

Niğde ilinde yetiştirilen patateslerdeki adi uyuz hastalık etmeni *Streptomyces* türlerinin belirlenmesi

Determination of *Streptomyces* species causing common scab disease on potato in Niğde Province

Nida ÜNLÜ¹ , Eminur ELÇİ¹ 

¹Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Niğde.

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Makale tarihçesi / Article history:

DOI: [10.37908/mkutbd.1092635](https://doi.org/10.37908/mkutbd.1092635)

Geliş tarihi / Received: 24.03.2022

Kabul tarihi / Accepted: 02.06.2022

Keywords:

Potato, *Streptomyces* spp., common scab, PCR, 16SrRNA, dendrogram.

✉ Corresponding author: Eminur ELÇİ

✉: eminur@gmail.com

Ö Z E T / A B S T R A C T

Aims: Potato is highly cultivated in Niğde province of Turkey with a total production area of 238,000 decares. Pests and diseases are the key biotic factors that causes huge annual yield losses in potato crop. Among the diseases, potato common scab caused by a soil-borne pathogen (*Streptomyces* species) results in enormous yield loss. The aim of this study is to determine *Streptomyces* species causing common scab disease on potato in Niğde province and molecular characterization of *Streptomyces* isolates.

Methods and Results: Symptomatic potato tubers infected with common scabies were collected from potato growing areas of Niğde. Bacterial isolations were done from those symptomatic tubers and a total of 28 bacterial isolates were selected for further analysis. Morphological identification and pathogenicity tests were performed using potato discs. The obtained pathogenic isolates were identified by 16SrRNA primers.

Conclusions: In this study, the incidence of potato common scab in potato production areas of Niğde province was determined. The isolates that can cause severe diseases were identified as *Streptomyces scabiei* by both morphological and molecular techniques.

Significance and Impact of the Study: This study is the first molecular identification of causal agents of potato common scab in Niğde province. Moreover, it is very important to know the main cause i.e., *Streptomyces scabiei* of this disease to avoid yield losses of potato crop. Hence, detailed analysis are still under process for *Streptomyces* species. In addition, these findings provide significant information for further studies of potato common scab disease.

Atıf / Citation: Ünlü N, Elçi E (2022) Niğde ilinde yetiştirilen patateslerdeki adi uyuz hastalık etmeni *Streptomyces* türlerinin belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(3) : 402-412. DOI: 10.37908/mkutbd.1092635

GİRİŞ

Patates (*Solanum tuberosum* L.), patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasından dünyada ve ülkemizde önemli kültür çeşitlerinden biri olup anavatanı Güney Amerika'nın And Dağları olan ve yaklaşık olarak 8000 yıldır yetiştiriciliği yapılan bir bitkidir. Dünyada en önemli patates üreticisi olan ülkeler Çin, Hindistan,

Rusya, ABD ve Ukrayna'dır. Ülkemiz, dünya patates üretiminde 17. sırada yer almaktadır (FAO, 2020). Toprak ve iklim özellikleri bakımından patates yetiştiriciliği için oldukça uygun olan ülkemizde patates üretim miktarı incelendiğinde; 622.435 ton ile Konya ili birinci sırada bulunmakta olup 575.627 ton ile Niğde ili ikinci, 562.927 ton ile Afyonkarahisar üçüncü, 520.948 ton ile Kayseri dördüncü, 447.092 ton ile İzmir beşinci

ve 295.503 ton ile Nevşehir altıncı sırada yer almaktadır (TÜİK, 2021).

Patates yetiştiriciliği yapılan arazilerde hastalık ve zararlılar oldukça ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Patates üretiminde kalite ve ürün kaybı açısından biyotik etmenlerin (bakteriler, funguslar, virüsler, viroidler, fitoplazmalar) yanı sıra, abiyotik faktörler (don, dolu, rüzgâr, kuraklık) de olumsuz etki etmektedir (Agrios, 2005). Bu kayıplar içerisinde bitki patojenlerinin neden olduğu hastalıklar önemli bir yere sahiptir. Patateste hastalığa neden olan bakteriyel etmenler göz önüne alındığında; Karabacak ve Yumuşak Çürüklük hastalık etmeni *Pectobacterium caratovororum* subsp. *atroseptica* (*Erwinia caratovora* subsp. *atroseptica*), *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* (*Erwinia caratovora* subsp. *caratovora*) ve *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysantemi*), Bakteriyel Solgunluk etmeni *Ralstonia solanacearum*, Bakteriyel Halka Çürüklüğü etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Patates Adi Uyuz etmeni (*Streptomyces* spp.) ile fitoplazmalardan Stolbur hastalık etmeni *Candidatus Phytoplasma solani* gibi etmenlerden dolayı patateste oluşan hastalıklar ön sıralarda görülmektedir (Han ve ark., 2005; Gudmestad ve Secor 2007; Holeva ve ark., 2014; Öztürk ve ark., 2016; Öztürk, 2017; Öztürk ve Aksoy, 2017; Öztürk ve ark., 2018; Saygılı ve ark., 2019; Sadunishvili ve ark., 2020; Öztürk, 2022; Öztürk ve Soylu, 2022).

Bu hastalıklar arasında Patates Adi Uyuz hastalığı yetiştiricilik yapılan alanlarda önemli derecede kalite ve verim kaybına, ayrıca ürünün pazar değerinde azalmaya neden olmaktadır. Hastalığın etmeni başta *Streptomyces scabiei* olmak üzere birçok farklı *Streptomyces* türü (*S. acidiscabies*, *S. aureofaciens*, *S. collinus*, *S. europaeiscabiei*, *S. intermedius*, *S. luridiscabiei*, *S. niveiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. reticuliscabiei*, *S. setonii*, *S. stelliscabiei* ve *S. turgidiscabies*, *S. bobili*, *S. galilaeus*, *S. griseoplanus*, *S. pratensis*, *S. xiamenensis*) patates yumrularında hastalığa neden olabilmektedir (Stead ve Wale, 2004; Cui ve ark., 2021; Henao ve ark., 2021). Hastalık etmeninin yumru üzerinde neden olduğu yaralar diğer mikroorganizmalar (fungus, nematod, bakteriler) için bir giriş kapısı olarak işlev görmektedir (Karahan, 2006). Hastalık etmeni; Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Japonya, Kore, Kanada, Finlandiya, Danimarka, Fransa, İngiltere, Hollanda, Güney Afrika, Norveç, Çin ve Rusya olmak üzere patates yetiştiriciliği yapılan birçok yerde bildirilmiştir (Karagöz, 2013; Fyans ve ark., 2016; Jordaan ve Van der Waals, 2016; Cui ve ark., 2021).

