

PAPER DETAILS

TITLE: Konya Ilinde Yetistirilen Patates Yumrularinda Lastik Çürüklük Hastalik Etmeni Geotrichum candidum'un Izolasyonu, Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu

AUTHORS: Soner SOYLU,Merve KARA,Osman TOKETTI,Emine Mine SOYLU,Aysun UYSAL,Sener KURT

PAGES: 353-361

ORIGINAL PDF URL: <http://dogadergi.ksu.edu.tr/tr/download/article-file/1035116>

Konya İlinde Yetiştirilen Patates Yumrularında Lastik Çürüklük Hastalık Etmeni *Geotrichum candidum*'un İzolasyonu, Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu

Soner SOYLU^{1*}, Merve KARA², Osman TOKETTİ³, E. Mine SOYLU⁴, Aysun UYSAL⁵, Şener KURT⁶

^{1,2,3,4,6}Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü 31034 Antakya-HATAY, ⁵Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi, 31034 Antakya-HATAY

¹<https://orcid.org/0000-0003-1002-8958>, ²<https://orcid.org/0000-0001-7320-3376>, ³<https://orcid.org/0000-0001-8955-2132>,

⁴<https://orcid.org/0000-0001-5961-0848>, ⁵<https://orcid.org/0000-0002-9067-285X>, ⁶<https://orcid.org/0000-0003-4545-5968>,

✉: soylu@mku.edu.tr

ÖZET

Patates (*Solanum tuberosum* L.), Türkiye'de en fazla tüketilen sebzelerin başında gelmektedir. Konya ilinin Çumra ilçesinde 2019 yılının Temmuz ayında patates yetiştirilen alanlarda gerçekleştirilen sörveyler sırasında ekşi koku yayan patates yumrularında beyaz miselyum ile kaplanmış suya batırılmış yumuşak lastik çürüklük lezyonları şeklinde yeni hastalık belirtileri gözlenmiştir. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan enfekteli yumruların alınan dokular Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri üzerine yerleştirilmiş ve 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Enfekteli dokulardan hızlı büyüyen beyaz, düz ve süetimsi-tozlu görünümüne pigmentizasyonsuz fungal koloniler gelişmiştir. Gelişen kolonilerin miselyumları dichotomous olarak dallanmış, şeffaf ve bölmeli yapıda olup, hiflerden oldukça farklı boyutlarda şeffaf, tek hücreli ve silindirik yapıda havai artrokonidilerin geliştiği gözlenmiştir. Fungal etmenin kültürel ve morfolojik özellikleri *Geotrichum candidum* ile tutarlıdır. Yapay inokulasyon yapılan patates yumruları üzerinde doğal enfekteli patates yumrularında görülen belirtilerin benzeri gözlenmiş olup fungal etmen bu dokulardan yeniden izole edilmiştir. İzole edilen fungal etmenin morfolojik tanısı, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) cihazı kullanarak protein profili ve Internal Transcribed Spacer (ITS) gen bölgesi (ITS1-5.8S rDNA-ITS4) çoğaltılıp dizilenmesi ile moleküler olarak da teyit edilmiştir. Gen bankasına kaydedilen temsili izolatin sekans sonucu *G. candidum* izolatu ile %99 oranında benzerlik göstermiştir. *G. candidum*'un sebep olduğu patates lastik çürüklük hastalığının varlığı Türkiye'de önceden bildirilmemiştir. Türkiye'de yetiştirilen patates yumrularında lastik çürüklüğü hastalığı etmeni *G. candidum*'un morfolojik ve moleküler karakterizasyonu ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 03.04.2020

Kabul Tarihi : 26.08.2020

Anahtar Kelimeler

Patates

Lastik çürüklük

Geotrichum candidum

MALDI-TOF

ITS

Isolation, Morphological and Molecular Characterization of Rubbery Rot Disease Agent *Geotrichum candidum* on Potato Tubers Grown in Konya Province

ABSTRACT

Potato is the one of the most consumed vegetable in Turkey. During field surveys in June of 2019, new disease symptoms on potato tubers, displaying a water-soaked soft rubbery rot with a sour, fermented smell, and white mycelial growth, were observed in commercial fields in Çumra district of Konya, Turkey. Diseased tubers were collected and small tissue pieces from surface disinfected symptomatic tuber were placed on potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25°C. Fast growing, flat, white to cream, dry and finely suede-like with no reverse pigmented fungal colonies were subsequently developed from infected tissues. Hyphae were hyaline, dichotomously branched and septate, producing aerial chains of hyaline, smooth, one-celled, cylindrical arthroconidia. Cultural and morphological characters were

Research Article

Article History

Received : 03.04.2020

Accepted : 26.08.2020

Keywords

Potato

Rubbery rot

Geotrichum candidum

MALDI-TOF

ITS

consistent with *Geotrichum candidum*. All artificially inoculated tubers displayed the same symptoms as seen for naturally infected tubers and the fungus having same morphological characters was re-isolated from inoculated tubers. Morphological identification of disease agent was confirmed molecularly based on protein profiling by using MALDI-TOF MS and also by sequencing amplified Internal Transcribed Spacer (ITS) region ((ITS1-5.8S rDNA-ITS4). The sequence was 99% identical and a representative sequence of isolate was submitted to GenBank. The presence of potato rubbery rot disease caused by *G. candidum* has not been previously reported in Turkey. This is the first report of morphological and molecular characterization of *G. candidum* causal disease agent of rubber rot on potato tubers grown in Turkey.

- Atıf İçin:** Soylu S, Kara M, Toketti O, Soylu EM, Uysal A, Kurt Ş 2021. Konya İlinde Yetiştirilen Patates Yumrularında Lastik Çürüklük Hastalık Etmeni *Geotrichum candidum*'un İzolasyonu, Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (2): 353-361. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.714056>.
- To Cite:** Soylu S, Kara M, Toketti O, Soylu EM, Uysal A, Kurt Ş 2021. Isolation, Morphological and Molecular Characterization of Rubbery Rot Disease Disease Agent *Geotrichum candidum* on Potato Tubers Grown in Konya Province. KSU J. Agric Nat 24 (2): 353-361. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.714056>.

