



**T.C.**  
**HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ'NDE TURUNÇGİLLERDE ANTRAKNOZ  
ETMENİ *COLLETOTRICHUM* TÜRLERİNİN MORFOLOJİK,  
PATOJENİK, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FUNGİSİT  
DUYARLILIKLARI**

**AYSUN UYSAL**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**HATAY**  
**MAYIS-2019**



T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ'NDE TURUNÇGİLLERDE ANTRAKNOZ  
ETMENİ *COLLETOTRICHUM* TÜRLERİNİN MORFOLOJİK,  
PATOJENİK, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FUNGİSİT  
DUYARLILIKLARI**

**AYSUN UYSAL**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**HATAY**

**MAYIS-2019**

T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ'NDE TURUNÇGİLLERDE ANTRAKNOZ  
ETMENİ *COLLETOTRICHUM* TÜRLERİNİN MORFOLOJİK, PATOJENİK,  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FUNGİSİT DUYARLILIKLARI**

AYSUN UYSAL  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

**Prof. Dr. Şener KURT** danışmanlığında hazırlanan bu tez **02/05/2019** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **OYBİRLİĞİ/OYÇOKLUĞU** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şener KURT  
Başkan

Prof. Dr. Emine Mine SOYLU  
Üye

Doç. Dr. Davut Soner AKGÜL  
Üye

Prof. Dr. Yeşim AYSAN  
Üye

Prof. Dr. Celil TOPLU  
Üye

**Kod No:**

**Prof. Dr. Erdal SERTKAYA**  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.  
Proje No: BAP-16556

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

02.05.2019

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**Aysun UYSAL**

## ÖZET

### DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ'NDE TURUNÇGİLLERDE ANTRAKNOZ ETMENİ *COLLETOTRICHUM* TÜRLERİNİN MORFOLOJİK, PATOJENİK, MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE FUNGİSİT DUYARLILIKLARI

Antraknoz, dünyada ve ülkemizde turunçgil üretimini ciddi düzeyde tehdit eden hastalıklardan birisidir. Turunçgillerde antraknoz hastalığına *Colletotrichum* cinsine ait türler neden olmaktadır. Bu çalışmada, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunçgil üretim alanlarında antraknoz etmeni *Colletotrichum* türlerini belirlemek için 2016-2017 yılları arasında sörveyler gerçekleştirilmiştir. Bölgede yapılan sörveylerde yoğun bir şekilde antraknoz belirtileri gözlenmiştir. Antraknoz hastalığının Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaygınlığının %62,1 oranında olduğu saptanmıştır. Sörveyler sonucunda toplanan örneklerden 161 adet *Colletotrichum* izolatu elde edilmiştir. Toplanan bu izolatlardan 72'si limon, 40'ı mandarin, 13'ü portakal, biri altıntop ve biri de turunçtan elde edilmiştir. Morfolojik çalışmalar sonucunda; koloni rengi, konidi şekil ve boyutları ile eşeyli üreme yapıları, apresoryum yapıları gibi morfolojik tanı karakterlerine göre izolatlar, *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* olarak tanımlanmıştır. ITS, GAPDH, ACT, CHS VE TUB gen bölgelerine göre multilokus filogenetik dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre limonda *C. gloeosporioides*'in 40 ve *C. karstii*'nin 34 izolatu kaydedilmiştir. Mandarinde ise *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerine ait, sırasıyla 32 ve 8 izolat saptanmıştır. Bununla birlikte *C. gloeosporioides* türüne ait olarak portakalda 13, altıntopda 1 ve turunçta 1 izolat belirlenmiştir. Dört genin birlikte kullanılarak kombinasyon halinde oluşturulan dendrogramda; izolatlar *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* şeklinde iki gruba ayrılmıştır. MALDI TOF MS analiz sonucunda, *C. gloeosporioides* türünde 63 izolat; *C. karstii* türünde ise; 30 izolat 2.000-2.299 (yeşil renk) arası değer olarak güvenilir düzeyinde tür tanısı yapılmıştır. *C. gloeosporioides* türünde 25 izolat; *C. karstii* türünde 12 izolat 1.700-1.999 (sarı renk) arası değer ile muhtemel cins düzeyinde tanımlama yapılmıştır. *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. gloeosporioides* tür kompleksinde, *Colletotrichum karstii* ise *C. boninense* tür kompleksinin bir üyesi olarak belirlenmiştir. Patojenisite denemelerinde; *C.gloeosporioides* türünde LC5 izolatu, *C. karstii* türünde ise LCk36 izolatının yüksek düzeyde virulent oldukları belirlenmiştir. Fungisit duyarlılık çalışmaları miselyal gelişim ve konidial çimlenme denemeleri şeklinde iki aşamalı olarak yapılmıştır. Fungisit denemeleri sonucunda, en etkili olarak myclobutanil, trifloxystrobin, boscalid+pyraclostrobin, carbendazim+ chlorothalonil ve thiophanate-methyl fungusitleri belirlenmiştir. Söz konusu çalışma, bildiğimiz kadarı ile, ülkemizde turunçgil antraknoz hastalığı ile ilişkili *Colletotrichum* türlerinin tanılanması ve mücadelesi konusunda yapılan en geniş kapsamlı çalışmadır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler hem bilimsel olarak hemde turunçgil üreticileri açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışma ile, yıllardır turunçgillerde göz ardı edilen antraknoz hastalığı üreticiler tarafından tam olarak tanınmadığı ortaya çıkmıştır. Üreticiler tarafından uçkurutan (*Phoma tracheiphila*) olarak bilinen hastalığın artık geri planda kaldığı ve yerini antraknoz (*Colletotrichum* spp.) hastalığına bıraktığı yapılan arazi gözlemleri ve laboratuvar analizleri ile kesinlik kazanmıştır.