Ülkemizde ise *S. scabiei* makroskopik olarak tespit edilmiş (Bremer, 1948). Karahan (2006), Orta Anadolu

bölgesinde Afyon, Bolu, Nevşehir, Niğde illerinde arazi çalışmaları yapmış ve yapılan çalışma sonucunda elde edilen izolatlardan 48 izolatı patojen olarak tespit etmiştir. Bunlardan 29 tanesi *Streptomyces scabies*, iki tanesi *S. reticuliscabiei* ve bir tanesi *S. turgidiscabies* olarak tanılanmıştır. Karagöz, (2013) Erzurum ilinde yürüttüğü çalışmada 114 fitopatogen *Streptomyces* straini elde etmiş ve bunlardan 47 tanesini *S. scabiei*, 15 tanesini *S. bottropensis*, sekiz tanesini *S. stelliscabiei*, beş tanesini *S. setonii*, dört tanesini *S. eupopascabiei*, dört tanesini *S. violaceus*, üç tanesini *S. puniscabiei*, iki tanesini *S. luridiscabiei* ve iki tanesini *S. intermedius* olarak tanılanmıştır.

Patates adi uyuz hastalığına neden olan *Streptomyces* türleri; *Bacteria* alemi, *Actinobacteria* şubesi, *Actinobacteria* sınıfı, *Actinomycetales* takımı, *Streptomycetaceae* familyası, *Streptomyces* cinsi içinde yer almaktadırlar. Gram pozitif bakteriler olan *Streptomyces* türleri ipliğimsi bakteriler olup, oluşturdukları 0.5-2.0 µm çapındaki vejetatif hifleriyle substrat miselyum üretebilmektedir. Bu miselyum üzerinde havai hifler oluşmakta ve bu hiflerin kırılmasıyla da üç veya daha fazla spordan oluşan zincirler meydana gelmektedir. Düz, spiral veya dalgalı bir yapıya sahip olabilen bu zincirler *Streptomyces* türleri için önemli bir taksonomik karakterdir. *Streptomyces* spp. toprakta, suda, insan ve hayvanlarda, bitkilerde olmak üzere birçok yerde bulunabilmektedirler ve doğal olarak oluşan antibiyotiklerin üçte-ikisini üretebilmektedirler (Mohanraj ve Sekar, 2013). *Streptomyces* türlerinin ürettiği antibiyotiklerin (aktinomisinler, streptotrisinler, streptomisinler, neomisin, tetrasiklinler, novobiosinler, polienler, aminoglikozitler) antimikrobiyal etkinlikleri açısından birçok alanda oldukça önemlidir. *Streptomyces*'in bazı türlerinin aktif sekonder metabolitler oluşturduklarının tespitinden sonra bitki hastalıkları ile biyolojik mücadele ajanı olarak da çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Loria ve ark., 1997).

Hasattan sonra tarladan temizlenmeyen bitki artıkları ve enfekteli tohumluk ile bulaşabilen adi uyuz hastalığı ile mücadelede dayanıklı çeşitlerin kullanılması, temiz tohumluk kullanılması, toprak pH'sının düşürülmesi, ekim nöbeti, kimyasal kullanımı ve biyolojik mücadele gibi mücadele yöntemleri kullanılmaktadır (Karagöz, 2013). *Streptomyces* türlerinin tanısı üzerine yapılan çalışmalar 1940' lı yıllardan sonra artarak devam etmiştir. Bunun sebebi ise ürettikleri antibiyotiklerin belirlenmiş olmasıdır. Bu gelişme ile birlikte çok fazla sayıda *Streptomyces* türü kayıt edilmiştir (Anderson ve Wellington, 2001). Bazı isimlendirmeler çok fazla sayıda

izolata verildiğinden sistemde karışıklık olmaya başlamasından sonra ISP (International *Streptomyces* Project) sistemi kurulmuş ve tanı çalışmaları için standartlar getirilmiştir. Elde edilen izolatlar spor zincir şekli, spor rengi, pigment üretimi, belirli karbon kaynağını kullanabilme gibi kriterlere göre tanılanabilmektedir (Karahan, 2006). Günümüzde moleküler çalışmaların hız kazanması ile tanı çalışmalarında kullanılan bu kriterleri destekleyecek birçok moleküler yöntemler kullanılabilmektedir (Flores-González ve ark., 2008; Lerat ve ark., 2009; Wanner, 2009; Leiminger ve ark., 2013; Lapaz ve ark., 2017; Cui ve ark., 2021).

Streptomyces cinsindeki bitki patojenitesi, adi uyuz hastalığının karakteristik simptomlarını uyaran toksin thaxtomin üretimine dayanır. Thaxtomin, bitki dokularının genişlemesinde bitki hücresi hipertrofini uyarır. *Nec1* ve *tomA* genleri adi uyuz hastalığına neden olan çok çeşitli *Streptomyces* ırklarında bulunurlar. *Nec1* geni, bitki dokusunda nekroza neden olan bir proteini kodlamaktadır. *TomA* geni ise, bitki patojenik funguslarında bulunan saponinazlara ait bir enzim olan tomatinaza homolog bir virülenslik faktörünü kodlamaktadır. *TxtA*, *txtB*, *txtC* ve *txtR* gibi thaxtomin üretimi ile ilişkili genler, PAI'nın 'toksikojenik bölge' olarak adlandırılan birinci bölümünde bulunurken, ikinci segmentte bulunan virülenslikle ilgili *tomA* ve *nec1* genleri, 'kolonizasyon bölgesi' olarak adlandırılmıştır (Lerat ve ark., 2009).

Bu çalışma ile patates üretiminin oldukça yoğun bir şekilde yapıldığı Niğde ilinde patates yetiştiriciliği yapılan bölgelerde patatesteki adi uyuz hastalığına neden olan *Streptomyces* türleri morfolojik ve moleküler olarak tanılanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Arazi çalışmaları

Arazi çalışmaları 2021 yılında Niğde ilinde patates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Altunhisar, Konaklı, Yeşilgölcük, Alay, Ağcaşar, Edikli, Orhanlı, Yıldıztepe, Karatlı, Aşlama kasabaları ve Elmalı köyü olmak üzere toplam 11 farklı bölgede yürütülmüştür. Patates hasat döneminde gidilen toplam 24 tarlada (2000 da) incelemeler yapılarak; üzerinde çukur, kabarık ve yüzeysel ağ şeklinde oluşan tipik uyuz lezyonları gösteren patates yumruları toplanmıştır (Henao ve ark., 2021).

