



Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi

Patateste Patojen *Streptomyces* Türlerinin Tanılama Yöntemleri

Aynur Karahan^{1*}, Yakup Zekai Katırcıoğlu²

¹Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:

Geliş tarihi 12 Aralık 2013

Kabul tarihi 09 Eylül 2014

Anahtar Kelimeler:

Streptomyces

Patates

Bitki patojeni

Tanı metotları

ÖZET

Patates adi uyuz hastalığına sebep olan *Streptomyces scabiei*'nin 1890 yılında ilk olarak Thaxter tarafından tanımlanmasından bu yana *Streptomyces* türlerinin tanısı için kullanılan metotlar sürekli olarak gelişmiştir. 1940'lı yıllarda *Streptomyces* türleri tarafından üretilen antibiyotiklerin keşfi ile 40 kadar tanımı yapılmış *Streptomyces* türünün sayısı kısa sürede 3000' in üzerine çıkmıştır. Ancak bu dönemde tanısı yapılan türlerin birçoğu sinonimdir. Günümüzde patojen türler de dâhil olmak üzere *Streptomyces* türlerinin tanısında kullanılmakta olan spor zinciri morfolojisi, spor rengi, substrat miselyum ve çözülebilir pigmentler, melanin üretimi ve bazı karbon kaynaklarını kullanma durumları gibi morfolojik ve fizyolojik metotlar bu proje ile ortaya konulmuştur. Bu dönemde 200'den fazla *Streptomyces* türü yeniden tanımlanmış ve tip kültürleri uluslararası kültür koleksiyonlarına yerleştirilmiştir. Günümüzde *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei* ve *S. niveiscabiei* gibi patateste patojen *Streptomyces* türlerinin tanısında klasik morfolojik ve fizyolojik metotların yanı sıra patojenisite, hücresel yağ asidi kompozisyonunun tespitine dayanan yağ asidi analizi ve PCR gibi moleküler metotlar da kullanılabilir. Günümüzde *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei* ve *S. niveiscabiei* gibi patateste patojen *Streptomyces* türlerinin tanısında klasik morfolojik ve fizyolojik metotların yanı sıra patojenisite, hücresel yağ asidi kompozisyonunun tespitine dayanan yağ asidi analizi ve PCR gibi moleküler metotlar da kullanılabilir.

Identification Methods of Pathogenic *Streptomyces* Species on Potato

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2013

Accepted 09 September 2014

Keywords:

Streptomyces

Potato

Plant Pathogen

Identification methods

ABSTRACT

Since *Streptomyces scabiei* causing potato common scab disease was identified firstly in 1890 by Thaxter methods used for the diagnosis of *Streptomyces* species have evolved continuously. In the 1940s with the discovery of antibiotics produced by *Streptomyces* species, the number of *Streptomyces* species defined up to 40 has increased by upon 3000. However many of species identified in this period were synonyms. Morphological and physiological methods such as spore chain morphology, spore color, substrate mycelium and soluble pigments, melanin production and use of some carbon sources in use of identification of *Streptomyces* species including pathogenic species are put forward with this project. During this period, more than 200 *Streptomyces* species were re-defined and the type cultures of them were placed in international culture collections. Today, pathogenicity, fatty acid analysis and molecular methods such as PCR have been used for the identification of pathogenic *Streptomyces* species on potato such as *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei* and *S. niveiscabiei* as well as classic morphological and physiological methods.

1. Giriş

Streptomyces türleri Bacteria âleminden Actinobacteria şube ve sınıfından, Actinomycetales takımından ve

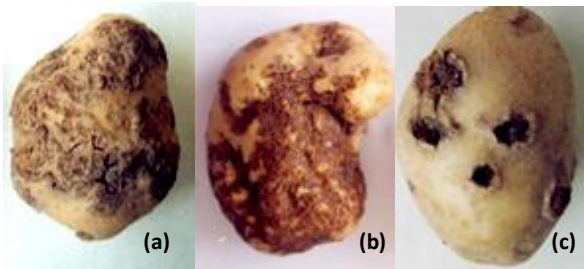
Streptomyces familyasındandır (Anderson ve Wellington 2001). Gram pozitif, hücre duvarına sahip, ipliğimsi bakterilerdir. Bu cins, 0.5-2.0 µm çapındaki vejetatif hifleriyle bir substrat miselyum üretmektedir (Holt

* Sorumlu yazar email: akarahan@zmmae.gov.tr

ve ark. 1994). Bu miselyum üzerinde havai hifler oluşmakta ve bu hiflerin kırılmasıyla üç veya daha fazla spor zinciri meydana gelmektedir. Düz, spiral veya dalgalı şekle sahip olabilen bu zincirler *Streptomyces* türleri için önemli bir taksonomik özelliktir. *Streptomyces* türleri birçok fungus benzeri hareketsiz bir yaşam tarzına sahiptir ve ürettikleri sporlar yayılmalarına yardımcı olmaktadır. *Streptomyces* türleri daha küçük spor ve hifleriyle de funguslardan kolaylıkla ayrılabilir (Lambert ve Loria 1989a,b; Miyajima ve ark. 1998; Loria ve ark. 2001).

Streptomyces kolonilerinin başlangıçta yüzeyi düzdür, havai miselyumun gelişmesi sonucu yünüksü, granüler, tozlu veya kadifemsi görünüm oluşmaktadır. Vegetatif ve havai misellerin rengini veren değişik pigmentlerin yanı sıra birçok tür bir veya daha fazla sayıda antibiyotik üretmektedir. Birçoğu saprofit olarak toprak, deniz suyu, bitki yüzeyi gibi ortamlarda bulunan bu cinsin bir kaç türü insan ve hayvanlarda, bir kısmı ise bitkilerde patojendir (Holt ve ark. 1994).

Bitki patojeni *Streptomyces* türleri üzerinde yapılan araştırmaların çoğu, patates hastalıkları üzerinde yoğunlaşmıştır (Loria ve ark. 1997). *Streptomyces* türleri yumru üzerinde patatesin çeşidine, çevresel etkenlere ve etmenin virulensine bağlı olarak yüzeysel, ağ benzeri, kabarık, çukur, düzensiz ve mantarimsı görünümde lezyonlar oluşturmaktadır (Şekil 1). Bu lezyonlar yumru kalitesini bozarak patatesin pazar değerini düşürmekte ve ayrıca diğer hastalık etmenleri ve nematodlar için de giriş kapısı oluşturmaktadır. *Streptomyces* türleri dünyada patates yetiştiriciliği yapılan her yerde yaygın olarak bulunmaktadır. Patateste adi uyuz olarak bilinen hastalığı oluşturan *Streptomyces scabiei* corrig. (ex Thaxter 1891) Lambert ve Loria, bu cins içerisinde tanımlanan ilk bitki patojenidir. Havuç, turp, şalgam gibi kazık köklü bitkiler ve yerfıstığı da konukçuları arasındadır. Bunun yanında birçok monokotiledonlu ve dikotiledonlu bitkinin fidelerinde hastalığa sebep olduğu laboratuvar çalışmalarıyla ortaya konmuştur. Bu bitkilerdeki belirtiler sürgün ve kök uzunluğunun azalması, dokularda kloroz ve nekroz şeklindedir (Labruyere 1971; Bang 1979; Janse 1988; Lambert ve Loria 1989a; Kritzman ve ark. 1996; Leiner ve ark. 1996; Pavlista 1996; Goyer ve Beaulieu 1997; Loria ve ark. 1997).



Şekil 1.

Patojen *Streptomyces* türlerinin patates yumrusunda oluşturduğu kabarık (a), yüzeysel (b) ve çukur (c) lezyonlar (Karahan 2006).

