

## Türkiye’de Yetiştirilen Kültür Mantarlarından (*Agaricus bisporus*) Yumuşak Çürüklük Hastalığı Etmeninin İzolasyonu ve Tanısı

Benian Pınar AKTEPE<sup>1\*</sup>, Yeşim AYSAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Organik Tarım İşletmeciliği Bölümü, Osmaniye

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-4731-9954>

<sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0003-2647-5111>

\*Sorumlu yazar: benianaktepe@osmaniye.edu.tr

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 04.12.2023

Kabul tarihi: 21.02.2024

Online Yayınlanma: 10.06.2024

#### Anahtar Kelimeler

LOPAT

*Pseudomonas marginalis*

*Agaricus bisporus*

MALDI-TOF/MS

Bakteriyel hastalık

### ÖZ

Dünya çapında yaygın olarak yetiştirilen yenilebilir bir mantar türü olan *Agaricus bisporus*'un Türkiye'de de yetiştiriciliği ve tüketimi hızla yaygınlaşmaktadır. Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde yetiştirilen *Agaricus bisporus*'un şapkalarında kahverengi renk değişikliği ve yumuşak çürüme belirtileri gözlemlenmiştir. Etkilenen kısımlardan floresan *Pseudomonas* türleri de dahil olmak üzere toplam 23 bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlar *Pseudomonas* cinsine uygun morfolojik özellikler sergilemiştir. Hastalığın potansiyel etmenini belirlemek için Gram reaksiyonu, oksidaz aktivitesi, arginin dihidrolaz, patatete yumuşak çürüklüğü, levan üretimi, tütünde aşırı duyarlı reaksiyonlar ve Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu- Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF/MS) gibi proteomik yöntemlerle mikrobiyal türlerin tanımlanması dahil olmak üzere bir dizi teknik kullanılmıştır. Mantarlardan elde edilen izolatların bazıları ve referans izolatu *Pseudomonas marginalis* (GSPB 2325, Göttingen, Almanya) izolatu ile *Pseudomonas marginalis*'e özgün LOPAT profili sergilemiştir. Biyokimyasal Tanılama sonuçları, 1,781 ila 2,094 arasında değişen puan değerleri ile patojenite testleri ve MALDI-TOF/MS analizi ile de teyit edilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, *Pseudomonas marginalis*'in Türkiye'de yetişen kültür mantarlarında yumuşak çürüklük hastalığına neden olduğunu bildiren ilk hastalık kayıdır.

## Isolation and Identification of Soft Rot Disease Agent from Cultivated Mushrooms (*Agaricus bisporus*) in Türkiye

### Research Article

#### Article History:

Received: 04.12.2023

Accepted: 21.02.2024

Available online: 10.06.2024

#### Keywords:

LOPAT

*Pseudomonas marginalis*

*Agaricus bisporus*

MALDI-TOF/MS

Bacterial disease

### ABSTRACT

*Agaricus bisporus*, a widely cultivated mushroom globally, is witnessing a rapid expansion of cultivation and consumption in Türkiye. In the Kadirli district of Osmaniye, Türkiye, instances of brown discoloration and soft rotting symptoms were observed on the caps of cultivated *Agaricus bisporus*. A total of 23 bacterial strains, including fluorescent varieties, were isolated from the affected portions. These strains exhibited morphological characteristics in line with the *Pseudomonas* genus. To pinpoint the potential causal agent of the disease, a range of techniques, including Gram reaction, oxidase activity, arginine dihydrolase, potato soft rot, levan production, hypersensitive reactions in tobacco, and microbial species identification through proteomic methods like Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS), were applied. Some strains from the mushrooms displayed a similar LOPAT profile characteristic of the reference strain *Pseudomonas marginalis* (GSPB 2325, Göttingen, Germany). This

conclusion was further supported by pathogenicity tests and MALDI-TOF/MS analysis, with score values ranging from 1.781 to 2.094. To our knowledge, this marks the first report of soft rot disease caused by *Pseudomonas marginalis* in cultivated mushrooms in Türkiye.

**To Cite:** Aktepe BP, Aysan Y., 2024. Türkiye’de yetiştirilen kültür mantarlarından (*Agaricus bisporus*) yumuşak çürüklük hastalığı etmeninin izolasyonu ve tanısı. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 4(2): 374-385.