Streptomyces türlerinin izolasyonu ve morfolojik karakterizasyonu

Araziden toplanan lezyonlu yumrular %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) içerisinde 3 dakika bekletilmiştir. Ardından 3 defa steril distile sudan geçirilerek yüzeysel dezenfeksiyonları tamamlanmıştır. Kahverengi-siyah lezyon gösteren kısım steril bir bisturi yardımıyla kesilerek temizlenmiş ve sonra alttaki saman sarısı renkli kısımdan 500 mg doku alınıp 1 ml steril distile su ile steril havan içerisinde homojenize edilmiş ve bu süspansiyondan 100 µl alarak içerisinde cycloheximide ilave edilmiş olan su agar (1 L dH₂O, %1.5 agar) besiyerine cam baget yardımı ile ekim yapılmıştır. Petriler 30°C'deki inkübatörde iki hafta geliştirilmiştir. Su agar besiyerinde gelişen tozlu ipliğimsi koloni morfolojisine sahip izolatlar seçilerek Yeast-Malt Extract (YME) (4.0 g yeast ekstrakt, 10 g malt ekstrakt, 4.0 g dextrose 1 L dH₂O) agar besiyerine ekilmiş ve saflaştırılmıştır. YME agar besiyerinde saf bir şekilde geliştirilen kültürler öze yardımı ile 30 ml Tryptic soy broth (TSB) (40 g TSBA, 1 L dH₂O) besiyeri içeren erlenlere aktararak, orbital çalkalayıcıda 30°C'de, 120 rpm'de yedi gün geliştirilmiş ve %30'luk gliserol içerisinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *Streptomyces scabiei* (Acc. No: KR422360.2) izolatu, Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ' den (Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) temin edilmiştir.

Streptomyces türlerinin morfolojik karakterizasyonu

Morfolojik karakterizasyon için, *Streptomyces* türlerinin kolaylıkla spor verdikleri YME agar besiyeri kullanılmıştır. YME agarda gelişen bakteri izolatları spor rengi, spor zincir şekli ve pigment üretimlerine göre değerlendirilmiştir. İzolatların iyi bir şekilde spor vermesi beklenmiş ve mikroskopta 40x'de direkt olarak incelenmiştir (Pridham ve Gottlieb, 1948; Shirling ve Gottlieb, 1966). İzolatların pigment oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için Pepton Yeast Extract Iron Agar (PYI) (6.0 g pepton iron agar, 1.0 g yeast ekstrakt 1 L dH₂O) kullanılmıştır. Bakteri izolatları besiyerine ekim yapıldıktan sonraki 2. ve 4. günlerde renk değişikliği kontrol edilerek ve yeşilimsi kahve, kahverengimsi siyah, siyah veya kahverengi tonlarında görülen pigment oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lambert ve Loria, 1989).

Patates diskleri ile patojenisite testleri

Sağlıklı patates yumruları yıkanarak %1'lik sodyum hipoklorit (NaClO) içerisinde 3 dakika bekletildikten sonra 3 defa steril distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra %70'lik etil alkole daldırılmış ve alkolün uçması

beklenmiştir. Steril bir bistüri yardımı ile patatesin kabuk kısmı soyulmuş ve 1 cm kalınlığında 3 cm çapında diskler kesilmiştir. Kesilen diskler steril saf sudan geçirilerek hemen kurutulup içerisinde nemli kurutma kağıdı bulunan petrilere yerleştirilmiştir. Ardından YME besiyerinde iki hafta geliştirilmiş olan şüpheli izolatlardan diskler alınarak hazırlanan patates disklerinin üzerine kapatılmıştır. Petrilere parafilm ile kapatılmış ve 28°C'deki inkübatörde 3-6 gün bırakılmıştır (Heno ve ark., 2021).

Streptomyces türlerinin moleküler karakterizasyonu

DNA izolasyonu ticari kit olan "Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Microprep Kit –ZymoResearch-D6007" yardımı ile izole edilmiştir. İlk olarak, YME agar besiyerinde geliştirilmiş kültürler öze yardımı ile 30 ml Tryptic soy broth (TSB) (40 g TSBA, 1 L dH₂O) besiyeri içeren erlenlere aktararak, orbital çalkalayıcıda 30°C'de, 120 rpm'de 2 gün geliştirilmiştir. Ardından kültürler 11 000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek, dipte kalan pellet alınıp ve steril havanlarda sıvı azot ve havan eli yardımı ile ezilmiştir. Ardından 20 mg/ml lizozim takviye edilerek TE buffer içeren tüplere aktarılmıştır. Ticari kitin aşamaları uygulanarak izole edilen DNA'nın miktarı, BioSpec spektrofotometre yardımı 50 ng/µl ayarlanmıştır. Elde edilen DNA'lar 16s rRNA genel primerleri 16S1F (5'CATTACGGA GAGTTTGATCC 3') 16S1R (5' AGAAAGGAGGTGATCCA GCC 5') (Wanner, 2006; Dees ve ark., 2013; Karagöz, 2013) ile PCR analizleri yapılmıştır. PCR; toplam hacim 25 µl olacak şekilde 5 µl 5× PCR buffer, 1 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl primer seti (10 µM), 0,2 µl Taq polimeraz (500 ünite/µl), içeren reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PCR reaksiyonları 40 döngü 94 °C'de 4 dak., 94 °C'de 30sn, 50-60°C'de 45 sn, 72 °C'de 1 dak., 72 °C'de 10 dak. olarak gerçekleştirmiştir. PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde 120 V akımda 45 dakika yürütülmüştür (Leiminger ve ark., 2013). Sybr Gold ile boyama işleminden sonra jel görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntülenmiştir.

DNA dizileme ve filogenetik analizler

Elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizi, ABI 3730 Automated Genetic Analyzer cihazı kullanılarak hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (MedSanTek, İstanbul). Elde edilen diziler BLAST (NCBI) analizlerine tabii tutulmuştur. Çoklu eşleştirmeler (Multiple alignment), genetik varyasyon ve filogenetik analizler MEGAX yazılımı kullanılarak neighbor-joining metodu ile 1000 bootstrap tekrarı ile yapılmıştır (Tamura ve ark., 2011).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Arazi çalışmaları

2021 yılında Niğde ilinde patates üretiminin yoğun olarak gerçekleştirildiği Altunhisar, Konaklı, Yeşilgölcük, Alay, Ağcaşar, Edikli, Orhanlı, Yıldıztepe, Karatlı, Aşlama kasabaları ve Elmalı köyü olmak üzere toplam 11 farklı bölge hasat döneminde incelenmiştir. Arazi çalışmaları kapsamında gidilen her bir tarladan hasat edilen yumrulardan üzerinde çukur, kabarık ve yüzeysel ağ şeklinde oluşan tipik uyuz lezyonları gösteren ortalama 10 adet yumru (Şekil 1) örneği toplanmıştır. Yapılan survey çalışmalarında çukur ve kabarık uyuz lezyonları ağırlıklı olmak üzere yüzeysel ağ şeklinde lezyonlarına ise daha az oranda rastlanılmıştır.



