelik çalışmalar 40 yılı aşkın bir süredir yürütülmektedir (Miller and Berger, 1985; Stead, 1992; Paisley, 1995). Ancak, ilk defa 1980’li yıllarda MIDI firması tarafından ABD’de geliştirilerek hizmete sunulan bilgisayar kontrollü bir gaz kromatografi sistemi yardımı ile kültüre alınabilen her türlü mikroorganizmanın tanısında kullanılabilen Mikrobiyal Tanı Sistemi (Microbial Identification System, MIDI Sherlock Delawaore, USA) geliştirilmiştir. Kotan (2002) tarafından yapılan bir çalışmada da; *Erwinia amylovora*’nın tanı ve karakterizasyonunda bu sistemin güvenilir bir şekilde kullanılabilceği belirtilmiştir.

Yağ asitlerinin bakterilerde hücre zarının selektivitesine etki ettikleri bilinmektedir (Dunnick and O’Leary, 1970). *Erwinia amylovora*’daki streptomisine dayanıklılığın kromozomal orijinli ve

plazmid orjinli olmak üzere bilinen en az iki mekanizması olduğu bilinmektedir (Burr et al., 1993). Ancak, *Erwinia amylovora*’da yağ asidi metil esterleri (FAME) içeriklerine bağlı olarak oluşturulacak FAME grupları ile antibiyotiklere duyarlılık arasında bir ilişkinin olup olmadığına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan bu çalışmada; Erzurum, Erzincan, Artvin, Kars ve Iğdır illerinde ateş yanıklığı hastalığının etmeni *Erwinia amylovora*’nın yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarından izole edilen toplam 41 straininin streptomisin sülfata karşı duyarlılıklarının test edilmesi; strainlerin yağ asidi metil ester (FAME) gruplarının belirlenmesi ve FAME grupları ile streptomisin duyarlılığı arasındaki ilişkinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Kullanılan Patojen Bakteriler

Bu çalışmada; 1999-2001 yılları arasında Kuzey Doğu Anadolu Bölgesi’nde (Erzurum, Erzincan, Kars, Artvin ve Iğdır) meyvecilik yapılan alanlardaki meyve bahçelerinden yumuşak çekirdekli meyvelerden (elma, armut ve ahlat) izole edilen toplam 41 *Erwinia amylovora* straini kullanılmıştır. Bu strainlerin 31’i armuttan, 7’si elmadan ve 3’ü ise ahlattan izole edilmiştir. Mikrobiyal Tanı Sisteminde (MIS) (MIDI, Inc., Newark, DE) tanısına ilave olarak tütünde HR ve elmada patojenite testleri de yapılmıştır (Kotan, 2002). Tanısı ve karakterizasyonu yapılan bu bakteriler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 1/1 oranında %30’luk glycerol ve LB Broth ihtiva eden eppendorf tüpler içerisinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### Bakteriyel İzolatların Yağ Asit Profillerinin Belirlenmesi

Muhafaza edilen bakteri strainlerinden yağ asit metil esterlerinin elde edilmesi ve analizi MIS sisteminin standart protokolüne göre yapılmıştır (Paisley, 1995). Steril platin bir öze ile test edilecek bakterilerin taze kültürlerinin tek bir kolonisinden, Tryptic Soy Agar (TSA) katı besiyerine 4 fazlı çizgi ekim yapılarak 25 °C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Takiben gelişen bakteri strainlerinin 3. ve 4. fazlarından canlı bakteri hücreleri steril bir öze ile toplanarak ağızları teflon kapaklı steril cam test tüplerine aktarılmış, test tüpleri etiketlenerek ağızları kapatılmıştır. Mikroorganizmaların yağ asitlerini saf olarak izole etmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır. Sırasıyla bakteri hücrelerinin parçalanması (saponification), metilleştirme (methylation), saflaştırma (extraction) ve bazik yıkamayı (base wash) takiben üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 ml’lik gaz kromatografi tüplerine transfer edilmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Örnekler MIS cihazı

üzerindeki örnek depolama tepsinine yerleştirildikten sonra, cihaz çalıştırılarak sistem kılavuzunda belirtildiği gibi analiz edilmiş ve tanı sonuçları alınmıştır. Bu testler bütün örnekler için 3 kez tekrar edilmiş ve yüzde olarak en yüksek tanı sonucu kesin sonuç olarak değerlendirilmiştir. Ancak yağ asidi analizleri bu üç raporun ortalamaları üzerinden yürütülmüştür.