2019, 141 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Mikoloji, Antraknoz, *Colletotrichum*, karakterizasyon, fungusit

## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL, PATHOGENIC, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND FUNGICIDES SENSITIVITY OF *COLLETOTRICHUM* SPECIES THE CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE ON CITRUS IN EASTERN MEDITERRANEAN REGION

Anthracoze is one of the diseases that seriously threat citrus production in the world and in our country. In citrus fruits, anthracnose disease is caused by the species belonging to the genus *Colletotrichum*. In this study, surveys were carried out between 2016-2017 in order to determine the anthracnose agent *Colletotrichum* species in citrus production areas in the Eastern Mediterranean Region. In surveys in the region showed intense anthracnose symptoms. The prevalence of anthracnose disease in the Eastern Mediterranean Region was 62.1%. As a result of surveys, 161 *Colletotrichum* isolates were obtained from the samples. Of these, 72 were obtained from lemon, 40 from mandarin, 13 from orange, one from grapefruit and one from sour orange. In the result of morphological studies; (colony color, conidia shape and sizes and sexual reproduction structures, apresorium structures) the isolates were defined as *C. gloeosporioides* and *C. karstii*. According to the ITS, GAPDH, ACT, CHS and TUB gene regions, multilocal phylogenetic sequence analyzes were performed. According to the findings, 40 isolates of *C. gloeosporioides* and 34 of *C. karstii* were recorded in lemon. 32 and 8 isolates from *C. gloeosporioides* and *C. karstii* species were found in Mandarin. In addition, *C. gloeosporioides* species were identified as 13 in orange, 1 in grapefruit and 1 in bitter orange. Dendrogram combined using four gene sequences showed that the isolates were divided into two groups as *C. gloeosporioides* and *C. karstii*. MALDI TOF MS analysis revealed 63 isolates of *C. gloeosporioides*; *C. karstii* type; 30 isolates were identified as 2.000-2.299 (green color) type reliable type level diagnosis type. 25 isolates of *C. gloeosporioides*; 12 isolates of *C. karstii* were identified as the value between 1.700-1.999 (yellow color) at the possible genus level. *Colletotrichum gloeosporioides* were identified in the *C. gloeosporioides* species complex and *Colletotrichum karstii*, was determined as member of the *C. boninense* species complex. In the pathogenicity experiments, LC5 isolates of *C. gloeosporioides* and LCk36 isolates of *C. karstii* were found to be the most virulent. Fungicide susceptibility studies were conducted in two stages as myelial growth and conidial germination trials. As a result of trials of fungicides myclobutanil, trifloxystrobin, boscalid+pyraclostrobin, carbendazim+ chlorothalonil ve thiophanate-methyl fungicides were determined as the most effective. To the best of our knowledge, it is the most comprehensive study on identification and control of *Colletotrichum* species associated with citrus anthracnose disease in our country. The data obtained as a result of the study is very important both in terms of science and citrus producers. With this study, it has been revealed that anthracnose disease, which has been ignored in citrus fruits for years, has not been fully recognized by producers and most importantly it is not recognized by producers. It has become definite by the field observations and laboratory analyzes that the disease, which is known by the producers as the mal secco disease, is now left behind and replaced by anthracnose disease.