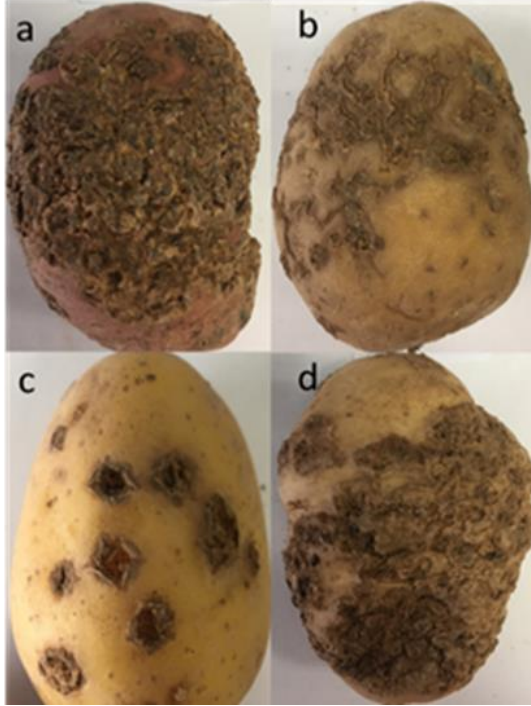
Şekil 1. Niğde ili patates arazilerinden toplanan lezyonlu patates yumruları

Figure 1. Potato tubers containing disease lesions collected from potato fields in Niğde province

Streptomyces türlerinin izolasyonu ve morfolojik karakterizasyonu

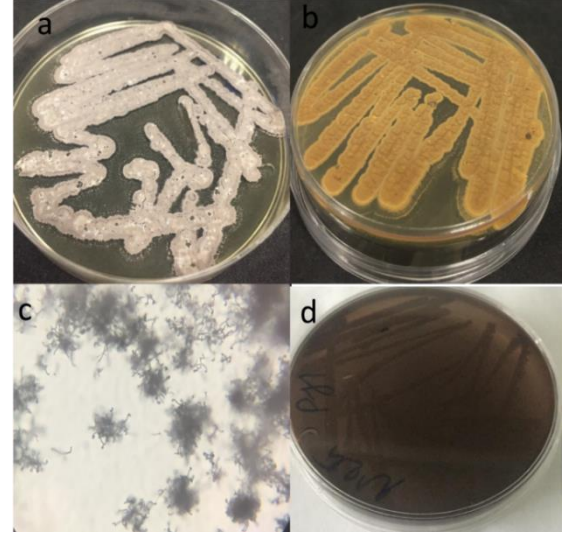
Arazi çalışmalarında toplanan kabarık, yüzeysel ağ, çukur, düzensiz ve mantarimsı lezyonlar gösteren lezyonlu yumru örneklerinden her bir tarla için üçer adet olmak üzere 72 tane yumru seçilerek izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 2). Yaklaşık iki hafta su agar besiyerinde geliştirilen örneklerden birbirinden farklı olabileceği düşünülen tozlu ipliğimsi tipik *Actinomyces* grubu koloni morfolojisi gösteren 28 farklı bakteri izole edilerek YME agar besiyeri

kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen bakteri izolatları YME agar besiyerine ekilerek 28 °C'de iki haftalık inkübasyon sonunda spor gelişimleri gözlemlenmiştir. Tüm izolatların YME agar besiyerinde geliştiği belirlenerek sonraki testler için kullanılmıştır.



Şekil 2. Patates yumruları üzerinde kabarıklık (a), yüzeysel ağ (b), çukur (c), düzensiz ve mantarimsı (d) lezyonlar
Figure 2. Observed disease symptoms were raised (a), superficial (b), deep-pitted (c), irregular and fungal-like (d) lesions on potato tubers.

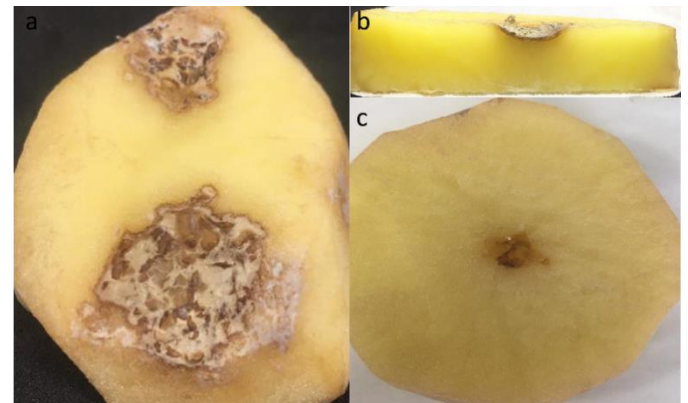
Elde edilen bakteri izolatlar YME agarda yaklaşık olarak iki hafta geliştirilmiş ve spor vermeleri sağlanmıştır. Spor veren bakteri izolatları spor rengi (Şekil 3a), YME agarda oluşturduğu koloni rengine (Şekil 3b), spor zincir şekli (Şekil 3c) ve PYI agarda (Şekil 3d) melanin üretimine göre sınıflandırılmıştır. Yapılan morfolojik karakterizasyon sonucunda elde edilen izolatların çoğunun ürettikleri spor renginin gri, YME agarda kahverengimsi sarı koloniler oluşturdukları, spiral spor zincirine sahip oldukları ve PYI agarda melanin üretebildikleri gözlemlenmiştir (Karahana, 2006; Hao ve ark., 2009; Karagöz, 2013; Lapaz ve ark., 2017).



Şekil 3. Aday *Streptomyces* izolatlarının oluşturduğu gri spor(a), YME agarda kahverengimsi sarı koloniler (b), spiral spor zincir (c), melanin pigment oluşumu (d)
Figure 3. Formation of gray spores (a), Brownish yellow colonies on YME agar (b), spiral spore chain (c), melanin pigment formation (d) by candidate *Streptomyces* isolates

Patates diskleri ile patojenisite testleri

Morfolojik olarak tanılanan 28 adet bakteri izolatı patates diskleri kullanarak patojenisite testleri yapılmıştır (Şekil 4). Patojenisite testi sonucunda 24 adet izolatın patojen olduğu belirlenmiştir. Patojen izolatları patates diskleri üzerinde çökük ve yüzeysel kahverengi lezyonlara ve çürümeye sebep olmuştur (Karahana, 2006; Hao ve ark., 2009; Karagöz, 2013; Lapaz ve ark., 2017). Kullanılan 72 adet lezyonlu yumru örneğinden 21 tanesinde patojen bakteri izolatı elde edilmiştir.