## Giriş

Ülkemizin kültür mantarı üretimi için hammadde potansiyelinin oldukça yüksek olması, çevre kirliliğine neden olan birçok endüstriyel ve tarımsal atıkların mantar yetiştirme ortamı olarak kullanılabilmesi ve yetiştiriciliğinin kolaylığı mantar üretimini cazip hale getirmektedir (Eren ve Pekşen, 2019). FAO verilerine göre 2021’de yaklaşık 44 milyon tona ulaşan kültür mantarının dünya genelinde en fazla üreten ülkesi Çin’dir. Türkiye’de ise yıllık kültür mantarı üretimi yaklaşık 62 bin tondur (Anonim, 2023a) ve dünyada olduğu gibi ülkemizde de en çok yetiştirilen *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach beyaz şapkalı mantar türüdür.

*Agaricus bisporus*, beyazdan koyu kahverengiye kadar değişen renklerde şapkaya sahip bir mantar türüdür. Gençken kapak kubbe şeklindeyken yaşlandıkça düzleşir. Beyaz şapkalı türü, genellikle meyve sebze pazarlarında ve marketlerde en yaygın olarak bulunan kültür mantarıdır. *Agaricus bisporus*, kontrollü koşullarda yetiştirilen ve büyük ölçekli ticari üretimi yapılan bir mantar türüdür. Yetiştiriciliği için uygun ortam sağlandığında hızlı bir şekilde büyüyebilir. Mantar üreticileri, kültür mantarının yetiştirilmesi için özel olarak tasarlanmış kapalı odalar kullanır. *Agaricus bisporus*, yemeklerde sıkça kullanılan bir malzemedir ve çok yönlü bir lezzet sunar. Çiğ olarak salatalarda, çorbada, pizza üzerinde, omletlerde ve birçok yemekte kullanılmaktadır. Ayrıca kurutulularak veya konserve edilerek saklanabilir. Özellikle antioksidan özelliklere sahip *Agaricus bisporus*, bağışıklık sistemini destekleyebilir. Ayrıca prebiyotik etkisiyle bağırsak sağlığını geliştirebilir. *Agaricus bisporus*, düşük kalorili bir gıda kaynağıdır ve protein, lif, B vitamini (örneğin, B2 ve B3) ve mineraller (örneğin, selenyum ve potasyum) içerir. Ayrıca ergosterol adı verilen bir bileşiği güneş ışığına maruz kaldığında D vitamini üretmek için kullanılabilir (Ünal ve ark., 2022).

Kültür mantarı üretiminde yüksek verim ve kaliteli ürün elde etmek üreticinin ana hedefi olsa da, üretim sürecinde ortaya çıkan hastalıklar ve zararlılar, ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olabilir (Eren ve Pekşen, 2019). Yüksek solunum hızı ve su içeriği mikrobiyal bozulmayı kolaylaştırır ve yüksek tirozinaz ve fenolik içeriği ise onları enzimatik esmerleşmeye duyarlı hale getirir. Mantarların hasat sonrası raf ömrü çoğu sebzeyle karşılaştırıldığında kısadır; çünkü mantarların mikrobiyal enfeksiyonlara karşı korunacak üst kabuğu yoktur ve patojenlere karşı oldukça duyarlıdır. Ayrıca depolamadan kaynaklanan renk bozulmalarına da oldukça hassastır.

Bu durum da patojenlerin kompost içinde hızla çoğalabilmelerine neden olmaktadır. Farklı *Pseudomonas* spp ait bakteri izolatlarının kompostta yaşadıkları ve *Agaricus bisporus*'ta hastalığa neden oldukları daha önceden yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (Abou-Zeid, 2012). Bu türler arasında *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas reactans* *Pseudomonas gingerii* ve *Pseudomonas marginalis* kültür mantarlarında hastalığa neden oldukları rapor edilmiştir (Milijasevic-Marcic ve ark., 2012). Söz konusu türler kültür mantarlarında hastalığa neden olduğu bilinmesine rağmen Türkiye'de mantar üretim alanlardan *Pseudomonas marginalis* izole edilerek tanılandığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Türkiye'de ve dünya genelinde kültür mantar yetiştiriciliğinde karşılaşılan en yaygın olan bakteriyel hastalık etmeni ise bakteriyel Kahverengi Benek Hastalığına neden olan *Pseudomonas tolaasii*'dir (Öztürk ve ark., 2017). Abu-Zeid (2012)'in bildirdiğine göre *Pseudomonas reactans* gibi komposttaki bazı saprofitik *Pseudomonas*lar, *Pseudomonas tolaasii* ile etkileşime girerek hastalık çıkışında rol oynayabilir. Bununla birlikte *Pseudomonas tolaasii*, düşük molekül ağırlıklı hücre dışı toksin olan tolaasin üretirken, *Pseudomonas reactans* ise lipopolisakkarit lipid A üretmektedir. Virülenslikte rol oynayan lipopolisakkaritler ve toksinler uygun çevre koşulları altında, konukçuda başlangıçta küçük ve ayırık olan lezyonların oluşumuna neden olurlar. Bu lezyonlar ilerleyen enfeksiyonlarda birleşerek pilusun geniş alanlarını etkiler sonuçta güçlü ve nahoş bir koku oluşumuyla yavaş yavaş çürümeye neden olmaktadır. Bu durum hasattan sonra da ortaya çıkabilir (Goor ve ark., 1986; Wells ve ark., 1996; Iacobellis ve Lo Cantore 2003).