2019, 141 pages

**Keywords:** Mycology, Anthracnose, *Colletotrichum*, characterization, fungicides

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmalarında ve yazım aşamasında değerli bilgileri ile bana yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Şener KURT' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında değerli görüş, katkı ve bilgilerini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi Üyeleri Prof. Dr. E. Mine SOYLU ve Doç. Dr. D. Soner Akgül' e teşekkürlerimi sunarım. Her konuda destek olan değerli hocam Prof. Dr. Soner SOYLU'ya ve arazi çalışmalarında yardımları olan Dr. Efkan Akçalı' ya, Dr. Serap Toker ile Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu mühendislerine teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmaları sırasında tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan HMKÜ Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü'ne, doktora tez çalışmamı TOVAG 1070688 nolu proje kapsamında kısmen destekleyen TÜBİTAK'a ve MKÜ BAP-16556 nolu kapsamında destekleyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş herkese içten teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi olarak yardımlarını esirgemeyen öncelikle annem Hacer UYSAL'a ve babam Nazmi UYSAL'a sonra Ar. Gör. Merve KARA' ya, Zir. Yük. Müh. Tuğba Hanedan' a ve MARGEM ekibine teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal.....	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Hastalık Sürveyi .....	32
3.2.2. <i>Colletotrichum</i> fungusunun izolasyonu .....	34
3.2.3. Morfolojik Karakterizasyon.....	35
3.2.4. Moleküler Karakterizasyon .....	36
3.2.5. Matrix asisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Analizleri.....	40
3.2.6. Patojenisite Çalışmaları.....	42
3.2.7. <i>C. gloeosporioides</i> İzolatlarının Seçilen Fungisitlere Karşı <i>in vitro</i> Duyarlılık Denemeleri.....	44
3.2.6.1. Miselyal Gelişim Denemesi.....	45
3.2.6.2. Konidiyal Çimlenme Denemesi.....	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	48
4.1. Hastalık Sürveyi ve <i>Colletotrichum</i> Etmeninin İzolasyonuna Ait Sonuçlar .....	48
4.3. Morfolojik Karakterizasyon.....	64
4.4. Moleküler Karakterizasyon .....	71
4.5. MALDI-TOF MS (Matrix asisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry) Analizleri.....	93
4.6. Patojenisite Çalışmaları.....	101
4.7. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> İzolatlarının Seçilen Fungisitlere Karşı <i>in vitro</i> Duyarlılık Denemeleri.....	109
4.7.1. Miselyal gelişim denemesi.....	109
4.7.2. Konidiyal çimlenme denemesi.....	118
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	125
KAYNAKLAR.....	128
ÖZGEÇMİŞ.....	136
EKLER.....	137
EK1.....	137