S. scabiei' in yanı sıra bu cins içinde yer alan *S. acidiscabies* (Lambert ve Loria 1989b), *S. turgidiscabies* (Miyajima ve ark. 1998), *S. europaeiscabiei* Bouček-Mechiche ve ark. (1998), *S. stelliscabiei* (Bouček-Mechiche ve ark. 2000), *S. luridiscabiei* (Park ve ark. 2003a), *S. puniscabiei* (Park ve ark. 2003a) ve *S. niveiscabiei* (Park ve ark. 2003a) gibi diğer türler de patateste adi uyuz hastalığına sebep olmaktadır. Bu türler morfolojik ve genetik olarak birbirlerinden farklıdır. Ancak oluşturdıkları belirtiler ve konukçu dizilişlerindeki benzerlikler nedeni ile patojenisitelerinin ortak bir mekanizmaya sahip olduğu düşünülmektedir. *S. scabiei*, *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies*' in thaxtomin olarak adlandırılan bir fitotoksin ürettiği bilinmektedir (Bukhalid ve ark. 1998; King ve ark. 1991; Loria ve ark. 1997).

Streptomyces cinsi içindeki türlerin tanılanması, karmaşık tanılama yöntemlerinden dolayı oldukça güçtür. Tanıda morfolojik veya fizyolojik metotlar kullanılabildiği gibi, hücresel yağ asidi kompozisyonunun tespitine dayanan veya nükleik asit hibridizasyonu gibi metotlar da kullanılabilmektedir. Uluslararası *Streptomyces* Projesi (ISP) kapsamında yapılan iki çalışma ile *Streptomyces* türlerinin tanısında halen kullanılmakta olan fizyolojik ve biyokimyasal metotlar ortaya konulmuştur. Bu çalışmalardan biri Amerikan Mikrobiyoloji Komitesi Actinomycetes Alt Çalışma Grubu tarafından yürütülmüş ve sonuçları 1961 yılında açıklanmıştır. Diğer çalışma ise Uluslararası Bakteriyolojik İsimlendirme Komitesinin Actinomycetes taksonomisi üzerinde çalışan alt komitesi tarafından yürütülmüş ve sonuçları 1961 ve 1964 yıllarında açıklanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda tavsiye edilen yöntemler kullanılarak, 1964 ile 1965 yılları arasında 200' den fazla tip ve neotipin tanısı başarıyla yapılmıştır (Shirling ve Gottlieb 1966). Günümüzde ise *Streptomyces* türlerinin tanısında patojenisite, yağ asidi analizi, PCR ve DNA-DNA hibridizasyonu gibi metotlar kullanılmaktadır (Healy ve Lambert 1991; Paradis ve ark. 1994; Ndowora ve ark. 1996; Takeuchi ve ark. 1996).

2. İzolasyon Yöntemleri

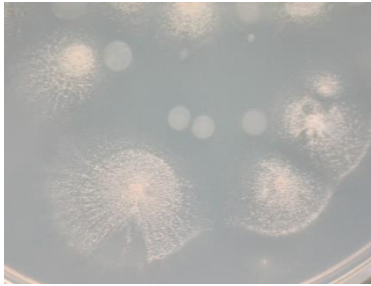
Patates ve diğer kazık köklü bitkilerden ya da topraktan *Streptomyces* türlerinin izolasyonu fungal veya bakteriyel etmenlerin bulaşmasından dolayı güçtür. Bu nedenle tanılama çalışmalarına başlarken en önemli basamak uygun bir şekilde etmenin izolasyonunun yapılmasıdır.

2.1. Patates Yumruları ve Kazık Köklü Diğer Bitkilerden İzolasyon

Patates yumruları ve diğer kazık köklü bitkilerden izolasyon için en uygun ortam su agarıdır. Fungal veya diğer bakteriyel etmenlerden dolayı oluşan bulaşmaları engellemek için NPPC su agar (Agar, 20.0 g; Antibiyotik stok solüsyonu, 10.0 ml; 990 ml steril destile su) da kullanılabilmektedir. Antibiyotik stok solüsyonu hazırlanırken, 100 ml steril destile su içine 500 mg Nystatin, 50 mg Polymyxin B sülfat, 10 mg Sodyum Penicilin-G,

500 mg Cycloheximide ilave edilip filtre kullanılarak sterilizasyon işlemi yapılmaktadır. Antibiyotik stok solüsyonunun 10 ml'si otoklav edildikten sonra 45-55 °C'ye soğutulan agarın üzerine ilave edilmektedir (Loria ve ark. 2001).

Yeni sökülmüş patates yumrularındaki lezyonlar üzerinde açık gri, beyaz sporulasyon varsa bir damlastiril su içinde bu spor ve miseller süspanse edilmekte, su agar veya NPPC su agar üzerine ekilmektedir. Eğer yumrular üzerinde gözle görülebilir miselyum yoksa, yumruların % 1.5' luk sodyum hipoklorit ile 1 dakika süreyle yüzeysel dezenfeksiyonu yapılmakta ve steril sudan geçirilmektedir. Daha sonra kahverengi siyah renkli lezyonları içeren kabuk bölümü kesilmektedir. Altta bulunan saman sarısı renkli dokunun küçük bir bölümü az bir miktar suyla steril havan içinde ezilmekte ve 5 ml steril su kullanılarak süspanse edilmektedir. Daha sonra bu süspanseyondan bir damla alınmakta ve su agar ya da NPPC su agar üzerine çizilerek ekim yapılmaktadır. 28-30 °C de 7-10 gün süreyle inkube edilmektedir. İnkubasyon süresi sonunda su agar üzerinde *Streptomyces* türleri ipliğimsi, tozlu koloniler vermektedir (Şekil 2) (Loria ve ark. 2001).



Şekil 2.

Su agar üzerinde *Streptomyces* türlerinin oluşturduğu ipliğimsi, tozlu koloniler (Karahan 2006).

İzolasyonda kullanılan diğer bir metot da patates yumrusunun tamamı fenol ve steril su karışımı (1:140) içerisinde 10 dakika tutulmakta ve daha sonra 15 dakika süreyle iki kez steril musluk suyu içerisinde bekletilmektedir. Bunun ardından lezyonun altındaki dokudan 5 mm³kadar bir doku çıkarılmakta ve içerisinde 10 ml steril su bulunan bir tüp içerisine yerleştirilmektedir. Tüp 30 dakika süreyle 55°C' lik su banyosunda tutulmaktadır. Isı uygulamasından sonra patates dokusu su agar veya NPPC su agar üzerine yerleştirilmektedir. 30 °C de 10 gün süreyle inkube edildikten sonra patates dokusu üzerinde gelişen sporlar Yeast Malt Extract (YME) ortamı üzerine aktarılmakta ve 28-30 °C de 15 gün süreyle inkube edilmektedir. Bu metot havuçtan yapılan izolasyonlarda da kullanılmaktadır (Faucher ve ark. 1992; Goyer ve Beaulieu 1997; Lindholm ve ark. 1997).

Patates yumrularından yapılan diğer bir izolasyon metodunda ise lezyonlu patates yumruları musluk suyuyla 5 dakika kadar yıkanmaktadır. Daha sonra lezyonların olduğu bölümden bir gram hastalıklı doku aseptik

koşullarda çıkarılmakta ve havanda ezilmektedir. Ekstraktan 10⁻⁶' ya kadar seyreltme serisi hazırlanmaktadır. 10⁻⁵ ve 10⁻⁶' seyreltme serilerinden 100'er ml alınmakta ve Tyrosine Casein Nitrate Agar ortamına ilave edilmektedir. İnokule edilmiş ortam petri kaplarına dökülmekte ve 10 gün süreyle 27°C' de inkube edilmektedir. Burada gelişen koloniler sporulasyon vermesi için Patates Dextrose Agar (PDA) ortamına aktarılmaktadır (Bonde ve McIntyre 1968; Bouchek-Mechiche ve ark. 2000).