GİRİŞ

Ana vatanı Güney Amerika'da yer alan Peru ve Şili olan patates (*Solanum tuberosum* L), insan beslenmesinde önemli bir yeri olan bir sebze türüdür. *Solanum* cinsine bağlı olan patates bitkisinin dünya genelinde 8 türünün tarımı ve üretimi yapılmaktadır. İngiltere'de en fazla tüketilen sebze olan patates, dünya genelinde ise mısır, pirinç ve buğday'dan sonra 381.000.000 ton üretimi ile en fazla tüketilen 4. önemli tarım ürünüdür (Ezekiel ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2017). Dünya Gıda Tarım Örgütü'nün (FAO) 2016 yılı dünya patates üretim istatistiklerine göre önemli patates üretimi yapan ilk 10 ülkelerin sırası ile Çin (99.065.00 ton), Hindistan (43.770.000 ton), Rusya (31.107.797 ton), Ukrayna (21.750.290 ton), ABD (19.990.950 ton), Almanya (10.772.100 ton), Bangladeş (9.474.099 ton), Polonya (8.872.000 ton), Fransa (6.834.680 ton) ve Hollanda (6.534.338 ton) olduğu bildirilmiştir (Anonymous, 2017). Türkiye'de en fazla patates üretimi 527.554 da alanla Orta Anadolu bölgesinde yapılırken, bu bölgeyi 276.641 da ile Ege, 147.257 da ile Batı Anadolu bölgeleri izlemiştir. Orta Anadolu bölgesinde Niğde (237.851 da alanda 892.297 ton) ve Nevşehir (58.856 da alanda 255.773 ton) illeri Türkiye'nin en fazla patates tarımının yapıldığı iller arasında olup, bu illeri Afyon (139.956 da alanda 476.900 ton), Konya (135.824 da alanda 549.802 ton) ve İzmir (104.974 da alanda 367.706 ton) illeri takip etmektedir (Anonim, 2017).

Türkiye için önemli bir ürün olan patatesin üretimi, verimi ve kalitesi farklı türlere ait toprak kökenli fungal hastalık etmenleri tarafından ciddi tehdit altındadır (Koike ve ark., 2007). Dünyanın önemli patates yetiştiriciliğinin yapıldığı ülkelerde olduğu gibi, Türkiye'de *Fusarium sambucinum*, *Phytophthora cryptogea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Synchytrium endobioticum* ve *Verticillium dahliae* gibi fungal etmenler patates

üretimini kısıtlayan en önemli toprak kökenli fungal hastalık etmenleri olarak bildirilmiştir (Çakır, 2005; Yanar ve ark., 2005; Çakır ve Demirci, 2012; Göre ve ark., 2015; Aydın ve ark., 2016; Kurt ve ark., 2017). Tarla koşullarında olduğu kadar, depolarda yer alan patates yumru örneklerinde *Colletotrichum coccoides*, *F. sambucinum* (*Gibberella pulicaris*), *F. solani*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* ve *Pythium ultimum* etmenlerinin farklı patates çeşitleri üzerinde şiddetli hastalık belirtilerine neden oldukları bildirilmiştir (Eken ve ark., 2000; Özer ve ark., 2018; Çakır ve ark., 2019).

Bu çalışmada, Konya ilinin Çumra ilçesinde yapılan sörveyler sırasında karşılaşılan, yumrulara sulu ve yumuşak çürüklük şeklinde belirtilere neden olan hastalık etmeninin morfolojik, patolojik ve moleküler olarak tanımlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Hastalık Etmeninin İzolasyonu, Morfolojik ve Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi

Hastalık etmeni, Konya ilinin Çumra İlçesinde hastalığın gözlemlendiği tarlalardan temin edilen 8 farklı hastalık belirtisi gösteren patates yumrularından izole edilmiştir. Bu amaçla, yumruların yarı hastalıklı ve yarı sağlam dokularından bistüri yardımıyla küçük parçalar kesilmiştir. Kesilen parçalar, %2'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 2 dakika yüzey dezenfeksiyonu yapıp steril saf su ile durulanmıştır. Dezenfekte edilen yumru dokuları steril kurutma kağıdına alınarak kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş olan yumru parçaları petri kaplarındaki 100 µg ml⁻¹ streptomycin sulphate içeren Patates Dekstroz Agar (PDA, Merck, Darmstadt, Germany) besiyeri üzerine yerleştirilerek 25°C'de 5-7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. PDA içeren petrilerde gelişen fungal kolonilerin tanısı morfolojik ve mikroskopik olarak

gerçekleştirilmiştir (Kim ve ark., 2011). Fungus, tek spor izolasyon tekniği ile saflaştırılmıştır. Elde edilen tek spor izolatu, eğik tüp içerisinde PDA besiyerine alınmış ve +4°C'de saklanmıştır.