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Dünya turunçgil üretiminin ülkelere göre dağılımı (milyon ton, FAO, 2017).....	1
Şekil 1.2.	Akdeniz Bölgesinde turunçgil üretim alan (A, dekar) ve miktarının (B, ton) illere göre dağılımı (TUİK, 2018).....	2
Şekil 1.3.	Türkiye’de turunçgil üretiminin (ton) türlere göre üretim miktarları (TUİK, 2018).....	3
Şekil 1.4.	<i>Colletotrichum</i> türlerinin neden olduğu antraknoz hastalığının yaşam döngüsü.....	7
Şekil 1.5.	Turunçgillerde <i>Colletotrichum</i> spp. türlerinin neden olduğu antraknoz hastalığının belirtileri; turunçgil yapraklarında tipik lezyonlar (A), sürgünlerde ve dallarda kuruma ve nekrozlar (B,C,D,E,F,G), meyvede lezyonlar (H) .....	9
Şekil 3.1.	Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yer alan turunçgil üretim alanlarında inceleme, gözlem ve örnekleme yapılan bahçelerin illere göre sayısal dağılımı.....	32
Şekil 3.2	Hastalık etmeni fungusu belirlemek için laboratuvara getirilen enfekteli turunçgil organları; meyve (A), dal ve sürgünler (B), (C), (D), ve yaprak örnekleri(E), (F). .....	34
Şekil 3.3.	Antraknoz belirtileri gözlenen bitki dokularının stereo araştırma mikroskopu altında incelenmesi (A). <i>Colletotrichum</i> sp. türlerine ait mikroskopik yapıların trinoküler araştırma mikroskopu altında incelenmesi (B) .....	36
Şekil 3.4.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için örnek başına karışımlar ve amplifikasyon için belirlenen koşullar. ....	37
Şekil 3.5.	<i>Colletotrichum</i> kültürlerinden Plant mini kit ile genomik DNA izolasyonu (A) PCR amplifikasyonu (B), QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme cihazı (C), QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme cihazı kuyucuklarına PCR örneklerinin yerleştirilmesi (D), QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme cihazı yazılım programında jel görüntüleme çalışmaları (E).....	38
Şekil 3.6.	MALDI-TOF MS analiz tekniğinde iş akışını gösteren diagram.....	40
Şekil 3.7.	MALDI TOF MS cihazında MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programındaki tanı skalası (A) ve <i>Colletotrichum</i> izolatlarının protein profillerinin kütle spektrumları (B).....	41
Şekil 3.8	MALDI TOF MS cihazı (A) ve örnek analiz çalışmaları (B).....	41
Şekil 3.9.	Turunçgil yapraklarının NaOCl (% 5) ile dezenfeksiyonu (A,B), kuruyan yaprakların petrilere yerleştirilmesi (C), ekvatorial bölgelerinden yara açılan meyvelere spor süspansiyonu inokulasyonu (D), spor süspansiyonu inoküle edilen meyvelerin polietilen torbalarda inkübasyonu (E), spor süspansiyonu hazırlanması (F).....	43
Şekil 3.10.	<i>In vitro</i> etkinlik denemelerinde kullanılan ticari fungusit preparatları (A), steril suya eklenmiş fungusit solüsyonları, fungusit solüsyonları (B,C),	