#### **Streptomisin Sülfat Duyarlılık Testleri**

Bu testler için Sensetive Agar (SA) besiyeri kullanılmıştır (Lelliot and Stead, 1987). Bu amaçla önce bakteriyel strainlerin her birisi ayrı ayrı Nutrient Agara (NA) ekilerek 25°C' de 24 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerin 10<sup>8</sup> hücre/mililitre konsantrasyondaki solüsyonları hazırlanmıştır. Steril eküviyonla daldırılarak her bir strainden SA içeren petriye yayma ekim yapılmıştır. Her bir petrinin tam ortasına ise sdH<sub>2</sub>O ile 100 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan streptomisin sülfatın (Sigma) 15 µL'lik hacimlerde boş disklerle (Oxoid) emdirilerek hazırlanmış numuneler yerleştirilmiştir. Kültürler 25°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda değerlendirme yapılmış ve disk etrafında kültürlerin gelişimlerinin engellendiği bölgenin çapı inhibasyon zonu (mm) olarak ölçülerek, elde edilen değer o bakteri straininin antibiyotiğe duyarlılığının belirlenmesinde kullanılmıştır. Testler 3 tekerrürlü olarak aynı şartlarda 3 kez tekrar edilmiştir. İnhibasyon zonu ≤9 mm olanlar (çok dayanıklı=+); 9<19 mm olanlar (dayanıklı=++); 19≤29 mm olanlar (orta derecede hassas=+++); 29<39 mm olanlar (hassas=++++) ve ≥39 mm olanlar (çok hassas=+++++) olarak değerlendirilmiştir.

#### **İstatistik analiz**

Test edilen strainlerin içerdikleri yağ asidi metil esterleri, yüzde oranları ve antibiyotik inhibasyon zonları kaydedilerek SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Version 9.0)'de analiz edilmiş, aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Ayrıca strainlerin yağ asidi metil esterlerine göre dendogramları oluşturularak FAME grupları belirlenmiştir. Duncan testine göre grupların içerdikleri yağ asidi oranlarının gruplar arasındaki farklılığının önem derecesine de bakılmıştır (p=0.05).

#### **ARAŞTIRMA SONUÇLARI**

Test edilen bakteriyel strainlerin streptomisine karşı duyarlılıkları, konukçuları, lokasyonları ve FAME grupları aynı tablo üzerinde gösterilmiştir (Tablo 1). Armuttan 31, elmadan 7 ve ahlattan 3

olmak üzere toplam 41 strain test edilmiştir. Bu sonuçlara göre; toplam 41 *Erwinia amylovora* straininin 13'ü (% 31.7) dayanıklı, 24'ü (% 58.5) orta derecede hassas ve 4'ü (% 9.6) hassas olarak tespit edilmiştir. Çok dayanıklı ya da çok hassas olarak değerlendirilebilecek bir strainine rastlanmamıştır. Test edilen toplam 7 elma straininden sadece 1'isi dayanıklı bulunurken; geri kalan dayanıklı strainlerin tamamını (12'si) armuttan izole edilenler oluşturmuştur. Test edilen 3 ahlatt straininin üçü de orta derecede hassas olarak tespit edilmiştir. Yağ asidi metil esterleri bakımından *Erwinia amylovora*'nın 4 farklı FAME grubunun olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklılığın % 8 ile % 24 arasında değiştiği görülmektedir.

Streptomisine farklı duyarlılıktaki strain sayılarının FAME gruplarına göre dağılımını gösteren sonuçlar Tablo 2'de özetlenmiş ve strain sayıları ile birlikte yüzde oranları (%) da verilmiştir. Buna göre; dayanıklılık oranının 2. grupta en yüksek (% 83.3) olduğu tespit edilmiştir. Bu oran 1. grupta % 27.6 iken; 3. ve 4. grupta dayanıklı strain görülmemiştir.

