

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Merve Sultan YEŞİL**

**UÇ KURUTAN HASTALIĞI ETMENİ [*Phoma tracheiphila*  
(Petri) KANC. & GHİK.]'NE KARŞI BAZI FUNGİSİTLERİN  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ADANA- 2020**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**UÇ KURUTAN HASTALIĞI ETMENİ [*Phoma tracheiphila* (Petri) KANC.  
& GHİK.]'NE KARŞI BAZI FUNGİSİTLERİN ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Merve Sultan YEŞİL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu Tez 14/02/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....  
Prof. Dr. Mukaddes KAYIM  
DANIŞMAN

.....  
Doç. Dr. B. Kemal ÇAĞLAR  
ÜYE

.....  
Dr. Öğr. Üye. Ali ENDES  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.  
**Kod No:**

**Prof.Dr. Mustafa GÖK  
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.  
Proje No: FYL-2018-10390**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UÇ KURUTAN HASTALIĞI ETMENİ [*Phoma tracheiphila* (Petri) KANC.  
& GHİK.]'NE KARŞI BAZI FUNGİSİTLERİN ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Merve Sultan YEŞİL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mukaddes KAYIM  
Yıl : 2020, Sayfa:69  
Jüri : Prof. Dr. Mukaddes KAYIM  
: Doç. Dr. B. Kemal ÇAĞLAR  
: Dr. Öğr. Üye. Ali ENDES

Bu çalışmada bir ruhsatlı olmak üzere 12 farklı fungusitin in vitro koşullarda *Phoma tracheiphila*'nın en virulent izolatlarının (E9 ve E10) miselyal gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. In vitro koşullarda patojenin miselyal gelişimini engellemede Cyprodinil (375 g/kg)+ Fludioxonil (250 g/kg) kombinasyonunun 5 ppm $\geq$ , Fluxapyroxad (75 g/L) + Difenoconazole (50 g/L) fungusit kombinasyonunun 100 ppm $\geq$  uygulama dozları %100 etki ederek en etkili fungusitler olmuştur. Bu fungusit kombinasyonlarının EC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.124 ve 1.228 ppm olarak hesaplanmıştır. Azoxystrobin, Dithianon ve Pyraclostrobin gibi etkili maddeli fungusitler *P. tracheiphila*'nın miselyal gelişimini engellemede kayda değer bir etki göstermemiştir. Sera denemelerinde ise Cyprodinil (375 g/kg)+ Fludioxonil (250 g/kg) ve Fluxapyroxad (75 g/L) + Difenoconazole (50 g/L) fungusit kombinasyonlarının normal dozları hastalık şiddetini engellemede çok etkili değilken, uygulama dozunun iki katı kullanıldığında hastalık sırasıyla %62.6 ile %45.3 düzeyinde engellenmiş, ruhsatlı fungusit, bakırhidroksit ise hastalığı en fazla % 9.8 oranında engellemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fungisit, Limon, Patojenisite, PCR, *Plenodomus tracheiphilus*.

## ABSTRACT

## MSC THESIS

### INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF SOME FUNGICIDES AGAINST MALSECCO DISEASE [*Phoma tracheiphila* (Petri) KANC. & GHİK.]

Merve Sultan YEŞİL

ÇUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor : Prof. Dr. Mukaddes KAYIM  
Year : 2020, Pages:69  
Jury : Prof. Dr. Mukaddes KAYIM  
: Assoc. Prof.Dr. B. Kemal ÇAĞLAR  
: Asst. Prof. Dr. Ali ENDES

In this study, 14 different concentrations of 12 fungicides, one licensed were tested to suppress radial growth of *P. tracheiphila* mycel in vitro condition. 5.0 ppm and above concentrations of Cyprodinil (375g/Kg) + Fludioxonil (250g/Kg) combination was found to be the most effective on radial growth inhibition. Fluxapyroxad (75g/L) + Difenconazole (50g/L) combination was the second effective fungicides to inhibit the radial mycel growth at 100ppm and above concentrations. EC<sub>50</sub> values of these fungicides were calculated respectively as 0.124 and 1.228 ppm. Fungicides with active substances such as Azoxystrobin, Dithianon and Pyraclostrobin did not show any significant effect in preventing mycelial development of *P. tracheiphila*. In greenhouse trials, the normal doses of Cyprodinil (375 g / kg) + Fludioxonil (250 g / kg) and Fluxapyroxad (75 g / L) + Difenconazole (50 g / L) fungicide have not been very effective in preventing disease severity. However, when using twice the application dose, the disease was prevented at 62.6% and 45.3%, respectively, and the licensed fungicide copper hydroxide prevented the disease at most 9.8%.

**Key Words:** Fungicide, Lemon, Pathogenicity, PCR, *Plenodomus tracheiphilus*.

## GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Adana ili ve çevresinde limon yetiştirilen bahçelerde büyük ölçüde ürün kayıplarına ve toplu ağaç ölümlerine fungal hastalık etmeni *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu bilinmektedir. Bölgede patojen gelişimini engellemek için kültürel ve bakırlı fungusitlerle yapılan entegre mücadele çalışmaları yeterli olmayıp, alternatif kimyasal mücadele yöntemleri ve biyolojik mücadeleye yönelik etkin antagonist mikroorganizmalar bir çok araştırmacı tarafından araştırılmaktadır.

Bu çalışmada *P. tracheiphila*'nın kimyasal mücadelesine yönelik, patojenin biyolojisi ve hastalık döngüsü göz önüne alınarak farklı etki mekanizmasına sahip sistemik ve koruyucu etkili fungusitlerin patojen gelişimini engellemede etkinliği üzerine araştırmalar yapılmıştır. Çalışmalar Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki koruma Bölümü Uygulama Seralarında, Bitki Koruma Biyoteknoloji Laboratuvarlarında ve Abdioğlu Çiftliğinde yürütülmüştür. Adana ili ve çevresinde limon yetiştiriciliği yapılan bahçelerden alınan Eureka ve Kütdiken limonların hastalıklı dal dokularından elde edilen 15 adet izolatın Abdioğlu Çiftliğinde Kütdiken limon fidanları üzerinde yapılan patojenisite çalışmalarıyla virülenslik düzeyleri belirlenmiştir. Farklı besiyerlerinde (HA, MEA, YUA) *P. tracheiphila*'nın miselyal gelişimi ve spor yoğunluğu araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda HA besiyerinde kullanılan diğer besiyerlerine göre miselyal gelişimin daha fazla ve spor yoğunluğunun % 70 olduğu hesaplanmıştır.

Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarlarında patojenin tanısında klasik morfolojiye dayalı teşhisin yanı sıra, etmenin genomik DNA'ları izole edilerek rDNA'nın transkripsiyon olmayan ITS bölgelerinin DNA'sı çoğaltılmış ve nükleotid dizilerinin NCBI gen bankası veri tabanında diğer ülkelere ait olan *P. tracheiphila* izolatları ile karşılaştırmaları yapılmıştır. Koloni morfolojisi, spor yapısı ve fialakonidilerin oluşumuna göre etmenin *P. tracheiphila* olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca etmenin moleküler olarak da tanısı 534 bp'lik rDNA'da ITS bölgelerine ait nükleotid dizileri ile de ispatlanmış ve Eureka izolatlarından E9 ve E10

için NCBI gen erişim kayıt numarası (MT012189 ve MT012190) alınmıştır. NCBI veri tabanında nükleotid eşleştirmede (nBLAST) *P. tracheiphila* izolatlarının ITS nükleotid dizileri % 100 eşleşmiş nükleotid eksikliği ve fazlalığı görülmemiştir. MEGAX yazılım programı kullanılarak Maksimum likelihood analizi ile oluşturulan soy ağacında 1000 tekrar sonucunda oluşturulan Bootstrap değerleri bağlantı noktalarında %86 ve %93 olarak elde edilmiştir. Türkiye izolatları İtalyan izolatlarla %100 eşleşmiş ve aynı dendogramda yer almış ve bootstrap değer %93'tür. İsrail, Tunus ve bazı İtalya izolatları ise farklı bir dallanma göstermiş ve bootstrap değeri %86'dır.

Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Biyoteknoloji Laboratuvarlarında in vitro koşullarda farklı etkili maddeli koruyucu ve sistemik 12 adet fungisit, patojenin miselyal gelişimini engellemede Cyprodinil (375g/kg )+ Fludioxonil (250 g/kg) ve Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50 g/l) fungisit kombinasyonları en yüksek etkiyi göstermiştir. İn vitro ortamda kullanılan 12 adet fungisit patojeni %50 engelleme oranlarına (EC<sub>50</sub>) göre dozlarına bakıldığında; en düşük dozda (375g/kg )+ Fludioxonil (250 g/kg) fungisit kombinasyonunun 0.124 ppm ve Fluxapyroxad (75g/l)+ Difenconazole (50 g/l) fungisit kombinasyonunun 1.228 ppm dozları patojen popülasyonunun %50 sini engelleme etkisi gösterirken, ruhsatlı fungisit % 35 metalik bakıra eşdeğer Bakır Hidroksit'in oldukça yüksek dozu, 186.844 ppm ile engelleme etkisi göstermiştir.

Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki koruma Bölümü Uygulama Seralarında, Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250 g/kg), Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50 g/l) fungisitleri ve patojene ruhsatlı Bakır Hidroksit (% 35 metalik bakıra eşdeğer) ile virüent E9 ve E10 izolatlarından elde edilen spor süspansiyonu inokulasyondan bir hafta önce ve inokulasyondan 2-4 hafta sonra olmak üzere 3 kez fungisit uygulamaları yapılmıştır. Fungisitlerin etkilerini belirlemek için, fidanlara fungisit uygulandıktan 6 hafta sonra gövde nekroz ölçümleri, fungisitlerin hastalık şiddeti üzerine etkisi ve yüzde engelleme oranları hesaplanmıştır. Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250 g/kg) fungisit kombinasyonunun en yüksek dozunda (100 ppm)

gövde iletim demetinde patojen gelişimi 20.3 mm, Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50 g/l) fungusit kombinasyonunun 100ppm dozunda patojen gelişimi 29.7 mm ve Bakır Hidroksit (% 35 metalik bakıra eşdeğer)'in 100 ppm dozunda ise 49 mm uzunluğunda patojenin iletim demetinde geliştiği ölçülmüştür.

Fungisitlerin % engelleme oranlarına bakıldığında ise Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250 g/kg) etkili madde uygulaması *P. tracheiphila* miselyal gelişimini % 16.6 -% 62.6 aralığında, Fluxapyroxad (75g/l)+ Difenconazole (50 g/l) % 5.2 -% 45.3 aralığında Bakır Hidroksit (%35 metalik bakıra eşdeğer) % 1.98 -% 9.8 arasındaki değerlerde engelleyici etki sergilemişlerdir. Bu sonuçlara paralel olarak hastalık oluşumu şiddetinin de doğal olarak en düşük seviyede olması beklenen fungusit kombinasyonu Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250 g/kg)'in 100 ppm dozunda %13 olarak elde edilmiştir. Fluxapyroxad (75g/l)+ Difenconazole (50 g/l) fungusit kombinasyonunu 100ppm dozunda hastalık şiddeti % 26, Tarım Bakanlığı tarafından ruhsatlı Bakır Hidroksit'in 100 ppm dozunda ise hastalık şiddeti % 40'a kadar çıkmıştır.

Yapılan bu çalışmada in vitro ve sera denemelerinde sistemik ve kontakt etkili fungusit Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250 g/kg) *Phoma tracheiphila* miselyal gelişimini engelleme de başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler patojenin miselyal gelişimini engellemeye yönelik iyi sonuçlar vermekle birlikte sera deneylerinden elde edilen veriler çok başarılı bulunmamıştır. Sera koşullarında fidanlarda patojenin fialokonidi ve piknidiosporları ile yapay infeksiyonlarda % 100 başarı sağlanmıştır. Bu nedenle sera koşullarında fungusit deneylerinde de başarılı sonuçlar alınmış, ancak bu sonuçlar, açık alan limon bahçelerinde kullanılacak kadar yeterli veri içermemektedir. Bu fungusitlerin aynı dozlarının bahçe koşullarında doğal ortamlarda da deneysel olarak tekrar edilmesi gerekmektedir.





## TEŞEKKÜR

Bana tez konumu veren, çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mukaddes KAYIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans çalışmalarım boyunca tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na ve maddi desteği ile deneylerimi destekleyen Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı yürütme aşamasında ve deneme sonuçlarımın analizinde yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali ENDES ve Doktora Öğrencisi Tahsin AY'a, laboratuvar olanakları ile desteklerini esirgemeyen Dr. Filiz Çalışkan KEÇE'ye de ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olup, desteğini her zaman hissettiren ve gösteren sevgili eşim Fikri KESER'e teşekkür ederim.

Tezim süresince ve eğitim hayatımın her aşamasında maddi, manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailem; babam İbrahim YEŞİL ve annem Mediha Mehtap YEŞİL'e, sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ .....	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET .....	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER .....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XII
SİMGE VE KISALTMALAR .....	XVI
1.GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	1
2.1. Dünyada Uçkurutan Hastalığı Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	1
2.2. Türkiye’de Uçkurutan Hastalığı Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	5
3. MATERYAL ve METOD .....	11
3.1. Materyal .....	11
3.1.1. Patojen İzolasyon Materyali.....	11
3.1.2. <i>İn vitro</i> Çalışmalarda Kullanılan Besiyerleri .....	11
3.1.3. Patojenisite Çalışmalarında Kullanılan Bitki Materyali.....	12
3.1.4. Çalışmalarda Kullanılan İzolatlar.....	12
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Fungisitler.....	12
3.1.6. <i>P. tracheiphila</i> ’nın Moleküler Tanısında Kullanılan Materyaller.....	14
3.2. Metod.....	15
3.2.1. <i>P. tracheiphila</i> İzolatlarının Elde Edilmesi.....	15
3.2.2. <i>P. tracheiphila</i> İzolatlarının Virülenslik Düzeylerinin Belirlenmesi .....	16
3.2.3. <i>In vitro</i> Koşullarda Farklı Besiyerlerinin Fungal Gelişime Etkisi .....	18
3.2.4. Fungisitlerin PDA Besi Ortamlarında Hazırlanması.....	18

3.2.5. İn Vitro Koşullarda Fungisitlerin <i>P. tracheiphila</i> İzolatları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi .....	20
3.2.6. Sera Çalışmalarında Kullanılan Fungisit Dozlarının Hazırlanması .....	20
3.2.7. <i>P. tracheiphila</i> Spor Süspansiyonunun Limon Fidanlarına İnokulasyonu .....	20
3.2.8. <i>P. tracheiphila</i> ile İnfekteli Limon Fidanlarına Fungisitlerin Uygulanması ve Değerlendirilmesi .....	21
3.2.9. <i>P. tracheiphila</i> 'un Moleküler Analizi .....	21
3.2.9.1. DNA İzolasyonu .....	21
3.2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon, Agaroz Jel Elektroforez ve PCR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	22
3.2.9.3. <i>P. tracheiphila</i> İzolatlarının ITS Gen Dizi Analizi .....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	25
4.1. <i>P. tracheiphila</i> 'nın Tanısı ve Patojenisitesi .....	25
4.2. <i>P. tracheiphila</i> 'nın Farklı Besiyerlerinde Miselyal Gelişimi .....	33
4.3. Fungisitlerin İn vitro koşullarda <i>P. tracheiphila</i> 'nın Miselyal Gelişimi Üzerine Etkileri .....	35
4.4. Fungisitlerin Sera Koşullarında <i>P. tracheiphila</i> 'ya Karşı Etkisi .....	50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	57
KAYNAKLAR .....	61
ÖZGEÇMİŞ .....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 4.1. <i>P. tracheiphila</i> ile infekteli Eureka ve Küt diken limon ağaçlarından elde edilen İzolatlar .....	26
Çizelge 4.2. <i>In vitro</i> koşullardaki denemelerde kullanılan fungusitlerin % 50 engelleme oranı (ppm).....	48
Çizelge 4.3. Sera koşullarında <i>P. tracheiphila</i> ile yapay olarak inoküle edilen Küt diken limon fidanlarına 3 farklı fungusitin 4 farklı dozunun uygulandığı Küt diken limon fidalarının dallarında patojenin oluşturduğu nekroz uzunlukları .....	52
Çizelge 4.4. Sera denemelerinde fidanlara uygulanan fungusitlerin farklı dozların patojeni % engelleme oranı .....	54



- Şekil 1.1. Uçkurutan etmeni (*Phoma tracheiphila*) ile infekteli Eureka Limon ağaçlarında hastalık belirtisi. (A); Uçkurutan nedeni ile yaprağı dökülen dallar, (B); Uçkurutandan dolayı tamamen kuruma belirtisi gösteren ağaç, (C); bir yıllık dalların enine kesitinde etmenin iletim demetinde oluşturduğu renklenme, (D): Uç kurutandan zarar görmüş infekteli kurumuş ince dal üzerinde etmenin piknidiumları ve yukarısında sağlıklı ince dal örneği..... 4
- Şekil 3.1. ITS5/ITS4 primerlerinin 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS 2 ve 28S rDNA bölgelerini içeren Nüklear rDNA'daki yerinin şeması..... 14
- Şekil 3.2. Hastalık belirtisi gösteren infekteli dal örneklerinden (A) kesilen bitki doku örneklerinin sterilizasyonu için parçalara ayrılması ve sterilizasyon işlemi yapılmış dokuların steril kabin içerisinde kaba filtre kağıtlarında kurutulması işlemi (B) ..... 16
- Şekil 3.3. Her bir izolat için 3 fidan olmak üzere, kontrol ile birlikte toplam 48 adet Kütdiken limon fidaları (A), *P. tracheiphila* izolatlarının saf kültürlerinden hazırlanan miselyal disk yerleştirilmiş fidanlar (B) ..... 17
- Şekil 3.4. Steril su içerisine denemelerde kullanılan fungusitlerin farklı dozlarda (0.0, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ppm) stok solüsyonlarının hazırlanması (A), (B); Stok fungusit solüsyonları içeren PDA'nın steril petrilere dökülmesi (C); steril kabin içinde PDA besiyerinde gelişen fungusların miselyal çaplarını hesaplamak için "x" ve "y" eksenin çizimi (D) ..... 19
- Şekil 3.5. PDA besiyerlerinde gelişen fungusların miselyal gelişiminin milimetrik bir cetvel ile ölçülmesi (A); Ölçümü yapılan fungusların haftalık çizelge takibi için listelenmesi (B) ..... 19

Şekil 4.1.	Uçkurutan hastalık belirtisi gösteren Eureka limon ağaçları (A, B) ve patojenin obur dalda kabuk altında iletim demetlerinde turuncu ve somon rengi görünümü (C) ve PDA besi ortamında oluşturduğu koloni deseni.....	25
Şekil 4.2.	<i>P. tracheiphila</i> 'nın konidi yapısının sterio ışık mikroskop altında görünümü (A); çimlenen sporların yapısı (B) (100 x büyültme).....	27
Şekil 4.3.	<i>P. tracheiphila</i> izolatlarının genomik DNA'larından PCR ile çoğaltılan ITS1, 5,8S rDNA ve ITS2 ile 18S rDNA'nın küçük bir parçasını içeren 600bp DNA'nın %1 agaroz jel elektroforezde 80 Volt 1 saat yürütüldükten sonra EtBr ile boyandıktan sonra görünümü .....	28
Şekil 4.4.	Eureka limon çeşidi ile infekteli ağaçlardan izole edilen <i>P. tracheiphila</i> patojenine ait E9 ve E10 izolatlarının ITS gen dizileri kullanılarak Maksimum likelihood analiz programı ile oluşturulan soy ağacı. 1000 tekrar sonucunda Bootstrap değerleri (%) bağlantı noktalarında gösterilmiştir .....	29
Şekil 4.5.	Kütdiken limon fidanlarının patojenisite çalışmalarında değerlendirilen Spiegel-Roy ve ark. (1978) ile Tusa ve ark. (2000)'nin 0-5 skalasına göre pozitif kontrol (A); skala değeri 1 nolu fidan (B); skala değeri 2 nolu fidan (C); skala değeri 3 nolu fidan (D); skala değeri 4 nolu fidan (E); skala değeri 5 nolu fidan (F) .....	31
Şekil 4.6.	<i>P. tracheiphila</i> izolatlarının % hastalık şiddeti değerleri.....	32
Şekil 4.7.	MEA, HA ve YUA besiyerinde <i>P. tracheiphila</i> 'un 7 (A), 14 (B) ve 21 (C) günlük miselyal gelişimi (soldan sağa doğru) .....	33
Şekil 4.8.	Farklı besi ortamlarının % spor yoğunluğu üzerine etkisi .....	34
Şekil 4.9.	<i>In vitro</i> koşullarda 250 g/L Azoxystrobin fungisitinin farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	36

Şekil 4.10. <i>In vitro</i> koşullarda % 4 Pyraclostrobin + % 12 Dithianon fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	37
Şekil 4.11. <i>In vitro</i> koşullarda % 12.8 Pyraclostrobin + %25.2 Boscalid fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	38
Şekil 4.12. <i>In vitro</i> koşullarda 375 g/kg Cyprodinil+ 250 g/kg Fludioxonil fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	39
Şekil 4.13. <i>In vitro</i> koşullarda 75 g/L Fluxapyroxad ve 50 g/L Difenconazole fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	40
Şekil 4.14. <i>In vitro</i> koşullarda 150g/L Propiconazole + 150g/L Difenconazole fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	41
Şekil 4.15. <i>In vitro</i> koşullarda 50 g/L Fenbuconazole fungusitinin farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	42
Şekil 4.16. <i>In vitro</i> koşullarda 60 gr / lt Metconazole fungusiti farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	43
Şekil 4.17. <i>In vitro</i> koşullarda %25 Tebuconazole fungusiti farklı dozlarının <i>P. tracheiphila</i> miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C).....	44



- Şekil 4.18. *In vitro* koşullarda % 3.4 Cyflufenamid + %15 Triflumizole fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)..... 45
- Şekil 4.19. *In vitro* koşullarda %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit fungusiti farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C) ..... 46
- Şekil 4.20. *In vitro* koşullarda % 25 metalik bakıra eşdeğer Bakır Oksiklorür fungusiti farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C) ..... 47
- Şekil 4.21. Sera koşullarında 1 yaşındaki Kütdiken limon fidanlarına patojen inoküle edilmiş ancak fungusit uygulanmamış hastalık gelişimi gözlenen pozitif kontrol (A) ve yapay inokülasyon yapılmamış ancak fungusit uygulanmış negatif kontrol (B)..... 51
- Şekil 4 22. *P. tracheiphila* ile yapay olarak inoküle edilmiş Kütdiken limon fidanlarında fungistlerin en yüksek dozlarının etkisi (A: Cyprodinil (375g/kg )+ Fludioxonil (250 g/kg), (B: 75 g/L Fluxapyroxad + 50 g/L Difenoconazole) ve (C: %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit) ..... 51
- Şekil 4.23. Sera koşullarında patojenin yapay olarak inoküle edildiği Kütdiken limon fidanlarına fungusit uygulandıktan 6 hafta sonra re-izolasyonları. Fungisit uygulanmamış pozitif kontrol (A); 25ppm %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit uygulanmış (B); 25ppm 75 g/l Fluxapyroxad+50 g/l Difenoconazole uygulanmış (C) ..... 55
- Şekil 4.24. Sera koşullarında *P. tarcheiphila* ile yapay olarak inoküle edilen Kütdiken limon fidanlarına uygulanan 3 farklı fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının hastalık şiddetine % etkisi ..... 56

## SİMGE VE KISALTMALAR

°C	: Derece celcius
Cm	: Santimetre
Ç.Ü.	: Çukurova Üniversitesi
Da	: Dekar
Dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiniükleotidtrifosfat
EtBr	: Ethidium bromid
FAO	: Food and Agriculture Organisation
G	: Gram
H <sub>2</sub> O	: Su
ITS	: Internal transcribed spacer
ITS4	: Internal transcribed spacer primer 4
ITS5	: Internal transcribed spacer primer 5
L	: Litre
M	: Molar
mg/ml	: Miligram/Mililitre
mg	: Miligram
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
nBLAST	: nükleotid Blastı: nükleotidlerin eşleştirilmesi
NCBI	: National Center for Biotechnology Information

ppm	: Part Per Million
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Patates Dekstroz Agar
pH	: Power of Hydrogen
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Revolutions per minute (Dakikada devir sayısı)
Sn	: Saniye
St	: Streptomisin
Taq	: Termo stabil polimeraz enzimi
Tet	: Tetrasiklin
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole

## 1.GİRİŞ

Turunçgiller dünyada ve ülkemizde ekonomik açıdan önemli bir gelir kaynağı olup, gerek iç tüketim gerekse dış ticarete günden güne artan bir öneme sahiptir. Dünya turunçgil üretiminde yaklaşık 38 milyon ton üretim ile Çin ilk sırada yer alırken bunu yaklaşık olarak 20 milyon ton üretimi ile Brezilya ve 12 milyon ton üretimiyle Hindistan izlemektedir. Türkiye ilk 10 ülke içerisinde yaklaşık olarak 4.9 milyon ton turunçgil üretimi ile 7. sırada yer almaktadır (FAO, 2018).