	50 C°' ye kadar soğutulmuş PDA besi ortamları (D), fungusit eklenmiş PDA besi yerleri(E,F).....	45
Şekil 4.1.	Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sörvey çalışmaları yapılan turunçgil üretim alanlarından elde edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının turunçgil türlerine göre dağılımları (G: Altıntop (Grapefruit; L: Lemon; M: Mandarin; O: Portakal(Orange). ....	48
Şekil 4.2.	<i>Colletotrichum</i> etmeninin izolasyonu sonucu gelişen koloniler (A), PDA besi ortamında geliştirilen saf <i>Colletotrichum</i> kültürleri (B).....	61
Şekil 4.3.	Hatay ilinde turunçgil tür ve çeşitlerinden elde edilen izolatların vejetatif ve generatif organlara göre dağılımları. Tür ve çeşitler; mandarin (Okitsu, Satsuma, Owari, Early Pride), limon (Interdonato) ve portakal (Navelina).....	62
Şekil 4.4.	Adana ve Osmaniye illerinde turunçgil tür ve çeşitlerinden elde edilen izolatların vejetatif ve generatif organlara göre dağılımları.Tür ve çeşitler; mandarin (Okitsu, Satsuma, Clementine, W. murcott), limon (Interdonato, Meyer, Yediveren, Kütdiken), portakal (Washington, Valencia, Navelina) ve Turunç.....	63
Şekil 4.5.	Mersin ilinde turunçgil tür ve çeşitlerinden elde edilen izolatların vejetatif ve generatif organlara göre dağılımları Tür ve çeşitler; mandarin (Okitsu, Satsuma), limon (İnterdonato, Yediveren, Kütdiken, İtalyan memeli, Molla memet, Eureka), portakal (Washington, Yafa) ve Altıntop (Starruby). ....	63
Şekil 4.6.	<i>C. gloeosporioides</i> 'in PDA ve CDA agar besi ortamlarındaki koloni gelişimleri (mm).....	65
Şekil 4.7.	<i>C. gloeosporioides</i> 'in PDA besi yerinde 25°C'de 7 günlük gelişme süresi sonucunda petrilere üstten (A) ve alttan (B) koloni gelişimleri, aservulus (C), conidiomata (D), aservulus-setae-konidi (E), konidi (F), konidi- konidiofor (G), SNA besi yerinde 4 haftalık inkübasyon sonucu ortaya çıkan apresoryumlar (H).....	66
Şekil 4.8.	<i>C. gloeosporioides</i> 'in gelişimin farklı evreleri. Yaprak dokusunda aservulus (A×70,B×450), conidiomata (C×70), PDA besi ortamında aservulus (D×450), SNA besi ortamında aservulus (E×350), konidi (F×1.500), çim tübü oluşturmuş konidi (G×1.700), hif (H×1.000).....	70
Şekil 4.9.	<i>C. karstii</i> 'in PDA ve CDA agar besi ortamlarındaki koloni çapı uzunlukları.....	68
Şekil 4.10.	<i>C. karstii</i> 'nin PDA besi yerinde 25°C'de 7 günlük gelişme süresi sonucunda petrilere üstten (A) ve alttan (B) koloni gelişimleri, aservulus-setae-konidi (C), konidi-konidiofor (D), ve SNA besi yerinde 4 haftalık inkübasyon sonucu ortaya çıkan apresoryumlar (E), Peritesyum (F), Askus ve askosporlar (G).. ....	70
Şekil 4.11.	Farklı primerlere göre PCR sonuçlarının QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme programında DNA bant görüntüleri.....	71
Şekil 4.12.	<i>Colletotrichum</i> türlerine bağlı izolatların turunçgil konukçu türlerine göre dağılımı .....	78
Şekil 4.13.	Hatay ilinde <i>C.gloeosporioides</i> türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları.....	79

Şekil 4.14. Hatay ilinde <i>C.karstii</i> türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları .....	80
Şekil 4.15. Mersin ilinde <i>C.gloeosporioides</i> türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları.....	81
Şekil 4.16. Mersin ilinde <i>C. karstii</i> türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları. ....	82
Şekil 4.17. Adana ve Osmaniye illerinde <i>C. gloeosporioides</i> ve <i>C.karstii</i> türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları. ....	83
Şekil 4.18. Turunçgil türlerinden izole edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının ITS gen dizisine ait dendrogramı. ....	88
Şekil 4.19. Turunçgil türlerinden izole edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının Actin gen dizisine ait dendrogramı. ....	89
Şekil 4.20. Turunçgil türlerinden izole edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının GAPDH gen dizisine ait dendrogramı. ....	90
Şekil 4.21. Turunçgil türlerinden izole edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının CHS gen dizisine ait dendrogramı. ....	91
Şekil 4.22. Turunçgil türlerinden izole edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının ITS, ACTİN, GAPDH ve CHS gen dizilerinin kombinasyonu ile oluşturulan dendrogramı. ....	922
Şekil 4.23. MALDI Biotyper 3.0 programı kullanılarak tür tanısı yapılan turunçgilde temsili <i>C. gloeosporioides</i> ve <i>C. karstii</i> izolatlarının MSP dendrogramı ile temsili <i>C. karstii</i> (mavi) ve <i>C. gloeosporioides</i> (kırmızı) izolatlarının MALDI-TOF MS spektrumları. ....	93
Şekil 4.24. MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan <i>C. gloeosporioides</i> ve <i>C. karstii</i> izolatların MALDI Biotyper 3.0 programı kullanılarak oluşturulan MSP dendrogramı. ....	94
Şekil 4.25. Mandarin (satsuma), limon (interdonato), portakal (washington) turunçgil türlerinde patojenisite çalışmaları; yapraklar (A,B,C), sürgün (D,E,F) ve limon (G), portakal (H) meyvelerinde lezyon gelişimleri.....	106
Şekil 4.26. <i>Colletotrichum</i> türlerinin Satsuma mandarin fidanlarındaki patojenisite denemesinde kaydedilen hastalık şiddeti (%) değerleri .....	107
Şekil 4.27. Mandarin (satsuma) fidanlarına yapılan patojenisite denemelerinde sürgünlerde oluşan hastalık belirtileri .....	108
Şekil 4.28. Seçilmiş olan bazı fungusitlerin, <i>C.gloeosporioides</i> 'in miselyal gelişimi üzerine <i>in vitro</i> etkileri (%) .....	114
Şekil 4.29. <i>C. gloeosporioides</i> izolatının trifloxystrobin (A), azoxystrobin (B), thiophanate methyl (C), bakıroksiklorür (D), boscalid+ pyraclostrobin (E), myclobutanil (F), eklenmiş PDA besi yerinde koloni gelişimleri.....	115
Şekil 4.30. Fungusitlerin farklı konsantrasyonlarında <i>C. gloeosporioides</i> izolatının miselyal gelişimi için hesaplanan EC50 değerleri .....	116
Şekil 4.31. Seçilmiş olan bazı fungusitlerin, <i>C. gloeosporioides</i> 'in konidi çimlenmesi üzerine <i>in vitro</i> etkileri (%).....	122
Şekil 4.32. Konidi çimlenme denemelerinin kontrol (A) ve etkili dozların (B,C,D) trinoküler araştırma mikroskobu altında görünümü.....	123