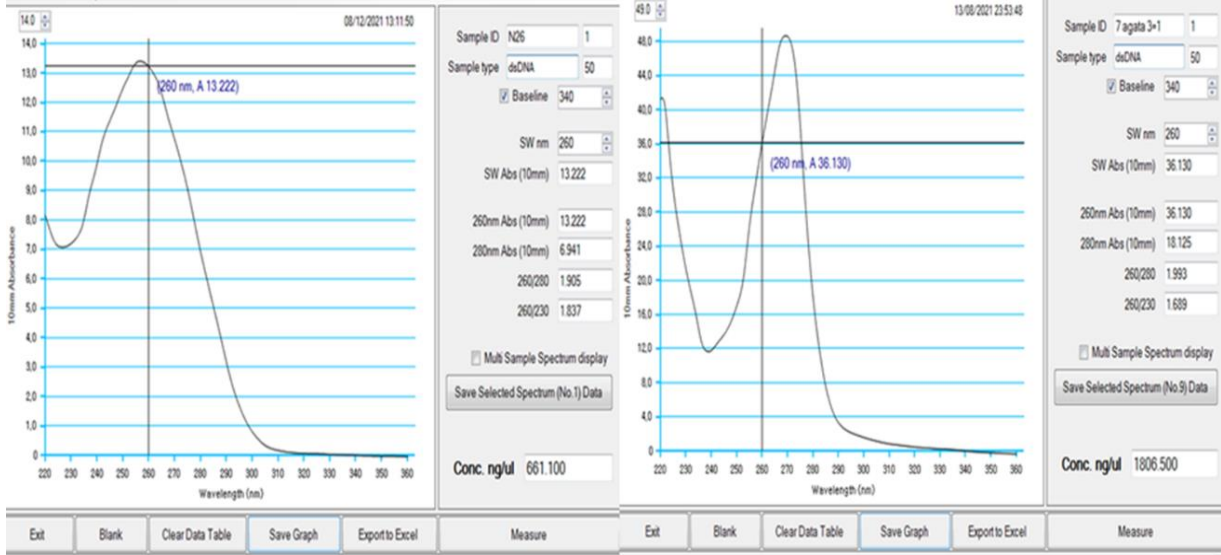


Şekil 4. Aday *Streptomyces* izolatlarının patates disklerinde oluşturduğu yüzeysel (a), çökük (b) kahverengi lezyonlar ve negatif kontrol (c)
Figure 4. Superficial (a), deep pit (b) brown lesion and negative control (c) caused by candidate *Streptomyces* spp. on potato tuber slices

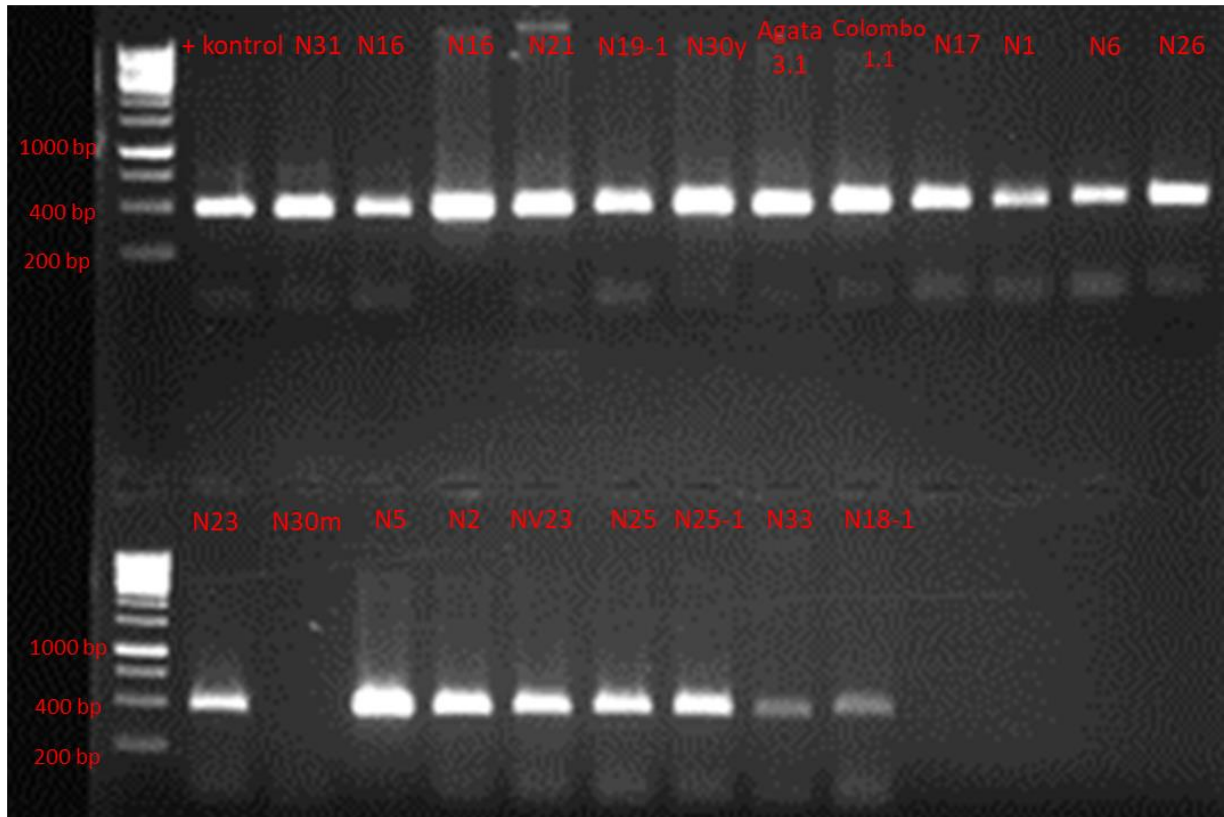
Streptomyces türlerinin moleküler karakterizasyonu

Morfolojik olarak aynı özellikleri gösteren ve patojenisite testi sonucunda patojen olduğu belirlenen 24 bakteri izolatından kit yardımı ile DNA izolasyonu yapılmıştır (Şekil 5). Elde edilen DNA' lar 16SrRNA genel primerleri (16S1F, 16S1R) ile PCR analizleri

gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu kısmında 21 adet bakteri izolatu 400 bp'lık amplifikasyon ürünü DNA bantları vermiş (Şekil 6) ve bu ürünlerden 2 tanesi nükleotid analizleri sonucunda *Streptomyces scabiei* olarak tanılanmıştır.



Şekil 5. Aday *Streptomyces* türlerinin DNA'larının nanodrop spektrofotometrede saflık ölçümü
Figure 5. Purity measurement of DNA of *Streptomyces* species in nanodrop spectrophotometer