Mantar yetiştiriciliğinde en önemli unsurlarından biri, sağlıklı, verimli ve yüksek pazar değerine sahip ürünler elde etmektir. Bu hedeflere ulaşabilmek için belirli koşulların yerine getirilmesi ve yetiştiricilik sürecinde karşılaşılan problemlerin üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Bunlar genellikle hijyenik önlemlerin ihmal edilmesi, istenilen kalitede üretim materyallerinin bulunmaması, uygun gelişim koşullarının sağlanmaması, hastalık ve zararlı organizmaların neden olduğu sorunlar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Mantar yetiştiriciliğinde kilit bir ana materyal olan kompost, mikrobiyal hastalıkların temel kaynağını oluşturabildiği için kompostun yeterince olgunlaştırılmaması, iyi havalandırılmaması ve uygun sıcaklıklarda pastörize edilmemesi gibi faktörler, hastalıkların oluşumuna zemin hazırlayabilir. Bu nedenle, kompostun uygun koşullara göre hazırlanması, örtü toprağı kaynaklı hastalıkları önlemek için ise örtü toprağının atılmadan önce dezenfekte edilmesi hastalık oluşumunu engelleyebilir. Hastalık ve zararlılarla mücadeleye yön verebilmek için üreticilerin hastalık ve zararlılar konusunda bilinçlendirilmesi de büyük önem taşımaktadır (Öztürk ve ark., 2017).

Bu çalışmada, Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde kültür mantarı yetiştirilen üretim tesisleri gezilerek yumuşak çürüklük ve kahverengi renklenme şeklinde hastalık belirtileri gösteren

mantar örneklerinden potansiyel hastalık etmeni bakterilerin izolasyonu ve hastalığa neden olan etmeni tür düzeyinde tanılamak amaçlanmıştır.

## **Materyal ve Metod**

### **Patojen Bakteri İzolasyonu**

Kültür mantarı örnekleri, Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde yetiştirilen *Agaricus bisporus*'un kahverengi lekeler ve yumuşak çürüklük belirtileri gösteren karpoforlardan (şapka+sap) klasik bakteriyolojik tekniklere göre izole edilmiştir (Lelliott ve Stead, 1987). Enfekte olmuş dış dokular esas olarak kahverengi renk değişimleri ve yumuşak çürüme sergileyen mantar şapkalarından alınmıştır. Alınan örnekler %96'lık alkol ile yüzeysel dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra steril havan içinde steril suda homojenize edilmiştir. Hazırlanan solüsyondan bir öze dolusu alınarak King B besi yerine çizgi ekimi yapılmış ve petriler 25°C'de iki gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından gelişen bakteri koloniler aynı ortamda saflaştırılmış ve fizyolojik, biyokimyasal ve patojenite testlerinde kullanılmak üzere eğik besi yerinde +4°C'de saklanmıştır.

### **Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler**

Bakteriyel izolatların biyokimyasal tanısında, Gram reaksiyonu, levan oluşumu, oksidaz reaksiyonu, pektolitik aktivite testi (Kovacs, 1956), arginine dihidrolase testi (Thornley, 1960), tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun N) bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu, King B besi yerinde gelişim (Klement ve ark., 1990) testleri esas alınmış ve her bir izolat için testler 3'er kez tekrarlanmıştır.

**Potasyum hidroksit testi (KOH) ile Gram reaksiyonun belirlenmesi:** Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra 48 saatlik bakteri kültürlerinden plastik özeye alınan bakteri, solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 10 saniye sonra öze yukarı kaldırıldığında sünmenin oluşması durumunda bakteriler gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Kontrol olarak gram pozitif özelliğe sahip *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatı (Cmm 3/1-A)(Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008), gram negatif özelliğe sahip *Erwinia amylovora* izolatı (YA-223) kullanılmıştır (Sands, 1990).