Şekil 4.33. Fungisitlerin farklı konsantrasyonlarında *C. gloeosporioides* izolatının konidi çimlenmesi için hesaplanan EC50 değerleri .....124



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Turunçgil tür ve çeşitleri ile ilişkili <i>Colletotrichum</i> 'un tür kompleksleri ve türleri.....	5
Çizelge 3.1.	Doğu Akdeniz Bölgesi'nde il ve ilçelere göre survey yapılan turunçgil bahçe alanları ve sayıları.....	33
Çizelge 3.2.	Multilokus dizi (MSL) analizlerinde kullanılan evrensel ve farklı gen bölgelerine spesifik primerler hakkında ayrıntılı bilgi .....	36
Çizelge 3.3.	NCBI veri tabanından alınarak filogenetik analizlerde kullanılan referans izolatlara ait konukçu bitki, kökeni ve Genbankası kayıtları.....	36
Çizelge 3.4.	<i>In vitro</i> etkinlik denemelerinde kullanılan fungusitler, içerdikleri etken maddeler ve özellikleri.....	44
Çizelge 4.1.	Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sörvey yapılan turunçgil alanlarında il düzeyinde antraknoz hastalığı yaygınlığı .....	49
Çizelge 4.2.	Mersin ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar.....	51
Çizelge 4.3.	Adana ve Osmaniye ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar .....	55
Çizelge 4.4.	Hatay ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen <i>Colletotrichum</i> izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar .....	57
Çizelge 4.5.	<i>Colletotrichum</i> izolatlarının morfolojik parametrelere göre karakteristik özellikleri.....	68
Çizelge 4.6.	Farklı turunçgil türlerinden elde edilen <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> türüne ait izolatların GAPDH primeri ile dizi analizleri ve BLAST benzerlikleri (%).....	73
Çizelge 4.7.	Farklı turunçgil türlerinden elde edilen <i>Colletotrichum karstii</i> türüne ait izolatların GAPDH primeri ile dizi analizleri ve BLAST benzerlikleri (%).....	76
Çizelge 4.8.	<i>C. gloeosporioides</i> ve <i>C. karstii</i> türlerinin ACTIN, GAPDH, CHS, TUB ve ITS genomik bölgelerine göre yapılan dizi analizleri sonucunda alınan GenBankası Erişim Numaraları.....	84
Çizelge 4.9.	MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan <i>C. gloeosporioides</i> ve <i>C. karstii</i> izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında analiz sonuçları .....	95
Çizelge 4.10.	<i>C. gloeosporioides</i> türüne ait temsili izolatların, Interdonato limon meyve, yaprak ve sürgünlerini kullanarak yürütülen patojenisite denemesinin sonuçları .....	102
Çizelge 4.11.	<i>C. karstii</i> türüne ait temsili izolatlarının, Interdonato limon meyve, yaprak ve sürgünlerini kullanarak yürütülen patojenisite denemesinin sonuçları .....	103