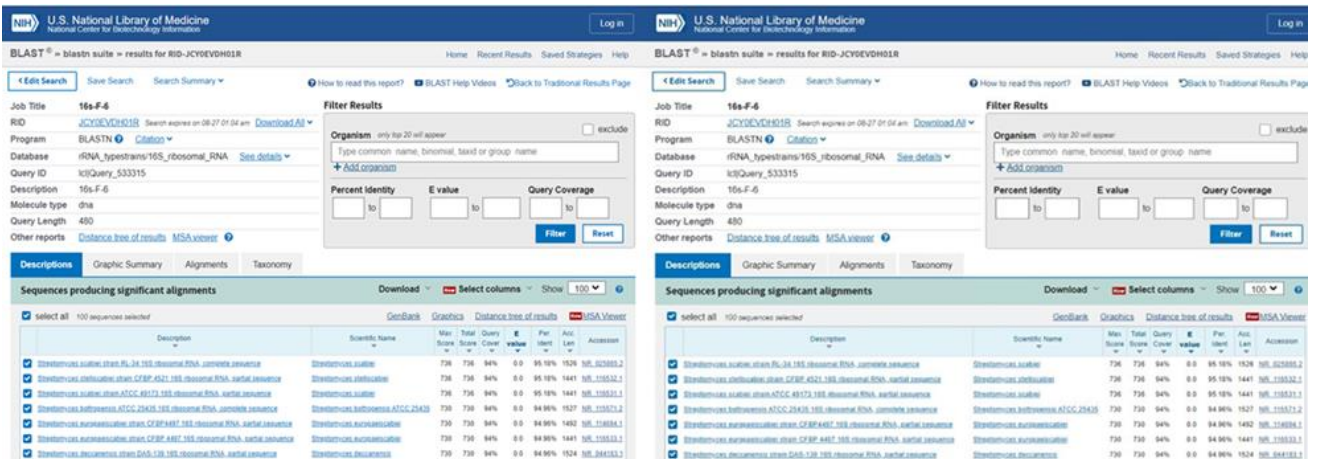
Şekil 6. *Streptomyces* izolatlarının 16SrRNA genel primerleri ile çoğaltılan PCR ürünleri
Figure 6. Gel electrophoresis results of PCR analysis of candidate *Streptomyces* species by 16SrRNA primers.

Daha önce yapılan çalışmalarda; Wanner (2006) *Streptomyces* türlerinin moleküler karakterizasyonu için 16SrRNA genel ve türe spesifik primerlerini kullanarak PCR analizi ile cins düzeyinde tanılamıştır. Tanılanan izolatların patojenisite ile ilgili olduğu bilinen *Nec1*, *TxtA*, *TxtAB* ve *TomA* genleri üzerinde çalışmalar yapmıştır. İzolatları *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. acidiscabies* ve *S. bottropensis* olarak tanılamış ve çoğu izolatta *Nec1*, *Txt*, *TomA* genlerinin varlığını pozitif olarak değerlendirmiştir. Dees ve ark. (2013) çalışmalarında Norveç’ de hastalık belirtisi gösteren patates yumrularından 957 bakteri izolatu elde etmişlerdir. Bu izolatları *TxtAB* genine göre değerlendirmişler ve 223 tanesini patojen olarak tespit etmişlerdir. Ardından evrim sürecinin başlarından günümüze kadar korunmuş bölgelere sahip olan *Streptomyces* cinsi içerisinde yatay gen transferlerinin saptanması için oldukça önemli bir yere sahip olan 16S rRNA genel primerlerini kullanarak *Streptomyces* spp. olarak tanılamışlardır. Kesin tür tanısı için *ScabI/II* ve *TurgI/II* spesifik primerlerinin kullanarak PCR yapmışlar ve 152 izolat *ScabI/II* primerleri için pozitif, 71 izolat ise *TurgI/II* primerlerinde pozitif sonuçlar vermiştir. Karagöz (2013) Erzurum ilinde patates yetiştiriciliği yapılan alanlarda surveyler yapmıştır. Yumrulardan elde ettiği izolatları patojenisite testi, spor zinciri şekli ve rengi, toksik maddelere duyarlılık, melanin ve çözünebilir pigment üretimi ve moleküler metotlarla tanılamıştır. Mikrobiyal tanı sistemi (MIS) kullanılarak izolatların yağ asidi metil ester profilleri belirlemiş ve patojenite bölgelerindeki hedef genlerin (*TxtAB*, *Nec1*, *TomA*) varlığını araştırmıştır. Toplam 114 patojen *Streptomyces* izolatının 47’sini *Streptomyces scabiei*, 15’ini *S. bottropensis*, 8’ini *S. stelliscabiei*, 5’ini *S. setonii*, 4’ünü *S. eupopascabiei*, 4’ünü *S. violaceus*, 3’ünü *S. puniscabiei*, 2’sini *S. luridiscabiei* ve 2’sini de *S. intermedius* olarak tanılamıştır. Yapılan analizler ile izolatların patojenite bölgelerinde *TxtAB* ve *Nec1* ve *TomA* genlerini sırasıyla %90, %94 ve %95 oranında var olduğunu bildirmiştir. Leiminger ve ark. (2013) Almanyada patates yetiştiriciliği yapılan alanlarda surveyler yapmışlar ve 293 izolat elde etmişlerdir. Elde edilen izolatları morfolojik olarak ve patojenisite testleri ile tanılamışlardır. Moleküler tanılamada ise 16S rRNA türe spesifik primerler ve Thaxtomin A genine spesifik primer kullanarak yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda izolatları *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. acidiscabiei*, *S. turgidiscabiei* ve *S. bottropensis* olarak tanılamışlar ve Almanyada en yaygın olan türü *S. europaeiscabiei* olduğunu bildirmişlerdir. Fyans ve ark. (2016) Kanada da patates yetiştiriciliği yapılan alanlarda surveyler yapmışlar ve 17 adet bakteri izolatu elde

etmişlerdir. İzolatları morfolojik ve biyokimyasal testler ile tanılamışlar ve turp fidelerine inokule etmişlerdir. Moleküler tanılama için patojenisite ile ilgili olan *Nec1* ve *TomA* gen bölgelerine spesifik primerler kullanarak izolatlardan 8 tanesini *S. europaeiscabiei* olarak tanılamışlardır. Henao ve ark. (2021) Kolombiya’ da yaptıkları surveylerde adi uyuz hastalığının spesifik semptomları olan yüzeysel ağ, derin ve yüzeysel çukur gibi semptomlar gözlenen patates yumrularını toplamışlar ve 33 adet izolat elde etmişlerdir. Elde edilen izolatlar ile patates diskleri ve turp fidelerini kullanarak patojenisite testleri yapmışlardır. Patojen olduğunu belirledikleri izolatların moleküler tanısı için 16SrRNA genel primerleri ve patojenisite ile ilgili *Nec1*, *txtAB*, *txtA* genlerine spesifik primeleri kullanarak PCR analizi yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda; 33 izolatın 17 tanesi patojen olarak tespit etmişlerdir. Patojen izolatların *S. pratensis* ve *S. xiamenensis* olarak tanılanırken bir kısmı henüz tanılanamamıştır.