**Floresan pigmentlerin üretimi:** Floresan *Pseudomonas*'ların tanımlanması için önemli bir testtir (Leliot ve Stead, 1987). İzolatlar KB ortamında geliştirilmiş ve 25°C'de 48 saatlik

inkübasyondan sonra geliştirilen bakteri kültürleri 365 nm UV ışıkla incelenmiştir. *Pseudomonas marginalis*'in referans izolatu GSPB 2325 (The Göttingen Collection of Phytopathogenic Bacteria, The University of Göttingen, Germany) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

**LOPAT profili:** İzole edilen bakterilerin LOPAT profilini (Levan üretimi, Oksidaz testi, Pektinolitik aktivite, Arginin dihidrolaz üretimi ve Tütünde aşırı duyarlık) belirlemek amacıyla *Pseudomonas*'lara yönelik testler gerçekleştirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). **Levan üretimi:** 48 saatlik izolatlar steril bir öze ile Sakkaroz Nutrient Agar (SNA) besi yerine aşılandıktan sonra 25°C'de inkübe edilmiştir. SNA'da 3-5 mm çapında kubbemsi, parlak, krem renkte, mukoid, levan tipte kolonilerin oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir Pozitif kontrol olarak *Erwinia amylovora* izolatu (YA-223) kullanılmıştır. **Oksidaz testi:** King B besi yerinde 48 saat geliştirilen izolatlar plastik öze yardımıyla steril bir filtre kağıdına damlatılan %1'lik tetra methyl-p-phenylendiamine dihydrochloride (Merck(CK17009302 739), Almanya) eriyiğinde çözüldürülmüştür. 10 sn içinde koyu mavi renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Acidovorax citrulli* izolatu (YA-888) kullanılmıştır. **Pektinolitik aktivite:** Çeşme suyunda yüzeysel dezenfeksiyonu yapılan patates yumruları %1'lik NaOCl ile 3 dakika muamele edildikten sonra steril suda bekletilmiştir. Patates yumrularının steril bir bıçak ile kabukları soyularak bir cm kalınlığında dilimlenmiştir. Dilimler nemli steril filtre kağıdı üzerinde steril petrilere yerleştirilmiştir. King B besi yerine aşılanmış bakteri kültüründen bir kürdan yardımıyla alınarak patates yüzeyine yayılmıştır. 25°C'de inkübatörde iki gün bekletildikten sonra inokule edilen bölgede oluşan yumuşama pozitif olarak değerlendirilmiştir Pozitif kontrol olarak *Pectobacterium carotovorum* izolatu (YA-703) kullanılmıştır.

**Arginin dehidrolaz testi:** 5 ml'lik cam tüplere 3'er ml aktararak hazırlanan Thornley 2A besi yerine 48 saatlik bakteri kültüründen öze ile tek koloni alınarak aşılama yapılmış ve üzerine 2 ml steril parafin ilave edilmiştir. Numuneler 7-15 gün arasında 25°C'de inkübatörde bekletildikten sonra pembemsi kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak BD-1 kodlu *Pseudomonas corrugata* izolatu (YA-647), negatif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv *tomato* izolatu (YA-10) kullanılmıştır.

**Tütünde aşırı duyarlık testi:** Mantar izolatlarının 10<sup>7</sup> hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonları insülin şırınga yardımıyla tütün yaprağının damar arasına infiltre

edilmiştir. Bitkiler 48 saat sonra inokulasyon bölgelerindeki nekroz oluşumu pozitif olarak kabul edilmiştir.

### **Patojenite Testi**

Sağlıklı *Agaricus bisporus*'un şapkaları steril damıtılmış saf su ile nemlendirilip her bir mantar şapkası bir sterile petri kabına yerleştirilmiştir. Her bir izolat için üç kültür mantarı şapkası kullanılmıştır. King B besiyerinde geliştirilen bakteri izolatlarının  $10^8$  hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan solüsyonu ve referans kültür izolatının (GSPB 2325) solüsyonundan 10 µl'si şapka yüzeyine bulaştırılmıştır. Negatif kontrol olarak steril saf su ile inoküle edilmiştir. Petri kapları saklama kutusu içine alınarak 22°C'de inkübe edilmiş ve belirtiler günlük olarak gözlemlenmiştir. Leke oluşumu kontrolle karşılaştırılarak patojenite değerlendirilmiştir (Abou-Zeid, 2012).