Türkiye’de turunçgil üretiminin türlere göre dağılımında; portakal yaklaşık 1.90 milyon ton üretim miktarı ile ilk sırada, mandarin 1.65 milyon ton üretim miktarı ile 2. sırada ve 1.1 milyon ton ile limon üretiminde 3. sırada yer almaktadır (TÜİK, 2018). Ülkemiz limon üretimiyle Akdeniz ülkeleri içerisinde, İspanya’dan sonra 2. sırada yer almaktadır (FAO, 2018). Türkiye’de limon üretiminin illere göre dağılımında Mersin, %57’lik üretim payı ile ilk sırada, %18’lik pay ile Adana ikinci sırada yer almaktadır. Dolayısı ile Türkiye limon üretiminin %75’lik kısmını bu iki ilimiz karşılamaktadır (TÜİK, 2018). Türkiye limon üretiminde, fiyatı ve uzun süre muhafaza edilebilme özelliği, üreticilerin turunçgil pazarı için aradığı şartların başında yer almaktadır.

Ülkemizde yetiştirilen limonlar; ekşi, tatlı ve limon benzerleri olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Doğu Akdeniz Bölgesinde ticari olarak tercih edilerek geniş çapta yetiştiriciliği yapılan Eureka, Kütdiken, Enterdonat, Yediveren ve Lizbon çeşitleri ekşi limon grubundandır. Akdeniz ülkelerinde ekşi limon grubu tüm limon çeşitleri Uç kurutan hastalığı etmeni [*Phoma tracheiphila* (Petri) Kan. and Gik. (*Phoma tracheiphila* (Petri) Gruyt Aveskamp & Verkley)]’ne son derece duyarlı olup, bu tip ağaçlarda ciddi kayıplar yaşanmaktadır. Nitekim Adana ili ve merkez ilçelerinde ekşi limonlar grubundan olan Eureka, Kütdiken, Enterdonat ve Yediveren çeşidi limon bahçelerinde yapılan survey çalışmalarında da ağaçların

çoğunluğunun Uçkurutan (*P. tracheiphila*) hastalık belirtileri gösterdiği ve ciddi ağaç ölümleri olduğu tespit edilmiştir (Survey gözlemleri).

*P. tracheiphila* Funguslar alemi içerisinde, Ascomycota şubesinde, Pleosporales takımında yer alan *Phoma* cinsi bir patojendir. DNA'nın keşfi ile birlikte moleküler biyoloji alanında sınırları zorlayan gelişmeler sayesinde patojenlerin genetik yapısının taksonomi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *Phoma tracheiphila* etmeni de *Plenodomus tracheiphilus* (Petri) Gruyter, Aveskamp & Verkley olarak; de Gruyter ve ark., (2013) tarafından tekrar sınıflandırılmıştır.

Turunçgillerde *P. tracheiphila* hastalık etmeninin neden olduğu Uçkurutan Hastalığı dünyada ilk kez 1894 yılında Yunan adaları olan Kios ve Poros'da görülmüştür (Sarejanni 1935, 1939; Ziadi ve ark., 2013). Ancak Uçkurutan hastalığı etmeni olan fungus 1929 yılında Petri tarafından keşfedilmiş *Deuterophoma tracheiphila* Petri (Petri, 1929; 1930) ve *Bakerophoma tracheiphila* (Petri) Cif. (Petri, 1929) olarak adlandırılmıştır. Söz konusu Uçkurutan hastalığı etmeni turunçgil yetiştiriciliği yapılan Akdeniz ve Karadeniz havzasındaki ülkelerde, İtalya, İspanya, Fransa, Irak, İsrail, Fas, Tunus, Libya, Arnavutluk, Portekiz, Yunanistan, Türkiye, Cezayir, Kıbrıs, Malta, Ege adaları, Kolombiya, Uganda, Avustralya da rapor edilmiştir (EFSA Journal 2014).

Uçkurutan Hastalığı etmeni *P. tracheiphila* konukçuları, Rutaceae familyası içerisinde yer alan *Poncirus trifoliata*, *Fortunella spp.*, *Severinia buxifolia* ve tüm turunçgil çeşitlerinde infeksiyona neden olduğu bilinmektedir. Bu türler arasından hastalığa en duyarlı olan turunçgiller ve akraba türleri; limon, ekşi turunçgil türleri (ağaç kavunu, turunç vb.), bergamot, bazı mandarin çeşitleri, tanjelo ve tangor çeşitleri, yuvarlak limon ve lime gösterilmektedir.

*P. tracheiphila*'nın optimum gelişme sıcaklığının 20–23°C olduğu ayrıca 30°C gibi yüksek sıcaklıklarda sporlarının 5 günden sonra çimlenme kabiliyetlerini kayb ettikleri bu sebeple yazın infeksiyon oluşturmadığı bilinmektedir (Kurt, 2013 ). Patojen sporlarının Adana bölgesinde Eylül-Mayıs ayları arasında bitkiyi

infekte ettiği ve en çok hastalık infeksiyonunun bu bölgede sonbahar mevsiminin özellikle de Ekim ayında olduğu bildirilmiştir (Erkılıç ve Çınar, 1989).

Uçkurutan Hastalığına neden olan fungal etmen *P. tracheiphila* 'nın piknidleri bir yıllık infekteli kurumuş sürgünler üzerinde, epidermisin hemen altında yer almaktadır. İnfeksiyon, rüzgar, dolu veya don hasarı gibi iklimsel olaylar, toprak işleme, yabancı ot kontrolü ve budama gibi kültürel uygulamalar infekteli sürgünlerdeki piknidiumlardan açığa çıkan piknidiosporlar; turuncgil ağaçlarının yaprak, sürgün, dal, gövde ve toprak yüzeyine çıkmış kılcal köklerindeki yaralı dokularından veya doğal açıklıklarından bitki dokusuna giriş yaparak hastalık oluşturmaktadır (Nachmias ve ark, 1980; Baydar, 2010). Hastalığın bilinen taşıyıcı belli bir vektörü yoktur ancak genç bitkiler özellikle etmenin infeksiyonuna karşı hassastır. *P. tracheiphila* bitki bünyesine girdikten sonra ürettiği selülotik ve pektolitik enzimler; hücreleri birbirine bağlayan orta lamellerin, daha sonra da hücre duvar yapılarının bozulmasına sebep olmaktadır. Miselyal gelişim sırasında ürettiği “Mal seccin” adı verilen fitotoksik bir glikopeptit toksini iletim demetleri içerisinde su geçişi ile bitkinin üst kısımlarına taşındığı belirtilmiştir. “Mal seccin” aynı zamanda plasmalemma, kloroplast ve sitoplazmanın yapısının ve şeklinin değişmesine, iletim demetlerinin zambak benzeri bir madde ile tıkanmasına ve su transferinin engellenmesine sebep olmaktadır. (Pacetto ve Davino, 1976; Bashi ve ark, 1980; Erkılıç 1988). Bitkinin dokularında gerçekleşen hasarların ardından hastalığın karakteristik belirtileri sırasıyla meydana gelmektedir; uç yapraklarda kloroz oluşumu ve yaprak sapı sürgünde kalacak şekilde bölgesel yaprak dökülmeleri, sürgünlerde kurumalar ilerleyerek dalların kuruması daha sonra tüm bitkinin ölümü ile sonuçlanmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Uçkurutan etmeni (*Phoma tracheiphila*) ile infekteli Eureka Limon ağaçlarında hastalık belirtisi. (A); Uçkurutan nedeni ile yaprağı dökülen dallar, (B); Uçkurutandan dolayı tamamen kuruma belirtisi gösteren ağaç, (C); bir yıllık dalların enine kesitinde etmenin iletim demetinde oluşturduğu renklenme, (D): Uç kurutandan zarar görmüş infekteli kurumuş ince dal üzerinde etmenin piknidiumları ve yukarısında sağlıklı ince dal örneği

*P. tracheiphila* etmeninin bitkide meydana getirdiği diğer karakteristik belirtilerinden “Mal fulminante” (ani ölüm) ve “Mal nero” olarak adlandırılan iki formu da bulunmaktadır. Mal fulminante, patojen bitkinin köklerindeki yaralardan giriş yaptığında belirtiler henüz bitkinin bir kısmını hastalandırılmış görünmektedir. Fakat hastalık o kadar ani ve hızlı bitkide ilerlemektedir ki yapraklar dallarda kurur ve ağaç ölür. “Mal nero” belirtileri ise infekte ettiği ağacın odun dokusunun kararmasına neden olan şiddetli bir hastalık belirtisidir. Patojen bitkiye girerek ağacın ksilemine ulaşana kadar herhangi bir dış belirtiler

oluşturmadan hastalık gelişim göstermektedir (Perrotta ve Graniti 1988). İnfeksiyon ilerledikçe sürgünlerin, dalların ve en içteki odun dokusunun rengi kahverengi bir hal aldığı gözlemlenir. Koyulaşan bitki odun dokusundan ise ilerleyen zamanda çürümüş kavun kokusu yayılmaktadır (Nigro et al. 2011).

Uçkurutan hastalığı mücadelesinde; kültürel önlemler olarak bahçeye dikilecek fidanların etmene dayanıklı ve sertifikalı olması, sürekli ağaçların kontrol edilip hastalıklı olanlarının sökülüp imha edilmesi, ağaçların obur dallarının düzenli temizlenmesi, bitkide yara açılmamasına dikkat edilmesi, hastalıklı sürgünlerin budanarak imha edilmesi özellikle budamaların patojenin inaktif olduğu yüksek sıcaklıklarda yapılması tavsiye edilmektedir. Ayrıca farklı antagonist mikroorganizma türlerinin biyolojik mücadelede kullanılması ile patojenin miselyal gelişimini engellemede başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bununla birlikte Uçkurutan hastalığı etmeni *P. tracheiphila*'nın mücadelesinde düzenli aralıklarla ruhsatlı fungusitlerin uygulanması önerilmektedir. Ancak Uçkurutan etmenine karşı ruhsatlı fungusitler bakırlı fungusitler olup koruyucu fungusit olarak patojenin bitki yüzeyinde çimlenmesini önlemeye yöneliktir. İnfekteli ağaçların bu fungusitlerle tedavi edilmesi mümkün değildir.

Bu çalışmanın amacı limon bahçelerinde sorun oluşturan Uçkurutan Hastalığı ile kimyasal mücadele kapsamında, sistemik ve koruyucu etkili fungusitlerin yer aldığı farklı etki mekanizmasına sahip bazı fungusitlerin in vitro ve sera koşullarında *P. tracheiphila*'nın gelişimini engelleme üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.





## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Dünyada Uçkurutan Hastalığı Üzerine Yapılan Çalışmalar

Solel ve Oren (1975), yaptığı araştırmalarında *P. tracheiphila* etmeninin Rutaceae familyası içerisinde *Citrus* türlerinden daha fazla limonu, sonra ise ağaç kavunu ve bazı mandarin çeşitlerinde hastalık oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Solel ve ark. (1977), İsrail’de yaptıkları Uçkurutan hastalığı ile kimyasal mücadele çalışmalarında en etkili uygulamayı yaprakтан uygulanan koruyucu fungusit Captofol uygulaması ile belirlemişlerdir. Hastalıklı bitkilere gövdeden Benzimidazol uygulamasının düşük etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Salerno ve Cutuli (1977), İtalya’da hastalığın infeksiyon dönemi öncesi zaman aralığında koruyucu fungusitlerle kimyasal mücadele yapılabilineceğini ve sistemik fungusitlerden Benomyl’in Eylül ayında kullanılmasının etmene karşı mücadelede etkili olduğunu, bu fungusitin sürekli kullanımında ise *P. tracheiphila*’nın dayanıklılık kazandığını tespit etmişlerdir.

Perrotta ve ark. (1980), yaptıkları çalışmalarda İtalya’da yetiştirilen limon çeşitlerinden Mal secco’ya en duyarlı çeşidin “*Feminello*”, en tolerant çeşidin ise “*Monachello*” olduğunu ifade etmişlerdir.

Thanassoulopolos (1990), Yunanistan bahçelerinden alınan limon çeşitlerinden seleksiyon yöntemiyle üretilen limon çeşidi “*Ermioni*”nin *P. tracheiphila*’ya tolerant ve yapraklardan yapılan protein analizi çalışmalarında ise İtalya’da üretilen tolerant limon çeşidi “*Monachello*” ile benzerlikleri olduğunu bildirmiştir.

Gentile, Tribulato ve ark. (1992), bazı turunçgil çeşitlerinin patojen-toksin ilişkisini incelemek ve *P. tracheiphila*’nın “Mal seccin” toksinine farklı duyarlılık gösterdiği üzerine araştırma yapmışlardır. “*Tarocco*” ve “*Feminello*” hücre hatlarından yapılan enzim tahlilleri sonucunda kontrollü ortamlardaki kitinaz ve

glukonaz varlığı ile bu hücre hatlarının *P. tracheiphila* toksinine karşı dayanıklılığı arasında pozitif bir ilişki olduğunu açıklamışlardır.

Burgio ve Rosciglione (1994), turunçgillerde hastalığa neden olan “Mal secco” hastalığının etmeni *P. tracheiphila*'nın in vitro koşullarda pektolitik enzim ürettiğini bunların poligalakturonaz (PG), polimetilgalakturonaz (PMG), pektin liyaz (PGL), pektat liyaz (PL) ve pektinetil esteraz (PME) olduğunu belirtmişlerdir (Graniti, 1969; Evola et al., 1973; Pacetto and Grasso, 1974; Burgio ve Rosciglione, 1994). Çalışmalarında *P. tracheiphila* türlerinin farklı virülenslikte olma durumunun ürettikleri pektolitik enzim yapısı ve seviyesi ile ilişkisini araştırmışlardır. Bu sebeple UV radyasyon uygulaması ile elde edilen en yüksek virüent 3 adet izolat (PTN83, PT1 and PT20) ve çok düşük virülense sahip bir izolat (PTM503) kullanmışlardır. Yapılan analizlerde en virüent 3 izolatın PG, PMG ve PL enzim aktivitesi sabit şekilde sürekli artıp 20. günde maksimum seviyeye ulaştığını, çok düşük virülansa sahip izolatta (PTM503) bu üç enzimin aktivitesinin oldukça düşük olduğunu, PGL enzim aktivitesinin ise tüm izolatlarda önemli bir artış göstermediğini bildirmişlerdir. Bundan yola çıkarak yüksek düzeyde bir PG enzim aktivitesinin olması patojenin virülensliğini yükseltmekte ancak bu tek başına yeterli olmamaktadır. Bunun sonucunda *P. tracheiphila*'da her bir enzimin sentezinin farklı bir şekilde kontrol edilme olasılığı olduğunu, patojenin virülensliğinin kontrolünde enzimin aktivitesinden ziyade enzim üretimini kontrolünün yapılması gerektiğini açıklamışlardır.

Solel ve ark. (1994), “Mal secco” etmeni *P. tracheiphila*'ya duyarlı turunçgil çeşitlerinden ağaç kavunu ve rangpur laymına exocortis viroidi (CEVd) infekte edilmiştir. Bir yıl inkübe edilen çeşitlerde viroid sistemik olarak yerleşmiş; ağaç kavunu yapraklarında kıvrılma ve kısa boğuma neden olurken, rangpur laymında bu semptomlara rastlanmamıştır. CEVd'li çeşitlere daha sonra yapraktan inoküle edilen *P. tracheiphila* her iki çeşitte de hastalık oluşturmuştur. Fakat önceden CEVd ile infekte edilen bitkilerin, CEVd ile infekteli olmayan bitkilere göre yapraklarda oluşan semptomlarının ve hastalık şiddetinin daha az

görüldüğünü, bu nedenle patojene sistemik dayanıklılığı arttırmak için CEVd ile ilk inokülasyon yapılabileceğini rapor etmişlerdir.

Gentile ve ark. (2006), çalışmalarında patojenlere karşı genetik hastalık direnci oluşturmak amacıyla antifungal genleri mikroorganizmalar aracılığıyla çeşitli bitkilerin genomuna yerleştirmişlerdir. *Trichoderma harzianum*'un *Chit42* genini (antifungal protein endokitinazın kodlanması), fungal hastalıklara tolerant transgenik bitkileri yeniden üretmek için "*Femminello siracusano*" limonuna *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla aktarmışlardır. Sonuç olarak in vitro koşullarda transgenik yaprak proteinlerinin *P. tracheiphila*'nın fungal gelişimini ve konidi çimlenmesini engellendiğini, limonda önemli ölçüde düşük oranda lezyon gelişimi görülmüştür. Antifungal endokitinaz enziminin bitkiye aktarımı, turuncgil çeşitlerinde hastalık kontrolü için bir yöntem teşkil edebileceğini bildirmişlerdir.

Ezra ve Kroitor (2007), Akdeniz Bölgesi'nin yıkıcı hastalığı "Mal secco" etmeni *P. tracheiphila*'nın özellikle turuncgillerden limon, turunç, laym ve ekşi turuncgil çeşitlerinin duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Mal secco'nun tipik semptomlarının bahçelerde kolaylıkla teşhis edildiğini fakat bunun hastalığın ileri safhalarda olduğunu anlaşıldığı, erken teşhis için PCR yöntemiyle patojeni teşhis etme çalışmaları yapmışlardır. Bu çalışmalar neticesinde İsrail'de farklı bölgelerdeki farklı turuncgil çeşitlerinden alınan izolatlarda önemli genetik farklılıklar olmadığını belirtmişlerdir.

Kalai ve ark. (2010), *P. tracheiphila* izolatlarının genetik çeşitliliği üzerine çalışmalar yapmak amacıyla Tunus'daki farklı meyve bahçelerinden etmenin farklı konukçularından aldıkları örneklerin moleküler teşhisini yapmışlardır. ITS-RFLP markırları ile yapılan çalışmada 4 adedi İtalya'dan olan 58 adet *P. tracheiphila* izolatının Tunus'dan alınan izolatlarla genetik ve tür özelliklerinin benzer olduklarını bildirmişlerdir. Patojenin turunç iletim demetlerinden geçişi virülen bir izolatın sayesinde moleküler olarak gözlemlenebilmiştir. Patojenin bitki bünyesinde hızlı ilerlemesi ile birlikte karakteristik semptomlar geliştikten sonra teşhis edildiğini ve bu durumun patojen mücadelesi için geç kalındığını ortaya

koymuştur. Bu sorunu çözmek için simptomların ortaya çıkmasından önce patojenin bitki bünyesinde teşhisi ve moleküler çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu belirtmişlerdir.

Ziadi ve ark. (2013), *P. tracheiphila*'nın coğrafi dağılımı ile patotipik mesafe arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla altı Akdeniz ülkesinin turunçgil bahçelerinden alınan farklı virülens düzeyinde 51 adet izolat kullanılmışlardır. Bu izolatlar içerisinde alt grup oluşturulan 20 patotipin farklı virülenslik seviyesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda virülenslik ile coğrafi dağılım arasında önemli bir ilişki bulunamadığını, patojenin dağılımının düzensiz ve kademesiz olduğunu açıklamışlardır.

Ezra ve ark. (2013), konukçu-patojen arasında etkileşime neden olan genleri tanımlamak için *P. tracheiphila* izolatının fialokonidisini *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile kaba limon fidelerine aktarmışlardır. Konukçu üzerinde düşük virülenslik gösteren mutant izolatları *Agrobacterium tumefaciens* ile belirlediklerini bildirmişlerdir.

Kalai ve ark. (2014), turunçgil çeşitlerinden (*Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*), *Medicago truncatula*, *Laurus nobilis*) izole ettikleri 200 adet bakteri izolatı içerisinde in vitro testler sonucunda, 28 adet izolatının vasküler patojen olan *P. tracheiphila* ve *Verticillium albo-atrum* gelişimini engellediği görülmüştür. 28 adet bakteri izolatı hidrolitik aktivitelerine göre lipopeptit biyosentezinden sorumlu bitki gelişimini teşvik eden bakteriler (PGPB), ribozom dışı peptid enzim salgılayan (NRPS) olarak gruplandırmışlardır. 16 adet bakteri izolatının hidrolitik aktiviteye pozitif sonuç verdiğini ve bu izolatlardan en az 2 adedi PGPB, 1 adedi NRPS olarak bulmuşlardır. Bu 16 adet bakteri izolatı içerisinde rastgele seçilenlerin sekansları sonucunda 9 izolatın *Bacillus velezensis*, 4 izolatın *Bacillus methyltrophicus*, 1 izolatın *Bacillus amyloliquefaciens* ve 2 izolatın *Bacillus mojavensis* olduğunu tespit etmişlerdir.

Karkouch ve ark. (2015), araştırmalarında lipopeptit üreten *Bacillus metiltrophicus* TEB1 türü, *P. tracheiphila* 'ya karşı güçlü bir antifungal aktivite sergilediğini, lipopeptit üretiminin *P. tracheiphila* miselyal büyümesini ve konidi çimlenmesini önemli ölçüde engellediğini açıklamışlardır. *Bacillus metiltrophicus* TEB1 türünün lipopeptit miktarının artırılmasının konidilerin parçalanmasına neden olduğunu, yapılan analizlerinde *P. tracheiphila* karşı lipopeptit aktif bileşiğin C15 iturin A ve bu bileşiğin ilerde biyolojik kontrol amacıyla, günümüzde kullanılan insektisitlerin yerini alabileceğini bildirmişlerdir.

## 2.2. Türkiye’de Uçkurutan Hastalığı Üzerine Yapılan Çalışmalar

Atalay ve Aksöz (1977-78), in vitro koşullarda “Mal secco” hastalık etmeni *P. tracheiphila*'nın sıvı ve katı besiyerlerinde morfolojik ve fizyolojik özellikleri üzerine çalışmalar yapmışlardır. Patojenin gelişimi için en az 5 günlük bir inkübasyon sürenin geçmesi gerektiğini açıklamışlardır. Fungusun optimum gelişmesi için sıcaklığın 20-25°C, pH'sının ise 5.5-6.0 arasında olduğunu bildirmişlerdir. İn vitro koşullarda sitokrom inhibitörleri, antifungal antibiyotikler, EDTA ve metal tuzlarının, fungusun büyümesi üzerine etkileri sonucunda; Cu ve Zn mikro elementi ile nistatin, grisefulvin ve sikloheksimin gibi antibiyotiklerin Uçkurutan hastalığı etmeni *P. tracheiphila*'yı kontrol edebileceğini savunmuşlardır.

Dinç ve ark. (1979), kimyasal mücadele üzerine yapılan çalışmalarında Turunçgillerde Uçkurutan hastalığına (*Deuterophoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik) karşı etkili bir yöntem tespit etmişlerdir. Bu yöntemle göre budama işlemleri fungusun durgun olduğu ağustos ayında yapılmasını, ağaçların ekim, aralık ve mart aylarında yeşil aksam ilaçlaması olarak 3 kez ilaçlanmasını, ilaçlamalarda Benomyl etkili maddeli ilaçların % 1.5 dozunda beyaz yağ ile karıştırlarak kullanımının hastalık üzerinde etkili olduğunu önermişlerdir. Sistemik etkili benomyl fungusiti bitkide kalıntı oluşturması nedeniyle günümüzde kullanımını yasaklanmıştır.

Akteke, 1979 yılında Mersin ilinde yetiştiriciliği yapılan Kütdiken, Lamas, Enterdonata, İtalyan Memeli, Yediveren ve Kıbrıs limon çeşitlerinin Uçkurutan hastalığına yakalanma oranlarını sırasıyla % 58.1 , % 51.4 , % 30.3 , % 33.0 , % 23.9 ve % 11.1 olarak saptamıştır. Buna ilaveten, ülkemizde yapılan çalışmalarda *P. tracheiphila*'nın bir yara paraziti olduğunu, patojenin; toprak içindeki yaralı kökten % 40, yaralı gövdeden %100, ayası koparılmış yaprak sapından %100, yaprağın üst yüzeyinden % 40, yaprağın alt yüzeyinden ise % 20 oranında bulaşabildiğini bildirmiştir.

Akteke (1979), konukçu yaşı-patojen infeksiyonu arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu, fidanların genç döneminde hastalık şiddetinin daha fazla görüldüğünü bildirmiştir. Limon çeşitlerinden Kütdiken ve Lamas (1-5), İtalyan ve Kıbrıs (6-10), Yediveren (11-19), Enterdonato (20-40) yaşları arasında hastalık şiddetinin yüksek olduğunu açıklamıştır.

Doğrul (1987), Mersin'de Uçkurutan hastalığının arazi şartlarında infeksiyon zamanlarını saptama çalışmasında Kütdiken limon çeşidi ve turunc fidanlarında simptom oluşumunu gözlemlemiştir. Çalışma sonucunda infeksiyonların Eylül ayında başladığını en yüksek hastalık bulaşma zamanının; sırasıyla Kasım, Aralık ve Ocak aylarında olduğunu bu aylardan sonra ise hastalığın bulaşmasında azalma olduğunu bildirmiştir.

Erkılıç (1988), bitki organları üzerinde bulunun saprofit mikroorganizmaların bazı bitki fungal patojenlerine karşı kontrolde kullanılabileceğini bildirmiştir. Bundan yola çıkarak limon ağaçlarında ciddi bir sorun olan *P. tracheiphila*'nın koloni gelişimini engellemede saprofit mikroorganizmaların antagonistik etkileri üzerine çalışmalar yapmıştır. Tespit edilen saprofit mikrofloranın çoğunluğunu beyaz ve pembe mayalar olarak tanımlanan *Cryptococcus* ve *Sporobolomyces* türleri ile *Cladosporium* türlerinin ve diğer fungus türlerinin yer aldığını saptamıştır. Yapılan in vitro çalışmalarda *Aspergillus*, *Epicoccum* ve *Trichoderma* türlerine ait izolatların *P. tracheiphila*'nın gelişimini engellediği görülürken yapılan sera denemelerinde ise kullanılan

*Aspergillus*, *Epicoccum*, *Trichoderma* ve *Cladosporium* spp. izolatlarının patojen ile birlikte veya patojen verildikten sonra verilen patojenlerin *P. tracheiphila*'nın gelişimini tamamen kontrol altına alamadığını tespit etmiştir.