Filogenetik analizler

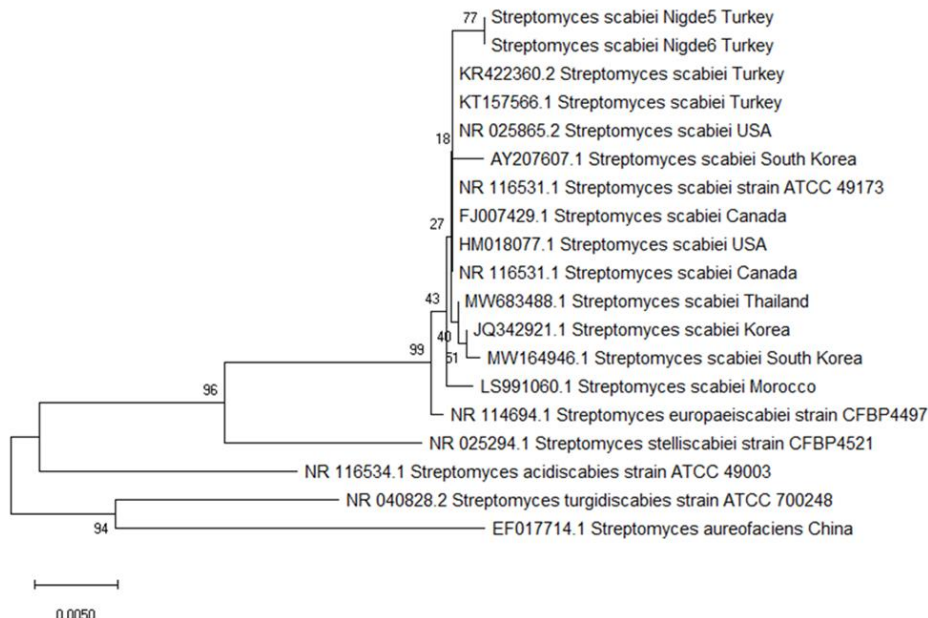
Elde edilen sekanslar kullanılarak NCBI BLAST analizleri yapılmış (Şekil 7) ve izole edilen bakterilerin GenBank’ da *S. scabiei* türleri ile yüksek oranda (%96-98) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 8).



Şekil 7. *Streptomyces* türlerinin BLAST analiz sonuçları
Figure 7. BLAST analysis results of *Streptomyces* species

Niğde ilinden elde edilen iki adet *Streptomyces scabiei* izolatu ve NCBI GenBank' tan alınan referans izolatları arasındaki nükleotid farklılığı belirlenmek için neighbour-joining metoduna dayalı filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Analiz sonucunda, Niğde ilinden elde edilen *Streptomyces scabiei* izolatlarının daha önceden farklı araştırmacılar tarafından Türkiye'den izole edilen *S. scabiei* izolatları (KR422360.2, KT157566.1) ile oldukça benzer olduğu bulunmuş olup yüksek bootstrap (seç-bağla) değeri ile aynı dalda kümelendiği görülmüştür. Ayrıca dünyanın değişik ülkelerinden (ABD, Güney Kore,

Kanada, Tayland, Kore, Fas ve Çin) izole edilip tanılanan *S. scabiei* türlerinin genel olarak aynı ana grup altında kümelendiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize analiz ettiğimiz 16SrRNA bölgesinin ülkeler bazında nükleotid varyasyon oranının düşük olduğunu göstermektedir. Analize alınan farklı *Streptomyces* türleri ise NCBI'n referans sekansları (RefSeq) arasından seçilmiş olup diğer dallarda yer alması türler arasındaki farklılıkları göstermektedir. Elde edilen yüksek bootstrap değerleri, analizin doğruluğunu onaylamaktadır.



Şekil 8. Neighbour-joining metodu kullanılarak farklı *Streptomyces scabiei* izolatlarının ve diğer *Streptomyces* türlerinin karşılaştırılması ile oluşturulan filogenetik ağaç. Dalların yanında yer alan rakamlar Bootstrap değerlerini göstermektedir

Figure 8. Phylogenetic tree generated from the comparison of different *Streptomyces scabiei* isolates and *Streptomyces* species by the neighbour-joining method. The numbers near nodes represent the percentages determined by bootstrap analysis with 1000 replicates

Sonuç olarak, ülkemizde patates üretiminde önemli bir yeri olan Niğde ilimizde hastalıklar önemli derecede verim ve kalite kaybına neden olmaktadır. Bu hastalıklardan en önemlilerinden bir tanesi Patates Adi Uyuz hastalığıdır. Yapılan bu çalışmada Niğde ilinde patates hasat döneminde arazi çalışmaları yapılarak adi uyuz lezyonlu yumru örnekleri toplanmıştır. Toplanan yumruların izolasyonları yapılarak morfolojik, patojenisite ve moleküler testler ile tanılanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda patates üretim alanlarında adi uyuz hastalığına sebep olan *Streptomyces* türü *Streptomyces scabiei* olarak tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalar sonucunda analiz edilen 16SrRNA bölgesinin nükleotid varyasyon oranının düşük olduğu tespit edilmiştir. Hastalıkla mücadelede hastalığa neden olan türün belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmanın sonuçlarının hastalıkla mücadelede daha etkili yöntemlerin kullanılmasına hem de yapılacak olan sonraki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Amaç: Patates yetiştiriciliğinde ekim alanı en geniş olan ilimiz, 238 bin dekar ile Niğde'dir. Patates yetiştirilen alanlarda ürün kayıplarına neden olan etmenlerin en başında hastalık ve zararlılar gelmektedir. Bu hastalıklardan en önemlilerinden bir tanesi toprak kökenli bir patojen olan *Streptomyces* türlerinin neden olduğu Patates Adi Uyuz hastalığıdır. Bu çalışmada, patates üretiminin oldukça yoğun bir şekilde yapıldığı Niğde ilinde patates yetiştiriciliği yapılan bölgelerde patateste adi uyuz hastalığına neden olan *Streptomyces* türlerinin izolasyonu, moleküler olarak tanılanması ve izolatlar arası nükleotid varyasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem ve Bulgular: Niğde ilinde patates yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde yapılan surveylerde adi uyuz hastalık simptomsu gösteren şüpheli yumru örnekleri toplanmıştır. Toplanan yumruların bakteri izolasyonları yapılmış ve toplam 28 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar morfolojik olarak tanılanmıştır. Ardından patates diskleri ile patojenisite testi yapılmıştır. Patojen olduğu belirlenen izolatların cins düzeyinde tanısı için 16SrRNA genel primerleri kullanılarak moleküler olarak tanılanmıştır.

Genel Yorum: Yapılan bu çalışmada Niğde ilinde patates üretim alanlarında Patates Adi Uyuz hastalığının varlığı yapılan arazi çalışmaları ile tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların morfolojik ve moleküler tanılanması yapılmış ve şiddetli bir şekilde hastalığa neden olan izolatlar,

Streptomyces scabiei olarak tanılanmıştır.