### **Bakteriyel İzolatların MALDI-TOF MS ile Tanısı**

Son yıllarda, mikroorganizmaların tanısını büyük ölçüde kolaylaştıran MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) teknolojisi kullanılarak patojen izolatların tanısı, Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde Prof. Dr. Soner SOYLU denetiminde gerçekleştirilmiştir. MALDI-TOF MS yöntemi, mikroorganizmaların protein yapılarının kütle spektrometresi ile analizi ve m/z değerlerine göre oluşturulan spektrallerin, sistemin referans veri tabanındaki organizmalara uygunluğuna dayanarak mikroorganizmaların cins ve türlerini hızla tanımlamayı amaçlamaktadır (Pavlovic ve ark., 2012). MALDI-TOF MS, mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin (protein, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonizasyonundan sonra manyetik bir alandan geçirilmesiyle protein profillerini çıkarır (Yılmaz ve ark., 2014). MALDI-TOF MS skor değerleri,  $\geq 2$  olduğunda tür düzeyinde tanı, 1,7 ile 1,9 arasında ise cins düzeyinde tanı, ve skor değeri  $< 1,7$  olduğunda güvensiz bir tanı olarak kabul edilir (Pavlovic ve ark., 2012; Uysal ve ark., 2019).

### **Bulgular ve Tartışma**

#### **Patojen Bakteri İzolasyonu**

Bakteri izolatları, Osmaniye'nin Kadirli ilçesindeki iki mantar üretim evinden kahverengi leke belirtileri gösteren *Agaricus bisporus* şapkalarından elde edilmiştir. *Agaricus bisporus* şapkalarında görülen yüzeysel kahverengi noktalarından ve çizgilerinden yapılan izolasyonlar sonucunda dairesel kubbeli, 2 mm- çapı sarımsı ve krem renkte koloniler elde edilmiştir. İki

mantarhaneden toplanan örneklerden yapılan izolasyonlarda 31 adet bakteriyel izolat elde edilmiştir (Tablo 1).

### Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler

**Potasyum hidroksit testi (KOH) ile Gram reaksiyonun belirlenmesi:** İzolatların Gram reaksiyonları Tablo 1’de verilmiştir. KM2-1, KM2-2, KM2-3, KM3, KM4, KM11, KM12, KM16, KM17, KM19, KM21, KM22, KM23 ve referans kültür izolatı GSPB 2325, viskoz ve yapışkan bir sünmeye yol açmış ve pozitif bir reaksiyon göstermiştir. Bu izolatlar, gram negatif bakteriler olarak sınıflandırılmıştır.

**Floresan pigmentlerin üretimi:** İzolatların King B besiyerinde geliştirildiğinde dokuz tanesi (KM2-1, KM2-2, KM2-3, KM4, KM11, KM16, KM19, KM21, KM22) sarı veya sarımsı yeşil floresan pigmentler üretmişlerdir.

**LOPAT profili:** İzolatların LOPAT karakterleri Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Bakteriyel izolatların morfolojisi, Gram reaksiyonu, floresan pigmentasyonu ve LOPAT karakteri

Kodu	Koloni Rengi	G*	F	L	O	P	A	T	Kodu	Koloni Rengi	G*	F	L	O	P	A	T
<b>GSPB 2325</b>	<b>Sarı</b>	-	+	+	+	+	+	-	KM13	Açık Sarı	+	-	-	-	-	+	-
KM1-1	Koyu sarı	+	-	-	-	-	-	+	KM14-1	Sarı	+	-	-	-	-	-	-
KM1-2	Koyu sarı	+	-	-	-	-	-	+	KM14-2	Sarı	+	-	-	-	-	-	-
<b>KM2-1</b>	<b>Sarı</b>	-	+	+	+	+	+	-	KM15	Krem	+	-	-	+	-	+	-
<b>KM2-2</b>	<b>Sarı</b>	-	+	+	+	+	+	-	KM16	Krem	-	+	-	+	-	+	-
KM2-3	Sarı	-	+	-	+	-	+	-	KM17	Sümüksü Krem	-	-	-	+	-	+	-
KM3	Koyu krem	-	-	-	+	-	+	-	KM18	Krem	+	-	-	+	-	-	-
KM4	Sarı	-	+	-	+	-	+	+	KM19	Krem	-	+	-	+	-	+	-
KM5	Koyu krem	+	-	-	-	-	-	-	KM20	Sarı	+	-	-	-	-	-	+
KM6	Koyu krem	+	-	-	-	-	-	-	KM21	Sarı	-	+	-	+	-	+	-
KM7	Koyu krem	+	-	-	+	-	-	-	KM22	Sarı	-	+	-	+	-	+	-
KM8	Krem	+	-	-	-	-	+	-	KM23	Krem	-	-	-	-	-	-	-
KM9	Sümüksü Krem	+	-	-	+	-	-	-	KM24	Krem	+	-	-	-	-	-	-
KM10	Sarı	+	-	-	-	-	+	-	KM25	Krem	+	-	-	+	-	-	-
KM11	Koyu Sarı	-	+	+	+	-	+	-	KM26	Krem	+	-	-	+	-	-	-
KM12	Krem	-	-	-	+	-	+	-	KM27	Krem	+	-	-	+	-	-	-