2.2. Topraktan İzolasyon

Bitki patojeni *Streptomyces* türlerinin topraktan izolasyonu güçtür. Topraktaki patojen *Streptomyces* türleri saprofit türlerle oldukça benzerdir ve topraktaki *Streptomyces*' lerin % 1 inden daha az bir bölümünü patojen olanlar oluşturmaktadır. *S.scabiei*' i topraktan izole edebilmek için havada kurutulmuş 10 g toprağın üzerine 100 ml steril su ilave edilmekte ve 10 dakika süreyle çalkalanmaktadır. Steril su kullanılarak 10⁻⁶ a kadar seyreltme serisi hazırlanmakta ve 10⁻⁶, 10⁻⁵ ve 10⁻⁴ den 100'er µl NPPC su agar üzerine bagetle ekilmektedir. Daha sonra 28-30 °C' de 7-10 gün inkube edilmektedir (Keinath ve Loria, 1989; Loria ve ark. 2001).

Topraktan yapılan izolasyonda antibiyotik içeren besi ortamlarının kullanımı, istenmeyen bakteri ve fungusların gelişimini büyük ölçüde azaltmaktadır. Ancak antibiyotiklerin bazı aktinomisetlerin gelişimini engelleyebidiği göz önünde bulundurulmalıdır. Kritzman ve ark. (1996) tarafından yerfistüği kapsüllerinden *Streptomyces* türlerinin izolasyonu için geliştirilen KSTR besi yerini Conn ve ark. (1998) Kanada' da patates yetiştirilen topraklardaki *Streptomyces* türlerinin izolasyonu için modifiye etmişlerdir. Modifiye edilen bu ortam STR-M olarak isimlendirilmiştir. İçeriğinde suda çözülebilir patates nişastası, 5.0 g; yeast extract (Difco), 4.0 g; bacto peptone (Difco), 0.6 g; protease peptono. 3 (Difco), 0.6 g; NaCl, 10 g; K₂HPO₄, 1.0 g; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g; agar (Merck), 17 g ve 1 ml mikroelementlerden oluşun stok solüsyon (FeSO₄, 10 mg; ZnSO₄, 1 mg; MnCl, 1 mg) bulunmaktadır. Bu besi yerinin pH' sı 7.2.' dir. Steril edildikten sonra içerisine cycloheximide rifampicin (0.6 ppm) ve nalidixic acid (15 ppm) ilave edilmektedir. Bu besi yerinin kullanımı ile topraktan izole edilen *Streptomyces* türlerinin sayısında bir azalma olmazken istenmeyen fungal ve bakteriyel etmenlerin sayısında önemli bir düşüş olmaktadır.

Ayrıca topraktan *Streptomyces* türlerinin izolasyonunda % 0.5' lik tyrosine ilave edilmiş glycerol-asparagine agar, YM-NPCR agar ve yeast starch agar gibi ortamlarda kullanılabilir (Keinath ve Loria 1989; Keinath ve Loria 1991; Naidenova ve Vladimirova 2002).

3. Tanı Yöntemleri

Streptomyces cinsi içindeki türlerin tanısında ISP' de önerilen morfolojik ve fizyolojik metotlar, yağ asidi analizi ve moleküler metotlar kullanılmaktadır.

3.1. Morfolojik Tanı Yöntemleri

Morfolojik tanı çalışmalarında, Pridham ve Gottlieb (1948) ile Shirling ve Gottlieb (1966) tarafından ortaya konan metotlar kullanılmaktadır.

3.1.1. Spor zincir şekli

Morfolojik tanı çalışmalarında standart ortamlar olarak adlandırılan ve *Streptomyces* türlerinin kolaylıkla spor verebildiği, Ortam 2 (yeast extract- malt extract agar), Ortam 3 (oatmeal agar), Ortam 4 (inorganic salt-starch agar) ve Ortam 5 (glycerol-asparagine agar) kullanılmaktadır (Shirling ve Gottlieb 1966). Spor zinciri ve sporofor morfolojisi çok iyi sporulasyon vermiş, tam

olarak olgunlaşmış kültürler üzerinde gözlenmelidir. Gözlemler 7, 14 ve 21. günlerde yapılmalıdır. Morfolojik tanıda, spor taşıyan hiflerin ve spor zincirlerinin mikromorfolojik olarak incelemesi yapılmaktadır. Bunun için ışık mikroskopunda 200-400x de minimum 10 mikroskop alanı kullanılmaktadır. Bu incelemede öncelikle olgun hifin uç kısmında yer alan sporların sayısı tespit edilmektedir. Bu sporlar tek, çift, 3-10 adet zincir ya da 10 adetten daha fazla sayıda zincir şeklinde olabilmektedir. Diğer bir önemli taksonomik karakter olan spor zincirlerinin çeşitleri Tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1.

Streptomyces türlerinin spor zinciri şekilleri (Pridham ve ark. 1958)

Basit	Verticillate
Düz [Straight-Rectus (R)]	Monovorticillus (MV)
Dalgalı [Flexible-Flexibilis (F)]	Monovorticillus-Spira (MV-S)
Kanca ya da ilmek benzeri [Open loops-Retinaculum-Apertum (RA)]	Bivorticillus (BIV)
Spiral-Spira (S)	Bivorticillus-Spira (BIV-S)
Tespit Edilmemiş (Undetermined-U)	

S. scabiei spiral (Şekil 3), *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies* ise dalgalı spor zincirlerine sahiptir (Shirling ve Gottlieb 1966; Lambert ve Loria 1989a,b; Miyajima ve ark. 1998; Loria ve ark. 2001).



Şekil 3.

Streptomyces scabiei'nin spiral spor zincirleri (Karahan 2006).

3.1.2. Spor ornamentasyonu

Tip kültürlerin tanısı yapılırken spor ornamentasyonu elektron mikroskopla incelenerek tespit edilmelidir. Spor yüzeyleri düz, dikenli, tüylü ve siğilimsi olarak tanımlanmaktadır (Shirling ve Gottlieb, 1966). Patatesten patojen *S. scabiei*, *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies* düz sporlara sahiptir (Lambert ve Loria, 1989 a ve b; Miyajima ve ark. 1998).

3.1.3. Renk tespitleri

Morfolojik tanıda yine önemli bir kriter olan renk tespitleri, olgunlaşmış ve spor vermiş kültürler üzerindeki, havai yüzey gelişiminin rengine, substrat miselyumun ters taraftan rengine ve melanin haricindeki diğer

çözülebilir pigmentlerin rengine bakılarak yapılmaktadır. Renk tespitleri için kullanılan ortamlar daha önceden belirtilmiş olan standart ortamlardır ve gözlemler 7, 14 ve 21. günlerde kuzeye bakan bir pencerede parlak gün ışığında yapılmalıdır (Shirling ve Gottlieb 1966).