Spreyle püskürtme inokulasyon yönteminin kullanıldığı patojenisite denemeleri için, sağlıklı patates yumruları (cv. Lady Anna) kullanılmıştır. Patojenite testinde, PDA ortamında 5-7 gün boyunca 25°C'de inkübe edilen bölge izolatına ait kültürler kullanılmıştır. Patojenite testinde kullanılan konidi süspansiyonunu hazırlamak için, tek spordan elde edilmiş fungal izolatin (GCP19MKU) kültürü içeren petri kabına steril saf su eklenerek ve miselyum yüzeyinden steril spatula yardımı ile kazıma yapılarak konidi süspansiyonu hazırlanmıştır. Konidi süspansiyonu, sporları miselyal parçalardan ayırmak için 2 katlı tülbent yardımı ile süzölmüştür. Elde edilen konidi süspansiyonu, hemositometre yardımı ile hesaplanarak 1×10^5 konidi ml^{-1} konsantrasyona ayarlanmıştır. Patates yumruları uygulama yapılmadan önce, çeşme suyu ile yıkanıp %2'lik NaOCl çözeltisi ile 2 dakika yüzeyde steril edilmiş, steril saf su ile 2 kez durulanmış ve yaralanmadan önce yumrular kurutma kağıdı üzerinde fan altında kurutulmuştur. Daha sonra yıkanıp kurutulan bu yumrulara, ekvatorial bölgede yumru üzerinde eşit açılarla üç farklı noktadan 2 mm derinliğinde 5 mm çapında bir yara oluşturmak için steril bir mantar delici yardımı ile yaralar açılmıştır. Yaralanmış yumrulara, 1×10^5 konidi ml^{-1} konsantrasyonunda hazırlanmış olan 20 ml hacmindeki spor süspansiyonu spreyle püskürtülerek inokulasyon gerçekleştirilmiştir (Hameed ve ark., 2019). Kontrol olarak, sadece steril saf su ile muamele edilmiş yumrular kullanılmıştır. İnokulasyon sonrası yumrular zemini steril su ile ıslatılmış kağıt havluların bulunduğu 20x20x10 cm ebadında plastik şeffaf saklama kutularına yerleştirildikten sonra, 20 °C, %85 bağıl nem ve 12 h fotoperiyot koşullarına ayarlı inkübatörler içerisinde inkübasyona bırakılmışlardır. Yapay olarak enfektelenmiş yumrulardan hastalık gelişimi inokulasyondan 7 gün sonra değerlendirilmiştir.

MALDI-TOF MS Analizi

Doğal olarak enfekteli yumrulardan elde edilen ve patojenisite çalışmalarında hastalık belirtilerine neden olan izolatların tür teşhisleri, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya) Mikroorganizma Tanımlama cihazı kullanılarak tanımlanmıştır (Kara ve ark., 2017; Soylu ve ark., 2020). Bu aşamada saf fungus kültürlerinden protein izolasyonu, etanol-formik asit ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Cihazın flex kontrol yazılım programı (Biotyper 3.0; Microflex LT; Bruker

Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ile elde edilen spektrumlar, Maldi Biotyper Real-Time Classification (RTC) yazılımı ile karşılaştırılarak tanı işlemi sürdürülmüştür. Analiz sonucunda, 2.000-3.000 arasında yeşil renkli olarak belirlenen veriler, yüksek güvenilirliğe sahip skor değeri olarak kabul edilmiştir (Carolis ve ark., 2012; Chalupová ve ark., 2014).

Moleküler Karakterizasyon

Morfolojik ve MALDI-TOF yöntemi kullanılarak ön teşhisleri yapılmış bölge ve patojenite testinden geri elde edilen fungal izolatların besi ortamında gelişen tek spor kültürlerinden alınan misellerinden (100 mg) toplam genomik DNA izolasyonu DNeasy Plant Mini Kiti (Qiagen, GeneMark Teknoloji Co, Valencia, CA, Katalog No. 69104) ile üretici firmanın önerdiği protokollerin uygulanması suretiyle yapılmıştır. PCR çalışmaları Internal transcribed spacers (ITS) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer çifti (White ve ark., 1990) kullanılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmasında her bir reaksiyon için 1× enzim buffer, 0.2 µl dNTP, 0.5 µl primer, 1.5 µl MgCl_2 , 0.2 µl (ng) DNA, toplam 25 µl olacak şekilde üzeri steril saf su ile tamamlanmıştır. DNA amplifikasyonu Thermal cycler PCR cihazında (Applied Biosystems, Singapore) yapılmıştır. PCR amplifikasyon koşulları için, 95°C'de 1 dk. başlangıç denatürasyonu, 95°C'de 20 sn. denatürasyon, annealing sıcaklığı 55°C'de 25 sn., 72°C'de 1 dk. ve final adımı olarak 72°C'de 10 dk. olarak belirlenmiştir. PCR ürünlerinin kalitesini belirlemek için Kapiler jel elektroforez cihazı kullanılmıştır (QIAxcel Advanced, Qiagen, Almanya). Bantların kalitesine göre PCR ürünü sekanslanmıştır. Sekans sonuçları BLAST programına yüklenerek fungus türü belirlenmiştir. PCR ürününe ait DNA nükleotid dizisi, NCBI (National Center for Biotechnology Information) kütüphanesinde yer alan BLASTn algoritmasını kullanarak (Boratyn ve ark., 2013) gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre tanısı yapılan izolatın, NCBI Gen Bankası kütüphanesinden erişim numarası alınmıştır. *G. candidum* GCP19MKU izolatını, farklı konukçu bitkilerden elde edilen referans izolatlarla karşılaştırmak için (Çizelge 1), MEGA 7 programını kullanarak ITS gen bölgesi için akrabalık derecelerine göre moleküler filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. İzolatlar arasındaki genetik akrabalığı gösteren dendrogram UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) yöntemi kullanılarak oluşturulmuş ve elde edilen filogenetik ağacın teyidi, 1,000 tekrarlı olarak (Bootstrap, p-distance, pairwise deletion) yapılmıştır (Kumar ve ark., 2016).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Hastalık Etmeninin İzolasyonu, Morfolojik ve

Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi

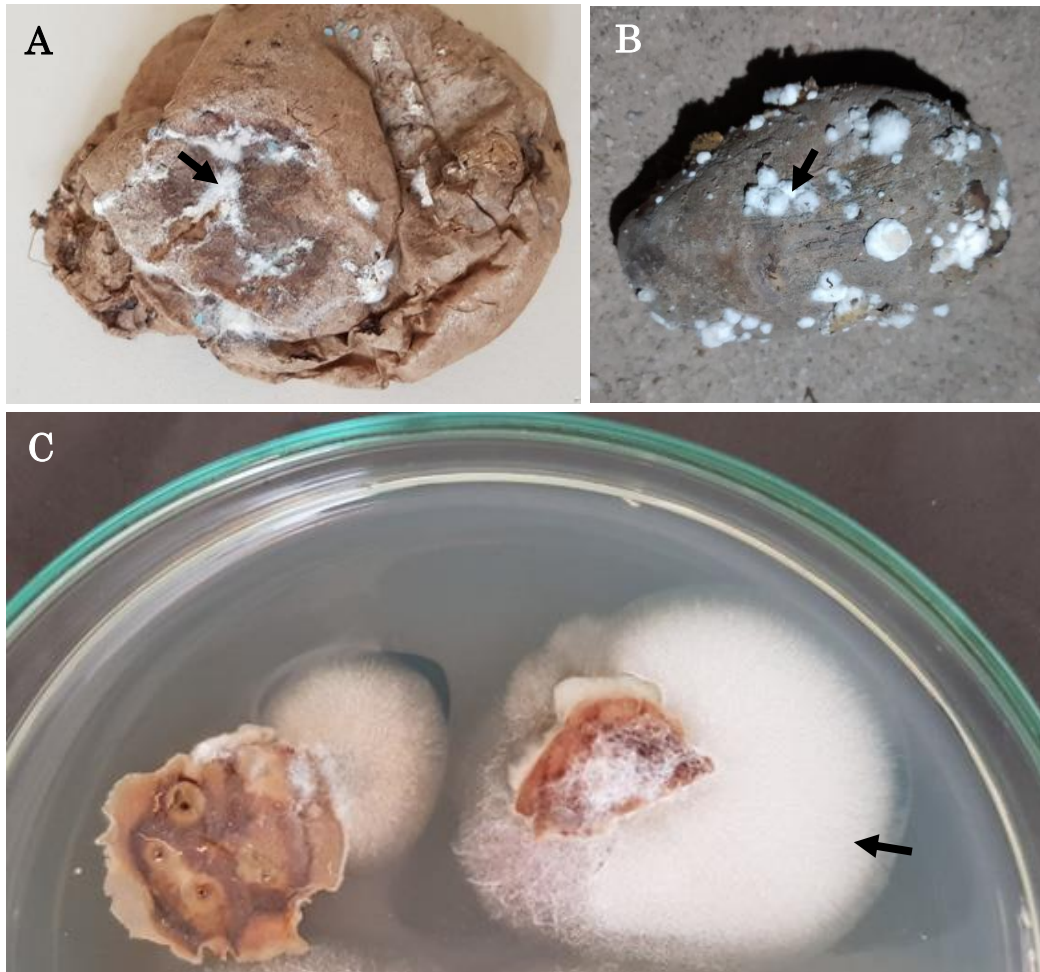
Konya ilinin Çumra ilçesinde patates yetiştirilen tarlalarda 2019 yılının Temmuz ayında gerçekleştirilen sürveyler sırasında ekşi koku yayan

patates yumruları yüzeyinde iç dokuya kadar ilerleyen suya batırılmış yumuşak çürüklük lezyonları ve bu lezyonların yüzeyinde kabarık beyaz miselyum ile kaplanmış yeni bir hastalık belirtileri gözlenmiştir.

Çizelge 1. NCBI veri tabanından alınarak filogenetik analizlerde kullanılan *G. candidum* referans izolatlarına ait konukçu bitki, izole edildiği ülke ve GenBankası erişim kayıtları

Table 1. Host plant, location and GenBank accession numbers of *G. candidum* isolates registered in NCBI database used in phylogenetic analysis

Tür (Species)	İzolat No. (Isolate No.)	Konukçu Türü (Host species)	Menşei (Origin)	GenBank Erişim No. (GenBank Accession No.)
<i>Geotrichum candidum</i>	GCP19MKU	Patates	Türkiye	MN621396
<i>Geotrichum candidum</i>	T5.01	Toprak	Brezilya	MK943787
<i>Geotrichum candidum</i>	UCDFST:09-582	Muz	ABD	MH153550
<i>Geotrichum candidum</i>	S001	Dut	Çin	KY486783
<i>Geotrichum candidum</i>	GC111	Şeker pancarı	ABD	MK436200
<i>Geotrichum candidum</i>	GC222	Şeker pancarı	ABD	MK436202
<i>Geotrichum candidum</i>	PD10019	Şeftali	Pakistan	KY495323
<i>Geotrichum candidum</i>	PD2018	Havuç	Pakistan	MH729185
<i>Geotrichum candidum</i>	PD2018B	Havuç	Pakistan	MK215811
<i>Geotrichum candidum</i>	UoS001	Meyve	Pakistan	KF975700
<i>Geotrichum candidum</i>	ET 13	Havuç	Türkiye	Kayıtlı Değil
<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	MKUGCA2	Turunçgil	Türkiye	Kayıtlı Değil