FAME grupların ihtiva ettikleri yağ asitleri yüzde oranları ve istatistikî önem dereceleri Tablo 3'de verilmiştir. Birinci grupta yer alan strainlerde 16:0 yağ asidi oranının (% 19.1-39.91) diğer gruplara göre yüksek ve diğer gruplarda bulunmayan 14:0 yağ asidinin bu grupta % 0.0-9.44 arasında olması bu grubun en önemli farklılığı olarak görülmektedir. İkinci grubun en ayırt edici özelliği ise; 18:1 w7c yağ asidinin diğer gruplara göre çok yüksek düzeyde olması (% 30.96-43.8) ve diğer grupların hiç birisinde bulunmayan 16:0 3OH (% 3.3-4.14) ve 16:1 2OH (% 0.0-2.18) yağ asidinin bu grupta bulunmasıdır. Üçüncü grupta 16:0 diğer gruplara göre en düşük düzeyde (% 4.37-17.14) bulunurken; 18:1 w7c diğer grupların üçünde de bulunurken bu grupta tespit edilmemiştir. 15:0 anteiso (% 40.78-72.95), 15:0 iso (% 4.16-36.84) ve 17:0 anteiso (% 0.0-15.94) yağ asitleri diğer grupların hiç birisinde bulunmayıp bu grupta görülmüştür. Ayrıca Summed future olarak belirlenen yağ asidi oranları diğer gruplarda % 27.45 ile 37.02 arasında bulunurken bu grupta oran çok düşük düzeyde (% 0.0-0.62) görülmüş ve bu da istatistikî olarak diğer her üç gruptakinden farklı bulunmuştur. Dördüncü grubun farklılığı olarak da bu grupta görülen 10:0 3OH (% 2.76-3.12), 12:0 2OH (% 2.15-2.71) ve 12:0 3OH (% 1.43-3.81) yağ asitlerinin diğer grupların hiçbirisinde ya hiç bulunmaması ya da çok düşük düzeylerde bulunmasıdır.

Tablo 1. *Erwinia amylovora* strainlerinin streptomisine duyarlılıkları (SD), strain numaraları (SN), konukçu/lokasyon bilgileri ve FAME grupları

SD	SN	Konukçu/Lokasyon	0	5	10	15	20	25
+++	FK-226	Azırat/Kağısmar/KARS						
+++	FK-246	Elma/Oltu/ERZURUM						
+++	FK-224	Elma/ERZINCAN						
++	FK-10	Azırat/IĞDIR						
+++	FK-206	Azırat/IĞDIR						
+++	FK-200	Azırat/IĞDIR						
+++	FK-217	Azırat/IĞDIR						
+++	FK-225	Azırat/IĞDIR						
+++	FK-220	Azırat/Yusufeli/ARTVIN						
+++	FK-219	Elma/Oltu/ERZURUM						
+++	FK-227	Azırat/IĞDIR						
+++	FK-291	Azırat/ERZINCAN						
+++	FK-202	Azırat/Kağısmar/KARS						
++++	FK-207	Azırat/Kağısmar/KARS						
+++	FK-216	Elma/Tortum/ERZURUM						
++	FK-9	Azırat/IĞDIR						
+++	FK-007	Azırat/Yusufeli/ARTVIN						
++	FK-5	Elma/ERZINCAN						
+++	FK-205	Azırat/Kağısmar/KARS						
+++	FK-271	Ahl ıt/Oltu/ERZURUM						
+++	FK-214	Elma/Şenkaya/ERZURUM						
++	FK-204	Azırat/Yusufeli/ARTVIN						
++	FK-205	Azırat/ERZINCAN						
++	FK-206	Azırat/ERZINCAN						
++	FK-207	Azırat/Tortum/ERZURUM						
+++	FK-292	Azırat/ERZINCAN						
+++	FK-210	Elma/Oltu/ERZURUM						
+++	FK-006	Azırat/ARTVIN						
++	FK-19	Azırat/IĞDIR						
++	FK-000	Azırat/ERZINCAN						
++	FK-012	Azırat/Ispiz/ERZURUM						
+++	FK-200	Azırat/ERZINCAN						
++	FK-010	Azırat/Yusufeli/ARTVIN						
++	FK-011	Azırat/Yusufeli/ARTVIN						
++	FK-201	Azırat/Oltu/ERZURUM						
+++	FK-272	Ahl ıt/Oltu/ERZURUM						
+++	FK-270	Ahl ıt/Oltu/ERZURUM						
+++	FK-020	Azırat/Ispiz/ERZURUM						
+++	FK-020	Azırat/Ispiz/ERZURUM						
+++	FK-260	Azırat/Yusufeli/ARTVIN						
+++	FK-270	Azırat/Şenkaya/ERZURUM						

+: Çok dayanıklı (zon ≤9 mm); ++: Dayanıklı (zon 9<19 mm); +++: Orta derecede hassas (zon 19≤29 mm); ++++: Hassas (zon 29<39 mm); +++++: Çok hassas (zon ≥39 mm)