Shirling ve Gottlieb (1966) tarafından bildirildiğine göre, havai yüzey gelişiminin rengini tespit etmek için kırmızı, sarı, yeşil, mavi, mor, gri ve beyazdan oluşan Tresner ve Backus renk serisi kullanılmaktadır (Tresner ve Backus 1963). *S. scabiei* kül rengi gri sporulasyon (Lambert ve Loria 1989a), *S. acidiscabies* beyaz pembe (Lambert ve Loria 1989b) ve *S. turgidiscabies* (Miyajima ve ark. 1998) ise gri sporulasyon vermektedir. Substrat miselyumun ters taraftan rengini tespit etmek için ise, Shirling ve Gottlieb (1966) tarafından bildirildiğine göre, ya Szabo ve Marton (1964) tarafından geliştirilen renk skalası (sarı-kahverengi, sarı-kahverengi + kırmızı (veya turuncu), sarı-kahverengi + mavi veya menekşe rengi, sarı-kahverengi + yeşil), ya da Prauser (1964) veya Bondartsev (1954) tarafından oluşturulan skalalar kullanılabilir. Bunların yanı sıra tam renk harmoni el kitabından da faydalanılabilmektedir.

S. scabiei tipik olarak melanoid pigment üretmektedir (Lambert ve Loria 1989a). Ancak *S. turgidiscabies* melanoid pigment veya herhangi bir dağılıbilir pigment üretmemektedir (Miyajima ve ark. 1998). Melanin üretimi için kullanılan besiyeri Ortam 6 (pepton yeast extract iron agar-PYI) ve Ortam 7 (modifiye edilmiş Masumoto's tyrosine agar)'dir. Melanin üretimi için inokulasyondan sonra besiyeri ortamları 2. ve 4. günlerde kontrol edilmekte ve yeşilimsi kahverengi, kahverengimsi siyah veya farklı bir kahverengi pigment oluşumu pozitif olarak kaydedilmektedir (Shirling ve Gottlieb 1966).

Melanin pigment haricinde diğer bir çözülebilir pigment üretimi herhangi bir ortam üzerinde oluşuyorsa bu renk de kaydedilmelidir. Ayrıca ortam pH' sı değiştirildiğinde oluşacak renk değişikliklerini tespit etmek için bir damla 0.05 N NaOH ve 0.05 N HCl kullanılmaktadır. Renk değişimi için gözlemler hemen yapılmakta ve uygulamadan 10-15 dakika sonrasına kadar incelemeye devam edilmektedir. *S. acidiscabies* modifiye salts starch agar üzerinde kırmızı sarı pH' ya duyarlı dağılıbilir pigment oluşturmaktadır (Lambert ve Loria 1989b).

3.2. Fizyolojik Tanı Yöntemleri

Fizyolojik tanılamada kullanılan en önemli özellik *Streptomyces* türlerinin karbon kaynaklarını kullanma yetenekleridir. Bunun yanında parçalama faaliyeti, azot kullanımı ve antibiyotik aktivitesi gibi bazı özelliklerde

fizyolojik tanılamada kullanılan diğer özellikler arasında yer almaktadır.

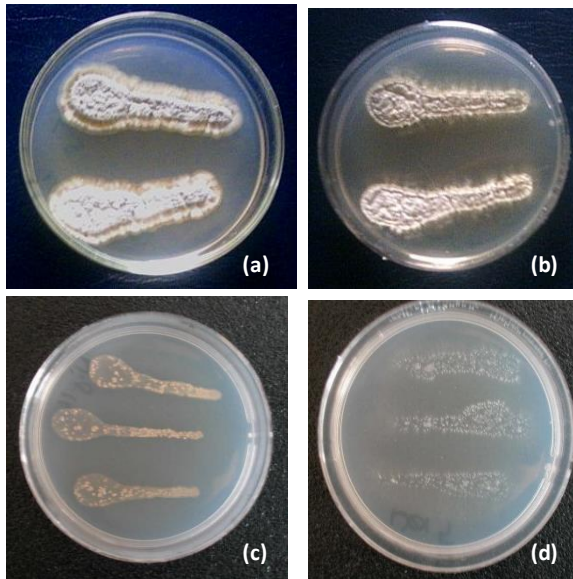
3.2.1. Karbon kullanımı

Karbon kullanımı için Pridham ve Gottlieb (1948) tarafından geliştirilen temel ortam kullanılmaktadır. Ortam hazırlanıp otoklav edildikten sonra 60 °C'ye soğutulmakta ve % 1'lik oranda karbon kaynağı ilave edildikten sonra petrilere dökülmektedir. Karbon kaynağı olarak L-arabinose, sucrose, D-xylose, I-inositol, D-mannitol, D-fructose, rhamnose, cellulose ve pozitif kontrol olarak glikoz kullanılmaktadır (Shirling ve Gottlieb 1966). İnokulasyonlar yapıldıktan sonra 10-16 gün süre ile petrilere kontrol edilmektedir. Kontroller pozitif ve negatif kontrolle karşılaştırmalı olarak yapılmaktadır. Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan skala Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2.

Karbon kaynağı kullanımı değerlendirme skalası (Shirling and Gottlieb 1966).

Kuvvetli pozitif (++)	Glikoz içeren pozitif kontrole eşit veya daha fazla gelişme
Pozitif (+)	Glikoz içeren pozitif kontrolden biraz az, karbon kaynağı içermeyenden önemli ölçüde fazla gelişme
Şüpheli (±)	Glikoz içeren pozitif kontrolden önemli ölçüde az, karbon kaynağı içermeyenden biraz fazla gelişme
Negatif (-)	Karbon kaynağı içermeyene eşit veya daha az gelişme



Şekil 4.

Streptomyces izolatlarının raffinose kullanımı; kuvvetli pozitif (a), pozitif (b), şüpheli (c), negatif (d) (Karahan 2006).

Streptomyces türlerinin 33 farklı karbon kaynağını kullanma kabiliyetinin değerlendirildiği bir çalışmada tüm izolatların D-glikoz, D-mannose, starch, dextrin ve gliserolü kullanabildiği bildirilmiştir (Pridham ve Gottlieb 1948). Ancak erythritol, phenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, Na-formate, Na-oxalate ve Na-tartarate'ı kullanamamışlardır. Aynı çalışma kapsamında *S. scabiei*'

in L-xylose, L-arabinose, rhamnose, D-fructose, D-galactose, sucrose, maltose, lactose, raffinose, inulin, D-mannitol, D-sorbitol, dulcitolü kullanabildiği görülmüştür. Patateste patojen olan *S. scabiei* ve *S. turgidiscabies* ISP' de tavsiye edilen tüm şekerleri, *S. acidiscabies* ise raffinose haricindeki diğer tüm şekerleri kullanmaktadır (Lambert ve Loria 1989 a,b; Miyajima ve ark. 1998; Loria ve ark. 2001). Patateste pas renginde uyuz belirtirine sebep olan *Streptomyces* türlerinin çoğunun L-arabinose, sucrose, D-xylose, I-inositol, D-mannitol, D-fructose, rhamnose ve raffinose'u karbon kaynağı olarak kullandığı tespit edilmiştir (Faucher ve ark. 1993). Yine *S. europaeiscabiei*' de sözü edilen 9 adet karbon kaynağını kullanmaktadır (Bouček-Mechiche ve ark. 2000).

Karbon kaynaklarının kullanımı için günümüzde Biolog, Inc., Hayward, CA tarafından üretilen Biolog SFP2™ hazır kitleri de kullanılmaktadır. Bu kitler bir su kontrolle birlikte 95 karbon kaynağı içermektedir. Yulaf ezmesi agar ortamı üzerinde geliştirilen her bir strainin spor süspansiyonu inokule edilmekte ve 72 saat sonra 590 nm' de okumalar yapılmaktadır (Davelos ve ark. 2004).