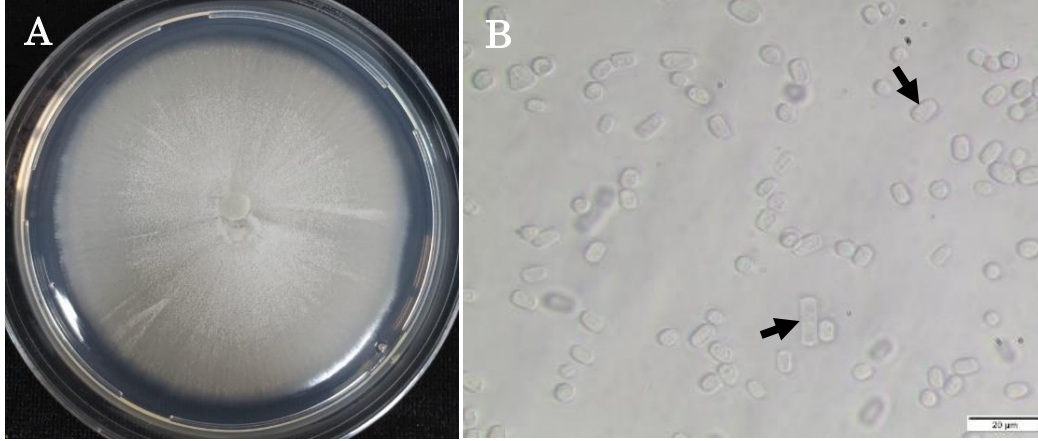
Şekil 1. (A ve B) Patates yumrularında *Geotrichum candidum* enfeksiyonlarının neden olduğu tipik hastalık belirtileri ve beyaz misel kitleleri (ok). (C) Enfekteli dokulardan gelişen *G. candidum* izolatının misel gelişimi (ok).

Figure 1. (A and B) Typical disease symptoms and white mycelial masses caused by *Geotrichum candidum* infections in

potato tubers (ok). Mycelial growth of G. candidum isolate developing from infected tissues (arrow).

Tipik hastalık belirtilerin gözlemlendiği yumrulardan (Şekil 1A,B) Patates Dekstroz Agar besiyeri üzerinde hızlı büyüyen düz, beyaz ve süet-tozlu görünümlü pigmentsiz fungal koloniler gelişmiştir (Şekil 1C, Şekil 2A). Gelişen kolonilerin miselyumları 2.5-6.0 µm çapında, dichotomous olarak dallanmış, şeffaf ve bölmeli yapıdadır. Dichotomous dallanma gösteren hiflerden, 4.5-12.5 × 3.5-7.0 µm boyutlarda, tek hücreli

havai uzun zincir şeklinde sıralanmış şeffaf, uçları kesik ve silindirik yapıda artrokonidilerin geliştiği gözlenmiştir (Şekil 2B). Konidiler genelde uçtan çimlenme göstermişlerdir. Hastalıklı bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda PDA besi yeri üzerinde gelişen tipik izolatlardan tek spor izolatları elde edilmiştir (Şekil 2A).



Şekil 2. (A) Hastalıklı dokulardan izole edilmiş saf tek spor *Geotrichum candidum* MKUBK-GCP19 izolatının PDA besiyerinde 5 günlük misel gelişimi. (B) *G. candidum* izolatına ait tipik artrokonidileri (ok)

Figure 2. (A) Mycelial development of pure single spore culture of *Geotrichum candidum* MKUBK-GCP19 isolate obtained from diseased tissues at the PDA medium 5 days after inoculation. (B) Typical arthroconidia of *G. candidum* isolate.

Fungus izolatının hif ve konidilerinin morfolojik ve taksonomik karakterlerine dayanarak etmen, *Geotrichum candidum* Link 1809 (Syn. *Galactomyces geotrichum*) olarak tanımlanmıştır (de Hoog ve ark., 1986; Watanabe, 2010). Etmenin sağlıklı patates yumruları üzerinde yapılan patojenite testi sonucunda, patates yumrularındaki inokulasyon noktalarında tarla örneklerinde görülen lastik çürüklük hastalık belirtilerine benzer lezyonlar inokulasyondan 7 gün sonra gelişmiştir. Hastalık etmeni yapay olarak inokulasyon yapılmış dokulardan geri izole edilmiştir. Fungusun patojenite testinde kullanılan ve geri elde edilen re-izolatların tek spor kültürleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezi'nde koruma altına alınmıştır (Kayıt numarası: MKUBK-GCP19).

MALDI-TOF MS Analizi

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan yeni nesil yöntemlerinden biri olan Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), proteomik yaklaşım ile özellikle bitki patolojisinde fungal ve bakteriyel mikrobiyal türlerin tanımlanmasında, kromatografik ve DNA'ya bağlı moleküler yöntemlere alternatif olarak kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır (Pulcrano ve ark., 2012; Aktan ve Soylu, 2020; Bozkurt ve ark., 2020). Gerek doğal enfekteli yumrulardan elde edilen,

gerekse patojenite testinden yeniden izole edilen (re-izolat) *G. candidum* fungal izolatların tanısı MALDI-TOF MS analiziyle teyit edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda fungal izolatların MALDI-TOF kütüphanesinde yer alan referans izolat *G. candidum* DSM 1240 ile 2.197 gibi yüksek benzerlik indeksi değerinde eşleşmiştir (Şekil 3).

Moleküler Karakterizasyon

Gerek morfolojik, gerekse MALDI-TOF ile tanımlaması yapılmış patojenite testinde belirtilere neden olmuş *G. candidum* GCP19MKU izolatın kesin tür tanısı, izolatın ITS bölgesini sekanslama yapmak suretiyle moleküler düzeyde belirlenmiştir. Ribozomal DNA'nın internal transcribed spacer (ITS) bölgesinin amplikonları, evrensel ITS1 ve ITS4 primerleri kullanarak PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen izolatın genomik DNA gen dizileri, %99 benzerlikle dünyanın farklı bölgelerinde farklı konukçu bitkilerden izole edilmiş *G. candidum* izolatlarının GenBank'taki DNA dizileri (erişim numaraları MK943787, MH153550, MK436202) ile eşleştiği belirlenmiş olup, analizde kullanılan patates izolatının (GCP19MKU) genomik DNA dizisi GenBank'a kayıt edilmiştir [GenBank erişim No: MN621396]. Gerek bu çalışmada elde edilen, gerekse NCBI kayıtlı farklı konukçu bitkilerden/kaynaklardan elde edilmiş *G. candidum* ve yakın akraba *G. citri-aurantii* izolatların nükleotid dizileri (Çizelge 1), UPGMA yöntemi kullanılarak