\*G: Gram reaksiyon, F: Floresan, L: Levan, O: Oksidaz, P: Pektinolitik aktivite, A: Arginin dihidrolaz, T: Tütünde aşırı duyarlık. +: izolatın bu testte pozitif reaksiyon verdiğini gösterir; -: izolatın bu testte negatif reaksiyon verdiğini gösterir.

*Pseudomonas marginalis* olduğu düşünülen izolatlar KM2-1 ve KM2-2 ve referans kültür, *Pseudomonas marginalis* için karakteristik olan benzer bir LOPAT IVa profili (++++-) göstermiştir; Levan üretimi (+); Oksidaz (+); Pektinolitik aktivite (+); Arginin dihidrolaz (+); Tütünde aşırı duyarlık (-). İzole edilen *Pseudomonas* türlerinin kolonileri UV ışığı altında

sarımsı yeşil floresan renk üreten bu izolatlar o grup için LOPAT IVa profil özelliğini göstermiş ve Lelliott ve Stead (1987) tarafından bildirilenlerle tutarlı olduğu görülmektedir.

### **Patojenite Testi**

*Pseudomonas marginalis* için karakteristik olan benzer LOPAT IVa profili (++++-) gösteren KM2-1 ve KM2-2 kodlu izolatlar ve GSPB 2325 referans kültür ile sağlıklı kültür mantarı şapkalarında yapılan patojenite testinde tipik hastalık belirtisi olan kahverengileşme ve yumuşak çürüklük inokulasyondan 15 gün sonra gözlenmiştir. Koch postulatları tamamlanan KM2-1 ve KM2-2 kodlu izolatlarının farklı kolonileri sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere eğişik besi yerinde +4°C’de saklanmıştır.

Kahverengileşme ve yumuşama mantar üretim yerlerinde ve pazarlarda istenmeyen bir olgudur ve tüketiciler tarafından tercih edilmesinde önemli bir faktördür (Vízányó ve Felföldi, 2000). Kültür mantarları sterilize edilmiş substratlarda yetiştirilmektedir ve yüzlerce fungus ve bakteri arasında bir mikroorganizma bile bulaştığında, ortamın yüksek nem içeriğinin yanında ve rekabet olmadığında hızlıca gelişmektedir (Brosnan ve Sun, 2002). Kültüre alınmış *Agaricus bisporus*’u etkileyen patojenik *Pseudomonas* türleri ile ilgili yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Lekeye neden olan *Pseudomonas*’lar arasında en iyi karakterize edilen mantar üretim alanlarında turba ve kaplama işleminde kullanılan kireçtaşıyla giren *Pseudomonas tolaasii* olarak vurgulanmaktadır (Wong ve Preece, 1980).

### **Bakteriyel İzolatların MALDI-TOF MS ile Tanısı**

MALDI TOF MS ile yapılan tanı sonucunda, KM2-1 kodlu izolat ise 2,115 indeks değeri ile ve KM2-2 kodlu izolat 2,094 indeks değeri ile *Pseudomonas marginalis* olarak tür düzeyinde tanılanmıştır (Ek1). Kültür mantarlarında kahverengileşmeye ve yumuşamaya neden olan *Pseudomonas marginalis*’in Türkiye’de varlığı henüz tespit edilmemiştir (EPPO, 2023). Bu çalışma Türkiye’de kültür mantarlarında *Pseudomonas marginalis*’in neden olduğu yumuşak çürüklük hastalığının ilk raporudur.