3.2.2. Parçalama faaliyeti

Parçalama faaliyeti için modifiye Bennett agar kullanılmaktadır. Bu ortam içerisinde adenine ve tyrosine litreye 5 g, hypoxanthine ve xanthine 4 g ve casein 10 g ilave edilerek parçalama faaliyeti tespit edilmektedir. *S. scabiei*, *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies* xanthini parçalayamamaktadır. *S. turgidiscabies*'in tüm strainleri adenine, casein, hypoxanthine ve tyrosini parçalayabilmektedir (Lambert ve Loria 1989 a,b; Miyajima ve ark. 1998). Aynı ortam içerisinde jelatin litreye 4 g ve nişasta 10 g ilave edilmekte ve 7 gün sonra jelatin için HgCl₂ ve

nişasta için iyot solusyonu ilave edilerek parçalama faaliyetini kontrol edilmektedir. Jelatin ve nişasta *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies* tarafından parçalanmaktadır (Lambert ve Loria 1989b; Miyajima ve ark. 1998). Poligalaktronik asit parçalanması modifiye Hankin pektin ve Hildebrand ortamı üzerinde gözlenmektedir. *S. scabiei* ve *S. acidiscabies* poligalaktronik asiti parçalayabilmektedir (Lambert ve Loria 1989 a,b).

3.2.3. Azot kullanımı

Lambert ve Loria (1989a) tarafından bildirildiğine göre, azot kullanımı için Williams ve ark. (1983), litrede 1 g azot kaynağı, 10 g glikoz, 5 g MgSO₄.7H₂O, 5 g NaCl, 10 mg FeSO₄.7H₂O, 1 g K₂HPO₄ ve 12 g agar içeren temel ortamı kullanmışlardır. Bu ortamın pH' ısı 7.4' tür. *S. turgidiscabies* tek azot kaynağı olarak DL-2-aminobutyric asit, L-asparagine, L-hydroxyproline ve L-methionine, potasyum nitrat, L-phenylalanine, L-serine, L-threonine ve L-valini kullanabilmektedir. Ancak L-cysteine ve L-histidini kullanamamaktadır (Miyajima ve ark. 1998). Yine *S. scabiei* tarafından L-hydroxyproline ve L-methionine kullanılmaktadır (Lambert ve Loria 1989a).

3.2.4. Antibiyotik aktivitesi

Antibiyotik aktivitesi için modifiye Bennett ortamı kullanılmakta ve antibiyotikler otoklavdan sonra agar ortamına ilave edilmektedir. Gözlemler 1, 2, 3 ve 7. günlerde yapılmaktadır. Besi yerinde gelişme varsa bu pozitif olarak değerlendirilmektedir (Lambert ve Loria 1989 a,b; Miyajima ve ark. 1998).

S. scabiei penicillin (10 IU/ml), oleandomycin (25 ve 100 µg/ml) ve streptomycin (20 µg/ml)'inde gelişmemektedir (Lambert ve Loria, 1989a). *S. acidiscabies* ise oleandomycin (100 µg/ml) haricinde diğer antibiyotiklerde gelişme göstermektedir (Lambert ve Loria 1989b). *S. turgidiscabies*' in tüm strainlerinin, chloramphenicol (30 µg/ml), gentamicin (20 µg/ml), kanamycin (30 µg/ml), lincomycin (100 µg/ml), neomycin (20 µg/ml), oleandomycin (100 µg/ml), polymyxin B (15 µg/ml), rifampicin (50 µg/ml), streptomycin (20 µg/ml), tobramycin (50 µg/ml) ve vancomycin (50 µg/ml)' e hassas, ancak penicillin G (3 IU/ml)' ye karşı dayanıklı olduğunu bildirmektedir (Miyajima ve ark. 1998).

3.3. Patojenisite

Streptomyces türlerinin patojenisite mekanizması *S. scabiei* ile enfekteli bitki doku ekstraktlarında thaxtomin isimli fitotoksin bulunana kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Thaxtomin, King ve ark. (1992) tarafından patates dokularından ilk defa izole edilmiştir ve 2-,5-dioxopiperazine molekülleri içeren 4-nitroindol-3-yl olarak tanılanmıştır. Saflaştırılan thaxtominlerin enfeksiyonlu bitki dokularındaki benzer belirtileri konukçu dokusu üzerinde de oluşturduğu tespit edilmiştir ve thaxtomin üretimiyle patojenisite arasında pozitif bir ilişki tespit edilmiştir (Lawrence ve ark. 1990; Gross 1991; King ve ark. 1991; Babcock ve ark. 1993; Doum-

bou ve ark. 1998; Healy ve ark. 2000). Thaxtomin A biosentezi eksik veya yetersiz olan *S. scabiei* mutantlarının patojenite kabiliyetlerini kaybettikleri görülmüştür (Goyer ve ark. 1998).

Thaxtomin A, *S. scabiei*, *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies* tarafından üretilen fitotoksindir. Bu türler thaxtomin A yanında diğer bazı thaxtominleri de üretmektedir. *S. ipomoeae* ise thaxtomin C' yi üretmektedir (Loria ve ark. 1997). Thaxtomin A'nın üretimi ve saflaştırılması için ayrıntılı metotlar geliştirilmiştir. Bu metotlar patates yumrularından izole edilen *S. scabiei*, *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies* için uygundur (Babcock ve ark. 1993; Goyer ve ark. 1998).

Son yıllarda patojen *Streptomyces* türlerinde patojenisiteyi belirleyici thaxtomin (txtAtxtB, txtC ve nos)'in yanısıra tomatınase (tomA) ve bir nekroz protein genini (nec1) kodlayan genler bulunduğu ortaya konulmuştur. Bu patojenisite genleri patojenisite adası (pathogenicity island, PAI) olarak adlandırılan geniş bir küme şeklinde yerleşmişlerdir. PAI patojen *Streptomyces* türlerinden saprofitik olanlara yatay olarak aktarılabilir ve bu şekilde yeni patojenik türlerin ortaya çıkışına sebep olmaktadır (Kers ve ark. 2005).

3.3.1. Patates yumrusunda patojenisite

Patateste *Streptomyces* türlerinin patojen olup olmadığını belirlemede kullanılan en geçerli metot patates yumrularının kullanıldığı metottur. Bu metot ya patojenden ari tohumluk yumruların dikilmesiyle ya da sap çelikleri, yaprak-tomurcuk çeliklerinden üretilen yumruların kullanımıyla yürütülmektedir (Loria ve Kempter 1986; Faucher ve ark. 1992; Faucher ve ark. 1993; Liu ve ark. 1996; Goyer ve Beaulieu 1997; Conn ve ark. 1998).

Patates yumruları kullanılarak yapılan patojenisite testinde, *Streptomyces* türleri sporulasyon verebilecekleri YME gibi uygun bir agar ortamı üzerinde geliştirilmekte ve hazırlanan inokulum patojenden ari olarak yetiştirilmiş tohumluk yumruların bulunduğu saksılara dökülerek inokulasyon gerçekleştirilmektedir. Bu metotta inokulasyondan yaklaşık 7-10 hafta sonra değerlendirmeler yapılmakta ve toprak nemi enfeksiyonu teşvik etmek için yumru oluşumu sırasında mümkün olduğunca düşük tutulmaktadır (Labruyere 1971; Loria ve Kempter 1986). Sap çelikleri ve yaprak-tomurcuk çeliklerinden üretilen mini yumruların kullanılması ile *Streptomyces* türlerinin patojenisite testlerinin süresi oldukça kısalmıştır (Loria ve Kempter 1986; Liu ve ark. 1996). Her iki metotta da çeliklerin alınacağı bir ana bitki yetiştirilmektedir. Sap çelikleri metodunda çeliklerin alınacağı bitkinin büyüme uçları kopartılarak koltuk altlarından sürgün gelişimi teşvik edilmektedir. Bu sürgünlerin 3 yapraklı olanları alınarak, nemli kum içeren saksılara dikilmekte ve 14 gün süreyle kök büyümesi için bırakılmaktadır. Daha sonra her bir saksıya 3 çelik olacak şekilde şaşırtılmakta ve bu saksılara önceden hazırlanmış olan inokulum verilmektedir. İnokulasyondan 21 gün sonra sap çelikleri sökülerek uyuz yönünden yumrular

değerlendirilmektedir (Loria ve Kempter 1986). Yaprak-tomurcuk çelikleri metodun da ise yetiştirilen ana bitkinin sürgünleri her biri bir yaprak-tomurcuk gözü içerecek şekilde kesilmekte ve nemli kum içerisinde yumru oluşumu için bırakılmaktadır. Yaklaşık bir ay sonra yaprak-tomurcuk gözünün olduğu yerde tek bir adet yumru oluşmakta ve hazırlanan inokulum bu yumruya verilmektedir. İnokulasyondan 10 gün sonra değerlendirmeler yapılmaktadır (Liu ve ark. 1996).