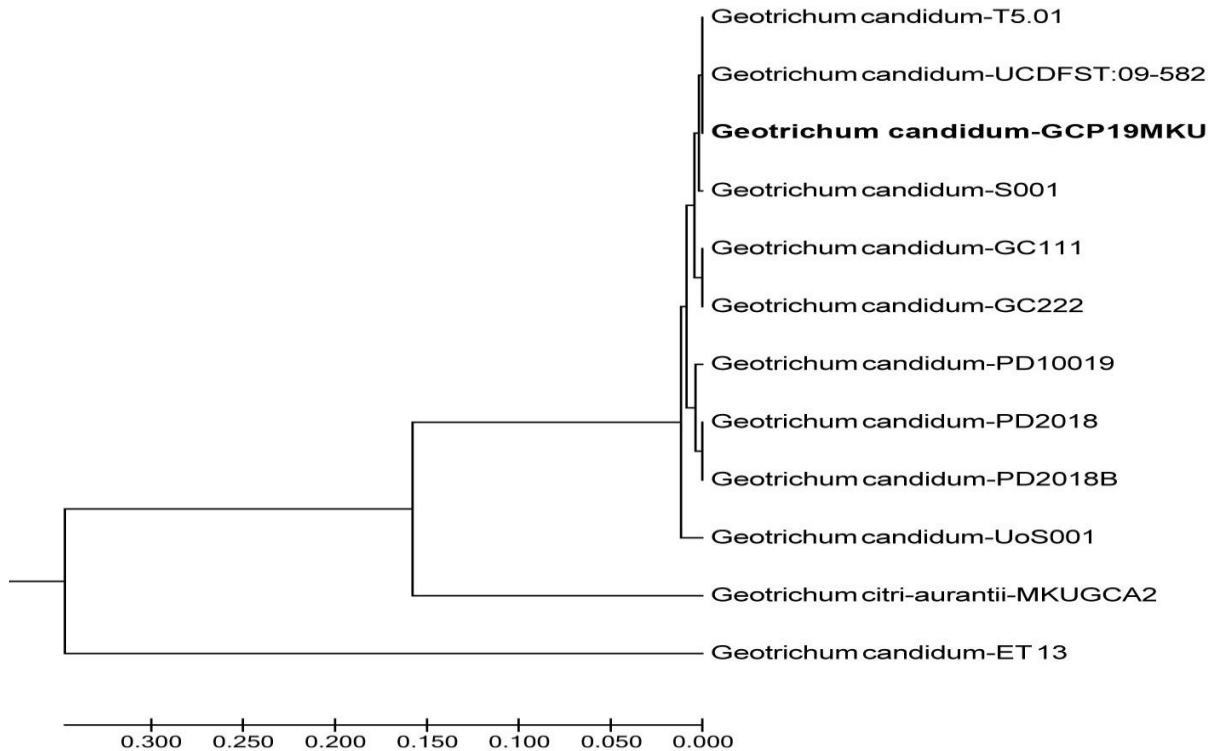
MEGA 7 yazılımı ile ITS gen bölgesi için filogenetik dendrogramı elde edilmiştir (Şekil 4). Bu dendrograma göre patatesten lastik çürüklük hastalığına neden olan *G. candidum* GCP19MKU izolatu toprak kökenli ve

muz meyvesinde ekşi çürüklük hastalığına neden olan *G. Candidum* UCDFST:09-582 ve T5.01 izolatları (MK943787 ve MH153550) ile aynı alt grupta yer ayrılmıştır.

Analyte1		Bruker Logo	
Analyte Name:	E1		
Analyte Description:			
Analyte ID:	Patates 19		
Analyte Creation Date/Time:	2018-10-01T12:18:10.486		
Applied MSP Library(ies):			
Applied Taxonomy Tree:	Taxonomy, Bruker Taxonomy, Projects		
Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Geotrichum candidum DSM 1240 DSM	2.197	27317
2 (++)	Geotrichum silvicola 04_322 LBK	2.072	215419
3 (+)	Geotrichum silvicola 04_007 LBK	1.94	215419
4 (+)	Geotrichum silvicola 04_188 LBK	1.907	215419
5 (-)	Geotrichum candidum CBS 184_56 CBS	1.662	27317

Şekil 3. Hastalıklı patates yumrusundan izole edilen ve patojenite testinde kullanılan *G. candidum* MKUBK-GCP19 izolatının MALDI-TOF teşhis sonucu.

Figure 3. MALDI-TOF identification result of *G. candidum* MKUBK-GCP19, isolated from the diseased potato tuber and used in the pathogenicity test.



Şekil 4. *G. candidum* GCP19MKU izolatu ile GenBank'tan alınan farklı *G. candidum* izolatlarının nükleotit sekanslarının dizilerine dayanılarak oluşturulan izolatlar arasındaki filogenetik ilişki. Filogenetik dendrogram, MEGA 7.0 programı kullanılarak UPGMA yöntemi ile oluşturulmuştur.

Figure 4. Phylogenetic relationship between *G. candidum* GCP19MKU and reference isolates of *G. candidum* retrieved from GenBank based on alignment of nucleotide sequences. The tree was constructed by the UPGMA method using MEGA version 7.0.