Çizelge 4.12. <i>C. gloeosporioides</i> ve <i>C. karstii</i> türlerine ait temsili izolatlarının, satsuma mandarin meyve, yaprak ve sürgünlerini kullanarak yürütülen patojenisite denemesinin sonuçları .....	119
Çizelge 4.13. <i>C. gloeosporioides</i> türünün ait temsili izolatlarının, washington portakal meyve, yaprak ve sürgünlerini kullanarak yürütülen patojenisite denemesinin sonuçları.....	105
Çizelge 4.14. Fungisitlerin farklı konsantrasyonlarında <i>C. gloeosporioides</i> izolatının ortalama miselyal gelişimleri .....	111
Çizelge 4.15. <i>C.gloeosporioides</i> izolatının fungusitlerin farklı konsantrasyonlarındaki ortalama konidi çimlenmeleri .....	119



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

ha	: Hektar
g	: Gram
L	: Litre
ml	: Mililitre
cm	: Santimetre
dk	: Dakika

### KISALTMALAR

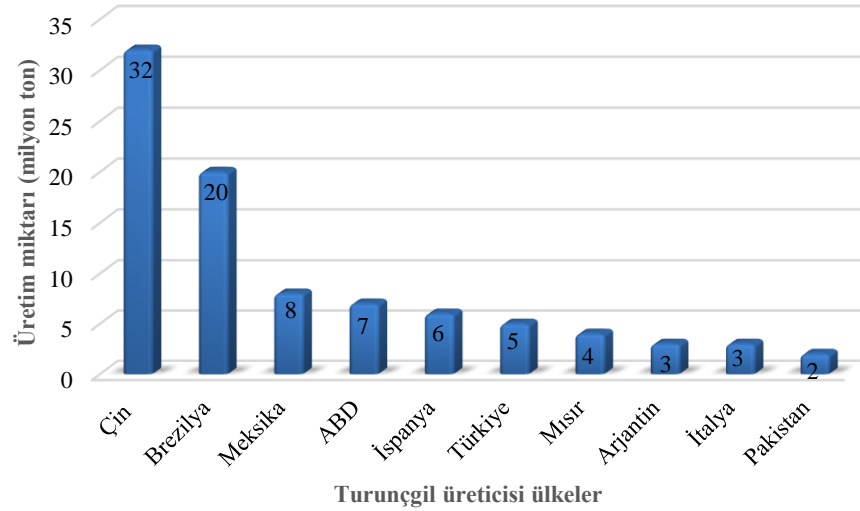
NaOCl	:Sodyum hipoklorit (dezenfektan)
SNA	:Sentetik Nutrient Agar
HCCA	: $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic asid
PDA	:Patates Dekstroz Agar katı besi yeri
PDB	:Patates Dekstroz Broth sıvı besi yeri
MALDI-TOF MS	:Matrix asisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry
NCBI	:National Center for Biotechnology Information
BLAST	:Basic Local Alignment Search Tool
HPLC	:High Performance Liquid Chromatography



## 1. GİRİŞ

Anavatanı Çin, Güneydoğu Asya ve Hindistan olan turunçgillerin, günümüzde subtropik iklime sahip hemen hemen tüm ülkelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Turunçgiller; altıtop, limon, mandarin ve portakal gibi yetiştiriciliği yaygın ve ekonomik değeri olan türlerin dışında şadok, ağaç kavunu, bergamot gibi diğer türleri de içerisinde bulunduran bir bitki topluluğudur. İnsan sağlığı ve beslenmesi yönünden önemli yararları bulunan turunçgiller, sofralık, taze tüketimin yanında reçel, marmelat ve meyve suyu olarak değerlendirilmekte, bunun yanında kozmetik sektöründe de hammadde olarak kullanılmaktadır (Akgün, 2006). Ilıman iklime ihtiyaç duyan ve yurdumuzda subtropik iklime sahip olan Akdeniz ve Ege bölgelerinde yetiştiriciliği yapılmakta olan turunçgiller, az da olsa Marmara ve Doğu Karadeniz bölgelerinde de üretilmektedir.