3.3.2. Patates disklerinde patojenisite

Patates disklerinde yapılan patojenisite testinde kullanılacak olan patates yumrularının kabukları soyulmakta, steril edilmekte ve yaklaşık 0,5 cm kalınlığında dilimlenmektedir. Daha sonra 2 cm çapında diskler bu dilimlerin ortasından çıkarılmaktadır. Bu diskler petri kaplarına yerleştirilmektedir. Yulaf ezmesi agar üzerinde 27 °C' de 7-10 gün süreyle yetiştirilen *Streptomyces* kültürlerinden alınan agar diskleri ters olarak patates diskleri üzerine yerleştirilmekte ve diskler 27 °C' de karanlıkta, nemli çemberde inkube edilmektedir. İnokulasyondan 5 gün sonra oluşun nekrozlar kontrol edilmektedir (Conn ve ark. 1998; Park ve ark. 2003b).

3.3.3. Turp fide testi

Yulaf ezmesi broth (oat meal broth- OMB) içerisinde *Streptomyces* türleri thaxtomin üretebilmektedir. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış ve içinde % 1 lik su agar bulunan cam tüpler içerisinde turp fideleri yetiştirilmektedir. Daha sonra bu fideler OMB üzerinde 4-6 gün süreyle geliştirilmiş *Streptomyces* kültürününün 0.1-0.5 ml' siyle inokule edilmektedir. Fideler oda sıcaklığında 6-10 gün süreyle 12 saat ışıkta tutulmakta ve bu süre sonunda değerlendirmeler yapılmaktadır. Patojenik türler, thaxtomin üretimi nedeniyle fidelerde cüceleşme, radyal kıvrılma ve kahverengi siyah lezyonlara sebep olmaktadır (Leiner ve ark. 1996; Loria ve ark. 2001) (Şekil 5).



Şekil 5.

Kökleri gelişmemiş, kalınlaşmış ve radyal kıvrılmış turp fideleri ve en sağda sağlıklı gelişen fide (Karahan 2006).

3.3.4. Patojenisitenin Moleküler Olarak Belirlenmesi

S. scabiei, *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies*' in birçok straininde *nec 1* olarak adlandırılan bir gen tespit edilmiştir. Bu gen saprofit *Streptomyces* türleri ve *S. ipomoeae*' da bulunmamaktadır. *Nec 1*' in olmadığı *S.*

scabiei 'lerin çok az miktarda olmasından dolayı *S. scabiei*, *S. acidiscabies* ve *S. turgidiscabies*' den bu genin çoğaltılması, patojenisite için güvenilir bir belirleyici olmaktadır. Yine *S. scabiei*' nin thaxtomin üretimi ve patojenisitesi ile bağlantılı ORF*tnp-nec1* genetik bölgesinin çoğaltılmasıyla elde edilen primerler kullanılabilir (Bukhalid ve Loria 1997; Bukhalid ve ark. 1998; Loria ve ark. 2001). Thaxtomin üretimi ve patojenisite üzerinde etkili olan *nec1* ve ORF*tnp* genleri Nf-Nr ve Tf-Tr PCR primerleri kullanılarak çoğaltılmaktadır (Bukhalid ve Loria, 1997). PCR ürününün elektroforezi sonucu *nec1* için 720 bp ve ORF*tnp* için ise 550 bp' de bantlar beklenmektedir (Park ve ark. 2003b).

3.4. Yağ Asidi Analizi

Mikroorganizmaların hızlı ve güvenilir tanılama yöntemlerinden biri de yağ asidi analizleridir (Gitaitis ve Beaver 1990; Sasser 1990; Bouzar ve ark. 1993). Diğer bakteriler gibi *Streptomyces* türlerinin tanısında da bu metod kullanılmaktadır. Yağ asidi analizinin morfolojik tanı yöntemleri yerine kullanılabilir alternatif bir metod olduğu ancak *Streptomyces* türlerine ilişkin sınırlı kayıt olmasından dolayı hücresel yağ asidi profillerini ortaya çıkaracak daha kapsamlı veri tabanlarının kurulması gerektiği bildirilmiştir (Faucher ve ark. 1993; Ndowora ve ark. 1996; Lindholm ve ark. 1997; Lazarovits ve ark. 2001). Mikrobiyal ID (MIDI Inc., DE, USA) tarafından geliştirilen Mikrobiyal Tanı Sistemi (MIS) bu amaçla kullanılmaktadır.

Yağ asidi analiz metodu için, *Streptomyces* izolatları PDA veya OMA besi yerinde geliştirilmektedir. Spor vermiş kültürler 20 ml trypticase soy broth (TSB) içine aktarılmakta ve 150 rpm' de 3-4 gün süreyle çalkalanmaktadır. Bu süspansiyonun 1 ml' si yeniden TSB içine aktarılmakta ve aynı işlem tekrarlanmaktadır. Bakteriyel kültür 3-4 gün sonra 12,000 rpm' de 10 dakika süreyle santrifüj edilmektedir. Üstte kalan sıvı boşaltılmakta ve toplanan hücreler steril öze yardımıyla ayrı bir tüp içine toplanmaktadır. Sodyum hidroksit-metil alkol ile bakteriyel hücrelerden hücresel yağ asitlerinin salıverilmesi, hidroklorik asit-alkol ile yağ asidi metil esterlerinin (FAME) metilasyonu, hekzan-MTBE solventiyle ekstraksiyon ve sodyum hidroksitle ekstraktın yıkanması ve bu şekilde geride kalan serbest yağ asitlerinin toplanması ile örnek hazırlığı devam etmektedir. Son olarak örnek kromatografi tüplerine toplanmakta ve GC cihazı ile hücresel yağ asidi profili belirlenmektedir. FAME ekstraktları gaz kromatografinin otomatik örnekleyicisine yüklenmekte ve analiz başlatılmaktadır. Sonuçlar örnek analizlerinin dizin haline getirilmesi, küme analizi, model tanım ve veri tabanı araştırmaları yoluyla değerlendirilmektedir. 2-D plot ve dendrogram özellikleri kullanılarak *Streptomyces* izolatlarının benzerliği ve akrabalık dereceleri belirlenmektedir (Faucher ve ark. 1993; Ndowora ve ark. 1996; Lindholm ve ark. 1997; Lazarovits ve ark. 2001).

3.5. Moleküler Tanı Yöntemleri

Bakterilerin izolasyonu ve kültüre alınmasını temel alan tanı metotlarının kullanılması, uyuz lezyonları üzerinde farklı *Streptomyces* türlerinin bir arada bulunması ve *Streptomyces* türlerinin yavaş gelişmesinden dolayı zaman kaybına sebep olmaktadır (Harrison 1962; Lindholm ve ark. 1997). Moleküler metotların kullanılması ile zaman kaybı ortadan kalkmış, 16S rRNA gen dizisinin değişken bölgelerini temel alan primerlerin kullanılmasıyla güvenilir bir şekilde türe özgü teşhis yapılması sağlanmış ve bu metotların kullanılması ile *Streptomyces* türleri içinde önemli ölçüde bir farklılık belirlenmiştir (Healy ve Lambert 1991; Bouček-Mechiche ve ark. 2000; Park ve ark. 2003; Lehtonen ve ark. 2004).