Türkiye’de şimdiye kadar *G. candidum*’un sebep olduğu ekşi çürüklük hastalığı havuç meyvelerinde bildirilmiştir (Tülek ve Dolar, 2011; Tozlu, 2016). Filogenetik analiz sonucunda oluşan dendogramda (Şekil 4) görüleceği gibi Tozlu (2016) tarafından Türkiye’de yetişen havuç meyvelerinden izole edilip moleküler karakterizasyonu yapılmış ancak NCBI kayıdı olmayan *G. candidum* ET13 izolat ile etmenin yakın akraba türü olan ve Hatay ilinde yetiştirilen turuncgillerde ekşi çürüklük hastalığına neden olan *Geotrichum citri-aurantii* MKUGCA2 izolatlarının (Kara ve Soylu, 2020) patatesten izole edilen *G. candidum* GCP19MKU izolatına kıyasla dış grupta yer almıştır. Elde edilen filogenetik çalışma sonucuna göre, havuç ve turuncgil izolatlarının patates izolatından farklı bir genetik yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).

Yapılan morfo-kültürel, patojenite denemeleri ve moleküler analizler sonucu Konya ili Çumra ilçesinde yetiştirilen patates yumrularında lastik çürüklüğü hastalığına neden olan fungal etmenin *G. candidum* olduğu kesinlik kazanmıştır. Toprak kökenli hastalık etmeni olan *G. candidum*, aynı zamanda depolanmış ürünlerde de sorun olan önemli bir fungal etmendir. Etmenin depolanmış ürünlerdeki hastalığı genelde ekşi çürüklük olarak adlandırılmaktadır. Hastalık etmenin şeftali, elma, armut, domates, patlıcan, hıyar, dut, havuç, kabak ve turp gibi bitkilerin meyvelerini enfekte edebildiği bilinmektedir (Koike ve ark., 2007; Kim ve ark., 2011; Hafeez, ve ark., 2015; Hussain ve ark., 2016; Horita ve Hatta, 2016; Punja ve ark., 2016; Alam ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2018; Kahn ve ark., 2019).

Türkiye’de şimdiye kadar *G. candidum*’un sebep olduğu ekşi çürüklük hastalığı havuç meyvelerinde bildirilmiştir (Tülek ve Dolar, 2011; Tozlu, 2016). Yapılan kapsamlı literatür araştırmasında (Farr ve Rossman, 2020), Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan patates yumrularında lastik çürüklüğü hastalığından sorumlu fungal hastalık etmeni olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Fungal etmenin patates bitkisinde hastalığa neden olduğu bugüne kadar sadece Papua Yeni Guinea (Shaw, 1984) ve Güney Kore (Kim ve ark., 2011) ülkelerinde bildirilmiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bazı ülkelerde patates bitkilerinde hastalığa neden olduğu bildirilen *G. candidum*’un Türkiye’de varlığı bazı sebzelerde ekşi çürüklük hastalığına neden olduğu bildirilmiş olmakla birlikte, patates yumrularında sebep olduğu lastik çürüklük hastalığı ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Etmenin geniş bir konukçu dizisinin bulunması, güçlü patojenitesi ve çeşitli ürünlerde hastalığın ortaya çıkması, patates üretiminde ciddi bir tehdit

oluşturabileceğini ortaya koymaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Osman TOKETTİ’nin yüksek lisans çalışmasının bir kısmını kapsamakta olup, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje Numarası: MKU BAP-18.YL.081).

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Aktan ZC, Soylu S 2020. Diyarbakır İlinde Yetişen Badem Ağaçlarından Endofit ve Epifit Bakteri Türlerinin İzolasyonu ve Bitki Gelişimini Teşvik Eden Mekanizmalarının Karakterizasyonu. KSU Tarım ve Doğa Dergisi 23 (3): 641-654.
- Alam MW, Rehman A, Malik AU, Iqbal Z, Amin M, Ali S, Hameed A, Sarfraz S 2017. First Report of *Geotrichum candidum* Causing Postharvest Sour Rot of Peach in Punjab, Pakistan. Plant Disease 101(8): 1543-1544.
- Anonim 2017. TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim Tarihi: 21.02.2020)
- Anonymous, 2017. FAOSTAT, World Production Quantities of Crops <http://www.fao.org> (Erişim tarihi: 21.02.2020).
- Aydın M.H, Pala F, Kaplan C 2016. Potato Tuber Sprout Rot Caused by *Fusarium sambucinum* in Turkey. Scientific Papers - Series A Agronomy 59: 189-193.
- Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, Madden TL, Matten WT, McGinnis SD, Merezhuk Y, Raytselis Y, Sayers EW, Tao T, Ye J, Zaretskaya I 2013. BLAST: A More Efficient Report with Usability Improvements. Nucleic Acids Research 41: 29-33.
- Bozkurt İA, Soylu S, Kara M, Soylu EM 2020. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Isolated from Medicinal Plants against Gall Forming Plant Pathogenic Bacterial Disease Agents. KSU Tarım ve Doğa Dergisi 23 (6): 1474-1482.
- Çakır E 2005. First Report of Potato Wart Disease in Turkey. Plant Pathology 54: 584.
- Çakır E, Demirci F 2012. First Report of *Phytophthora cryptogea* on Potato Tubers in Turkey. Plant Disease 96: 1224-1225.