Tuzcu ve ark.(1992), *P. tracheiphila*'ya duyarlı Kütdiken limon çeşidi Antalya Yerli Yuvarlak, Finike Yerli Yuvarlak, Monachello, Enterdonato, Mollo Memed, Kıbrıs, Santa Teresa, Zagara Bianca ve Aklimon çeşitleri ile melezleme çalışmaları yapmışlardır. Geliştirilen melez çeşitlerden Tuzcu-8941 ve Tuzcu - 895L *P. tracheiphila* ile yapılan yapay inokülasyon çalışmaları sonucunda dayanıklı olarak tespit edilmiştir. Ancak geliştirilen bu melez hatların ticari olarak kullanımı ile ilgili hiçbir veriye rastlanmamıştır.

Çimen (1994), Uçkurutan hastalığı etmenine karşı kimyasal mücadele çalışmalarında turunç üzerine aşılı Kütdiken limonunda sistemik etkili inhibitör Paclobutrazol'ün in vitro, sera ve arazi koşullarında farklı uygulamaların etkisi üzerine araştırmalar yapmıştır. Elde edilen verilere göre Paclobutrazol'un toprak ve yaprak uygulama denemeleri ile *P. tracheiphila*'nın gelişimini önemli ölçüde engellendiği gözlemlenmiştir. Paclobutrazol'ün, Kütdiken limonunda sürgün ve boğum arası kısılma, obur dal oluşumu ve gelişmesinin engellenmesi, sürgünlerde yaprak kalınlığı-boyu oranında artması gibi etkilerin patojenin bitkiye girişine engel oluşturduğunu açıklamışlardır.

Atacan ve Yalçın (2004), limon ağaçlarında hastalığa neden olan patojen *P. tracheiphila*'yı baskılayan Etkin Mikroorganizmaların [(EM) (başlıca laktik asit bakterileri, fotosentez bakterileri, maya, aktinomisetler ve belirli bazı mantarlardan oluşmaktadır)] etkisini test etmek amacıyla daha önce Uçkurutan nedeniyle terkedilmiş bir limon bahçesi içinde çalışmalar yapmışlardır. EM (Etkin Mikroorganizmalar) bileşiği, Japonya'nın Okinawa kentinde, Ryukyus Üniversitesi'nden Profesör Dr. Teruo Higa tarafından geliştirilmiş aşılavıcı bir mikroorganizma karışımıdır. Belirli sayıda ağaçlara iki farklı konsantrasyonda EM FPE (EM ile fermente olmuş bitki özü) ve EM5 karışımı ile tek konsantrasyon ve yalnızca bazı ağaçlara EM aktif (EMa) uygulanmıştır. EM'nin, toprak



kalitesinin iyileştirilmesinde, bitkilerin büyümesi ve ürün kalitesinin artırılmasında etkili olduğu, meyve vermeyi ve olgunlaşmasını teşvik ettiği ayrıca bitkileri patojenlerin zararlı etkilerinden koruduğu bildirilmiştir (Teruo Higa 1993). Uygulamadan yalnızca bir hafta sonra EM'nin önemli derecede iyileştirici etkisi gözlenmiştir. Yaptıkları çalışmaların elde edilen sonuçlarında EM'nin, Uçkurutan hastalığının tedavisinde yararlı ve etkin bir yöntem olabileceğini tespit etmişlerdir. Hastalığın gerilediğini ve hastalıklı ağaçların kesilmesi yerine bir süre sonra tamamen iyileşmiş, normal gelişme gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Baş ve Koç (2006) çalışmalarında, *P. tracheiphila*'ya duyarlı embriyogenik Kütdiken limon kallusunu, *P. tracheiphila*'nın toksinine karşı etkilerini araştırmışlardır. *P. tracheiphila*, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Geotrichum candidum* ile kültür çalışmaları yapılmıştır. Bir dirençli kallus kütlesi seçilmiştir (Kütdiken limonu 20b). *P. tracheiphila*'nın gelişimi, seçilen alt kültür çalışmalarında inhibe edilebilmiştir. Çalışmalar sonucunda fungus gelişimini engelleyici mekanizmanın, fungus için toksik olan sekonder metabolitlerin olabileceği bildirilmiştir.

Uzun ve ark. (2009), *P. tracheiphila* etmenine tolerant limon çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda bulunmuşlardır. Dört yıllık araştırmaların sonucunda "Finike Yerli Yuvarlak" ve "Kütdiken" limon çeşitleri melez hibritleri olan 'Tuzcu 894', 'Kütdiken' limon çeşidine göre yüksek verim, meyve kalitesi, meyve suyu ve düşük tohum sayısı ile umut verici olduğu bildirilmiştir. 'Tuzcu 8911' hibridi yüksek verimli ve sık dikime elverişli bulunmuştur. Bununla birlikte umut veren bu iki genotip yapay ve doğal *P. tracheiphila* infeksiyonlarına, sert kış koşullarına dayanıklı olması nedeniyle endüstride ilgi çekmiştir. Moleküler analizde (ISSR) primerleri ile 'Tuzcu 09 Aklimon' ve seleksiyonlarının 'Tuzcu 896', 'Tuzcu 897', 'Tuzcu 898' diğer genotiplerden farklılık gösterip benzerlik değerinin 0.82 olduğunu bildirmişlerdir. Diğer genotiplerin ise arasındaki genetik farklılığın düşük, bazı genotiplerin benzer olduğunu açıklamışlardır. Tarımsal

karakterler arasındaki farklılığın temelde mutasyona bağlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Baydar, 2010 yılında Uçkurutan Hastalığı etmeni *P. tracheiphila*'nın koloni gelişiminde fenolik bileşiklerden hesperidin ve limoninin etkilerini araştırmıştır. Bu çalışma için belirlenen limon çeşitlerine (Meyer, Kütdiken, Enterdonato, Yediveren, Tatlı limon ve Eureka) hastalık etmeni *P. tracheiphila* inokule edilmiştir. Hastalıklı dokularda HPLC (High Pressure Liquid Chromotography) tekniği ile enfeksiyon sonrası hesperidin ve limonin miktarlarının arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda dayanıklı ve orta dayanıklı çeşitlerde (Tatlı limon, Meyer ve Enterdonato) hesperidin ve limoninin veya her ikisinin ya da bir tanesinin duyarlı çeşitlere (Euroka, Yediveren, Kütdiken) oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. In vitro koşullarda ise hesperidin ve limonin farklı konsantrasyonlarını *P.tracheiphila* gelişimi üzerine engelleyicilik yüzdeleri araştırılmış ve her iki fenolik bileşiminde konsantrasyonları arttıkça *P. tracheiphila*'nın gelişimini engellediği belirlenmiştir. Ayrıca fungus gelişiminde limoninin etkisinin hesperidinden daha fazla olduğunu belirlemiştir.

Uzun ve ark.(2012), turunçgillerde büyük zararlara neden olan fungal hastalık Mal secco etmeni *P. tracheiphila*'ya dayanıklı ve duyarlı farklı turunçgil çeşitlerinin; Cleopatra mandarin (*C. reshni Tan.*), turunç (*C. aurantium L.*), Kaba limon (*C. jambhiri Lush.*), Volkameriana (*C. volkameriana Tan. and Pasq.*), Carrizo citrange (*Poncirus trifoliata L. Raf. X C. sinensis L. Osbeck*) ve Üç yapraklı potakal (*P. trifoliata*) ağaçlarının kök bölgesindeki antioksidant enzim aktivitesini araştırmışlardır. Çeşitler arasından Kleopatra mandarinin Mal Secco'ya dirençli olduğu; Kaba limon, turunç ve Üç yapraklı portakalın çok duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Toplam peroksidaz (TPX; EC: 1.11.1.7) aktivitesi, Anatoptan peroksidaz (APX; EC: 1.11.1.11) aktivitesi artmıştır. Çeşitlerin çoğunda Uçkurutan hastalığının askorbat peroksidaz (APX; EC: 1.11.1.11) aktivitesini arttırdığını ve katalaz (CAT; EC: 1.11.1.6) aktivitesi ile Mal secco'ya dayanıklılık arasında ilişki olduğu ifade edilmiştir.

Avcı (2018), yeni kurulan turunçgil bahçelerinde fungal patojenlerin belirlenmesi ve turunçgil çeşitlerinin duyarlılıklarının araştırılması amacı ile 24 adet turunçgil çeşidinin turunçgil bahçelerinde üretimini kısıtlayan *Alternaria alternata f.sp. citri*, *Phytophthora citrophthora* ve *Phoma tracheiphila* gibi patojenlerin turunçgil çeşitlerine etkileri araştırılmıştır. Bahçe koşullarında *Phoma tracheiphila*'ya en duyarlı türün limon hemen ardından ise altıntop çeşidinin olduğu gözlemlenirken mandarin ve portakal çeşitlerinin ise diğer çeşitlere göre hastalığa daha dayanıklı olduğunu bildirmiştir.

Özdemir (2019), çalışmasında limon ağaçlarında *P. tracheiphila*'nın neden olduğu Uçkurutan hastalığına karşı, Salisilik asit (SA), DL- $\beta$ -amino-n-butirik asit (BABA), Acibenzolar -S- methyl (ASM) ve Fosetyl-Al dayanıklılık teşvik edici kimyasallar ile *Glomus caledonium*, *Glomus clarium*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices* ve *Glomus mosseae* mikorizal fungusların hastalık oluşumu ve bitkideki fenolik bileşikler üzerine etkilerini araştırmıştır. Dayanıklılık teşvik edici kimyasallardan Fosetyl-Al, in vitro ve in vivo koşullarda patojenin miseliyal gelişimini tamamen engelleyerek diğer kimyasallara göre en etkili kimyasal olduğu, fenolik bileşik hesperidin miktarını etkilediğini bulmuştur. Ayrıca ASM kimyasalının da patojen varlığında tüm fenolikler üzerinde en etkili kimyasal olduğu tespit edilmiştir. Mikorizal funguslardan en etkili bulunan *Glomus fasciculatum* uygulamasının limon fidanları üzerinde hastalık oluşumunu engellediği ve patojen varlığında uygulamasının ise tüm fenolik bileşiklerin miktarında en yüksek artışa neden olduğu kaydedilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda dayanıklılık teşvik edici kimyasallar ve mikorizal fungus uygulamaları ile yapılacak çalışmalar Uçkurutan hastalığı ile mücadele de umut verici sonuçlar oluşturabileceğini bildirmiştir.

**3. MATERYAL ve METOD**

Bu çalışma 2017-2019 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarı ile Bitki Koruma Bölümü'nün uygulama arazisinde gerçekleştirilmiştir.

**3.1. Materyal****3.1.1. Patojen İzolasyon Materyali**

Adana ili, Yüreğir ilçesi, Misis Mahallesi, Abdioğlu beldesinde Uçkurutan hastalık etmeni *P. tracheiphila* ile infekteli olduğu simptomatolojik olarak tespit edilmiş, tesadüfi olarak seçilen toplam 20 adet "Eureka" ve "Kütdiken" limon ağaçlarının bir yıllık infekteli dalları, patojen izolasyonlarının gerçekleştirilmesi için kullanılmıştır.

**3.1.2. *In vitro* Çalışmalarda Kullanılan Besiyerleri**

*P. tracheiphila* saf izolatlarının elde edilmesi ve *in vitro* fungusit deneme çalışmalarında besiyeri olarak PDA (potato dextrose agar) kullanılmıştır. Buna ek olarak farklı ortamlarda *P. tracheiphila*'un miselyal gelişimi, piknidium ve spor yoğunluğunu belirlemek amacıyla Yulaf Unu Agar (YUA), Malt Extract Agar (MEA) ve Havuç Agar (HA) besiyerleri ile *in vitro* denemeler kurulmuştur.

- ✓ PDA 1 litre için; 200g patates, 20g glikoz, 15 g agar ve 1 litre saf su
- ✓ YUA 1 litre için ; 30g yulaf unu, 15g agar ve 1 litre saf su
- ✓ HA 1litre için; 200g havuç, 15g agar ve 1 litre saf su
- ✓ MEA 1 litre için; 20g malt extract, 1g pepton, 20g glikoz, 20g agar ve 1 litre saf su

### 3.1.3. Patojenisite Çalışmalarında Kullanılan Bitki Materyali

En virüent patojen izolatı belirlemek amacıyla yapılan patojenisite çalışmalarında; her bir izolat için 3 tekrür olmak üzere 15 adet izolat için 45 adet ve 3 adet negative control olacak şekilde toplam 48 adet sağlıklı iki yaşında “Kütdiken” limon fidanları patojenisite testi için kullanılmıştır. Patojenisite testi, Adana ili, Yüreğir ilçesi, Misis Mahallesi, Abdioğlu beldesi, Özler Tarım çiftliği plastik seralarında gerçekleştirilmiştir.

Sera Koşullarında Fungisit Denemelerinde bitki materyali olarak 1 yaşında Kütdiken limon çeşitinden toplam 45 adet fidan 3 farklı fungusit deneyi için kullanılmıştır. Her fungusit için (3 tekrür fidanı x 4 doz + 3 negatif kontrol fidan) 15 adet fidan kullanılmıştır. Fungisit denemeleri Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nün uygulama arazisindeki seralarında yürütülmüştür.

### 3.1.4. Çalışmalarda Kullanılan İzolatlar

3.1.1.'de belirtilen hastalıkla infekteli ağaçlardan elde edilen 15 adet patojen izolatlarından 3.1.3'de belirtildiği şekilde patojenisite çalışmaları sonucunda elde edilen en virüent E9 ve E10 izolatları in vitro ve sera denemelerinde fungal patojen izolat materyalleri olarak kullanılmıştır.

### 3.1.5. Çalışmada Kullanılan Fungisitler

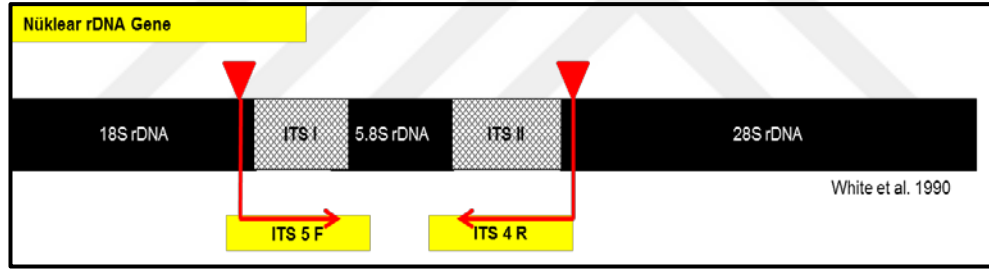
İn vitro koşullarda fungusit denemelerinde 8 farklı etkili madde grubuna (Bakırlı fungusitler, Strobilurin, Quinone, Carboximide, Primidine, Pyrrol, Pyrazole, Triazole) ait toplam 12 adet fungusit içerisinden, bir adedi ruhsatlı olmak üzere 2 adet bakırlı fungusit kullanılmıştır. İn vitro fungusit denemelerinde başarılı olduğu saptanan en etkili 2 adet fungusit ve 1 adet ruhsatlı bakırlı fungusit sera çalışmalarındaki denemelerde kullanılmıştır. Denemede kullanılan fungusitler ve etkili maddelerin bağlı olduğu gruplar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Fungisitler ve Etkili Madde Grubu

<b>Etkili Madde Adı ve Miktarı</b>	<b>Etkili Madde Grubu</b>	<b>Etki Mekanizması</b>
Azoxystrobin (250 gr/L)	Strobilurinler	a: Mitokondriyal membranda stokrom b'den sitokrom c1'e elektronların taşınmasını engellemek
Dithianon (%12) Pyraclostrobin (% 4)	Quinone, Strobilurinler	Bitkide savunma mekanizmasını uyarma+ a
Pyraclostrobin(%12.8)+ Boscalid (%25.2)	Strobilurinler, Carboximide	a + Suksinat dehidrogenaz inhibitörü (SDHI)
Cyprodinil(375g/kg)+ Fludioxonil (250g/kg)	Pyrimidine, Pyrrol	Metionin biyosentezini engelleme + Ozmotik sinyal üretiminde MAP Histidin Kinaz enzimi
Fluxapyroxad (75g/l) Difenoconazole (50 g/l)	Pyrazole-4 Carboxamide Triazololler	SDHI + b: Funguslarda sterol (ergosterol) biyosentezini engelleme
Propiconazole(150g/l)+ Difenoconazole 150g/l)	Triazololler	b
Metconazole (60g/l )	Triazololler	b
Tebuconazole (%25)	Triazololler	b
Fenbuconazole (50g/l)	Triazololler	b
Cyflufenamid(%3.4)+ Triflumizole (%15)	Phenyl acetamide + İmidazole	Hedef noktası bilinmiyor + b
Bakır Oksiklorür (%25 metalik bakıra eşdeğer)	Bakırlı fungisitler	c: Enzim işlevini, enerji transferi ve membran bütünlüğünü bozma, spor çimlenmesini engelleme
Bakır Hidroksit (%35 metalik bakıra eşdeğer)	Bakırlı fungisitler	c

### 3.1.6. *P. tracheiphila*'nın Moleküler Tanısında Kullanılan Materyaller

*P. tracheiphila* etmenine ait 15 farklı izolatin PDA besi ortamında geliştirilen miselleri genomik DNA izolasyonu için kullanılmıştır. DNA izolasyonunda Qiagen Plant DNeasy kiti, su banyosu (Nüve, nb9), masa üstü santrifüj (Nüve, NF048) kullanılmıştır. *P. tracheiphila* tür tanısını ispatlamak ve soy ağacını oluşturmak için rDNA'nın ITS bölgelerini (ITS1, 5,8S ve ITS2) (Şekil 3.1) çoğaltmak için ITS5/ITS4 oligonükleotid primerleri (ITS5: İleri primer: 5' GGAAG TAAAGTCGTAACAAGG-3' ve ITS4:Geri primer: 5'-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3') (White ve ark, 1990)] (Şekil 3.1), Taq polimerase enzimi, dinükleotid trifosfatlar (dNTP), tampon çözelti, termal döngü cihazı ([Applied Biosystems, ProFlex™ Base](#)) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. ITS5/ITS4 primerlerinin 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS 2 ve 28S rDNA bölgelerini içeren Nükleer rDNA'daki yerinin şeması

PCR ile çoğaltılan ürünlerin elektroforezinde güç kaynağı (Biorad, PowerPac™ Basic), farklı modellerde elektroforez tankı (Biorad, Mini-Sub® Cell GT Cell, Wide Mini-Sub Cell GT Cell ve Sub-Cell® GT Cell), 1XTAE tampon çözelti ile hazırlanan %1 agaroz (Sigma, A6013) jel, etidyum bromid (Sigma, E1510) ve UV transillimünatörü (Sigma, Z641359) kullanılmıştır. Phoma izolatlarının baz dizilerini elde etmek için, PCR pürüfikasyon kiti (Qiagen, 28106) kullanılmış ve baz dizi analizleri için Genoks (Ankara) firmasından hizmet alımı yapılmıştır.

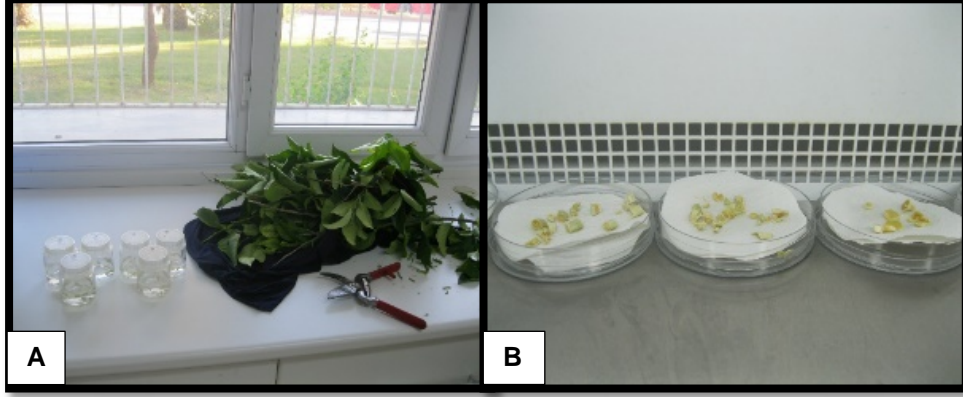
### 3.2. Metod

#### 3.2.1. *P. tracheiphila* İzolatlarının Elde Edilmesi

3.1.1’de belirtildiği şekilde hastalık belirtisi gösteren Eureka ve Küt diken limon çeşitlerinin infekteli bir yıllık dalların doku örneklerinden patojen izolasyonları standart yöntemler kullanılarak Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Laboratuvara getirilen, hastalık etmeni ile bulaşık 1 yaşındaki dal örnekleri bahçe makası ile önce enine 1-2 cm uzunluğunda parçalara kesilmiş, sonra kabuk dokuları soyulmuştur. İnfekteli doku örnekleri yüzey sterilizasyonu için, % 70’lik etil alkolde 30 sn bekletildikten sonra steril su ile yıkanmış ve alkol dokudan uzaklaştırıldıktan sonra % 1’lik ticari sodyum hipokloritte 3 dakika bekletilerek sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüzeysel olarak sterilize edilen doku parçaları 3-4 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra steril kabin içerisinde, otoklav edilmiş kaba filtre kağıtları üzerinde kurutulmuştur (Şekil 3.2). Tamamen kuruyan bitki doku parçaları 0.5 cm uzunluğunda kesilerek her petriye 5-6 adet parça olacak şekilde 100mg/L tetrasiklin içeren PDA ortamına yerleştirilmiştir.

Bitki dokuları yerleştirilen petriler karanlık koşullarda, 20 – 23°C sıcaklıkta 7-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerde gelişen koloniler tekrar alt kültüre alınarak aynı koşullarda 1 ay boyunca tam koloni gelişimleri sağlanmıştır. *P. tracheiphila*’nın tek spor kültürü piknidumlardan elde edilen piknidiosporların alt kültüre alınması ile sağlanmıştır. Patojen tanısı için önce koloni ve mikroskopik morfolojik yapılar incelenmiştir. Etmenin moleküler yöntemlerle tanısında ise PCR ile çoğaltılan ITS gen (White ve ark., 1990) dizilerinin NCBI’da referans gen dizileri ile karşılaştırmalarına göre % 99 homojeniteye göre yapılmıştır. Saflaştırılan *P. tracheiphila* izolatları daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere gliserol içeren Eppendorf tüplere konularak -80°C’ de depolanmıştır.





Şekil 3.2. Hastalık belirtisi gösteren infekteli dal örneklerinden (A) kesilen bitki doku örneklerinin sterilizasyonu için parçalara ayrılması ve sterilizasyon işlemi yapılmış dokuların steril kabin içerisinde kaba filtre kağıtlarında kurutulması işlemi (B)

### 3.2.2. *P. tracheiphila* İzolatlarının Virülenslik Düzeylerinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatların virülenslik seviyelerini belirlemek amacı ile 2 yaşında “Kütdiken” limon fidanları kullanılmıştır. Bu amaçla 15 adet bir izolat ve kontrol için 3 tekerrür olmak üzere, toplam 48 adet Kütdiken limon fidanları kullanılmıştır. *P. tracheiphila* izolatlarının 3.2.1’de belirtildiği şekilde elde edilen saf kültürlerinde gelişen miselyal koloniden 6 mm çaplı mantar delici ile çıkartılan misel diskler aynı çaplı mantar delici ile fidan gövdesinden çıkartılan kabuk ve odun dokuda açılan yaralara yerleştirilmiştir (Şekil 3.3).

Fidanlar  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$  hava sıcaklığında sera koşullarında 6 hafta inkübe edilmiştir. Virülenslik seviyelerinin belirlenmesinde Spiegel-Roy ve ark. (1978) ile Tusa ve ark. (2000), tarafından belirtilen 0-5 skalası kullanılmıştır.

0-5 Skalası aşağıda verilmiştir.

0: İnfeksiyon yok

1: Yapraklarda klorotik renklenme-lokal sararma

2: Yaprakların tamamın sararması ve/veya dökülmesi

3: Bir veya birkaç sürgünde uçtan kuruma başlaması

4: Tepeden aşı noktasına kadar ilerleyen kuruma

5: Bitkinin tamamen kuruması



Şekil 3.3. Her bir izolat için 3 fidan olmak üzere, kontrol ile birlikte toplam 48 adet Kütdiken limon fidaları (A), *P. tracheiphila* izolatlarının saf kültürlerinden hazırlanan miselyal disk yerleştirilmiş fidanlar (B)

Değerlendirme sonucu elde edilen skala değerleri üzerinden, Tawsend-Heuberger formülüne göre hastalık şiddeti hesaplanmıştır. Değerlendirme sonucunda en yüksek hastalık şiddeti gösteren izolat virülenslik seviyesinin en yüksek olduğu *P. tracheiphila* izolatı olarak belirlenmiş olup, çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmıştır.