Fransa'da adı ve ağ benzeri uyuz lezyonlarından izole edilen 23 izolat ve diğer ülkelere ait 19 izolatın genomik akrabalığı DNA-DNA hibridizasyonu ile değerlendirilmiştir. *S. scabies* türleri içinde genetik olarak farklı 3 grup belirlenmiştir. Bunlar daha önceden tanımlanmış *S. acidiscabies* ve *S. caviscabies*'den farklıdır. Bu farklı gruplardan ikisi yeni türler olarak tanımlanmış ve *S. europaeiscabiei* ve *S. stelliscabiei* olarak isimlendirilmiştir. Son grup ise *S. scabies* izolatlarından oluşmaktadır. Ağ benzeri uyuz lezyonlarını oluşturan patojenik türler ise yeni bir tür olarak tanımlanmış ve *S. reticuliscabiei* olarak isimlendirilmiştir (Bouček-Mechiche ve ark. 2000). Bu türlerin 16S rRNA geni baz alınarak yapılan filogenetik analizlerinde, tüm *rrs* geninin çift sarmal PCR metodu kullanılarak çoğaltılmıştır. 16S rRNA genini çoğaltmak için, FGPS5-281 ve FGPS1509-153 üniversal primerleri kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda 1500 bp' de PCR ürünü gözlemlenmiştir. DNA dizi analizi dört internal primer ve çoğaltım primerleri kullanılarak yapılmış ve değerlendirmelerde CLUSTAL X kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda *S. reticuliscabiei*'nin diğer *Streptomyces* türlerinden farklı olduğu, *S. stelliscabiei*'nin *S. bottropensis* ve *S. europaeiscabiei*'nin ise *S. scabiei* ile çok benzer olduğu belirlenmiştir (Bouček-Mechiche ve ark. 2000).

Lazarovits ve ark. (2001), topraktaki patojenik *Streptomyces* türlerinin tanımlanması için PCR'ı kullanmışlardır. PCR primerleri *S. scabies* DNA' sından (*necl*) sentezlenmiştir. DNA topraktan Lazarovits ve ark. (2001) tarafından önerilen şekilde ekstrakte edilmektedir. Ayrıca topraktan Bio 101 kit metoduyla da DNA ekstrakte edilebilmektedir. Bunun için Bio101, Savant Bio/Can Scientific, Toronto, Ontario tarafından üretilen Bio 101 Fast DNA spin kit kullanılmaktadır. DNA ekstraktının kullanılmasıyla hedef DNA çoğaltılmakta ve bu işlemden sonra PCR ürünü % 1.2' lik agarose jelde koşturulmaktadır. Bu çalışma sonucunda *necl* geninden sentezlenen primerlerin *S. scabiei*' e spesifik olduğu, *S. scabiei* DNA' sının 3 pg kadar az bir miktarının topraktan PCR yoluyla tespit edilebildiği ve toprağın her bir gramından 2×10^3 cfu patojen *S. scabiei*' nin PCR' la tespit edilebildiği görülmüştür.

ScabI, ScabII, TurgI, TurgII, AurI ve AurII isimli 3 farklı primer çifti tasarlanmış ve bu primer çiftlerinin

türlere karşı özgülüğünü belirlemek için patatesteki farklı uyuz lezyonlarından elde edilen 1245 *Streptomyces* izolatı ile çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları *S. scabiei* ve *S. turgidiscabies*'in tespiti için PCR'ın güvenilir bir metot olduğunu ortaya koymuştur. Patates yumruları ve diğer kaynaklardan izole edilen fazla sayıdaki izolatın kullanıldığı bu çalışmada 16S rRNA'nın değişik bölgelerini hedef alan primerlerin kullanımı ile türe özgü bir tanı yapılabildiği ortaya konulmuştur (Lehtonen ve ark. 2004). Ancak *S. scabies* ve *S. europaeiscabiei*'nin 16S rRNA gen dizileri birbirinin benzeri olduğundan bu primerlerle ayrımları yapılamamaktadır. Bu nedenle 16S operonun intergenic transcribed spacer (ITS) bölgesi ITS-RITS-L primerleri kullanılarak çoğaltılmakta ve PCR ürünü *Hpy99I* enzimiyle kesilerek bu iki türün birbirinden ayrımı yapılmaktadır (Song ve ark. 2004; Flores-Gonzalez ve ark. 2008; Dees ve ark. 2013).

4. Sonuç

Streptomyces türlerinin morfolojik özellikleri ve karbon kaynaklarını kullanma özelliklerine dayanan tanılama metotları günümüzde halen geçerliliğini koruyan ve kullanılmakta olan metotlardır. Morfolojik ve fizyolojik metotlara dayanan tanı çalışmalarının mutlaka çok iyi sporulasyon vermiş koloniler üzerinden yapılması gerekmektedir. *Streptomyces* türleri ise 15-20 gün hatta 1 ayı bulan sürelerde ancak spor verebilmektedir. Yine morfolojik tanıda önemli bir kriter olan spor zincirlerinin şeklinin gözlemlendiği kültürlerin de tam sporulasyon vermiş ancak fazla yaşlanmamış kültürler olması önemlidir. Çünkü yaşlanmış kültürlerde spor zinciri morfolojisinde değişiklikler oluşabilmektedir. Bütün bunlardan anlaşılacağı gibi *Streptomyces* türlerinin morfolojik ve fizyolojik özelliklerine dayanarak yapılan tanı çalışmaları çok hassas bir çalışmayı gerektirmektedir ve ayrıca *Streptomyces*'lerde tanı çalışmalarında kullanılan kültürlerin yaşlanmasından veya diğer nedenlerden ortaya çıkabilecek hataları minimuma indirebilmek için mutlaka kurulan denemelerin en az iki defa tekrarlanması gerekmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı bu metotlar kullanılarak yapılan tanılamaya çalışmaları özellikle fazla sayıda izolatın kullanıldığı ekolojik çalışmalarda çok zaman ve emek kaybına yol açmaktadır. Günümüzde *Streptomyces* türlerinin tanımlanmasında hücre sel yağ asidi analiz metodu da kullanılmaktadır. Ancak hücre sel yağ asidi profil veri tabanının çok sınırlı sayıda olmasından dolayı, fazla izolatla yapılan çalışmalarda ortaya çıkabilecek yeni türlerin tanısının bu metotla güvenilir bir şekilde yapılamayacağına ilişkin endişeler mevcuttur. Bu nedenlerle *Streptomyces* cinsi içindeki türlerin tanıma yönelik çalışmalarda hızlı ve pratik olması nedeniyle moleküler metotlar önemli bir yer almıştır. Bu metotlar kullanılarak son yıllarda patatesteki uyuz hastalığına sebep olan yeni *Streptomyces* türleri belirlenmiştir. Ayrıca bu metotların kullanımıyla bu türler arasındaki genotipik akrabalık seviyesi belirlenmeye başlanmış ve bunun sonucunda da bu cins içerisindeki taksonomik karışıklık bir ölçüde giderilmiştir.