- Çakır E, Karahan A, Kurbetli İ 2019. Involvement of *Colletotrichum coccodes* Causing Atypical Symptoms of Potato Tubers in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection* 126: 173-176.
- Carolis ED, Posteraro B, Lass-Flo C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M, Fadda G 2012. Species Identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with Direct Surface Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection* 18: 475-484.
- Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, Šebela M 2014. Identification of Fungal Microorganisms by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Biotechnology Advances* 32: 230-241.
- De Hoog GS, Smith MT, Gueho E 1986. A Revision of the Genus *Geotrichum* and Its Teleomorphs. *Studies in Mycology* 29: 1-131.
- Eken C, Demirci E, Şahin F 2000. Pathogenicity of the Fungi Determined on Tubers from Potato Storages in Erzurum. *Journal of Turkish Phytopathology* 29: 61-69.
- Ezekiel R, Singh N, Sharma S, Kaur A 2013. Beneficial Phytochemicals in Potato – A Review. *Food Research International* 50: 487-496.
- Farr DF, Rossman AY 2020. Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, USDA ARS. Retrieved from <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/> (Erişim Tarihi: 21.02.2020)
- Gore ME, Senkal BC, Berk SK, Onaran H, Altın N, Ay E, Tuna S, Zencirci N 2015. Recovery of *Verticillium dahliae* from Commercially Available Potato Seed Lots Planted in Turkey and Characterization of Isolates by Vegetative Compatibility and Aggressiveness. *Phytoparasitica* 43: 241-251.
- Hafeez R, Akhtar N, Shoaib A, Bashir U, Haidar MS, Awan ZA 2015. First Report of *Geotrichum candidum* from Pakistan Causing Postharvest Sour Rot in Loquat (*Eriobotrya japonica*). *The Journal of Animal & Plant Sciences* 25(6): 1737-1740.
- Hameed A, Alam MW, Rehman A, Naveed K, Atiq M, Rajput NA, Sarfraz S, Liaqat N, Tahir FA 2019. First Report of *Geotrichum candidum* Causing Postharvest Sour Rot of Carrot in Punjab, Pakistan. *Journal of Plant Pathology* 101(3): 763.
- Horita H, Hatta Y 2016. Sour Rot of Carrot Caused by *Geotrichum candidum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 82: 65-68.
- Hussain M, Hamid MI, Ghazanfar MU, Akhtar N, Raza M 2016. First Report of Fruit Rot of Strawberry Caused by *Geotrichum candidum* in Pakistan. *Plant Disease* 100(9): 1948-1949.
- Kahn MFR, Haque ME, Brueggeman R, Zhong S, Bhuiyan MZR, Poudel RS, Gross T, Hakk P, Liu Y, 2019. First Report of *Geotrichum candidum* Causing Postharvest Rot of Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Roots in Minnesota and North Dakota. *Plant Disease* 103(12): 3278.
- Kara M, Uysal A, Soylu S, Kurt Ş, Soylu, EM 2017. Identification of Plant-Associated Microorganisms Employing MALDI TOF Mass Spectrometry as a Rapid Detection Technique. *International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF)*, 15-17 May, 2017. Nevşehir, p. 1111.
- Kara M, Soylu EM 2020. Assessment of Glucosinolate-Derived Isothiocyanates as Potential Natural Antifungal Compounds Against Citrus Sour Rot Disease Agent *Geotrichum citri-aurantii*. *Journal of Phytopathology* 168(5): 279-289.
- Kim YK, Kim TS, Shim HS, Park KS, Yeh WH, Hong SJ, Shim CK, Kim JS, Park JH, Han EJ, Lee MH, Jee HJ 2011. First Report of Sour Rot on Post-Harvest Oriental Melon, Tomato, Cucumber, Potato, Pumpkin and Carrot Caused by *Geotrichum candidum*. *Research in Plant Disease* 17(2): 232-234.
- Koike ST, Gladders P, Paulus, AO 2007. *Vegetable Diseases: A Colour Handbook*. Manson Publishing, London, pp. 95-115.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* 33(7): 1870-1874.
- Kurt Ş, Uysal A, Kara M, Soylu S, Soylu EM 2017. Natural Infection of Potato by *Sclerotinia sclerotiorum* Causing Stem Rot Disease in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes* 12: 39.
- Ozer G, Bayraktar H, Tsrör L, Yaman T, Kabakci H, Gore ME 2018. Vegetative Compatibility Groups in *Colletotrichum coccodes* from Turkey and Their Aggressiveness to Potato. *Plant Pathology* 67: 1735-1739.
- Pulcrano G, Roscetto E, Iula VD, Panellis D, Rossano F, Catania MR 2012. MALDI-TOF Mass Spectrometry and Microsatellite Markers to Evaluate *Candida parapsilosis* Transmission In Neonatal Intensive Care Units. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31: 2919-2928.
- Punja ZK, Rodriguez G, Tirajoh A, Formby S 2016. Role of Fruit Surface Mycoflora, Wounding and Storage Conditions on Post-Harvest Disease Development on Greenhouse Tomatoes. *Canadian Journal of Plant Pathology* 38(4): 448-459.
- Shaw DE 1984. Microorganisms in Papua New Guinea. *Research Bulletin of the Department of Primary Industries Port Moresby* 33: 1-344. (6277)
- Soylu EM, Soylu S, Kara M, Kurt Ş 2020. Sebzelelerde Sorun Olan Önemli Bitki Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Vermikomposttan İzole Edilen Mikroorganizmaların *in vitro* Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi. *KSU Tarım ve Doğa Dergisi* 23(1): 7-18.

- Tozlu E 2016. Bazı Bakteriyel Biyokontrol Ajanlar ile Havuç Acı Çürüklük Hastalığı (*Geotrichum candidum* Link)'nın Biyolojik Mücadelesi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 47 (1): 1-9.
- Tülek S, Dolar FS, 2011. Havuçlarda Görülen Depo Hastalıkları ve Yönetimi. GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 28(2): 187-198.
- Watanabe T 2010. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, 3rd Ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 426 pp.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Yanar Y, Yilmaz G, Cismeli I, Coskun S 2005. Characterization of *Rhizoctonia solani* Isolates from Potatoes in Turkey and Screening Potato Cultivars for Resistance to AG-3 Isolates. Phytoparasitica 33: 370-376.
- Zhang H, Xu F, Hu HH, Dai XF 2017. Progress of Potato Staple Food Research and Industry Development in China. Journal of Integrative Agriculture 16(12): 2924-2932.
- Zhang L, Li YH, Zhang XM, Zhang QH, Xian HQ 2018. First Report of Sour Rot Caused by *Geotrichum candidum* on *Mori fructus* in China. Plant Disease 102(12): 2640-2641.