Tablo 2. *Erwinia amylovora*'nın dört farklı FAME gruplarında streptomisine (100 µg/ml) karşı farklı duyarlılıktaki strain sayıları ve toplam strainler içerisindeki yüzde (%) oranları

Streptomisine duyarlılık testinde inhibasyon zon grupları	Streptomisine duyarlı strain sayıları ve % oranları				Toplam strain sayısı ve % oranı
	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	
+ (zon ≤9 mm)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)
++ (zon 9<19 mm)	8 (% 27.6)	5 (% 83.3)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	13 (% 31.7)
+++ (zon 19≤29 mm)	17 (% 58.6)	1 (% 16.7)	4 (% 100)	2 (% 100)	24 (% 58.5)
++++ (zon 29<39 mm)	4 (% 13.8)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	4 (% 9.6)
+++++ (zon ≥39 mm)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)	0 (% 0.0)
Toplam	29	6	4	2	41

+: Çok dayanıklı; ++: Dayanıklı; +++: Orta derecede hassas; ++++: Hassas; +++++: Çok hassas

Tablo 3. *Erwinia amylovora*'nın dört farklı FAME gruplarındaki istatistikî olarak önemli bulunan ortalama yağ asidi oranları

FAME türleri	FAME oranları (%)*			
	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
10:0 3OH	0.13 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	2.94 <sup>b</sup>
12:0	4.57 <sup>c</sup>	3.08 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>	4.76 <sup>d</sup>
12:0 2OH	0.17 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	2.43 <sup>b</sup>
12:0 3OH	0.13 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	2.62 <sup>b</sup>
14:0	3.79 <sup>b</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>
15:0 iso	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	19.63 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>
15:0 anteiso	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	57.26 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>
16:0	31.77 <sup>c</sup>	19.68 <sup>b</sup>	12.79 <sup>a</sup>	23.81 <sup>b</sup>
16:0 3OH	0.25 <sup>a</sup>	3.76 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>
17:0 cyclo	6.61 <sup>b</sup>	3.57 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>
17:0 anteiso	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>	7.91 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>
16:1 2OH	0.0 <sup>a</sup>	1.21 <sup>b</sup>	0.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>a</sup>
18:1 w7c	12.08 <sup>b</sup>	35.71 <sup>d</sup>	0.0 <sup>a</sup>	24.63 <sup>c</sup>
Summed Future	35.52 <sup>c</sup>	27.45 <sup>b</sup>	0.15 <sup>a</sup>	37.02 <sup>c</sup>
Diğerleri**	4.08	5.21	2.26	1.68

\* Gruplar arasında istatistikî olarak önemli bulunan yağ asitlerinin benzerliği Duncan testine göre belirlenmiş olup, aynı satırdaki değişik harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemli bulunmuştur (p=0.05)

\*\* Gruplar arasında istatistikî olarak önemsiz bulunan yağ asitlerinin toplamı olarak verilmiştir

## TARTIŞMA

MIS sisteminin mikrobiyal tanıda rutin çalışmalar için gerek zaman açısından gerekse de ekonomik olması bakımından çok uygun tanı yöntemi olduğu bilinmektedir. Mikroorganizmaların yağ asidi profillerindeki farklılıklar genetiksel akrabalıkların dolaylı bir göstergesidir. Son yıllarda aynı tür bakterilerin farklı strainlerindeki yağ asidi farklılıklarının konukçu dizisine (Duran et al. 2006) ve antibiyotik duyarlılığına (Nischwitz et al., 2007) bağlı olarak değiştiğini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Bu sonuçlar MIS sisteminde elde edilen FAME profillerinin tanıya ilave olarak farklı amaçlar için de kullanılabileceğini göstermektedir.

Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlarda; genel olarak aynı gruptaki *Erwinia amylovora* strainleri arasında yağ asitleri metil ester tür ve oranları bakımından büyük bir benzerliğin olduğu; ancak gruplar arasında ise istatistikî olarak da önemli bulunan değişkenliğin olduğu görülmektedir. Bu değişkenliğin konukçu ya da izole edildikleri coğrafik alan farklılığından kaynaklanmadığı da açıktır. Çünkü aynı konukçu ve aynı coğrafik alanlardan izole edilen strainler arasında da bazı yağ asitleri yönü ile farklılıkların olduğu görülmektedir.