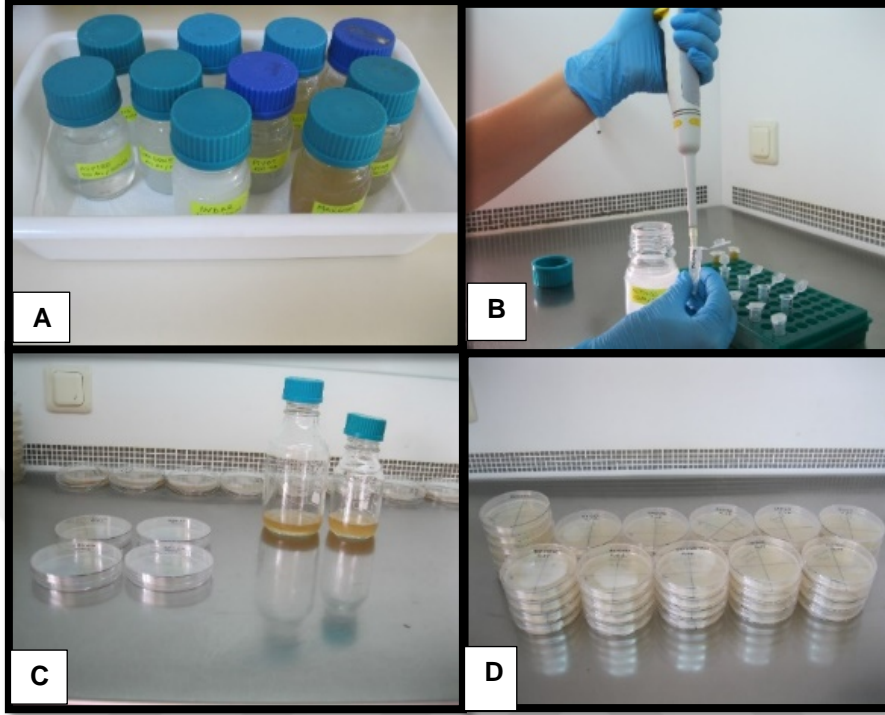
**3.2.3. *In vitro* Koşullarda Farklı Besiyerlerinin Fungal Gelişime Etkisi**

3.1.2’de belirtilen 4 farklı besi ortamı hazırlandıktan sonra 100 ml’lik steril cam şişelere aktararak otoklav edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besi ortamlarının sıcaklıkları su banyosunda 55°C’ye düşürülerek, steril kabinde 10 mg tetrasiklin antibiyotiği ilave edilerek karıştırılmış ve 9 cm çaplı steril plastik Petri kutularına 20 ml olacak şekilde dökülmüştür. Besi ortamları katılaştıktan sonra Petri kapları ters çevrilerek üzerine bir cetvel ile x ve y eksenleri çizilmiştir. Silindirik mantar delici ile 10 günlük saf *P. tracheiphila*’nın E9 ve E10 izolat karışımı olan fungal koloniden alınan 6 ml’lik diskler eksenlerin tam ortasına yerleştirilmiştir. Patojenin misel diskleri inkübasyon için karanlık ortamda 23°C’ye ayarlanmış iklim odasında inkübe edilmiştir. Haftalık miselyal gelişimi takip edilerek besiyerleri arasındaki farklar kaydedilmiştir.

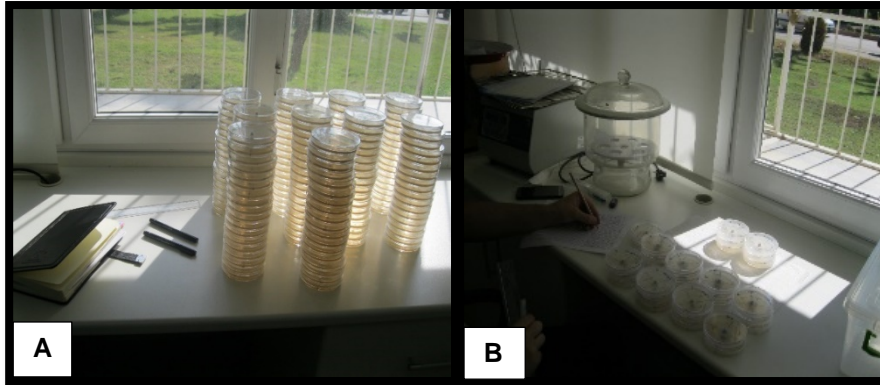
**3.2.4. Fungisitlerin PDA Besi Ortamlarında Hazırlanması**

100 ml’lik cam şişelerin her birine 60 ml PDA ortamı hazırlanarak otoklav edilmiştir. Öncelikle denemelerde kullanılması planlanan fungisitlerin steril su içerisine farklı dozlarda (0.0, 0.05, 0.01, 0.5, 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ppm) stok solüsyonları hazırlanmıştır. Her bir ticari preparatın stok solüsyonlarından ppm olarak hesaplanan fungisitler PDA ortamlarına eklenerek homojen karıştırıldıktan sonra fungisit içeren besi ortamları 9 cm’lik plastik steril Petri kaplarına dökülmüştür (Şekil 3.4).

Steril kabin içerisinde ortamların katılaşmasını takiben *P. tracheiphila*’nın PDA ortamındaki 10 günlük saf kültürlerinden alınan 6 mm’lik diskler fungisitli besi ortamlarına aktarılmıştır. Fungus yerleştirilen ortamlar parafilm ile kapatılarak 15 litrelik şeffaf, plastik saklama kapları içerisine yerleştirilmiş, karanlıkta 23 °C iklim odasında 4 hafta inkübe edilmiştir. Bu sürede haftalık olarak petrilerde gelişen fungusların miselyal gelişimi milimetrik bir cetvel ile dik kesişen eksenlerden (x,y) ölçümler yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Steril su içerisinde denemelerde kullanılan fungusitlerin farklı dozlarda (0,0, 0,05, 0,01, 0,5, 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ppm) stok solüsyonlarının hazırlanması (A), (B); Stok fungusit solüsyonları içeren PDA'nın steril petrilere dökülmesi (C); steril kabin içinde PDA besiyerinde gelişen fungusların miselyal çaplarını hesaplamak için "x" ve "y" eksenin çizimi (D)



Şekil 3.5. PDA besiyerlerinde gelişen fungusların miselyal gelişiminin milimetrik bir cetvel ile ölçümü (A); Ölçümü yapılan fungusların haftalık çizelge takibi için listelenmesi (B)

### 3.2.5. İn Vitro Koşullarda Fungisitlerin *P. tracheiphila* İzolatları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışma, tesadüf parselleri deneme desenine göre her izolat için 3 tekerrürlü olarak kurulmuş, her petri bir tekerrür varsayılmıştır. Elde edilen değerlere varyans analizi yapılarak, ortalamalar arasındaki farklar LSD ( $\alpha = 0.05$ ) testine göre değerlendirilmiştir. Fungisitlerin engelleme oranları Abbott (1925), formülüne göre aşağıda belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

**Yüzde etki** = (İlaçsızda koloni gelişimi - İlaçlıda koloni gelişimi) / (İlaçsızda koloni gelişimi)  $\times 100$

### 3.2.6. Sera Çalışmalarında Kullanılan Fungisit Dozlarının Hazırlanması

Deneme, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü uygulama arazisinde bulunan seralarda Kütdiken limon fidanları üzerinde yürütülmüştür. Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak 2 kez kurulmuş, her fidan bir tekerrür kabul edilmiştir. Sera çalışmalarında fungusit etkinliğini saptamak amacı ile *İn vitro* çalışmalar sonucunda belirlenen etkili 2 adet fungusit ve pozitif kontrol olarak ruhsatlı 1 adet bakırlı fungusit seçilmiştir. Bu fungusitlerin ve bakırlı bileşiğin 4 dozu  $\{(X_1: \text{Normal Doz}; X_2 = [X_1 - (X_1 \times \frac{3}{4})]; X_3 = [X_1 + (X_1 \times \frac{3}{4})]; X_4 = [2 X_1 ]\}$  saf su (Negatif Kontrol) ile homojen karışımı hazırlanarak kullanılmıştır.

### 3.2.7. *P. tracheiphila* Spor Süspansiyonunun Limon Fidanlarına İnokulasyonu

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü uygulama arazisindeki seralarda bulunan ve 1 hafta önce fungusit uygulanmış fidanlara patojen inokulasyonu için 2 nolu böcek iğnesi ile yapay küçük yaralar açılmış ve spor süspansiyonu bu yaralara doğru sprey ile uygulanmıştır. İnokulasyondan bir hafta önce ve inokulasyondan 2-4 hafta sonra olmak üzere 3 kez fungusit uygulamaları yapılmıştır.

### 3.2.8. *P. tracheiphila* ile İnfekteli Limon Fidanlarına Fungisitlerin Uygulanması ve Değerlendirilmesi

3.2.7’de belirtildiği şekilde dört farklı dozda (X1, X2, X3 ve X4) hazırlanan fungusit karışımları bir el spreyi püskürtme yöntemiyle fidanın tüm kısımlarına gelecek şekilde uygulaması, 15 günde bir kez olmak üzere toplamda 3 kez ilaçlama yapılmıştır. Denemelerin değerlendirilmesi ilk fungusit uygulamasını takip eden 45. günde yapılmıştır. Fungisit uygulamalarının değerlendirilmesinde Spiegel-Roy ve ark. (1978) ile Tusa ve ark (2000)’nın tabloda belirtilen 0-5 skalası kullanılmıştır.

Elde edilen skala değerleri kullanılarak aşağıdaki Tawsend-Heuberger formülü ile hastalık şiddeti hesaplanmıştır. Hesaplanan hastalık şiddet değerleri açı transformasyonuna tabi tutulduktan sonra elde edilen değerlere varyans analizi yapılarak, ortalamalar arasındaki farklar LSD ( $\alpha = 0.05$ ) testine göre değerlendirilmiştir.

$$\Sigma(\text{Skala değeri} \times \text{Skalaya Giren Fidan Sayısı})$$

$$\text{Hastalık şiddeti} = \frac{\Sigma(\text{Skala değeri} \times \text{Skalaya Giren Fidan Sayısı})}{\text{En Yüksek Skala Değeri} \times \text{Toplam Birey sayısı}} \times 100$$

$$\text{En Yüksek Skala Değeri} \times \text{Toplam Birey sayısı}$$

### 3.2.9. *P. tracheiphila*’un Moleküler Analizi

#### 3.2.9.1. DNA İzolasyonu

Total genomik DNA piknidiumdan elde edilen sporların misellerinden elde edilmiştir. DNA izolasyonu Qiagen Plant DNeasy kiti ve protokolleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Materyal olarak bitki dokusu yerine 100 mg misel kullanılmıştır (Kayim ve ark., 2004).

**3.2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon, Agaroz Jel Elektroforez ve PCR Ürünlerinin Saflaştırılması**

PCR analizi her bir örnek için toplam 100 µL hacimde olacak şekilde gerçekleştirilmiş olup PCR kokteyli Çizelge 3.2.

Çizelge 3.2. PCR Kokteylinin Hazırlanışı

PCR Kokteyli	25 µL	ve	100 µl hacim için
10 x PCR Buffer	2.5 µL		10
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5 µL		10
dNTP (2 mM)	2.5 µL		10
İleri Primer (10 µM)	0.5 µL		2
Geri Primer (10 µM)	0.5 µL		2
Taq polimeraz (1 U / 1 µl)	0.5 µL		2
DNA (patojen)	2.0 µL		8
sQH <sub>2</sub> O	14.0 µL		56
Toplam	25 µL		100

PCR döngüsü; başlangıç denatürasyon sıcaklığı 96 °C'de 2 dk ve sonraki 40 döngü için 95 °C'de 30 sn, 55 °C'de 45 sn, 72 °C'de 90 sn ve son bitiş döngüsü 72 °C'de 5 dk olarak ayarlanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyon ile çoğaltılıp ürünleri birbirinden ayırt etmek için TAE tampon çözeltide hazırlanıp %1 agaroz jel elektroforez kullanılmıştır. Daha sonra jel 0.5 µg/ml etidyum bromid ile boyanan PCR ürünleri bir UV transillimünatör üzerinde görülebilir duruma getirilip, dijital fotoğrafı çekilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünleri baz dizi analizlerinin yapılabilmesi için Qiagen PCR saflaştırma kiti kullanılarak PCR ürünleri dizi analizi için hazır duruma getirilmiştir.

**3.2.9.3. *P. tracheiphila* İzolatlarının ITS Gen Dizi Analizi**

*P. tracheiphila* türleri arasındaki fiogenetik ilişkiyi incelemek, morfolojik özellikler kullanılarak yapılan patojenlerin tanısını desteklemek yada morfolojik olarak ayırt edilemeyen türlerin tanısını yapabilmek için PCR ile elde edilen ITS genlerinin baz dizilimlerinden yararlanılmıştır. Bunun için elde edilen PCR ürünleri çift yönlü (5'-3' ve 3'-5') olmak üzere baz dizilimi için Genoks firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Buradan elde edilen baz dizileri, NCBI (National Center of Biotechnology Information) sitesindeki gen verileri ile Blastn programı kullanılarak dünyadaki diğer *P. tracheiphila* izolatlarının ITS genine ait DNA dizileri ile karşılaştırılarak tür düzeyinde tanıları ispatlanmıştır.

Buradan elde edilen izolatlara ait her primer için baz dizilerinin pik noktaları dikkate alınarak, sorunlu bölgeler, BioEdit programı ile belirlenmiş ve böylece ileri ve geri primerlere ait sorunsuz bölgeler ClustalW programı ile hizalanmıştır. NCBI sitesindeki gen verileri ile Blastn programı kullanılarak dünyadaki diğer *P. tracheiphila* izolatlarının, ITS genine ait baz dizileri ile karşılaştırılmış ve izolatlar tür düzeyinde tanılanmıştır. Ayrıca Phoma izolatlarının akrabalık ilişkilerinin belirlenmek için MEGAX filogenetik analiz programı kullanılmıştır. İzolatlara ait tüm baz dizileri, ITS geni için maksimum likelihood ile genetik soy ağaçları oluşturulmuştur.

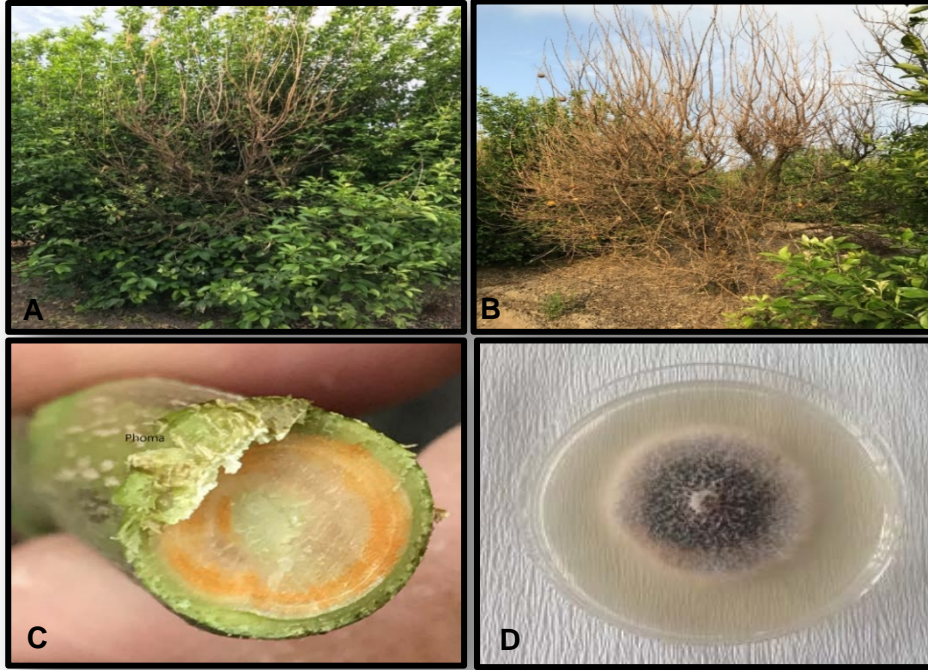




#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

##### 4.1. *P. tracheiphila*'nın Tanısı ve Patojenisitesi

Adana ili Misis-Abdioğlu beldesinde Eureka limon çeşitleri ile kurulmuş bahçeler ve Kozan ilçesinde Kütdiken limon ağaçlarından oluşan bahçelerin tamamında yoğun olarak Uçkurutan hastalığı gözlenmiştir. İnfeksiyonun yeni başladığı ağaçlarda taç kısmında seyrekleşme, obur dallarda yaprak sapı dal üzerinde kalacak şekilde yaprak dökülmeleri gözlenirken, hastalığın biraz ilerlediği ağaçlarda bir yönde dal demetlerinden oluşan obur dallarla birlikte uçtan geriye doğru kuruma (Şekil 4.1A), hastalığın tamamen ilerdiği ağaçlarda ise tepe kısımlarında kuruma ve daha sonra tüm ağaçta kuruma ile sonuçlanan ölümler gözlemlenmiştir (Şekil 4.1B).



Şekil 4.1. Uçkurutan hastalık belirtisi gösteren Eureka limon ağaçları (A, B) ve patojenin obur dalda kabuk altında iletim demetlerinde turuncu ve somon rengi görünümü (C) ve PDA besi ortamında oluşturduğu koloni deseni

Uçkurutan hastalık etmeni tek yıllık dalların iletim demetlerinde çıplak gözle görülebilir somon rengi toksin üretmekte (Şekil 4.1C) ve PDA besi ortamında başlangıçta kremi sonra turuncu-grimsi koloni oluşturmaktadır (Şekil 4.1D). Nitekim Türkiye ve diğer Akdeniz ülkelerinde bir çok araştırmacı tarafından da hastalık belirtilerinin aynı şekilde gözlemlendiği, uçkurutan ile ilgili bir çok araştırmada vurgulanmıştır (Salerno ve Perrotta, 1966; Akteke, 1976: Erkalıç,1988, Koç ve ark., 1999; Kalai ve ark., 2010; Kozak, 2019).

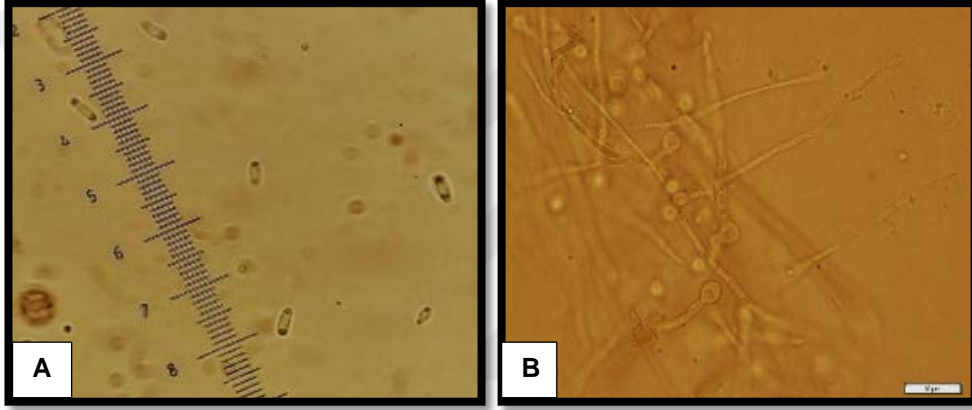
Adana ili ve çevresinde *P. tracheiphila* ile infekteli olduğu simptomotolojik olarak tespit edilen Kütdiken ve Eureka limon çeşitlerinden alınan dokulardan izole edilen 15 adet *P. tracheiphila* izolatu (Çizelge 4.1), laboratuvar koşullarında tanısı yapılmak üzere PDA ortamlarında geliştirilmiş ve morfolojik yapıları mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. *P. tracheiphila* ile infekteli Eureka ve Kütdiken limon ağaçlarından elde edilen İzolatlar

Yer	İzolat No	Yer	İzolat No	Yer	İzolat Adı
Abdioğlu	E1	Abdioğlu	E6	Kozan	K1
Abdioğlu	E2	Abdioğlu	E7	Kozan	K2
Abdioğlu	E3	Abdioğlu	E8	Kozan	K3
Abdioğlu	E4	Abdioğlu	E9	Kozan	K4
Abdioğlu	E5	Abdioğlu	E10	Kozan	K5

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi 10 adet Eureka ve 5 adet Kütdiken limon ağaçlarından olmak üzere toplam 15 patojenik *P. tracheiphila* izolatu elde edilmiştir. Phoma izolatlarının tanısı koloni morfolojisi, rengi, piknidyumların sertliği, miselyum yapısı, piknidiosporların şekline, büyüklüğüne, fialitler ucunda oluşan fialakonidilerin varlığı gibi özellikler temel alınarak yapılmıştır. (Şekil 4.2) (Barnett ve Hunter, 1972; Baydar, 2010). Klasik tanıda dikkate alınan morfolojik

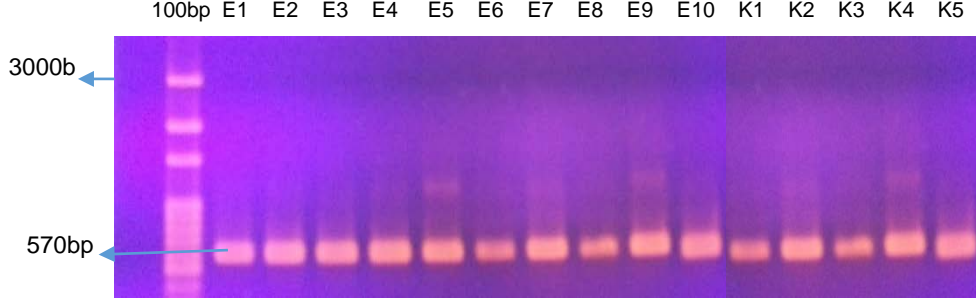
özellikler bu çalışmada da gözlenmiştir. *P. tracheiphila* petride çok yavaş ve sıkı bir miselyal gelişme göstermiştir. Miselyal koloni rengi başlangıçta kirli beyaz, sonrasında açık kahverengi-yeşil ve turuncu tonlarda gelişmeye devam etmiştir. Elde edilen bazı izolatlarda kolonin altı tamamen turuncu-kırmızı renkle kaplandığı gözlemlenmiştir. PDA besi ortamında gelişen miselyal kolonilerde piknidiumlar yeşilimsi-gri siyaha kadar değişen renklerde ve farklı büyüklüklerde ve sertlikte gelişmiştir (Burada resimleri verilmemiştir).



Şekil 4.2. *P. tracheiphila*'nın konidi yapısının sterio ışık mikroskop altında görünümü (A); çimlenen sporların yapısı (B) (100 x büyültme)

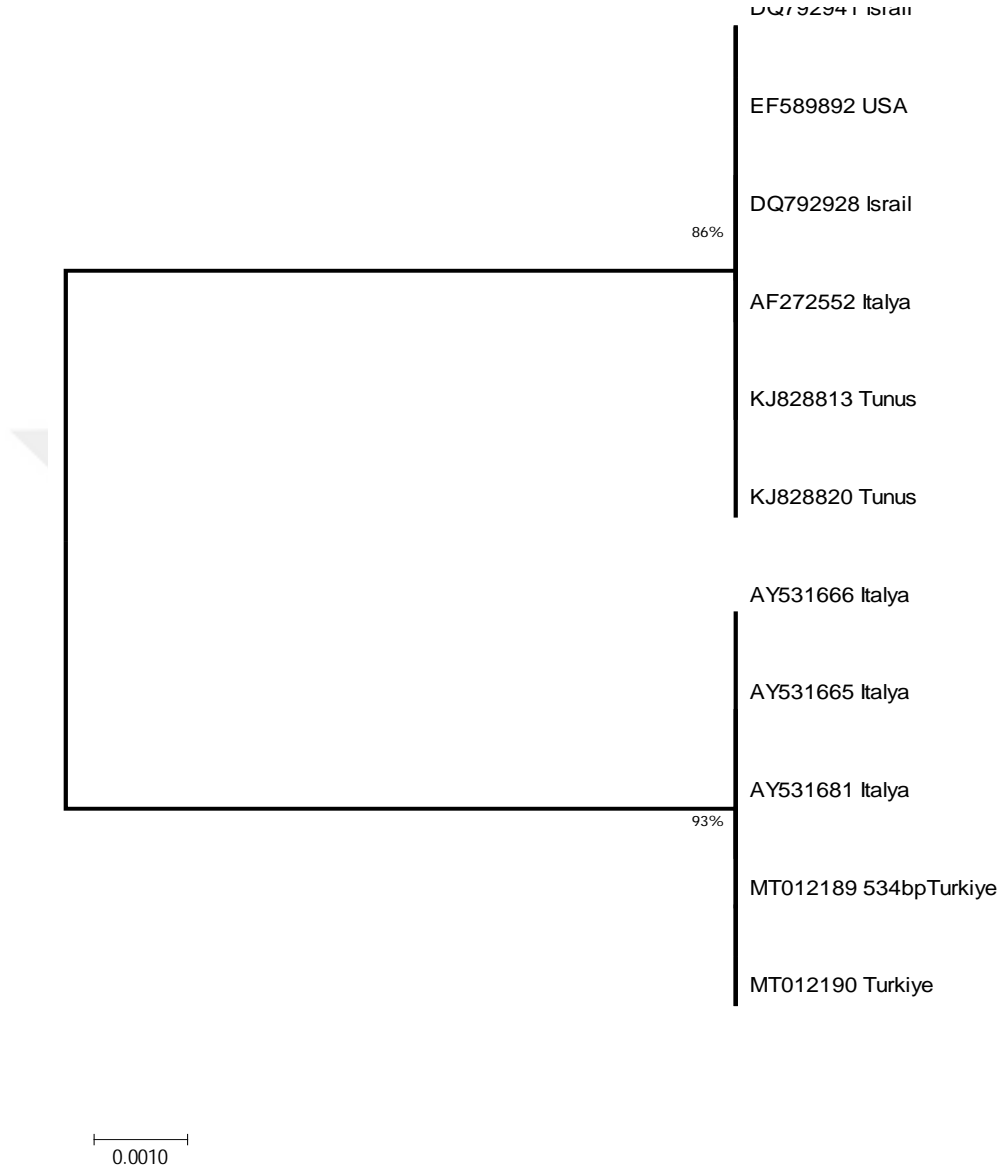
Şekil 4.2'de PDA besi ortamında geliştirilen *P. tracheiphila*'nın jelimsi yapı gösteren piknidiumlarından alınan sıvı içerisinde piknidiosporların yapısı Şekil 4.2A'da görüldüğü gibi iki ucu koyu hyalin renkli hafif silindirik ve küçük, büyük yuvarlak konidiler (Şekil 4.2B) şeklinde gözlenmiştir. Şekil 4.2B'de küçük yuvarlak fialakonidiler çim borusu oluşturmadan önce şişerek büyük spor şekline dönüşmüştür. Burada çim borusu oluşturmuş yapıları gözlenmektedir. Işık mikroskopunda fialakonidilerin varlığı 100x büyültme ile görülebilmektedir.