### **Sonuç ve Öneriler**

Osmaniye’nin Kadirli ilçesindeki mantar üretim alanlarında yetiştirilen kültür mantarlarından kahverengi leke ve yumuşama görülen hastalıklı 27 karpofor toplanmıştır. Hastalıklı karpoforlardan yapılan izolasyonlar sonucunda 31 bakteriyel izolat elde edilmiştir. Bakteriyel izolatların fizyolojik ve biyokimyasal testleri sonucunda *Pseudomonas marginalis* için karakteristik olan benzer LOPAT IVa profili (++++-) gösteren iki izolat patojenite testleri



için seçilmiştir. Test edilen bakteri izolatları, şapkalar üzerinde açıktan koyu kahverengiye kadar değişen farklı düzeylerde renk değişikliği ve dokuda yumuşama göstermiştir. KM2-1 ve KM2-2 kodlu izolatlar *Pseudomonas marginalis*'in referans izolatının neden olduğu lezyonlarla tutarlı sonuç vermiştir. MALDI TOF MS teknolojisi kullanılarak yapılan tanı sonucunda KM2-1 ve KM2-2 kodlu izolat *Pseudomonas marginalis* olarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. MALDI-TOF tanılama sisteminin son yıllarda dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde yapılan birçok fungal ve bakteriyel etmenlerin tanılama çalışmalarında moleküler çalışmaları tamamen destekleyen yeni nesil tanılama sistemi olduğu bildirilmiştir (Duman ve Soylu, 2019; Soylu ve ark., 2020; Soylu ve ark., 2021; Kara ve Soylu, 2022; Soylu ve ark., 2022a; Uysal ve ark., 2022).

Hastalık etmeni *Pseudomonas marginalis*'in de aralarında bulunduğu *P. fluorescens*, *P. mediterranea*, *P. veronii*, *Erwinia rhapontici*, *E. persicina*, *Enterobacter cloacae*, *Lelliottia amnigena*, *Rahnella aquatilis* ve *Pantoea agglomerans* gibi bakteriyel hastalık etmenlerinin ülkemizde yetiştirilen havuç bitkilerinde fırsatçı saprofit karakterde hastalık etmeni olduğu, özellikle primer yumuşak çürüklük hastalık etmenlerinin sebep olduğu hastalık şiddetini artırdığı bildirilmiştir (Soylu ve ark., 2022). *Pseudomonas marginalis*'in mantar üretim alanlarındaki ekonomik etkisinin yanı sıra, yetiştirme ortam koşulları (sıcaklık, yüksek nem) göz önüne alındığında özellikle bakteriyel hastalıkların enfeksiyon meydana geldikten sonra mücadelesinin neredeyse imkansız olduğu bir gerçektir ayrıca bu patojenin yayılma eğilimi de henüz kesin olarak bilinmemektedir. Daha geniş çapta araştırmalar yapılarak *Pseudomonas marginalis*'in ülkemizdeki mantar üretim alanlarındaki yayılım düzeyinin tespiti incelenmelidir.

### **Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti**

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

**Not:** Bu makalenin özeti daha önce 9. Uluslararası Bilimsel Tarım Sempozyumunda poster bildiri olarak sunulmuştur.

## Kaynaklar

Abou-Zeid MA., 2012. Pathogenic variation in isolates of pseudomonas causing the brown blotch of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Brazilian Journal of Microbiology 2012: 1137-1146

Aktepe BP, Mertoğlu K, Evrenosoğlu, Aysan Y., 2019. Farklı bitki uçucu yağların erwinia amylovora'ya karşı antibakteriyel etkisinin belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 16(1): 34-41.

Anonim 2023a. Bitkisel üretim verileri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=104&locale=tr> (Alınma Tarihi: 25.10.2023).

Brosnan T, Sun DW., 2002. Inspection and grading of agricultural and food products by computer vision systems—a review. Computers and Electronics in Agriculture, 36(2-3): 193-213.

Çetinkaya Yıldız R, Aysan Y., 2008. Domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al)'nin izolasyonu, geleneksel, serolojik ve moleküler yöntemlerle tanılanması. Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 19(1): 114-122.

Duman K, Soylu S., 2019. Characterization of plant growth-promoting traits and antagonistic potentials of endophytic bacteria from bean plants against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Bitki Koruma Bülteni, 59: 59-69.

EPPO 2023. Distribution of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMMS/distribution> Erişim Tarihi: 22.11.2023.

Eren E, Pekşen A., 2019. Türkiye’de kültür mantarı üretimi ve teknolojik gelişmeler. Mantar Dergisi, 10(3): 225-233.

Günay A., Abak K., 1976. Yemeklik mantarın botanik özellikleri ve tarımı. Türkiye I. Yemeklik Mantar Kongresi, 23-24 Kasım, Ankara.