5. Kaynaklar

- Anderson AS, Wellington EMH (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 797-814.
- Babcock MJ, Eckwall EC, Schottel JL (1993). Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *Journal of Genetic Microbiology* 139: 1579-1586.
- Bang H (1979). Studies on potato russet scab. I. Acharacterization of different isolates from northern Sweden. *Acta Agriculturae Scandinavica* 29: 145-150.
- Bonde MR, McIntyre GA (1968). Isolation and biology of a *Streptomyces* sp. causing potato scab in soils below pH 5.0. *American Potato Journal* 45: 273-278.
- Bouček-Mechiche K, Gardan L, Normand P, Jouan B (2000). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S.europaeiscabiei* sp. nov. and *S.stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S.reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 91-99.
- Bouzar H, Jones, JB, Hodge NC (1993). Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology* 83: 733-739.
- Bukhalid RA, Loria R (1997). Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. *Journal of Bacteriology* 179: 7776-7783.
- Bukhalid RA, Chung SY, Loria R (1998). *Nec 1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11: 960-967.
- Conn KL, Leci E, Kritzman G, Lazarovits G (1998). A quantitative method for determining soil populations of *Streptomyces* and differentiating potential potato scab-inducing strains. *Plant Disease* 82: 631-638.
- Davelos AL, Xiao, K, Flor JM, Kinkel LL (2004). Genetic and phenotypic traits of streptomycetes used to characterize antibiotic activities of field-collected microbes. Microbial observatories project no: 9977907, p.38, USA.
- Dees MW, Sletten A, Hermansen A (2013). Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathology* 62: 217-225.
- Doumbou CL, Akimov V, Beaulieu C (1998). Selection and characterization of microorganisms utilizing thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4313-4316.
- Faucher E, Savard T, Beaulieu C (1992). Characterisation of Actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14: 197-202.
- Faucher E, Otrysko B, Paradis E, Hodge NC, Stall RE, Beaulieu C (1993). Characterization of *Streptomyces* causing russet scab in Quebec. *Plant Disease* 77: 1217-1220.
- Flores-González R, Velasco I, Montes F (2008). Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant Pathology* 57: 162-169.
- Gitaitis RD, Beaver RW (1990). Characterization of fatty acid methyl ester content of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 80: 318-321.
- Goyer C, Beaulieu C (1997). Host range of *Streptomyces* strains causing common scab. *Plant Disease* 81: 901-904.
- Goyer C, Vachon J, Beaulieu C (1998). Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* 88: 442-445.
- Gross DC (1991). Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annual Review of Phytopathology* 29: 247-278.
- Harrison MD (1962). Potato russet scab, its cause and factors affecting its development. *American Potato Journal* 39: 368-387.
- Healy FG, Lambert DH (1991). Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 479-482.
- Healy FG, Wach M, Krasnoff SB, Gibson DM, Loria R (2000). The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabiei* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology* 38: 794-804.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PH., Staley JT, William ST (1994). *Streptomyces* and related genera. Pages 605-667 in W.R. Hensyl, ed., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The William and Wilkins Co, Baltimore.
- Janse JD (1988). A *Streptomyces* species identified as the cause of carrot scab. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 94: 303-306.
- Karahan A (2006). Orta Anadolu Bölgesinde patateslerde zararlı *Streptomyces* türlerinin tespiti ve önemli patates çeşitlerinin yaygın olan türe karşı reaksiyonlarının belirlenmesi. Yayınlanmamış doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Keinath AP, Loria R (1989). Melanin-producing *Streptomyces* spp. respond to potato plant growth and differentially to potato cultivars. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 279-285.

- Keinath AP, Loria R (1991). Effects of inoculum density and cultivar resistance on common scab of potato and population dynamics of *Streptomyces scabies*. *American Potato Journal* 68: 515-524.
- Kers JA, Cameron KD, Joshi MV, Bukhalid RA, Morello JE, Wach MJ, Gibson DM, Loria R (2005). A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* 55: 1025-1033.
- King RR, Lawrence CH, Clark MC (1991). Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *American Potato Journal* 68: 675-680.
- King RR, Lawrence CH, Calhoun LA (1992). Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies* the causal organism of potato common scab. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 40: 834-837.
- Kritzman G, Shani-Cahani A, Kirshner B, Riven Y, Bar Z, Katan J, Grinstein A (1996). Pod wart disease of peanut. *Phytoparasitica* 24: 293-304.
- Labruyere RE (1971). Common scab of the potato. International Course on Potato Production, 10 p. Wageningen, The Netherlands.
- Lambert DH, Loria R (1989a). *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 387-392.
- Lambert DH, Loria R (1989b). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 393-396.
- Lawrence CH, Clark MC, King, RR (1990). Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* 80: 606-608.
- Lazarovits DG, Yang Z, Conn KL, Bukhalid RA, Loria R, Lee KL, Odumeru J (2001). Development of rapid and quantitative procedures for identification of plant pathogenic *Streptomyces* spp. from soil. Ontario Research Enhancement Program (OREP) Report No. OREP-1999/09, p.41, Canada.
- Lehtonen MJ, Rantala H, Kreuze JF, Bang H, Kuisma L, Koski P, Virtanen E, Vihlman K, Valkonen JPT (2004). Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathology* 53(3):280-287.
- Leiner RH, Fry BA, Carling DE, Loria R (1996). Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* 86: 709-713.
- Lindholm P, Kortemaa H, Kokkola M, Haahtela K, Salkinoja-Salonen M, Valkonen JPT (1997). *Streptomyces* sp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Disease* 81: 1317-1322.
- Liu D, Anderson NA, Kinkel L (1996). Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 487-502.
- Loria R, Kempter BA (1986). Relative resistance of potato tubers produced from stem cuttings and seed-piece-propagated plants to *Streptomyces scabies*. *Plant Disease* 70: 1146-1148.
- Loria R, Bukhalid RA, Fry BA, King RR (1997). Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease* 81: 836-846.
- Loria R, Clark CA, Bukhalid RA, Fry BA (2001). Gram Positive Bacteria, *Streptomyces*. (Schaad ve ark. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria). 236-248.
- Miyajima K, Tanaka F, Takeuchi T, Kuninaga S (1998). *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 495-502.
- Naidenova M, Vladimirova D (2002). Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in Bulgaria. *Journal Cul. Collection* 3: 15-24.
- Ndowora TCR, Kinkel LL, Jones RK, Anderson NA (1996). Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of *Streptomyces* species isolated in Minnesota. *Phytopathology* 86: 138-143.
- Paradis E, Goyer C, Hodge NC, Hogue R, Stall RE, Beaulieu C (1994). Fatty acid and protein profiles of *S. scabies* strains isolated in eastern Canada. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 561-564.
- Park DH, Kim JS, Kwon SW, Wilson C, Yu YM, Hur JH, Lim CK (2003a). *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 2049-2054.
- Park DH, Yu YM, Kim JS, Cho JM, Hur JH, Lim CK (2003b). Characterization of Streptomycetes causing potato common scab in Korea. *Plant Disease* 87: 1290-1296.
- Pavlista AD (1996). How important is common scab in seed potatoes. *American Potato Journal* 73: 275-278.
- Pridham TG, Gottlieb D (1948). The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *Journal of Bacteriology* 56: 107-114.
- Pridham T.G, Hesseltine CW, Benedict RG (1958). A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. *Applied Microbiology* 6 (1):52-79.
- Sasser M (1990). Identification of bacteria through fatty acid analysis. Methods in phytobacteriology. Z.

- Klement, K. Rudolph, D. Sands: Akademiai Kiado. Budapest. pp. 199-204.
- Shirling EB, Gottlieb D (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16: 313-340.
- Song J, Lee SC, Kang JW, Bae HJ, Suh JW (2004). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:203–209.
- Takeuchi T, Sawada H, Tanaka F, Matsuda I (1996). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 476-479.