Morfolojik tanıyı desteklemek amacı ile patojenlerin moleküler tanısında ITS bölgesi 3.2.9.2'de belirtildiği şekilde PCR ile çoğaltılmış ve agaroz jel elektroforez ile görüntülenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *P. tracheiphila* izolatlarının genomik DNA'larından PCR ile çoğaltılan ITS1, 5,8S rDNA ve ITS2 ile 18S rDNA'nın küçük bir parçasını içeren 600bp DNA'nın %1 agaroz jel elektroforezde 80 Volt 1 saat yürütüldükten sonra EtBr ile boyandıktan sonra görünümü

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi *P. tracheiphila*'nın tüm izolatlarından 570 bp büyüklüğünde DNA çoğaltılmıştır. Bu izolatlara ait PCR ürünleri saflaştırılarak Genoks firmasına sekans analizi için gönderilmiş ve ITS nükleotid dizilerinin ABI grafikleri ve nükleotid dizinimi verileri elde edilmiştir. Sekans verileri ABI ile karşılaştırılarak 5' ve 3' terminal uçlarındaki karmaşık nükleotidler Bioedit programı kullanılarak kesilmiş ve geriye kalan 534 bp nükleotid NCBI gen bankası veri tabanında karşılaştırması yapılmış (nBlast) ve diğer *P. tracheiphila* izolatlarının nükleotidleri ile % 100 homojenisite göstermiştir. E9 ve E10 izolatları için sırasıyla MT012189 ve MT012190 gen erişim numarası alınmış ve diğer Akdeniz ülkeleri ile karşılaştırmaları yapılmıştır (Şekil 4.4).

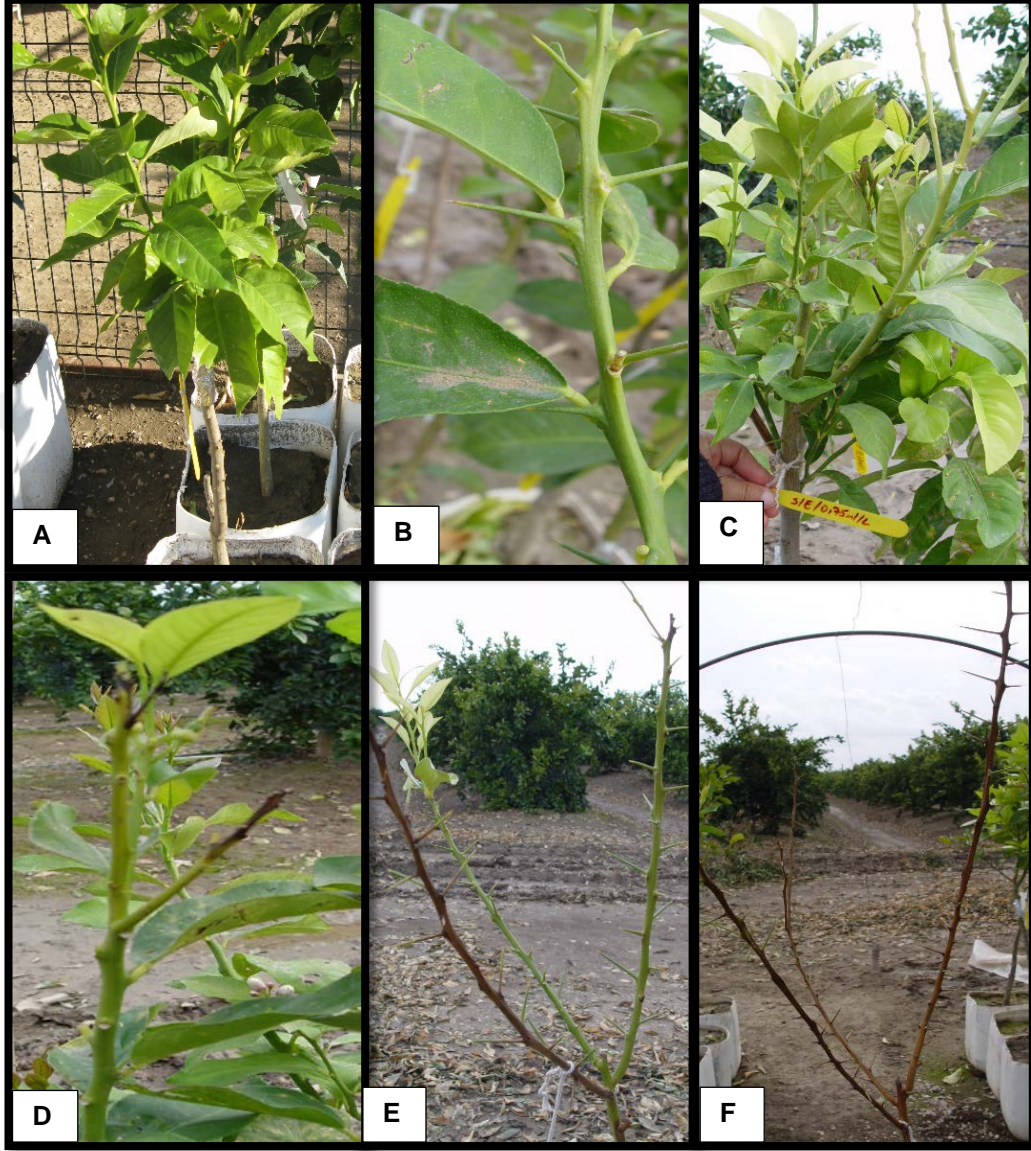


Şekil 4.4. Eureka limon çeşidi ile infekteli ağaçlardan izole edilen *P. tracheiphila* patojenine ait E9 ve E10 izolatlarının ITS gen dizileri kullanılarak Maksimum likelihood analiz programı ile oluşturulan soy ağacı. 1000 tekrar sonucunda Bootstrap değerleri (%) bağlantı noktalarında gösterilmiştir

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi *P. tracheiphila* ITS bölgelerine göre ülkeler arasında 2 grup oluşturmuştur. Bu gruplardan Türkiye'ye ait 2 adet izolat ve İtalya'nın 3 adet izolatı %93 bootstrap değeri verirken, İsrail, Tunus, İtalya'nın bir izolatı ile ABD'de deve dikenini gibi yabancı otlarda endofit *Plenodomus tracheiphilus* izolatları ile ayrı bir grup oluşturmuştur. Türkiye izolatları İtalya izolatları ile çok yakın akrabalık ilişkisi gösterirken, Tunus ve İsrail izolatları ile daha uzak akrabalık ilişkisi göstermektedir. ABD, İsrail, Tunus ve bir adet İtalya izolatı %86 bootstrap değeri vermiştir. Bu sonuçlar Türkiye izolatlarının İtalya orijinli olabileceği, özellikle İtalya'dan İtalyan Memeli, Zagara Bianca, Santa Terasa gibi bir çok limon çeşitlerinin Uçkurutan hastalık etmeni ile bulaşık olarak ülkeye girmiş olabileceği sonucuna varılmaktadır.

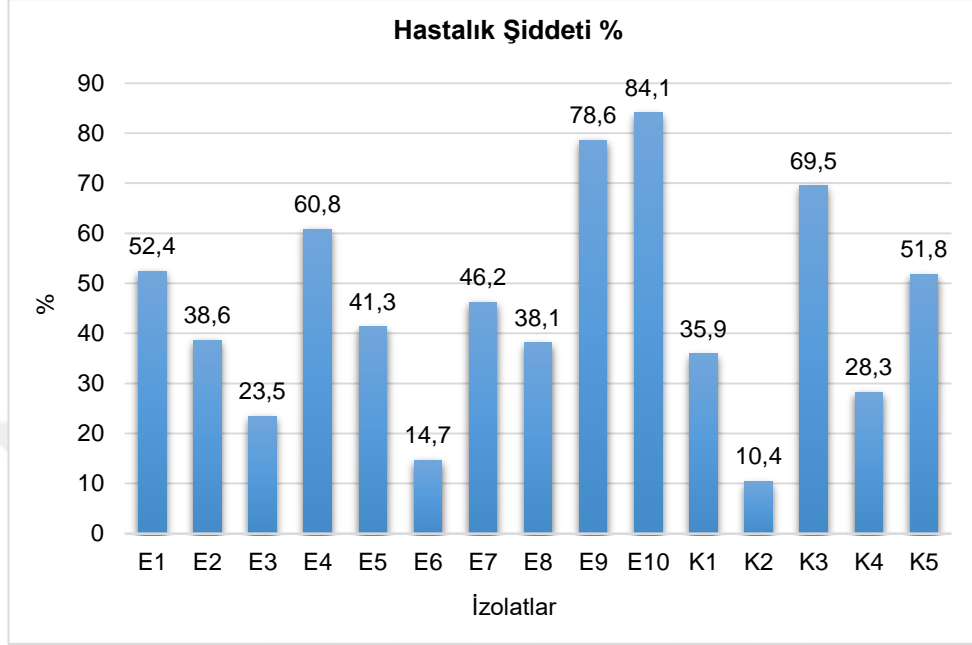
İnfekteli dokulardan saflaştırılmış olan 15 adet izolat, 2 yıllık Küt diken limon fidanlarının gövde kabuk dokusu altına aşılansak yapay olarak inokule edilmiş ve en virulent izolatlar saptanmıştır (Şekil 4.5).

Hastalıklı fidanların, Spiegel-Roy ve ark. (1978) ile Tusa ve ark. (2000)'nin 0-5 skalası'na göre değerlendirmeleri yapılmış (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da sonuçlar verilmiştir. İzolatların virülenslik düzeylerini belirlemek amacıyla yürütülen patojenisite çalışmaları sonucunda değerlendirmeye alınan 15 adet izolatın her biri farklı seviyelerde hastalık şiddeti değerleri vermiştir. Bu izolatlar arasında Eureka limon ağaçlarından saflaştırılan E9 ve E10 izolatları sırasıyla % 78.6 ve % 84.1 gibi en yüksek hastalık şiddeti oluşturmuştur. Bu izolatları % 69.5 ile Küt diken ağacından saflaştırılan K3 izolatı ve % 60.8 ile E4 izolatları takip etmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Kütdiken limon fidanlarının patojenisite çalışmalarında değerlendirilen Spiegel-Roy ve ark. (1978) ile Tusa ve ark. (2000)'nın 0-5 skalasına göre pozitif kontrol (A); skala değeri 1 nolu fidan (B); skala değeri 2 nolu fidan (C); skala değeri 3 nolu fidan (D); skala değeri 4 nolu fidan (E); skala değeri 5 nolu fidan (F)





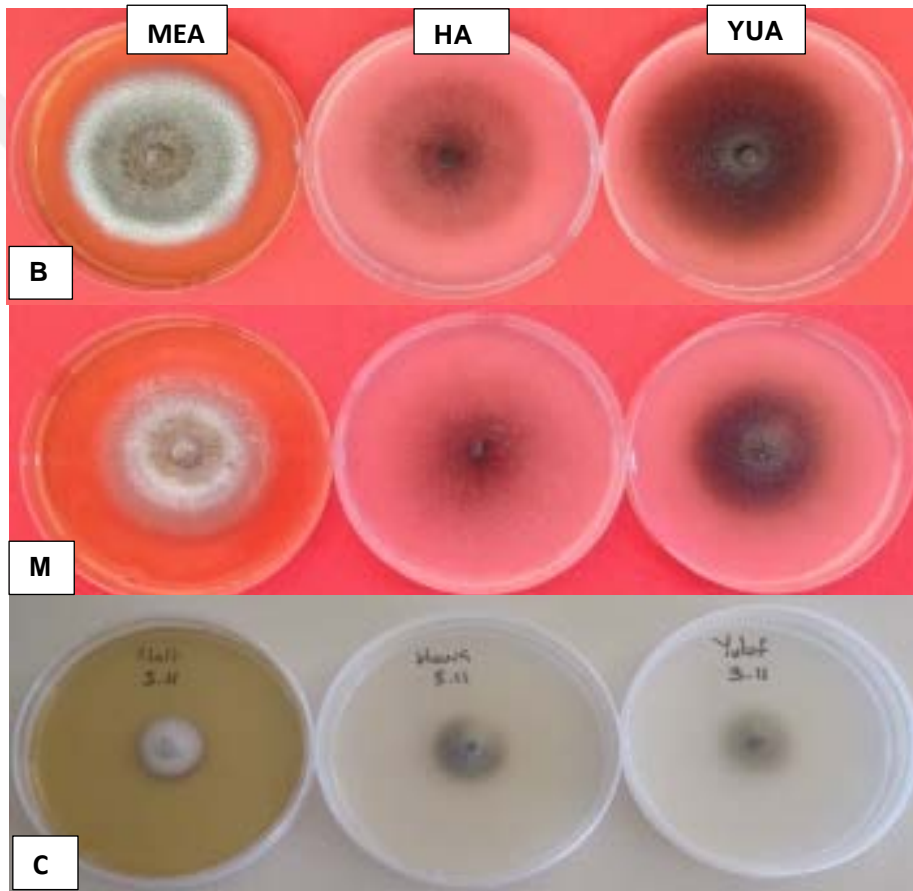
Şekil 4.6. *P. tracheiphila* izolatlarının % hastalık şiddeti değerleri

Kozak (2019), tarafından uçkurutan hastalığı ile infekteli ağaçların bulunduğu iki farklı ilin farklı bölgelerinden alınan ve hastalıklı bitki dokularından saflaştırılan izolatların hastalık şiddetini belirleme çalışmasında da 15 adet farklı izolatın hepsinde farklı hastalık şiddeti değerleri verdiğini göstermiştir. Araştırmacı Kütüden limonu üzerinde yürüttüğü çalışmasında izolatların en yüksek % 86,7 ve en düşük % 6,7 hastalık şiddetine sahip olduğunu belirtmiştir. Nitekim bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada en düşük hastalık şiddeti (%10,4) K2 izolatından elde edilmiştir.

Bu durumda Türkiye’de bulunan *P. tracheiphila* izolatlarının farklı patotipleri olabileceği fikrini vermektedir. Lietartürlerde bildirilen “Mal nero” ırkının da var olabileceği şüphesini uyandırmaktadır. Nitekim bakımsız bahçelerin yanı sıra bakımlı bahçelerde de çok ciddi ve hızlı bir şekilde ağaç ölümleri gözlenmektedir.

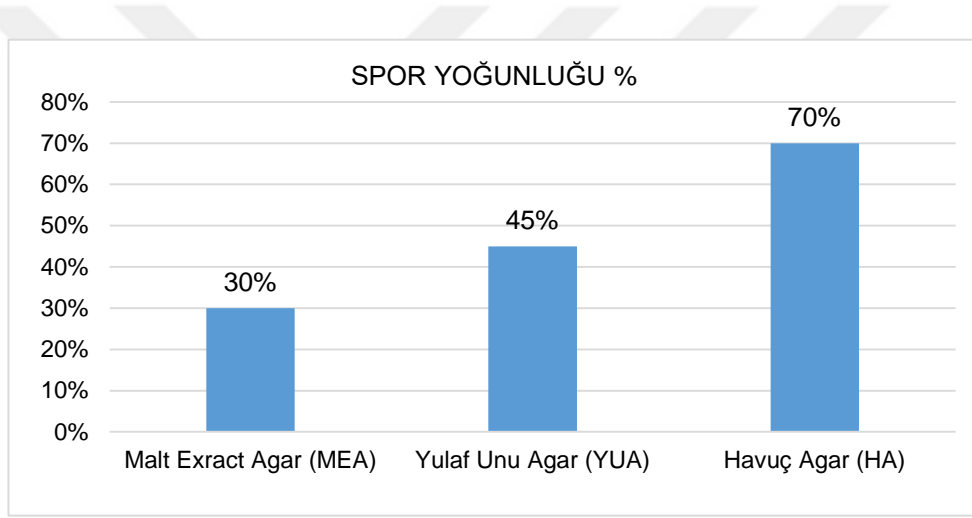
**4.2. *P. tracheiphila*'nın Farklı Besiyerlerinde Miselyal Gelişimi**

Farklı besi ortamlarında *P. tracheiphila*'nın misel ve piknidium gelişimi ile spor yoğunluğunu belirlemek amacıyla Yulaf Unu Agar (YUA), Malt Extract Agar (MEA) ve Havuç Agar (HA) ortamlarında kültüre alınan patojenin misel diski dört haftalık radyal miselyal gelişimi ölçülmüş (Şekil 4.7) ve ışık mikroskobu altında Thoma lamı ile spor yoğunluğu hesaplanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. MEA, HA ve YUA besiyerinde *P. tracheiphila*'nın 7 (A), 14 (B) ve 21 (C) günlük miselyal gelişimi (soldan sağa doğru)

Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere misel gelişimi denemeye alınan tüm besi ortamlarında ilk hafta yaklaşık 2 cm çapa ulaşırken 2. hafta fungal misel gelişimi tüm besi ortamlarında hızlanmış ve 3. haftaya ulaşıldığında misel çapları en az 6 cm'ye ulaşmıştır. YUA besi ortamında misel çapı 7 cm'ye kadar ulaşmıştır. Ancak MEA ortamında miseller havai gelişim gösterirken diğer besi ortamlarında *Phoma* miselleri daha zayıf gelişim göstermiştir. Diğer taraftan her besi ortamından hasat edilen fialakonidi spor yoğunluğuna bakıldığında ise en iyi spor yoğunluğu veren besi ortamının HA olduğu görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Farklı besi ortamlarının % spor yoğunluğu üzerine etkisi

Şekil 4.8'deki grafiğe bakıldığında en az spor yoğunluğunun %30 ile MEA besi ortamında olduğu, bunu % 45 ile YUA izlediği, en iyi spor yoğunluğunun ise %70 ile HA besi ortamından hasat edildiği saptanmıştır. Sporilasyonun teşviği açısından organik maddelerden elde edilen agar (Yulaf ve Havuç) ortamlarında daha fazla spor elde edilmiştir. Bu ortamların, MEA besi ortamına göre *P. tracheiphila*'nın sporilasyonu ve misel gelişimi için daha zayıf içeriğe sahip olması nedeniyle stres altındaki patojen daha fazla spor oluşturmuştur. *P. tracheiphila*'nın patojenisite ya da diğer spor kaynaklı çalışmalarında, PDA, YUA

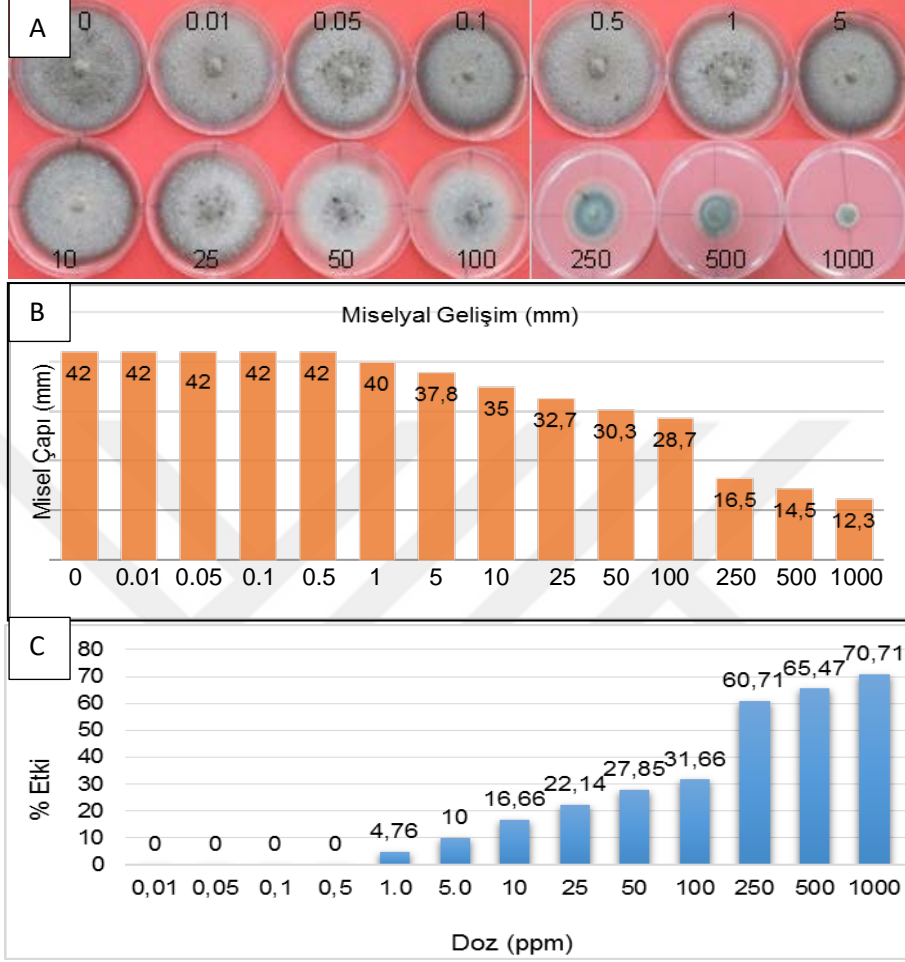
ve MEA besi ortamları yerine HA besi ortamı üzerinde kültüre alınmasının çalışmaları daha da kolaylaştıracağı bu çalışma ile saptanmıştır.

#### **4.3. Fungisitlerin İn vitro koşullarda *P. tracheiphila*'nın Miselyal Gelişimi Üzerine Etkileri**

Açık alan veya sera koşullarında bitkilerde hastalık oluşturan patojenlere karşı kimyasal mücadele kapsamında kullanılacak fungusitlerin öncelikle in vitro koşullarda test edilerek en uygun fungusit konsantrasyonlarının saptanması gerekmektedir. Bu tip küçük çapta laboratuvar şartlarında yapılan testler kontrollü koşullar olup, küçük alanda fazla sayıda tekrür yapabilmeye olanağı sağlaması, ve bu nedenle ekonomik olması, fungusitlerin olası olumsuz yan etkilerini engelleme, hızlı sonuç alma vb. bir çok avantajlar sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında, tepe sürgünleri 20 cm kadar kesilerek yeşil aksama uygulanan fungusitlerin *P. tracheiphila* (E9 ve E10 izolat karışımı)'nın miselyal gelişimine olan etkileri incelenmiştir. Denemeye alınan 12 farklı fungusitin 0,01-1000 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda PDA ortamına ilave edilmesiyle, doz artışına bağlı olarak patojenin miselyal gelişiminde farklı seviyelerde azalmalar olmuştur. Çalışmada kullanılan 12 fungusitin patojenin koloni gelişmesi üzerine etkileri genel olarak incelendiğinde, fungusit konsantrasyonları arttıkça fungal miselyal gelişimde azalma olduğu görülmüştür. Fungisitlerin her biri bireysel ve ikili kombinasyon şeklinde değerlendirilmiştir.

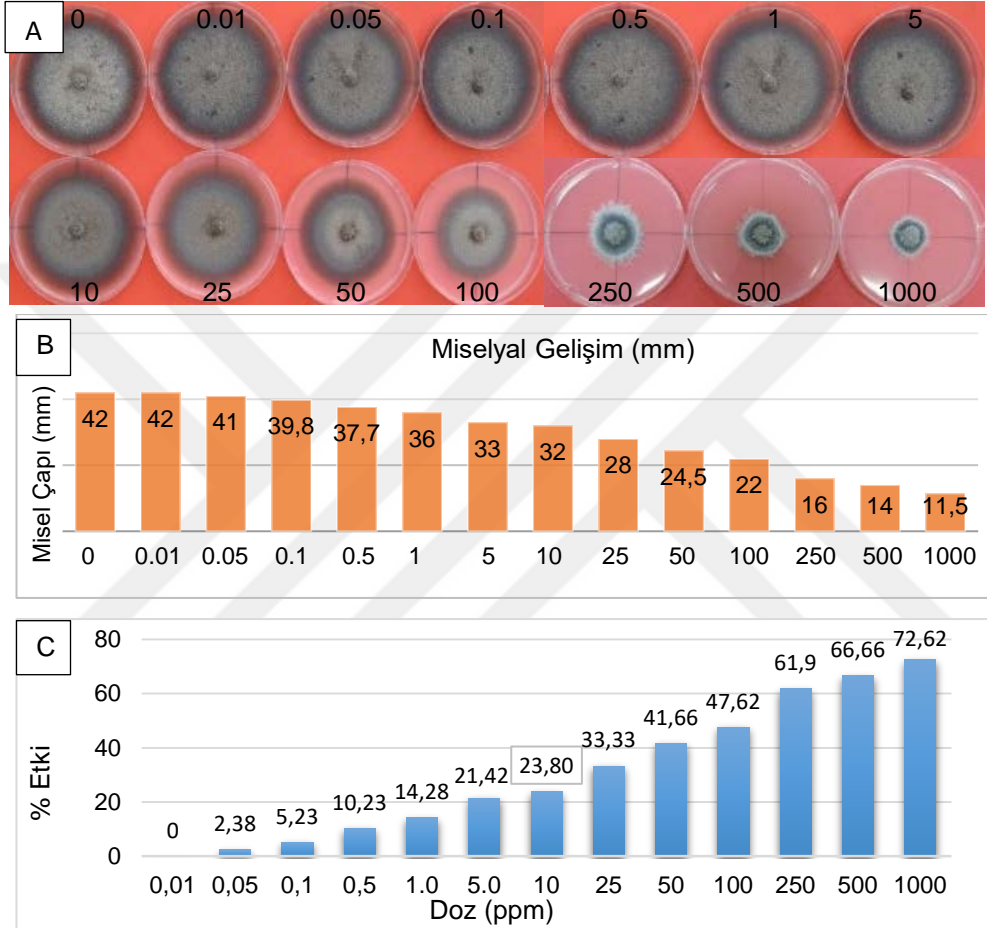
Funguslarda ergosterol biyosentezi inhibitörü olan Strobilurin grubu fungusitlerden Azoxystrobin etkili maddeli fungusitin 1 ppm üzerindeki dozları fungal misel gelişimi engellemeye başlamış, 250 ppm üzerindeki uygulama dozlarında ise gözle görülebilir derecede misel gelişiminde engelleme oluşturmuştur (Şekil 4.9A, B). 1000 ppm konsantrasyonunda *P. tracheiphila*'nın miselyal gelişimini % 70.71 oranında engellemiştir (Şekil 4.9 C).