Iacobellis NS, Lo Cantore P., 2003. *Pseudomonas* “reactans” a new pathogen of cultivated mushrooms. In: Iacobellis, N.S. et al. (eds). *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 595-605.

Kara M, Soylu S., 2022. Isolation of endophytic bacterial isolates from healthy banana trees and determination of their *in vitro* antagonistic activities against crown rot disease agent *Fusarium verticillioides*. Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 27(1): 36-46

Klement Z, Rudolph K, Sands DC., 1990. Methods in phyto bacteriology. Akademia Kiado, Budapest, 568p.

Kovacs N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyaneus* by oxidase reaction. Nature, 178(4535): 170-173.

Lelliott RA, Stead DA., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: Preece, T.F. (ed). Methods in Plant Pathology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, p. 216.

Milijasevic-Marcic M, Todorović B, Potočnik I, Stepanović M, Rekanović E., 2012. First report of *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus* in Serbia. Phytoparasitica, 40: 299–303.

Olivier JM, Guillaumes J, Martin D., 1978. Study of a bacterial disease of mushroom caps. Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. INRA, Angers, France, 903-916.

Öztürk N, Basım E, Basım H., 2017. Yemeklik kültür mantarında (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) yaygın görülen mikrobiyal hastalıklar. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 21(1): 112-125.

Pavlovic N, Zdravkovic J, Cvikic D, Zdravkovic M, Adzic S, Pavlovi, S, Surlan-Momirovic G., 2012. Characterization of onion genotypes by use of RAPD markers. Genetika, 2: 269–278

Sands DC., 1990. Physiological criteria-determinate tests. In Methods in Phytobacteriology, ed: Klement, Z., Rhudolp, K., Sands, D.C., Academia Kiado, Budapest, Hungary.

Soylu EM, Soylu S, Kara M, Kurt Ş., 2020. Sebzelerde sorun olan önemli bitki fungal hastalık etmenlerine karşı vermicomposttan izole edilen mikrobiyomların *in vitro* antagonistik etkilerinin belirlenmesi. KSU Tarım ve Doğa Dergisi, 23: 7-18.

Soylu S, Kara M, Uysal A, Kurt Ş, Soylu E.M., 2021. Determination of antagonistic potential of endophytic bacteria isolated from lettuce against lettuce white mould disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Zemdirbyste-Agriculture, 108: 303-312.

Soylu S, Kara M, Uysal A, Kurt Ş, Soylu EM, Üremiş İ, Sertkaya E, Bozkurt İA, Öztürk M., 2022. Amik ovası havuç ekim alanlarında sorun olan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerin belirlenmesi. KSU Tarım ve Doğa Dergisi, 25: 1326-1340.

Thornley MJ., 1960. The differentiation of pseudomonas from other gram-negative bacteria on the basis of ariginine metabolism. Journal of Applied Microbiology, 23(1): 37–52.

Uysal A, Kurt Ş, Soylu S, Kara M, Soylu EM., 2022. Hatay ilinde yer alan turunçgil paketleme tesislerinde meyve ve hava kökenli mikrobiyata içerisindeki fungal ve bakteriyel türler ile yoğunluklarının belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 27(2): 340-351.

Uysal A, Kurt Ş, Soylu S, Soylu EM, Kara M., 2019. Yapağı yenen sebzelerdeki mikroorganizma türlerinin MALDI-TOF MS (Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi) tekniği kullanılarak tanımlanması. Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences, 29(4): 595-603.

Ünal S, Bağcı H, Oral H, Sabır FK., 2023. Salisilik asit uygulamalarının mantarlarda (*Agaricus bisporus*) soğukta muhafaza süresince kalite özelliklerine etkisi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 28(1): 59-70.

Vízhányó T, Felföldi J., 2000. Enhancing color differences in images of diseased mushrooms. Comput. Electron. Agric., 26: 187-198.

Wells JM, Sapers GM, Fett WF, Butterfield JE, Jones JB, Bouzar H, Miller FC., 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans,'* and *P. 'gingeri'*. Phytopathology., 86: 1098–1104.

Wong WC, Preece TF., 1980. *Pseudomonas tolaasii* in mushroom crops: a note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England. J. Appl. Bacteriol., 49: 305–314.

Yılmaz S, Duyan S, Artuk C, Diktaş H., 2014. Mikrobiyolojik tanımlamada MALDI-TOF MS uygulamaları. TAF Preventive Medicine Bulletin, 13(5): 421-426.