*Erwinia amylovora*'nın streptomisine karşı dayanıklı strainlerinin bulunduğunu gösteren birçok

çalışma mevcuttur (Schroth et al., 1971; Chiou and Jones, 1991; Sobiczewski et al., 1991; Burr et al., 1993; Saygılı and Üstün., 1996; Manulis et al., 1998; Sholberg et al., 2001; Aysan et al., 2006). Bu çalışmanın sonucu da yapılan diğer çalışmaların sonucunu desteklemesinin yanı sıra; Doğu Anadolu Bölgesi'nde bu patojenin dayanıklı strainlerinin varlığını gösteren ilk çalışma olması açısından önem arz etmektedir. Doğu Anadolu Bölgesinde çok yoğun bir bahçe tarımı yapılmadığı ve bahçeler genelde aile işletmeleri şeklinde olduğundan streptomisin kullanımının olmadığı düşünülmektedir. Buna rağmen dayanıklı strainlere rastlanma nedeni bahçe tesisinde kullanılan fidanların büyük bir çoğunluğunun başka bölgelerden gelmiş olmasıdır. Üreticilerin ülkemizde yasa dışı olarak antibiyotik kullandığı bilinmektedir. Diğer bölgelerden streptomisin uygulanmış fidanların bölgeye girişi ile bu dayanıklı strainlerin bölgeye gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Yapılan değerlendirmede streptomisine duyarlılığın konukçuya ya da lokasyona bağlı olmadığı; ancak yağ asidi profillerine bağlı olarak bazı yağ asitlerinin önem arz ettiği görülmektedir. Streptomisine karşı oluşan dayanıklılığın ikinci grupta en yüksek düzeyde (% 83.3) olduğu görülmüştür. Bu grubun diğer gruplardan yağ asitleri açısından en önemli farklılığı; 18:1 w7c yağ asidinin çok yüksek düzeyde olması (% 30.96-43.8) ve diğer grupların hiç birisinde bulunmayan 16:0 3OH (% 3.3-4.14) ve 16:1 2OH (% 0.0-2.18) yağ asidinin bu grupta bulunmasıdır. Yağ asitlerinin antibiyotiklere karşı oluşan dayanıklılık mekanizmasında rollerinin olduğu; ancak yağ asitlerinin etkinliğinin antibiyotik türüne ve bakteri türüne bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (Dunnick and O'Leary, 1970). Yapılan bir çalışmada; *Pantoea ananatis* türünün farklı strainlerindeki 12:0 yağ asidinin bakıra hassas ve dayanıklı strainlerde farklılık arz ettiği belirtilmektedir (Nischwitz et al., 2007). Ancak *Erwinia amylovora* ile ilgili benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; Doğu Anadolu Bölgesi'nde *Erwinia amylovora* strainlerinde streptomisine karşı dayanıklılığın geliştiği belirlenmiştir. MIS sisteminin bu patojenin tanısında başarılı bir şekilde kullanılabilmesinin yanı sıra, elde edilen FAME profillerinin antibiyotiklere duyarlılığın da bir göstergesi olduğu ve bunun laboratuvar şartlarında antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde yeni bir yöntem olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ancak, farklı tür patojenlerde de benzer çalışmaların yapılarak sonuçların çok daha ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aysan, Y., Mirik, M., Sahin, F., Kotan, R. and Saygılı, H., 2006. Phenotypic characterization of *Erwinia amylovora* from pome fruits in Turkey. *Acta Hort*, 704, 459-464
- Beer, S. V. 1990. Fire blight in : Compendium of Apple and Pear Disease (Edts. A. L. Jones and H. S. Aldwinckle). 61-63 APS Press, St. Paul, Minesota USA.
- Beer, S. V. and Opgenorth, D. C., 1976. *Erwinia amylovora* on fire blight canker surfaces and blossoms in relation to disease occurrence. *Phytopathology*, 66, 317-322.
- Burr, T. J., Norelli, J. L., Reid, C. L., Capron, L. K., Nelson, L. S., Aldwinckle, H. S. and Wilcox, W. F., 1993. Streptomycin-resistant bacteria associated with fire blight infections. *Plant Dis.*, 77, 63-66.
- Chiou, C. S. and Jones, A. L., 1991. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 81, 710-714.
- Demir, G. ve Gündoğdu, M., 1991. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında görülen ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.*) hastalığı üzerinde araştırmalar. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildiriler, 7-11 Ekim, İzmir, Türkiye, 299-302.
- Dunnick, J. K. and O'Leary, W. M., 1970. Correlation of bacterial lipid composition with antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 892-900.
- Duran, M., Haznedaroglu, B. Z. and Zitomer, D. H., 2006. Microbial source tracking using host specific FAME profiles of fecal coliforms. *Water Research*, 40, 67-74.
- Kotan, R. 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde Yetiştirilen Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarından İzole Edilen Patojen ve Saprofitik Bakteriyel Organizmaların Klasik ve Moleküler Metodlar ile Tanısı ve Biyolojik Mücadele İmkanlarının Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 217.
- Kotan, R., Sahin, F., and Ala, A., 2006. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruits trees in eastern Anatolia region of Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113 (1), 8-13.
- Manulis, S., Zutra, D., Kleitman, F., Dror, O., David, I., Zilberstaine, M. and Shabi, E., 1998. Distribution of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. *Phytoparasitica*, 26 (3): 223-230.
- Miller, I., and Berger, T., 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Hewlett-Packard Gas Chromatography Application Note, Hewlett-Packard Co., Alto, CA., 228-238.
- Mirik, M., 2000. Amasya ve Tokat illerinde yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarındaki ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.*) hastalığının oranı, duyarlı ve dayanıklı çeşitlerin tespiti. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Momol, M. T., 1990. Ateş yanıklığının epidemiyolojisi ve mücadelesi. *Ak. Ü. Zir. Fak. Derg.*, 3, 1-2, 25-38.
- Momol, M. T., Yeğen, O., Basım, H., Rudolp, K. ve Zachowski, M. A., 1991. Batı Akdenizde *Erwinia amylovora*'nın neden olduğu ateş yanıklığının epidemisi ve mücadelesi. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 7-11 Ekim, İzmir, Türkiye, 301-305.
- Nischwitz, C., Gitaitis, R., Sanders, H., Langston, D., Mullinix, B., Torrance, R., Boyhan, G. and Zolobowska, L., 2007. Use of fatty acid methyl ester profiles to compare copper-tolerant and copper-sensitive strains of *Pantoea ananatis*. *Phytopathology*, 97 (10), 1298-1304.
- Öktem, Y. E. and Benlioğlu, K., 1988. Studies on fire blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.*) of pome fruits. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 17 (3), 106.
- Paisley, R., 1995. MIS whole cell fatty acid analysis by gas chromatography. MIDI, Inc., Newark, DE, 5.