Şekil 4.9. *In vitro* koşullarda 250 g/L Azoxystrobin fungusitin farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

Funguslarda ergosterol biyosentez inhibitörü Strobilurin ve bitkilerde savunma mekanizmasını uyaran koruyucu etkiye sahip Quinone kombinasyonu olan %12 Dithianon + % 4 Pyraclostrobin fungusit kombinasyonunun 14 farklı dozunun etkisine bakıldığında, Azoxystrobinde olduğu gibi 1 ppm üzerindeki konsantrasyonlarda fungal gelişimi engellemeye başlamış (Şekil 4.10A, B), 250-1000 ppm aralığındaki

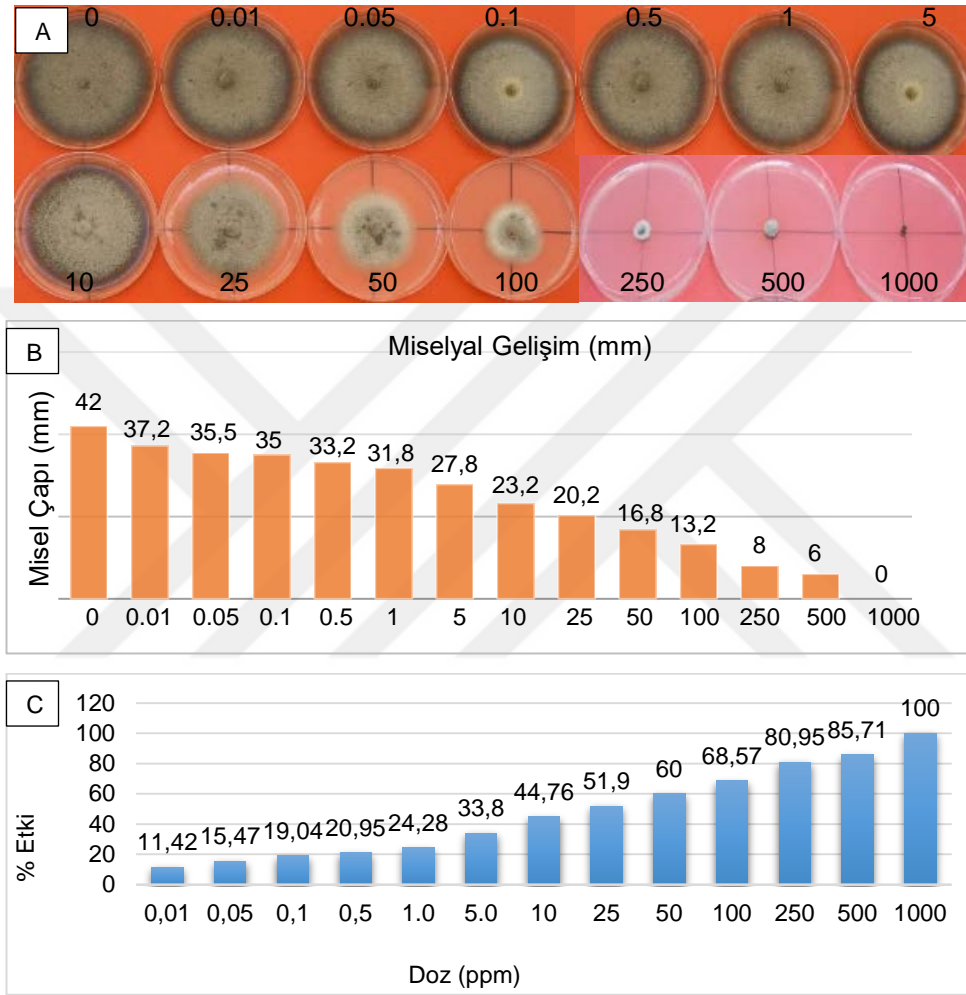
konstrasyonlarda fungal miselyal gelişimi %61,69'dan % 72,66'a kadar oranda engellemiştir (Şekil 4.10C).



Şekil 4.10. *In vitro* koşullarda % 4 Pyraclostrobin + % 12 Dithianon fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

Strobilurin ve Carboximide kombinasyonu olan % 12,8 Pyraclostrobin + %25,2 Boscalid fungusit konsantrasyonlarının hepsi fungal miselyal gelişimi engellemeye başlamıştır. Ancak gözle görülebilir düzeyde engelleme 25 ppm ve üzerindeki uygulama dozlarında gözlenmiştir (Şekil 4.11A,B). Bu fungusitlerin en

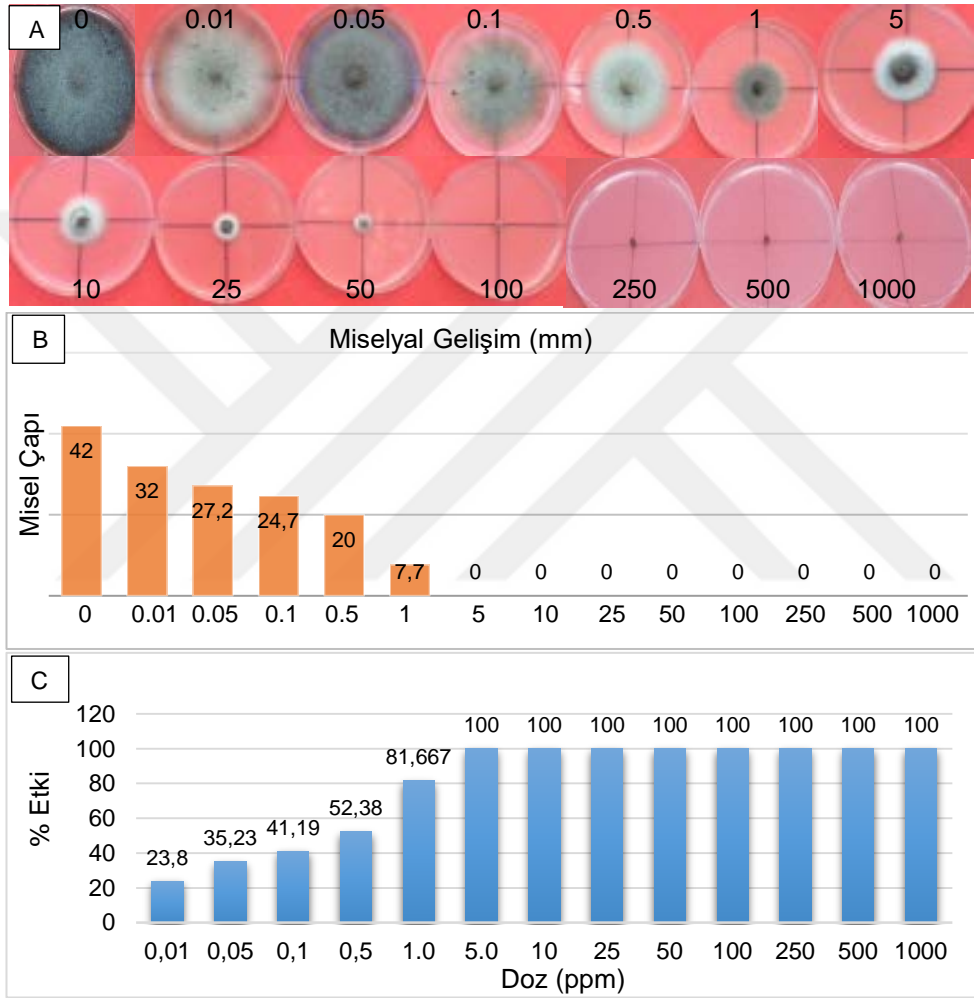
yüksek uygulama dozunda (1000 ppm) miselyal gelişim %100 oranında engellenmiştir (Şekil 4.11C).



Şekil 4.11. *In vitro* koşullarda % 12.8 Pyraclostrobin + %25.2 Boscalid fungisit kombinasyonunun farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

Funguslarda metionin biyosentezini engelleyen Pyrimidine ve bitkide ozmotik sinyal üretiminde MAP histidin kinaz enzimini teşvik eden koruyucu etkiye sahip Pyrrol kombiasyonu olan 375 g/kg Cyprodinil+ 250 g/kg Fludioxonil

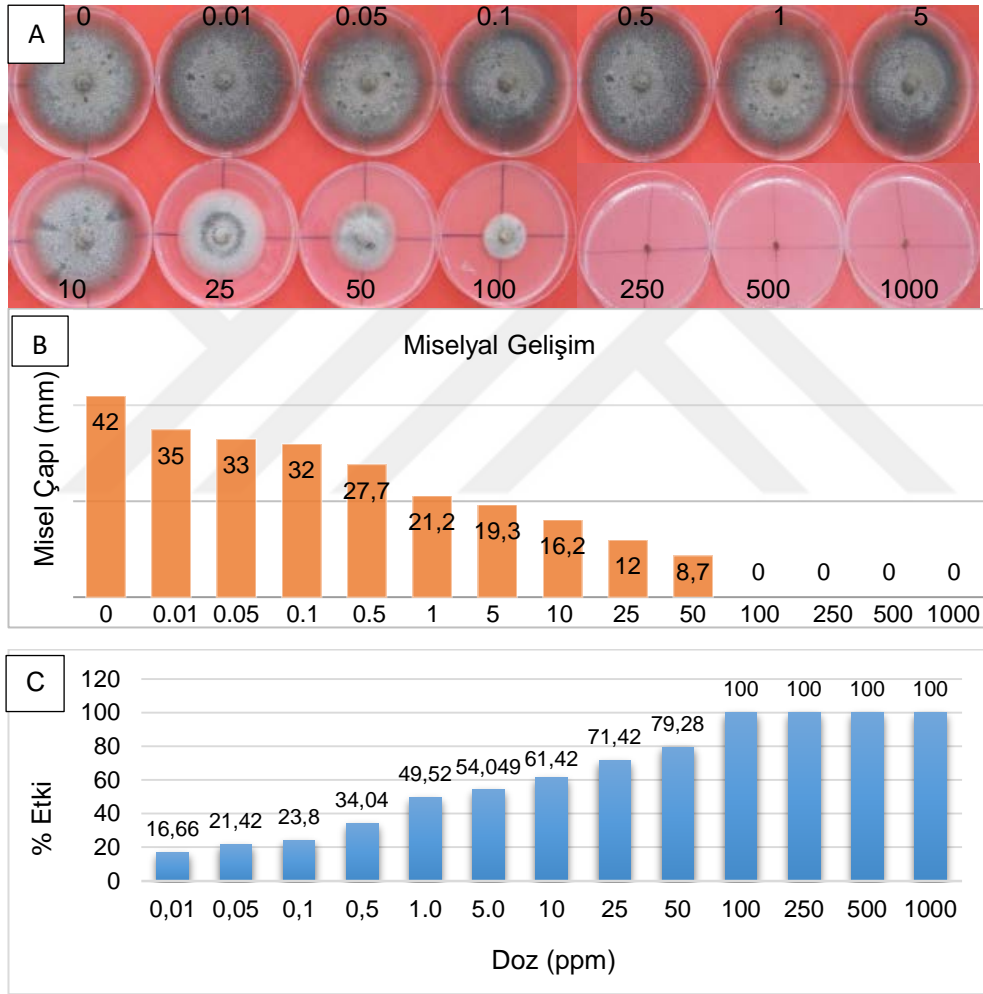
fungisit kombinasyonu, denenen fungusitler içerisinde en etkili bulunmuş olup, 5ppm ve üzerindeki uygulama konsantrasyonlarında fungal miselyal gelişimi % 100 engellenmiştir (Şekil 4.12A, B, C).



Şekil 4.12. *In vitro* koşullarda 375 g/kg Cyprodinil+ 250 g/kg Fludioxonil fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

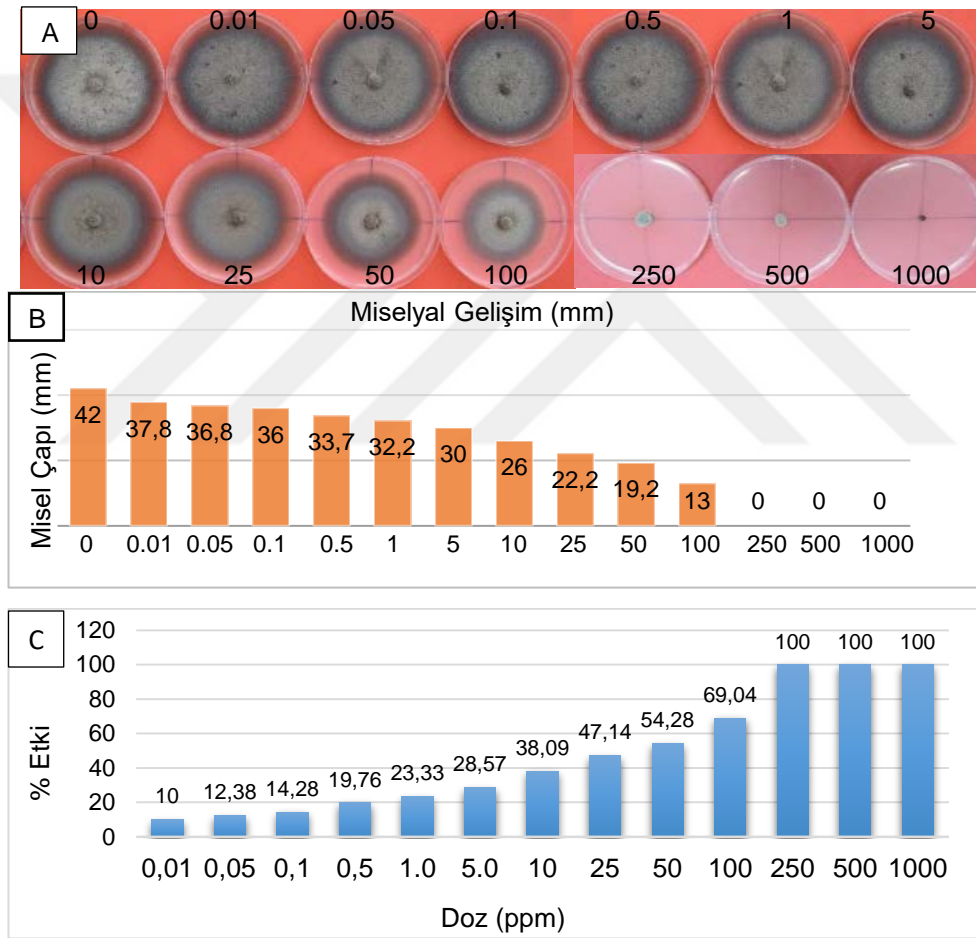


SDHI etkili Pyrazole-4 Carboxamide ve Triazol kombiasyonu olan 75 g/L Fluxapyroxad ve 50 g/L Difenconazole fungusit kombinasyonunun 14 farklı dozunun etkisine bakıldığında, 5 ppm üzerindeki konsantrasyonlarda fungal gelişimi engellemeye başlamış (Şekil 4.13 A, B), 250-1000 ppm aralığındaki konstrasyonlarda fungal miselyal gelişimi % 100 engellemiştir (Şekil 4.13 C).



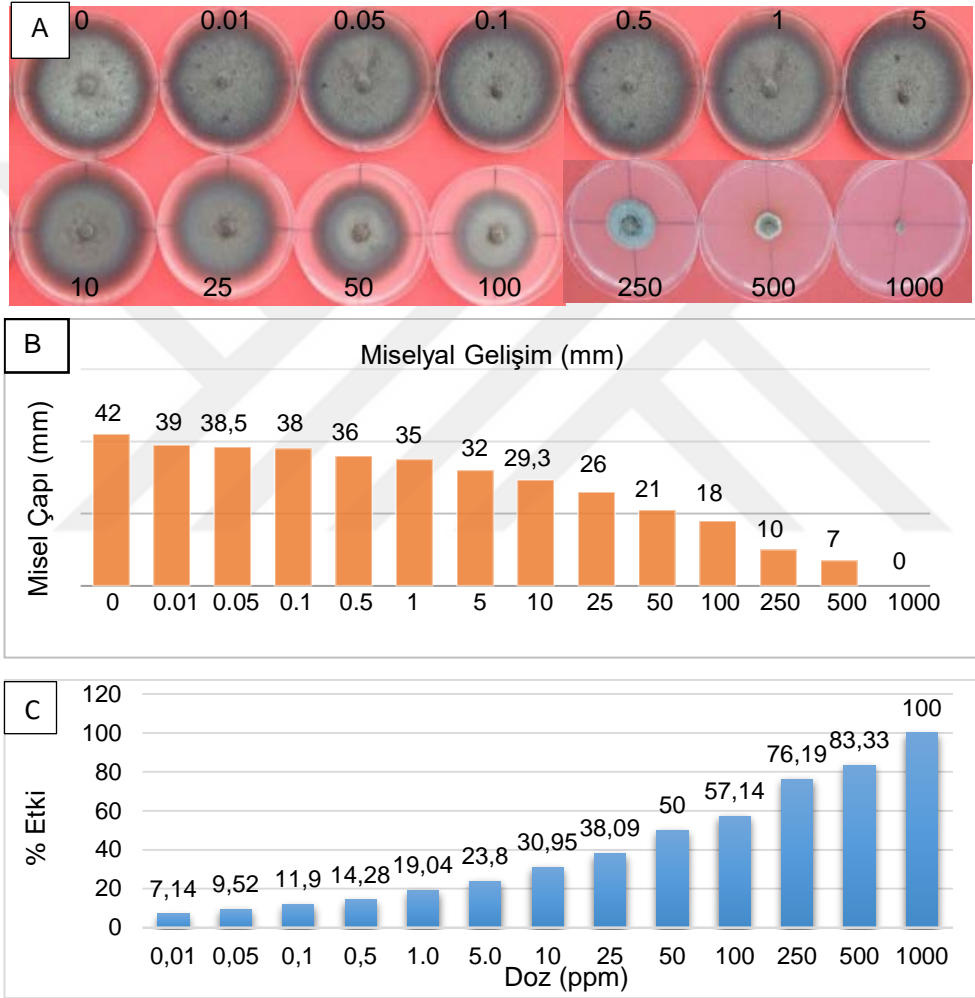
Şekil 4.13. *In vitro* koşullarda 75 g/L Fluxapyroxad ve 50 g/L Difenconazole fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

İki adet Triazol etkili madde grubu içeren 150g/L Propiconazole + 150g/L Difenconazole fungusit kombinasyonunun 14 farklı uygulama dozunun etkisine bakıldığında, 0.01 ppm üzerindeki konsantrasyonlarda fungal miselyal gelişim engellenmeye başlanmış (Şekil 4.14 A, B), 100-1000 ppm aralığındaki konsantrasyonlarda miselyal gelişim % 69.04'den % 100'e kadar değişen aralıkta engellenmiştir (Şekil 4.14 C).



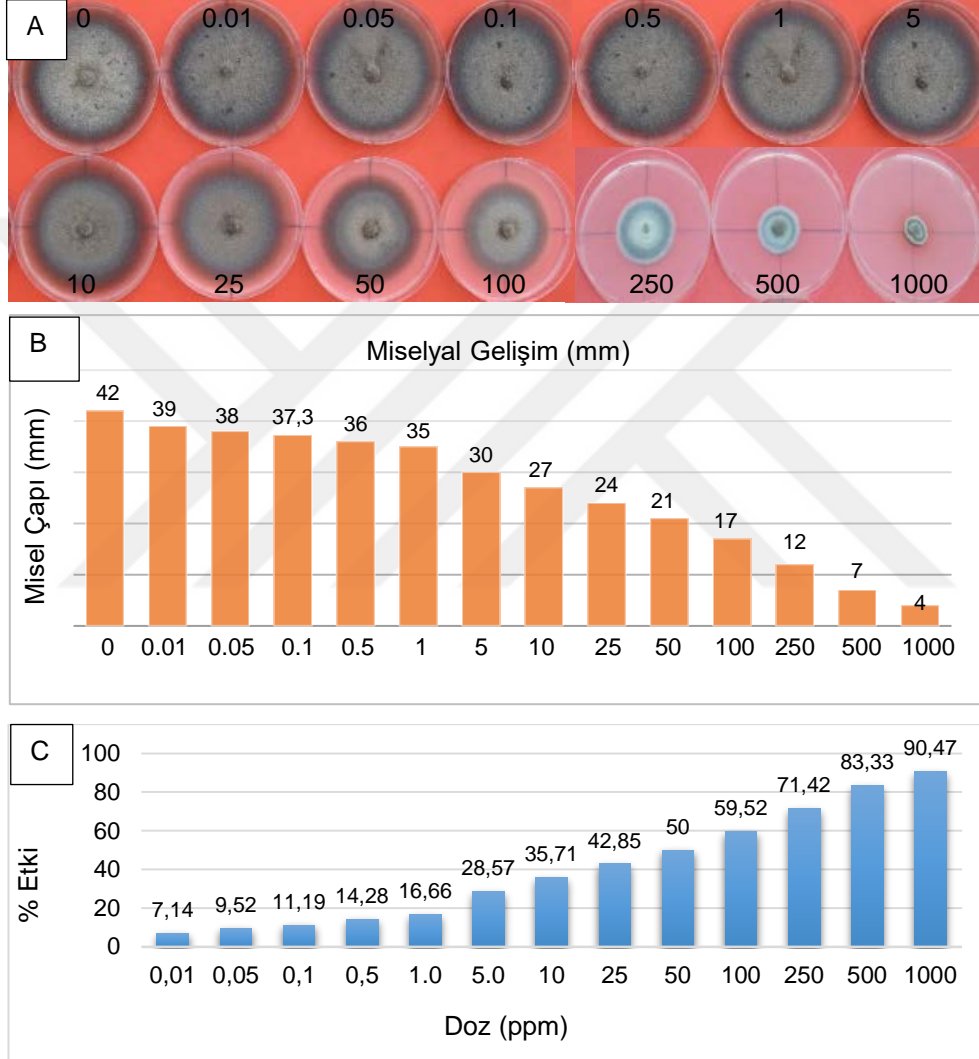
Şekil 4.14. *In vitro* koşullarda 150g/L Propiconazole + 150g/L Difenconazole fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

Triazol grubu olan 50 g/L Fenbuconazole fungusitinin 14 farklı dozunun etkisine bakıldığında, diğer triazol gruplarında olduğu gibi 10 ppm üzerindeki konsantrasyonlarda fungal miselyal gelişim engellenmeye başlamış (Şekil 4.15A, B), 250 -1000 ppm aralığındaki konstrasyonlarda ise engelleme etkisi 76,19'dan % 100'e kadar değişmiştir (Şekil 4.15C).



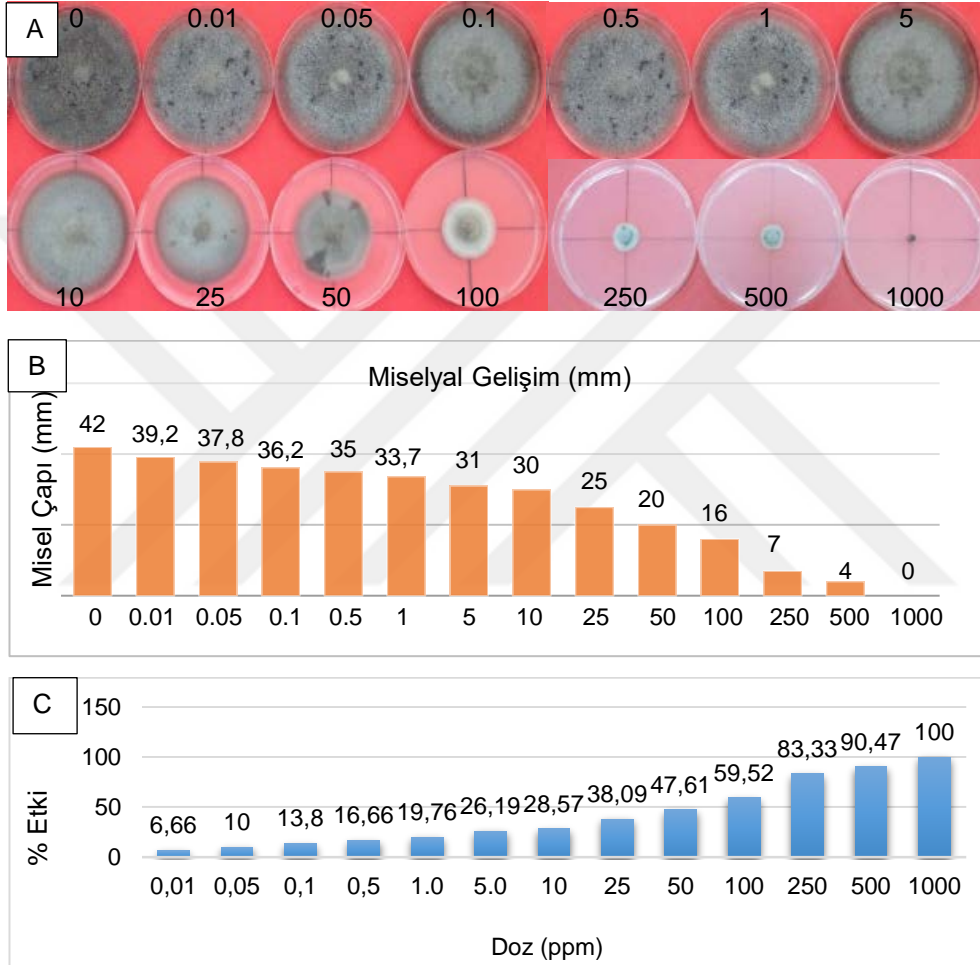
Şekil 4.15. *In vitro* koşullarda 50 g/L Fenbuconazole fungusitinin farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

Triazol grubu olan 60 gr/lt Metconazole fungusinin 14 farklı uygulama dozunun etkisine bakıldığında, diğer triazol gruplarında olduğu gibi 10 ppm üzerindeki konsantrasyonlarda fungal miselyal gelişim engellenmeye başlamıştır (Şekil 4.16 A, B).