Çalışmanın Önemi ve Etkisi: Yapılan bu çalışma patates adi uyuz hastalığının Niğde ili patates arazilerinde varlığının moleküler yöntemlerle belirlenmesi açısından bir ilk niteliği taşımaktadır. Hastalıkla mücadelede hastalığa neden olan *Streptomyces* türlerinin bilinmesi oldukça önem arz etmektedir. Yapılan bu çalışma ile Niğde ili patates arazilerinde patates adi uyuz hastalığı tespit edilmiş olup tür düzeyinde çalışmalar hala devam etmektedir. Ayrıca bu çalışmanın yapılacak olan sonraki çalışmalara temel olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Patates, *Streptomyces* spp., adi uyuz, PCR, 16SrRNA, dendrogram.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiş olup (Proje Numarası: TGT 2020/19-BAGEP), kısmen Nida ÜNLÜ'nün doktora tez çalışmalarından üretilmiştir. Çalışmada kullanılan pozitif kontrol *Streptomyces scabiei* izolatı temini için Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ (Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü)'e çok teşekkür ederiz. Çalışmanın moleküler kısmındaki teknik yardımlarından dolayı doktora öğrencisi Quratul-Ain SAJID' e teşekkür ederiz

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Yazar(lar) çalışma konusunda çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Agrios GN (2005) How plants defend themselves against pathogens. In: Plant Pathology, (Ed., Agrios GN) Elsevier Academic Press, London. Pp 207-248.
- Anderson AS, Wellington EMH (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1: 797-814.
- Anonim (2021) TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim Tarihi: 16 Şubat 2022).
- Anonim (2020) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy Web. Retrieved February 16, 2022, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

- Bremer H (1948) Türkiye Fitopatolojisi I-II, Ankara, 219 s.
- Cui L, Yang C, Jin M, Wei L, Yang L, Zhou J (2021) Identification and biological characterization of a new pathogen that causes potato scab in Gansu Province, China. *Microb. Pathog.* 161: 105276.
- Dees MW, Sletten A, Hermansen A (2013) Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathol.* 62(1): 217-225.
- Flores-González R, Velasco I, Montes F (2008) Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant Pathol.* 57(1): 162-169.
- Fyans JK, Bown L, Bignell DR (2016) Isolation and characterization of plant-pathogenic *Streptomyces* species associated with common scab-infected potato tubers in Newfoundland. *Phytopathol.* 106(2): 123-131.
- Gudmestad NC, Secor GA (2007) Zebra chip: a new disease of potato. *NPE* 19: 1-4.
- Han JS, Cheng JH, Yoon TM, Song J, Rajkarnikar A, Kim WG, Yoo ID, Yang YY, Suh JW (2005) Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. *J. Appl. Microbiol.* 99: 213-221.
- Hao JJ, Meng QX, Yin JF, Kirk WW (2009) Characterization of a new *Streptomyces* strain, DS3024, that causes potato common scab. *Plant Dis.* 93(12): 1329-1334.
- Heno L, Guevara M, Restrepo S, Husserl J (2021) Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species associated with potato crops in the central part of Colombia. *Plant Pathol.* 71(2): 750-761.
- Holeva MC, Glynos PE, Karafila CD, Koutsoumari EM, Simoglou KB, Eleftheriadis E (2014) First report of *Candidatus* *Phytoplasma solani* associated with potato plants in Greece. *Plant Dis.* 98(12): 1739-1739.
- Jordaan E, Van der Waals JE (2016) *Streptomyces* species associated with common scab lesions of potatoes in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 144(3): 631-643.
- Karagöz K (2013) Erzurum İli Patates Tarlalarından İzole Edilen Bitki Patojeni *Streptomyces* Türlerinin Tanısı ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 116 s.
- Karahan A (2006) Orta Anadolu Bölgesi'nde patateslerde zararlı *Streptomyces* türlerinin tespiti ve önemli patates çeşitlerinin yaygın olan türe karşı reaksiyonlarının belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 91 s.
- Lambert DH, Loria R (1989) *Streptomyces scabiei* sp. nov., nom. Rev. *Int. J. Syst. Microbiol.* 39(4): 387-392.
- Lapaz M I, Hugueta-Tapia JC, Siri M I, Verdier E, Loria R, Pianzola MJ (2017) Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant Dis.* 101(8): 1362-1372.
- Leiminger J, Frank M, Wenk C, Poschenrieder G, Kellermann A, Schwarzfischer A (2013) Distribution and characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Germany. *Plant Pathol.* 62(3): 611-623.
- Lerat S, Simao-Beaunoir AM, Beaulieu C (2009) Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 10: 579-85.
- Loria R, Bukhalid RA, Fry BA, King RR (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* 81: 836-846.
- Mohanraj G, Sekar T (2013) Isolation and screening of *Actinomycetes* from marine sediments for their potential to produce antimicrobials. *Int. J. Life Sc. Bt. and Pharm. Res.* 2(3): 115-126.
- Ozturk M, Aksoy HM, Ozturk S, Potrykus M, Lojkowska E (2016) First report of potato blackleg and soft rot caused by *Pectobacterium wasabiae* in Turkey. *New Dis. Rep.* 34(17): 2044-0588.
- Öztürk M (2017) Orta Karadeniz bölgesinde patatesten sorun olan *Pectobacterium* ve *Dickeya* spp. bakteriyel etmenleri üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bil. Ens. Bitki Koruma ABD, 164 s.
- Öztürk M (2022) Determination of the host range of *Pectobacterium polaris* causing bacterial soft rot disease. *MKU Tar. Bil. Derg.* 27(2): 234-240.
- Öztürk M, Aksoy HM (2017) First report of *Dickeya solani* associated with potato blackleg and soft rot in Turkey. *J. Plant Pathol.* 99(1): 287-304.
- Öztürk M, Aksoy HM, Potrykus M, Lojkowska E (2018) Genotypic and phenotypic variability of *Pectobacterium* strains causing blackleg and soft rot on potato in Turkey. *Eur. J. Plant Pathol.* 152: 143-155.
- Öztürk M, Soylu S, (2022) Yozgat ve Kırşehir illerinde tüketime sunulmuş patates yumrularında bakteriyel yumuşak çürüklük etmeni *Pectobacterium* izolatlarının izolasyonu ve tanılanması. *Tekirdağ Zir. Fak. Derg.* 19(2): 332-342.
- Pridham TG, Gottlieb D (1948) The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetales* as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* 56: 107-114.

- Sadunishvili T, Węgierek-Maciejewska A, Arseniuk E, Gaganidze D, Amashukeli N, Sturua N, Kvesitadze G (2020) Molecular, morphological and pathogenic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* strains of different geographic origins in Georgia. Eur. J. Plant Pathol. 158(1): 195-209.
- Saygılı H, Şahin F, Aysan Y, Soylu S, Mirik M, (2019) Bitki Bakteri Hastalıkları. Toprak Ofset Matbaacılık, Tekirdağ, 382 s.
- Stead D, Wale S (2004) Non-water control measures for potato common scab. British Potato Council 5-50.
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* Species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30(12): 2725-2729.
- Wanner LA (2006) A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing common scab in the United States. Plant Dis. 96: 1363-1371.
- Wanner LA (2009) A patchwork of *Streptomyces* species isolated from potato common scab lesions in North America. Am. J. Potato Res. 86(4): 247-264.