- Saygılı, H. and Üstün, N., 1996. Studies on effectiveness of some chemicals to fire blight pathogen (*Erwinia amylovora* Burr. Winslow *et al.*). Acta Hort., 411, 331-335.
- Schroth, M. N., Thomson, S. V. and Moller, W. J., 1971. Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. Phytopathology, 69, 565-568.
- Sholberg, P. L., Bedford, K. E., Haag, P. and Randall, P., 2001. Survey of *Erwinia amylovora* isolated from British Columbia for resistance to bactericides and virulence on apple. Can. J. Plant. Pathol., 23: 60-67.
- Smith, E. F., 1920. An introduction to bacterial diseases of plants. W. B. Saunders, Philadelphia, 1, 688.
- Sobieczewski, P., Chiou, C. S. and Jones, A. L., 1991. Streptomycin-resistant epiphytic bacteria with homologous DNA for streptomycin resistance in Michigan apple orchards. Plant Dis., 75, 1110-1113.
- Stead, D. E., 1992. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 281-295.
- Tokgönül, S., 1991. Doğu akdeniz bölgesinde armutlarda ateş yanıklığı hastalığı *Erwinia amylovora* (Burr. Winslow *et al.*)'nın tanısı ve yaygınlık durumu üzerine araştırmalar. Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü, 49, Adana, Türkiye.
- Turan, K. ve Tokgönül, S., 1993. Akdeniz Bölgesi meyve fidanlıklarında görülen fungal ve bakteriyel hastalıkların tespiti üzerinde çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 33 (3-4), 109-118.
- Van der Zwet, T. and Keil, H. L., 1979. Fire Blight-A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. U. S. Dep. Agric. Handb., 510, USA.
- Van der Zwet, T., Zoller, D. C. and Thomson, S. V., 1988. Controlling fire blight of pear and apple by accurate prediction of the blossom blight phase. Plant Dis., 72, 467-472.
- Watkins, J. E., 1992. Fire blight of apple, pear and woody ornamentals. NebGuide, G92-1120-A.