Şekil 4.16. *In vitro* koşullarda 60 gr / lt Metconazole fungusiti farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

250 -1000 ppm aralığındaki konstrasyonlarda fungal miselyal gelişim %71.42'den % 90.47'e kadar engellenebilmiştir (Şekil 4.16 C). Bu fungusit ile % 100 miselyal gelişim engelenememiştir.

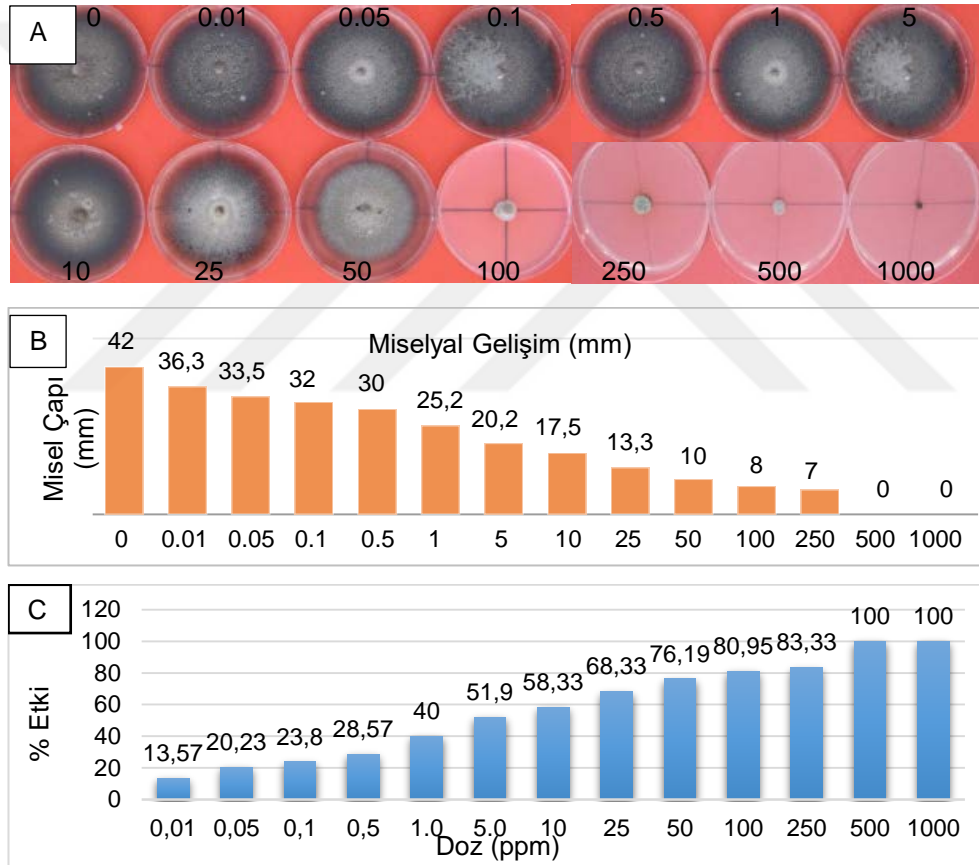


Şekil 4.17. *In vitro* koşullarda %25 Tebuconazole fungusiti farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

Şekil 4.17'de görüldüğü üzere triazol grubu olan %25 Tebuconazole fungusitinin 14 farklı dozunun etkisine bakıldığında, diğer triazol gruplarında olduğu

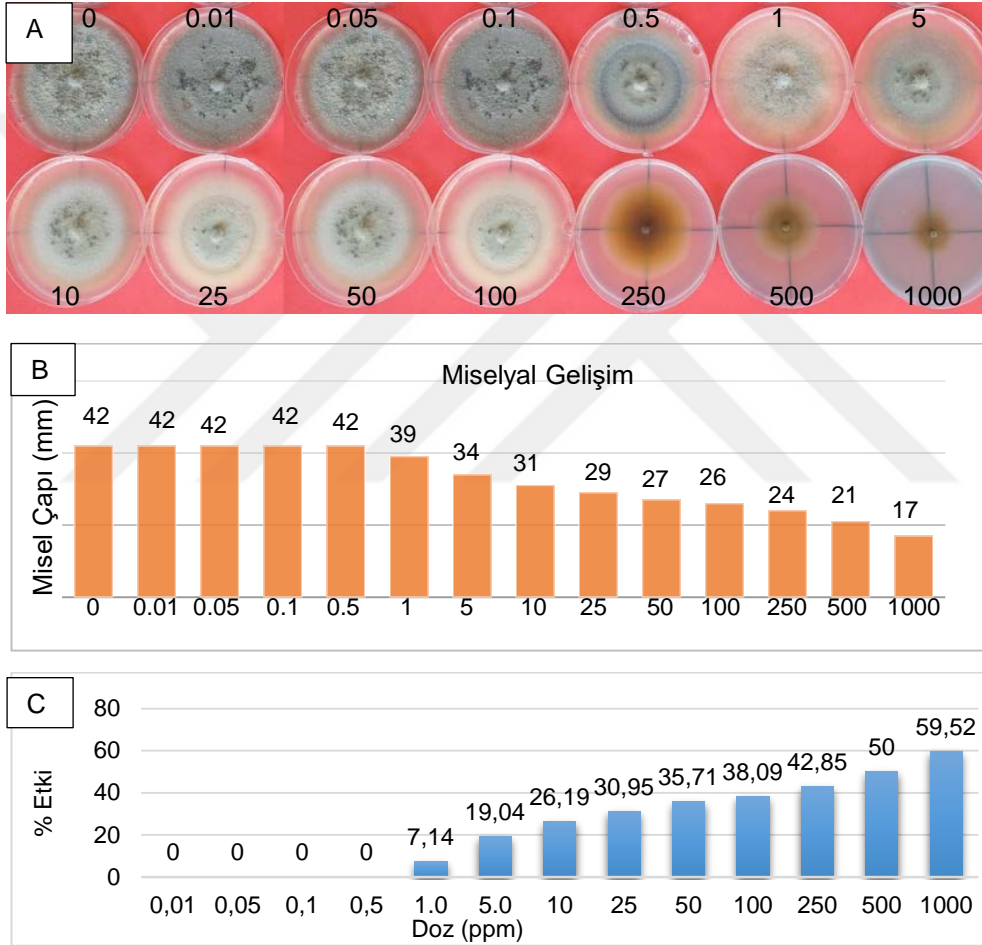
gibi 10 ppm üzerindeki konsantrasyonlarda fungal miselyal gelişim fark edilebilir oranda engellenmeye başlamış (Şekil 4.17 A,B), 500-1000 ppm aralığındaki konsantrasyonlarda ise % 100 olmuştur (Şekil 4.17C).

İmidazole grubu %3.4 Cyflufenamid +%15 Triflumizole fungisit kombinasyonunun 14 farklı uygulama dozunun etkisine bakıldığında, sadece 500 ve 1000 ppm uygulama dozlarında fungal miselyal gelişim % 100 engellenmiştir (Şekil 4.18A, B, C).



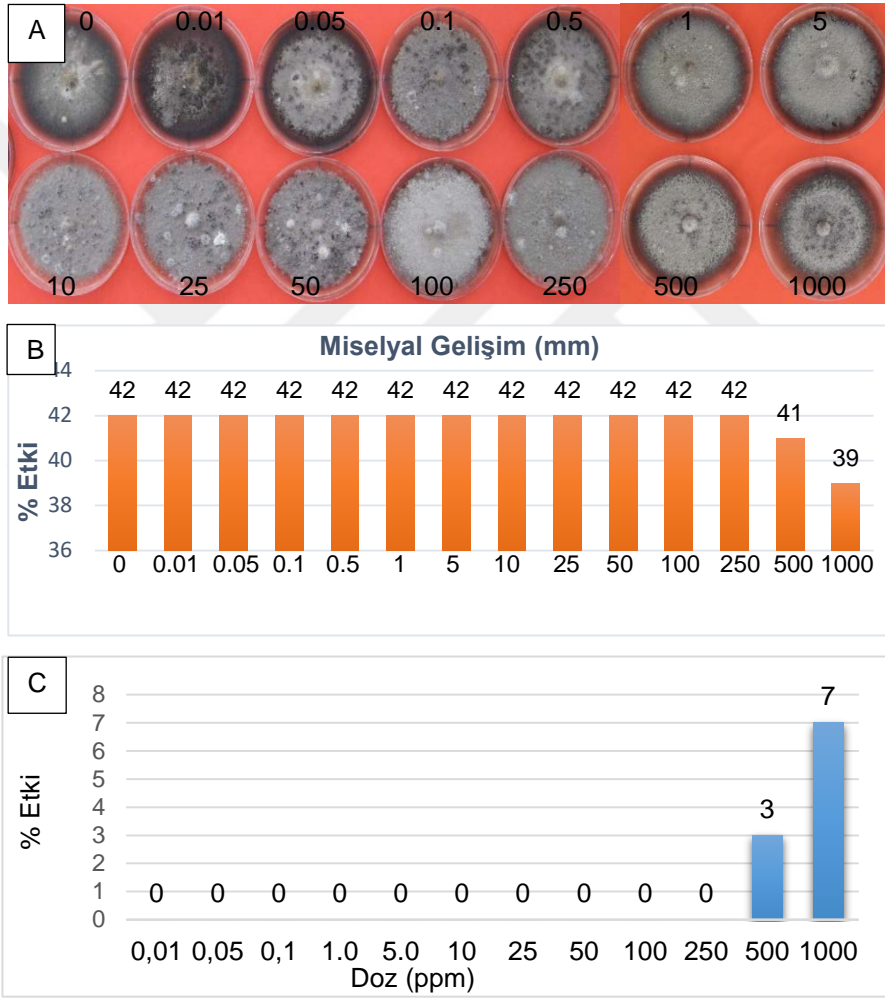
Şekil 4.18. *In vitro* koşullarda % 3.4 Cyflufenamid + % 15 Triflumizole fungisit kombinasyonunun farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

Bakırlı fungusitler grubundan olan %35 metalik bakıra eşdeğer Bakır Hidroksit fungusitinin 14 farklı dozunun etkisine bakıldığında, gözle fark edilebilir fungal miselyal gelişimin baskılandığı sadece 250 ppm üzerindeki uygulama dozlarında görülmektedir (Şekil 4.19 A, B), Bununla birlikte en yüksek uygulama dozunda bile miselyal gelişimi engelleme ancak % 59.52 olmuştur (Şekil 4.19 C).



Şekil 4.19. *In vitro* koşullarda %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit fungusiti farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)

Koruyucu fungusit özelliğinde diğer bir bakırlı fungusit olan % 25 metalik bakıra eşdeğer Bakır Oksiklorür fungusitinin 14 farklı konsantrasyonunun etkisine bakıldığında, hiçbir uygulama dozunda ciddi bir seviyede miselyal gelişim engellenememiştir (Şekil 4.20 A, B). 500 ve 1000 ppm konsantrasyonlarında %3 ve %7 gibi oldukça düşük oranda fungal miselyal gelişim engellenmiştir (Şekil 4.20 C).



Şekil 4.20. *In vitro* koşullarda % 25 metalik bakıra eşdeğer Bakır Oksiklorür fungusiti farklı dozlarının *P. tracheiphila* miselyal gelişimi üzerine etkisi (A, B) ve engelleme oranı (% etkisi) (C)



Miselyal gelişimi için  $EC_{50}$  değerleri incelendiğinde, bakır oksiklorür'ün  $204.313 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyon ile en yüksek  $EC_{50}$  değerine sahip fungusit olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *In vitro* koşullardaki denemelerde kullanılan fungusitlerin % 50 engelleme oranı (ppm)

Fungisitler	%50 Engelleme Oranı (ppm)
% 25 metalik bakıra eşdeğer Bakır Oksiklorür	204.313
%35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit	186.844
250 g/L Azoxystrobin	195.967
%12 Dithianon+ % 4 Pyraclostrobin	103.653
60 g/l Metconazole	27.089
50 g/l Fenbuconazole	27.020
% 25 Tebuconazole	18.313
% 25.2 Boscalid+% 12.8 Pyraclostrobin	9.577
150 g/l Propiconazole+150 g/l Difenconazole	8.974
% 3,4 Cyflufenamid + %15 Triflumizole	2.367
75 g/l Fluxapyroxad+50 g/l Difenconazole	1.228
375 g/kg Cyprodinil+ 250 g/kg Fludioxonil	0.124

250g/L Azoxystrobin, %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit ve %12 Dithianon+ % 4 Pyraclostrobin fungusit kombinasyonunun  $EC_{50}$  değerleri incelendiğinde, 250 g/L Azoxystrobin en yüksek (195.967) olduğu bunu, 186.844 ile ruhsatlı fungusit olan bakır hidroksitin takip ettiği ve  $103.653 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ile %12 Dithianon+ % 4 Pyraclostrobin fungusit kombinasyonunun izlediği görülmektedir. Bu üç fungusit ve kombinasyonun  $EC_{50}$  değerlerinin yüksek olduğu dolayısı ile en az etkiye sahip fungusitler olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan çok daha düşük

dozlarda fungal miselyal gelişimi baskılayan 60 g/l Metconazole (27.089) ve 50 g/l Fenbuconazole (27.020)'ün EC<sub>50</sub> değerlerinin birbirine oldukça yakın olup, *P. tracheiphila* için bu iki fungusitin benzer etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Tebuconazole fungusitinin yukarıda sözkonusu edilen iki fungiste göre daha etkili olduğu EC<sub>50</sub> değerinin 18.313 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonunda saptanmıştır. Cyprodinil (375g/kg )+ Fludioxonil (250 g/kg) fungusitinin EC<sub>50</sub> değeri 0.124 ppm'lik doz kullanımıyla denemede çalışılan diğer fungusitler içerisinde en düşük konsantrasyonda en etkili sonuç veren fungusit olduğu ve patojenin bu fungusite çok duyarlı olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte bu tip fungusitlerin sürekli kullanımı sonucunda patojenlerde direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu nedenle farklı etki mekanizasına sahip fungusitlerin dönüşümlü olarak kullanılması ve diğer mücadele yöntemleri ile entegre olması gerekmektedir. Kültürel uygulamalar, biyolojik preparatlar, fiziksel mücadele ve kimyasal uygulamalardan en 2 ve 3'lü kombinasyon şeklinde olup, kimyasal preparatlar en son tercih edilmesi gereken uygulama şeklinde düşünülmelidir.

Fungal miselyal gelişimi baskılamada tüm uygulama dozları göz önünde bulundurulduğunda en düşük etkiye sahip fungusitlerin ruhsatlı koruyucu fungusitlerden bakırlı fungusitlerin olduğu görülmektedir. Bunun nedeni bakırlı fungusitler fungal sporun çimlenmesini ve bitkiye girişini engellemektedir. Ancak fungus miseline etkisi olmamaktadır. Bununla birlikte bu tip fungusitlerin kullanılması kültürel önlemlerle birlikte doğada dayanıklı spor yataklarının oluşumunu engelleme potansiyeline sahiptir. Diğer taraftan kimyasal preparatların yetersiz çok düşük dozları uygulandığında ise patojenin dayanıklı spor yatakları olan piknidiumların gelişimini teşvik etmektedir. Özellikle bu tip piknidiumların gelişimi in vitro koşullarda burada yapılan fungusit deneme sonuçlarında gözlenmiştir. Özellikle bakırlı koruyucu fungusitlerin düşük dozlarında çok ciddi miktarlarda *P. tracheiphila* piknidiumları gelişmiştir (sayıları ve resimleri burada verilmemiştir).

#### 4.4. Fungisitlerin Sera Koşullarında *P. tracheiphila*'ya Karşı Etkisi

Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü uygulama arazisi seralarında Kütdiken limon fidanları üzerinde *In vitro* çalışmalar sonucunda belirlenen en etkili 2 adet fungusit Cyprodinil (375g/kg )+ Fludioxonil (250 g/kg) ve 75 g/l Fluxapyroxad+50 g/l Difenconazole kombinasyonları ile pozitif kontrol olarak ruhsatlı %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit seçilmiştir. Bu fungusitlerin ve bakırlı fungusitin 4 dozu  $\{X_1: \text{Normal Doz}; X_2 = [X_1 - (X_1 \times \frac{3}{4})]; X_3 = [X_1 + (X_1 \times \frac{3}{4})]; X_4 = [2X_1]\}$  saf su (Negatif Kontrol) ile homojen karışımı hazırlanarak kullanılmıştır.

En virulent izolatların (E9-E10) spor süspansiyonu ( $4 \times 10^5 - 7 \times 10^6$  spor/ml) fidanlara el spreyi ile püskürtülmüştür. Patojenle inokülasyondan hemen önce fidanlarda 2 nolu böcek iğnesi yaprak sapı, yaprak orta damarları ve gövdelerine batırılmak suretiyle küçük yaralar açılmış ve spor süspansiyonu bu yaralara sprey ile uygulanmıştır. İnokülasyondan bir hafta önce ve inokülasyondan 2 ve 4 hafta sonra olmak üzere 3 kez fungusit uygulamaları yapılmıştır. 20-23 °C sıcaklık ve nemli ortamda 6 hafta bekletilen limon fidanlarının gövde nekroz uzunlukları (Şekil 4.21, 4.22, Çizelge 4.3), uygulanan dozların % engelleme oranı (Çizelge 4.4) ve infekteli dokuların re-izalasyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.23).

Şekil 4.21 ve 4.22'de yapay inokülasyon yöntemi ile *P. tracheiphila* ile Kütdiken limon fidanlarının inokülasyonundan 1, 2 ve 4 hafta sonra olmak üzere 3 kez ilaçlama yapılmıştır. Uçkurutan etmeni ile inokülasyonda 6 hafta sonra, fungusitlerin etkinliğini ölçmek amacı ile dallar tepeden 50 cm uzunluğunda kesilmiş ve gövde kabuk dokusu kaldırılmış ve etmenin varlığını gösteren iletim demetinde oluşan turuncu renklenmenin uzunluğu ölçülmüştür (Çizelge 4.3).



Şekil 4.21. Sera koşullarında 1 yaşındaki Kütdiken limon fidanlarına patojen inoküle edilmiş ancak fungusit uygulanmamış hastalık gelişimi gözlenen pozitif kontrol (A) ve yapay inokülasyon yapılmamış ancak fungusit uygulanmış negatif kontrol (B)



Şekil 4.22. *P. tracheiphila* ile yapay olarak inoküle edilmiş Kütdiken limon fidanlarında fungusitlerin en yüksek dozlarının etkisi (A: Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250 g/kg), (B: 75 g/L Fluxapyroxad + 50 g/L Difenconazole) ve (C: %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit)

Çizelge 4.3. Sera koşullarında *P. tracheiphila* ile yapay olarak inoküle edilen Kütdiken limon fidanlarına 3 farklı fungusitin 4 farklı dozunun uygulandığı Kütdiken limon fidalarının dallarında patojenin oluşturduğu nekroz uzunlukları

Fungisitler	Uygulama Dozları (ppm)				
	0	25	50	75	100
	Nekroz Uzunluğu (mm)				
<b>Cyprodinil (375g/kg)+Fludioxonil (250 g/kg)</b>	54.3	45.3 a	36 a	31 a	20.3 a
<b>75 g/l Fluxapyroxad+50 g/l Difenoconazole</b>	54.3	51.5 b	46 b	36.5 a	29.7 b
<b>%35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit</b>	54.3	53.3 c	52.5 b	51.3 b	49 c

Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi fungusit uygulanmamış Uçkurutan etmeni ile infeksiyondan sadece 6 hafta sonra Kütdiken limonu dallarında *P. tracheiphila* etmeni tepeden aşağı doğru 54.3 mm uzunluğunda iletim demetlerinde ilerlemiştir (Şekil 4.21A). Diğer taraftan in vitro koşullarda EC<sub>50</sub> değeri en düşük, en etkili fungusit kombinasyonunun Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250g/kg) uygulandığı fidanlarda nekroz uzunluğu aynı süre içerisinde 20.3 mm kadar tepeden aşağı doğru ilerlemiştir (Şekil 4.22A). In vitro koşullarda fungal etmen gelişimini % 100 engellemesine rağmen sera koşullarında fungal etmen inokülasyonundan önce fungusit uygulandığı halde patojen lokal sistemik tekiye sahip fungusit içermesine rağmen patojen etmen bitki dokusunda yine ilerleme göstermiştir. EC<sub>50</sub> değeri düşük ikinci en etkili fungusit kombinasyonu (75 g/l Fluxapyroxad+50 g/l Difenoconazole)’nun en yüksek dozunun uygulandığı fidanlarda nekroz uzunluğu ise 29.7 mm olarak gelişmiştir (Şekil 4.22B). %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit’in en yüksek dozunun uygulandığı

fidanlarda nekroz uzunluğu ise 49 mm (Şekil 4.22C, Çizelge 4.3) olup, neredeyse hiç fungusit uygulanmamış (Şekil 4.21A) pozitif kontrole yakın nekroz oluşturmuştur.

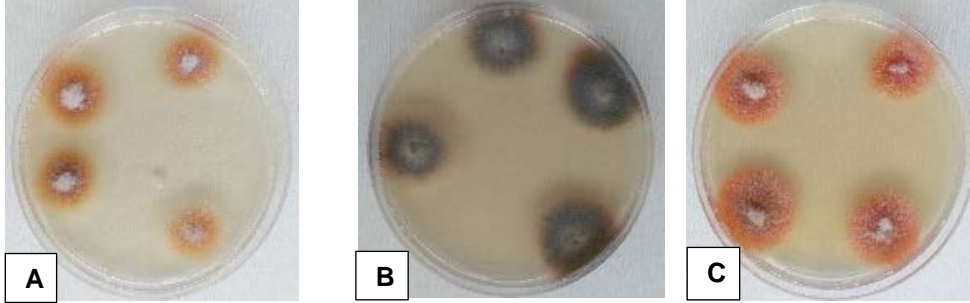
Sera koşullarında fungusit uygulamalarından in vitro koşullarında elde edilen verilerden çok daha uzak veriler elde edilmiştir. Bu durum patojenin endofit olup, fungusitle doğrudan temas edememesinden kaynaklanmaktadır. Nitekim bu tip fungal etmenlere karşı geçmiş yıllarda benomyl etkili sistemik fungusitlerin ekim, aralık ve mart aylarında yeşil aksam ilaçlaması olarak %1.5 dozunda beyaz yağ ile karıştırılarak kullanımını aylarında kullanılması Dinç ve ark. (1979), tarafından önerilmiştir. Ancak sistemik etkili benomyl fungusiti bitkide kalıntı oluşturması nedeniyle günümüzde kullanımı yasaklandığından bu patojenle mücadelede sadece bakırlı preparatlar koruyucu fungusit olarak kullanılmaktadır. Diğer tarftan bu fungus ile mücadelede etkili bir sistemik fungusit olmamakla birlikte daha dirençli ırkları geliştirebileceği varsayıldığından bu tip fungusitlerin tek başına kullanımı da önerilmemektedir.

Aynı fungusitlerin hastalığı engelleme yüzdelerine baktığımızda doğal olarak en düşük nekrozun geliştiği fungusit kombinasyonu uygulanması % etki bakımından en etkili olarak saptanmıştır. Buna göre Cyprodinil (375g/kg )+ Fludioxonil (250 g/kg) kombinasyonunun 100 ppm dozu fungusu % 62.6 oranında engellemiştir (Çizelge 4.4). Bunu sırasıyla 75 g/L Fluxapyroxad ve 50 g/L Difenoconazole fungusit kombinasyonu % 45.3 ile %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit ise %9.8 engelleme oranı ile takip etmiştir.

Çizelge 4.4. Sera denemelerinde fidanlara uygulanan fungusitlerin farklı dozların patojeni % engelleme oranı

Fungisit	Uygulama Dozları (ppm)				
	0	25	50	75	100
	Engelleme Oranı (%)				
<b>Cyprodinil (375g/kg)+Fludioxonil (250 g/kg)</b>	-	16.6	33.7	42.9	62.6
<b>75 g/L Fluxapyroxad ve 50 g/L Difenoconazole</b>	-	5.2	15.3	32.8	45.3
<b>%35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit</b>	-	1.8	3.3	5.5	9.8

Fungisitlerin normal dozları uygulandığında ise hastalık engelleme oranları Sırasıyla %33.7, %15.3 ve %3.3 olarak saptanmıştır. Fungal gelişimi baskılamada hiçbir fungusist % 100 etki olamamıştır. Fungisit uygulmuş fidanlardan tekrar patojen izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.23). Sera koşullarında fungusit uygulamalarının patojenin bitkide gelişimini durduramadığı gösterilmiştir. Bu durumda limon üreticilerinin temmuz ve ağustos aylarında ağaçlarda çok iyi temizlik, budama ve koruyucu fungusitlerle entegre mücadele programı ve bunların arasına biyolojik preparatları da girdirerek toprak yapısını iyileştirme ve bitkinin savunma mekanizmasını teşvik edici uygulamalarla mücadele programlarını desteklemeleri gerekmektedir.

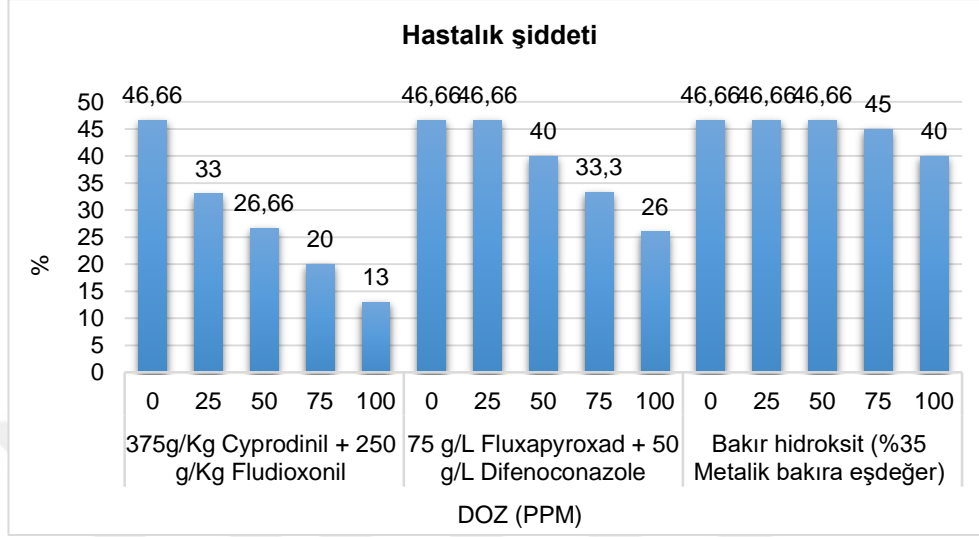


Şekil 4.23. Sera koşullarında patojenin yapay olarak inoküle edildiği Kütdiken limon fidanlarına fungusit uygulandıktan 6 hafta sonra re-izolasyonları. Fungisit uygulanmamış pozitif kontrol (A); 25ppm %35 Metalik Bakıra Eşdeğer Bakır Hidroksit uygulanmış (B); 25ppm 75 g/l Fluxapyroxad+50 g/l Difenconazole uygulanmış (C)

Bu patojene karşı sistemik fungusitler önerilmediği için limon ağaçlarında faydalı endofit mikroorganizmalarında saptanması, saflaştırılarak Uçkurutan ile mücadeleye dahil edilmesi sağlanmalıdır.

Sera koşullarda fungusit uygulama sonuçlarına göre, Cyprodinil (375g/kg )+ Fludioxonil (250 g/kg) etkili madde uygulaması *P. tracheiphila* 'nın miseliyal gelişimini %16.6 ve %62.6 arasında farklı değerlerde engelleyici etki sergilemiştir. Farklı etkili maddeli fungusitlerde uygulama dozları arasında istatistiksel farklar tespit edilmiştir. Genel değerlendirme yapıldığında ise bu azaltıcı etkinin artan dozlarla alakalı olduğu açıklanabilir (Çizelge 4.4).





Şekil 4.24. Sera koşullarında *P. tarcheiphila* ile yapay olarak inoküle edilen Kütdiken limon fidanlarına uygulanan 3 farklı fungusit kombinasyonunun farklı dozlarının hastalık şiddetine % etkisi

Yapılan denemeler sonucunda hastalık şiddeti hesaplamalarında elde edilen verilere göre; Cyprodinil (375g/kg)+ Fludioxonil (250 g/kg) fungusitinin etki oranı % 33-13, Fluxapyroxad (75g/l)+ Difenconazole (50g/l) % 40-26, ruhsatlı Bakır Hidroksit (% 35 metalik bakıra eşdeğer) ise % 47-40 arasında en düşük etkiyi göstermiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülke ekonomisinde ticari değeri yüksek olan limon yetiştiriciliği sırasında tarımsal faaliyetler, iklimsel olaylar, bitki hastalık ve zararlıları gibi geniş kapsamlı sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu sorunların başında özellikle Akdeniz ülkelerinde limonlarda fungal kökenli Uçkurutan Hastalığı ilk sırada yer almaktadır. Etmeni *Phoma tracheiphila* olan patojen Adana ve Mersin illerini kapsayan Çukurova Bölgesi'nde "Meyer" hariç "Kütdiken", "Eureka", "İtalyan Memeli" ve "Enterdonat" gibi limon çeşitlerinde ciddi ağaç ölümlerine neden olmaktadır. Her ne kadar kültürel önlemler bu hastalık etmeni ile mücadelede çok önemli olsa da tek başına yeterli olmamaktadır. Bu nedenle kimyasal mücadele bu hastalığın yönetimi için alternatif yaklaşımlardan biridir.

Yapılan çalışmalarda, Adana ile çevresinde yaygın görülen ve büyük zarar oluşturan Uçkurutan Hastalığı etmeni *P.tracheiphila*'ya karşı farklı etki mekanizmasına sahip sistemik ve koruyucu etkili fungusitlerin etmenin gelişimini engelleme durumları araştırılmıştır.

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir;

1. Adana ili ve çevresinde Uçkurutan Hastalığı belirtileri gösteren Kütdiken ve Eureka limon çeşitlerinden alınan doku örneklerinden 15 adet *P. tracheiphila* patojen izolatları saflaştırılmış ve izolatların patojenisite çalışmaları için *P. tracheiphila* miselyal diskleri Kütdiken limon çeşidine yapay olarak inokule edilmiştir. Yapay inokulasyon sonucunda fidanlarda hastalık gelişimiyle birlikte hastalık şiddeti takip edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda 15 adet izolattan, E9 ve E10 izolatında belirtilerinin diğer izolatların oluşturduğu hastalık yoğunluğuna göre daha şiddetli olduğu 0-5 skalası kullanılarak saptanmıştır.
2. *P. tracheiphila*'nın en iyi miselyal gelişim gösterdiği ve en yüksek spor yoğunluğu oluşturduğu ortamları belirlemek amacıyla in vitro koşullarda

HA, PDA, MEA ve YUA besi yerleri testlenmiştir. Radyal misel gelişimde besi ortamları arasında ciddi bir fark gözlenmezken aynı süre içerisinde YUA ortamında misel gelişimi diğer ortamlara göre 1 cm daha hızlı olmuştur. Bununla birlikte PDA besi ortamında misel kütlesi daha yoğun ve havai gelişmiştir. Fialakonidi oluşumunda ise HA besi ortamı diğer besi ortamlarına göre ciddi fark yaratmış olup, spor yoğunluğu %70 oranında elde edilmiştir.

3. İn vitro koşullarda farklı etkili maddeli koruyucu ve sistemik 12 adet fungusitin patojenin miselyal gelişimini engelleme üzerine yapılan denemeleri sonucunda Cyprodinil (375g/kg )+ Fludioxonil (250 g/kg) ve Fluxapyroxad (75g/l)+ Difenconazole (50g/l) fungusitleri en yüksek etkiyi göstermiştir. İn vitro koşullarda kullanılan 12 adet fungusitin patojenin % 50 engelleme oranlarına göre dozlarına bakıldığında; en düşük dozda Cyprodinil (375g/kg)+Fludioxonil (250 g/kg) fungusit kombinasyonunun 0.124 ppm doz ile patojeni engelleme etkisi gösterirken, en yüksek dozda % 25 metalik bakıra eşdeğer Bakır Oksiklorür 204.313 ppm doz ile patojeni engelleme etkisi göstermiştir.
4. Cyprodinil (375g/kg)+ Fludioxonil (250 g/kg), Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50g/l) ve Bakır Hidrosit (%35 metalik bakıra eşdeğer) fungusitlerinin *P. tracheiphila*'ya karşı etkinliklerini saptamak amacıyla yapılan sera denemelerinde 6 haftalık sonuçlar değerlendirilmiştir. Fungisit ile hastalık etmeninin mücadelesinde; gövde nekroz ölçümleri, fungusitlerin hastalık şiddeti ve yüzde engelleme oranları hesaplanmıştır. Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250 g/kg) gövde nekroz uzunluğu uygulanan en yüksek dozda 20.3 mm, Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50 g/l) fungusiti 29.7 mm ve patojene ruhsatlı Bakır Hidroksit (%35 metalik bakıra eşdeğer) 49 mm'lik gelişim göstermiştir.
5. Fungisitlerin % engelleme oranlarına bakıldığında ise Cyprodinil (375g/kg)+ Fludioxonil (250 g/kg) etkili madde uygulaması *P.*

*tracheiphila* miselyal gelişimini %16.6- %62.6 , Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50 g/l) kombinasyonu % 5.2- % 45.3 Bakır Hidroksit (% 35 metalik bakıra eşdeğer) bileşiği ise % 1.98- % 9.8 arasındaki değerlerde engelleyici etki sergilemişlerdir. Hastalık oluşum şiddeti ise Cyprodinil (375g/kg) + Fludioxonil (250 g/kg) fungusitinin en yüksek dozunda (100ppm) %13, Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50 g/l) fungusit kombinasyonunda % 26 ve Bakır Hidroksit (% 35 metalik bakıra eşdeğer)'de % 40 düzeyinde gelişmiştir.

6. Sonuç olarak; Fungisitlerin patojenin miselyal gelişimi üzerine etkileri incelendiğinde; patojenin miselyal koloni gelişmesini en iyi baskılayan fungusitler; Cyprodinil (375g/kg)+ Fludioxonil (250 g/kg) ile Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50 g/l) kombinasyonları olmuştur; ancak 250 gr Azoxystrobin, % 12 Dithianon ve % 4 Pyraclostrobin'in miselyal gelişme üzerinde kayda değer etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Cyprodinil (375g/kg)+ Fludioxonil (250 g/kg), Fluxapyroxad (75g/l )+ Difenconazole (50 g/l) her ne kadar hastalığın kontrolünde başarılı olsalarda sera denemelerinde tek başına % yüz etki gösterememişlerdir. İleri dönemlerde yapılacak çalışmalarda; Cyprodinil, Fludioxonil, Fluxapyroxad ve Difenconazole etkili maddeli fungusitlerinin de yer aldığı kimyasal mücadele programlarının düzenlenmesi *P. tracheiphila* miselyal gelişimi engellemede etkili olabileceği düşünülmektedir.
7. Bu tip hastalık etmenleri ile mücadelede bir diğer sorun da lokal sistemik veya tam sistemik fungusitler sürekli kullanıldığında bu patojenler fungusitlere daha dirençli yeni ırklar geliştirebilmektedir. *P. tracheiphila*'ya karşı mücadelede sadece fungusit değil antagonist *Trichoderma* türleri, bakteriler, mayalar ve mikorizal fungusların da mücadele programlarına alınması için daha geniş kapsamlı alanlarda denemelerin kurulması gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

- Akteke, Ş.A., 1976. Limonlarda Uçkurutan (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik. ) hastalığının sürveyi ve biyolojisi üzerinde araştırmalar. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırma Genel Müdürlüğü Yay. 17. 95. 1.
- Baş, B., and Koç, N. K., 2006. In vitro Selection of Kütdiken Lemon 20b to Candidate for Resistance to *Phoma tracheiphila*. Plant Pathology Journal, 5(1): 35-40.
- Baydar, K., 2010. Bazı limon çeşitlerinin (*Citrus lemon* (L.) Burm f.) Uçkurutan Hastalığı (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik.)'na Karşı Dayanıklılık Mekanizmasının Fenolik Bileşikler Bazında Belirlenmesi Çukurova Yüksek Lisans Tezi.
- Burgio, A., Rosciglione, B., and Laviola, C., 1988. Comparison between virulence and some cultural characteristics of eleven mutants and two wild strains of *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc, et Ghik. In : Proceedings of Sixth International Citrus Congress , (R. Goren and K. Mendel, editors), vol. 1, 807-816, March 6-11, Tel Aviv, Israel.
- Burgio, A., and Rosciglione, B., 2018. Pectolytic activity in vitro by *Phoma tracheiphila* strains with different virulence Phytopathologia Mediterranea, Vol. 33, No. 2 (August 1994), pp. 158-161.
- Chapot, H., 1963. Le 'mal secco'. Al Awamia 9: 89-125.
- De Cicco, V., Ippolito, A., Salerno, M., 1987. Duration of the infective capacity of soil containing mal secco infected lemon twigs. Proceedings of the 7th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Granada Spain 20-26 September 1987. pp 175-176.
- Dinç, N., Turan, K., ve Salih, H., 1982. Akdeniz bölgesi limonlarında görülen Uçkurutan hastalığı [*Deuterophoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik.]'nın savaş yöntemleri üzerine araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 21, 89-99.

- Doğrul, N., 1987. Limon Uçkurutan Hastalığının (*Phoma tracheiphila*) Yıl İçinde İnfeksiyon Süresi İle Yaprak ve Sürgünlerdeki Saprofit Mikrofloranın Saptanması. Çukurova Üniversitesi Yüksek Lisans tezi.
- Donovan, N.J., Hailstones, D.L., Ghalayini, A., 2007. Development of a diagnostic protocol for *Phoma tracheiphila*. Final report to Department of Agriculture, Fishery and Forestry, 15 pages.
- EPPO, have published a data sheet and a diagnostic protocol which are both available on line through the EPPO web site (<http://www.eppo.org/>) including the (<http://www.eppo.org/PUBLICATIONS/bulletin/bulletin.htm>).
- Erkılıç, A., 1988. Limon Ağaçlarındaki Mikroorganizmalar ve Uçkurutan Hastalığı (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc et Ghik) Arasındaki Antagonistik İlişkilerin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Doktora tezi.
- Esaka, M., Enoki, K., Kouchi, B., Sasaki, T., 1990. Purification and characterization of abundant secreted protein in suspension- cultured pump kin cells. *Plant Physiol* 93:1037-1041.
- Evola, C., Rosciglione, B., and Salerno, M., 1973. Attività pecti nolitica, cellulosolitica e  $\beta$ -glucosidasica di *Phoma* (*Deuterophoma*) *tracheiphila* (Petri) Kanc, et Ghik. *Phytopathologia mediterranea*, 12, 36-42.
- Eyal, Y., Fluhr, R., (1991) Cellular and molecular biology of patho- genesis-related proteins. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol.* 7:223 -2.
- Ezra, D., Kroitor, T., Sadowsky, A., 2006. Molecular characterization of *Phoma tracheiphila*, causal agent of Mal secco disease of citrus, in *Israel Plant Pathology* (2007) 118:183–191.
- Ezra, D., Kroitor, T., Sadowsky, A., 2007. Molecular characterization of *Phoma tracheiphila*, causal agent of Mal secco disease of citrus, in *Israel. European Journal of Plant Pathology* 118:183– 191.
- FAO, 2018. ([www.fao.org](http://www.fao.org))

- Galun, E., Breiman, A. 1991. Quantitative assays of phytotoxins using plant protoplasts and isolated cells. In: Jackson JF, Linskens HF (eds) Modern methods of plant analysis, new series, vol 13. Springer-Verlag, Berlin, pp 33-50.
- Gavish, H., Vardi, A., Fluhr, R. 1991. Extracellular proteins and early embryo development in citrus nucellar cell culture. *Physiol Plant* 82:606-616.
- Gavish, H., Vardi, A., Fluhr, R. 1992. Suppression of somatic embryogenesis in Citrus cell cultures by extracellular proteins. *Planta* 186:511-517.
- Gentile, A., Continella, G., Tribulato, E., Vardi, A., (1992a) Differential responses of citrus calli and protoplasts to culture filtrate and toxin of *Phoma tracheiphila*. *Theor Appl Genet* 83: 759- 764.
- Gentile, A., Tribulato, E., Deng, Z.N., Vardi, A., 1992b. Selection of 'Femminello' lemon plants with tolerance to the toxin of *Phoma tracheiphila* via cell culture. *Proc Int Soc Citriculture, Acireale, Italy* (in press).
- Gentile, A., Deng, Z., Malfa, S.L., Distefano, G., Dominal, F., Vitale, A., Polizzi, G., Lorito, M., And Tribulato, E., 2006. Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene *Plant Breeding* 126, 146—151 (2007).
- Gimenez, V., and Cicco, V., 1977. Saggio di attivita di due fungicidi sistemici verso il Mal Secco degli agrumi. *Instituta di patologia Vegetale Universita degli studi di Bari*.
- Graniti, A., 1969. Host-parasite relations in citrus diseases as exemplified by *Phytophthora gummosis* and *Deuterophoma* 'mal secco'. In: *Proceedings of the 1st International Citrus Symposium Volume 3, Riverside CA, University of California*. Eds: Chapman HD. pp 1187- 1200.
- Granata, G., Perrotta, G., Tirro, A., and Grasso, S., 1977. Comportamento di selezioni clonali di limone nei confronti di infezioni naturali di *Phoma tracheiphila*, *Tecnica Agricola*, 29, 337-334.



- Grasso, S., and Perrotta, G., 1978. Production of pycnidia in trees of the Rutaceae family affect by *Phoma tracheiphila*. Riv. Plat. Veg. 14, 41-45.
- Kalai, L., Mnari-Hattab, M., Hajlaoui, M.R., 2010. Molecular diagnostics to assess the progression of *Phoma tracheiphila* in Citrus aurantium seedlings and analysis of genetic diversity of isolates recovered from different citrus species in Tunisia. Journal of Plant Pathology 92(3): 629-636
- Karel, G., 1956. Limonlarda Uçkurutan "Mal secco". hastalığı ve koruma çareleri. Ziraat Vekaleti, Ankara Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sayı 9, Yıldız Matbaacılık ve Gazetecilik T.K.Ş. Ankara.
- Kayım, M., Ceccardi, T.L., Berretta, M.J.G., Barthe G.A., and Derrick, K.S., 2004. Introduction of a citrus blight-associated gene into Carrizo citrange [Citrus sinensis (L.) Osbc. × Poncirus trifoliata (L.) Raf.] by Agrobacterium-mediated transformation, Plant Cell Reports, 23:377-385.
- Khanchouch, K., Hajlaoui, M.R., and Kutucu, H., 2012. A Biomathematical Model for *Phoma tracheiphila* Citrus Resistance Screening Biotechnol. & Biotechnol. eq. 2012, 26(5), 3282-3285.
- Koç, N.K., Kayım, M., and Çınar, A., 1999. Protoplast Füzyonu (Somatik Hibridizasyon) ile Limonda Uçkurutan Hastalığı ( *Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik.) Dayanıklı Bitkiler Elde Etme Olanaklarının Araştırılması Tr. J. of Agriculture and Forestry 23, Ek Sayı 1, 157-168.
- Klotz, L. J., 1954. Mal Secco disease of Citrus.; Citrus leaves, January 1954.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Licciardello, G., Grasso, F.M., Bella, P., Cirvilleri, G., Grimaldi, V., Catara, V., 2006 Identification and detection of *Phoma tracheiphila*, causal agent of citrus mal secco disease, by real-time polymerase reaction. Plant Disease 90: 1523-1530.

- Luisi, N., Ciccio, V.O., and Salerno, M., 1976. Attivitaa di fungicide benzimidazolici contro il Mal Secco degli agrumi. Estrato da imformatore Fitopatoloj ica., 6. 19-24.
- MYCOBANK, 2018. ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)).
- Nachmias, A., Joseph, M., Solel, Z., Barash, I., 1979. Diagnosis of mal secco disease in lemon by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 69(6): 559-561.
- Nigro, F., Ippolito, A., Salerno, M.G., 2011. Mal secco disease of citrus: a journey through a century of research. *Journal of Plant Pathology* 93(3): 523-560.
- Özdemir, K.S., 2019. Limon ağaçlarında uçkurutan hastalığı'na (*Phoma tracheiphila* kanc. & ghik.) karşı mikorizal funguslar ve dayanıklılık teşvik edicilerin etkinliğinin belirlenmesi Çukurova Üniversitesi Doktora tezi.
- Özsan, B., 1967. Türkiye'de Turunçgil .Ziraati.Tarım Bakanlığı Teknik Kitap D. III. Dizerkonca Matb. İstanbul, 283.
- Ippolito, A., De Ciccio, V., Cutuli, G., Salerno, M., 1987. The role of infected citrus fruits and seeds in the spread of mal secco disease. Proceedings of the 7th Congress of the Mediterranean Phytopathology Union, Granada Spain. pp 166-7.
- Perrotta, G., Graniti, A., 1988 *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanchaveli & Gikashvili. In: European Handbook of Plant Diseases. Eds: IM Smith, J Dunez, RA Lelliott, DH Phillips, SA Archer. pp 396-398. Blackwell Scientific Publications, Oxford UK.
- Pinkas, J., and Chorin, M., 1967, Control of mal secco disease of lemons with the systemic fungicide Acti-dione. The First Israel Congres of Plant Pathology, 1967. Summarias of lectures.
- Punithalingham, E., Holliday, P., 1973. *Deuterophoma tracheiphila*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 399.

- Reverberi, M., Betti, C., Fabbri, A., Zjalic, S., Spadoni, S., Mattei, B., and Fanelli, C., 2008. A role for oxidative stress in the Citrus limon /*Phoma tracheiphila* interaction Plant Pathology, 2008. 57 , 92–102.
- Rollo, F., Amici, A., Foresi, F., and Silvestro, I., 1987. Construction and characterization of a cloned probe for the detection of *P.tracheiphila* in plant tissues Appl Microbiol Biotechnol (1987) 26:352—357.
- Russo, M., Grasso, F.M., Bella, P., Licciardello, G., Catara, A., Catara, V., (2011) Molecular diagnostic tools for the detection and characterisation of *Phoma tracheiphila*. Acta Horticulturae 892: 207-214.
- Salerno, M., and Çatara, G., 1966. Ricerche sur Mal secco degli Agrumi (*Deuterophoma tracheiphila* Petri) VII - Proje di campo. sull efficacia alcuni antioritto gamici Ric. Pat. VegM IV. 1, 71-82.
- Salerno, M., and Somma, V., 1971. Observatione on the systemic nature of benomyl in sour orange seedlings and results of trials against citrus Mal secco. Phytopth. Mediterranea 10 (1) 99-106 (Rev. App. Pathology 50 (12) 674).
- Solel, Z., Pinkas, J., and Loebensten, E., 1972. Evaluation of systemic fungicides and mineral oil Adjuvants for the Control of Mal secco disease of lemon plants. Phytopathology 62: 10081013.
- Solel, Z., Oren, Y., 1975. Outbreak of mal secco disease in Israel on normally tolerant citrus cultivars. Plant Disease Reporter 59(12): 945-946.
- Solel, Z., Pinkas, Y., and Shabi, E., 1976. Internal Therapy of Mal Secco of Lemon by Pressure Infection of Fungicides. Neth. J. Plant Path. 83 (1): 383391.
- Solel, Z., Salerno, M., (2000) Mal secco. In: Compendium of Citrus Diseases 2nd Edition. Eds: LW Timmer, SM Garnsey, JH Graham. APS Press USA.
- Somma, V., Favalord, M., and G. Sorge., 1969. Ricerche sul "Mal Secco" degle Agrumi (*D.tracheiphila* Petri), VIII. Ulteriori alcuni antricitto gamici. TEC. AGR. 21 (1), 92-98.

- Somma, V., and M, Salerno., 1974. Proje di campo Sull efficacia del Benomyl contro il Mal Secco degli agrumi, Fitopath. Mediterranea XIII –(143-146).
- Tamura, K., and Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Tusa, N., Bosco, S., Nigro, F., and Ippolito, A., 2000. Response of Cybrids and a Somatic Hybrid of Lemon to *Phoma tracheiphila* Infections Hort science 35(1):125–127. 2000.
- Tuzcu, Ö., Kaplankıran, M., Yeşiloğlu, T., ve Erkılıç, A., 1992. Türkiye’de Uçkurutan (*Phoma tracheiphila*) Hastalığına Dayanıklı Limon Çeşidi Islahı Çalışmalarından Elde Edilen Ön Sonuçlar. *Derim*, 9(3): 99-107.
- Traversa, E., Ippolito, A., and Cicco, V., 2018. Epidemiological investigation on Citrus mal secco (*Phoma tracheiphila*). Presence of the pathogen in the leaves of infected twigs *Phytopathologia Mediterranea*, Vol. 31, No. 2 (Agosto 1992), pp. 103-106.
- TÜİK, 2018. (<http://www.tuik.gov.tr>)
- Uzun, A., Seday, U., Canhos, E., and Gulsen, O., 2012. Oxidative Enzyme Responses of Six Citrus Rootstocks Infected with *Phoma tracheiphila* (Petri) Kantschaveli and Gıkkashvılı *Expl Agric*. 2012. volume 48 (4), pp. 563–572 Cambridge University Press 2012.
- Ziadi, S., Chebil, S., Ippolito, A., and Mliki, A., 2013. Virulence spectra and geographical distribution of Mal Secco disease of citrus caused by *Phoma tracheiphila* in the Mediterranean countries: Tunisia and Italy *Eur J Plant Pathol* (2014) 138:123–131.



## ÖZGEÇMİŞ

Osmaniye de 1992 yılında doğdu. Osmaniye Atatürk Lisesinde eğitimini tamamladıktan sonra, 2010 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Fitopatoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