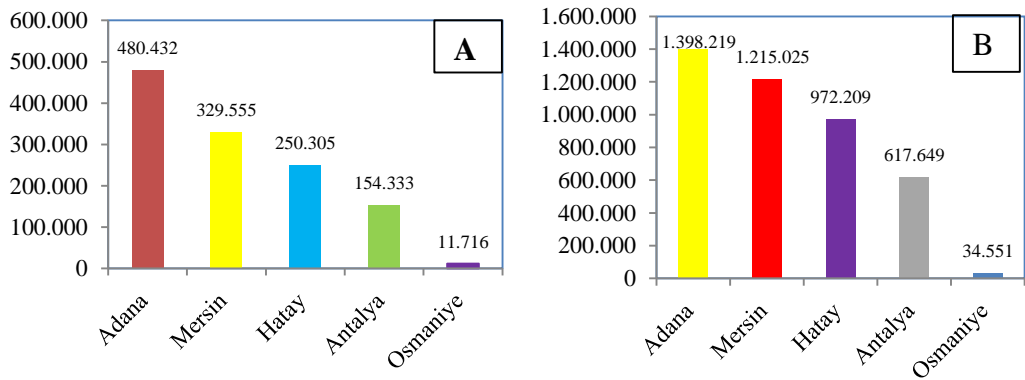
Dünyada en fazla yetiştirilen ve tüketilen meyve grubunda yer alan turunçgillerin üretimi 8 milyon ha alanda 133 milyon ton olarak gerçekleştirilmiştir. Turunçgil üretiminde (ton) ilk sırayı 32 milyon ile Çin almakta olup, bu ülkeyi 20 milyonla Brezilya ve 8 milyon ile Meksika izlemektedir. Ülkemiz, turunçgil üretiminde 5 milyon tonla altıncı sırada yer almaktadır (Şekil 1.1; FAO, 2017).



Şekil 1.1. Dünya turunçgil üretiminin ülkelere göre dağılımı (milyon ton, FAO, 2017).

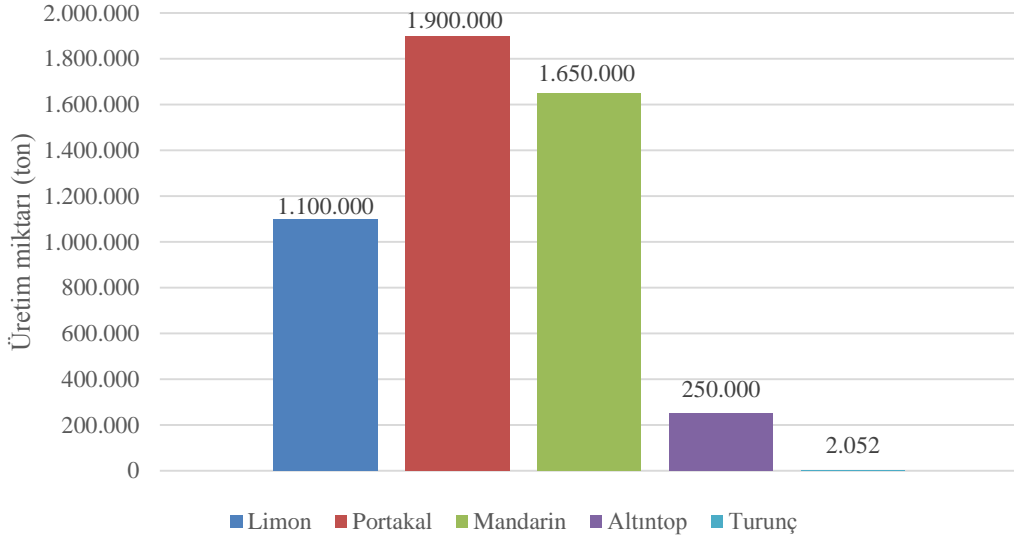
Tarım ve kırsal kalkınma planlarında stratejik ürün olarak değerlendirilen turunçgil (*Citrus spp*) türleri, ekonomik ihracat değerleri ve yerel tüketimleri nedeniyle

Türkiye’ de önemli bir meyve olarak kabul edilmektedir. Türkiye turunçgil üretiminin türlere göre dağılımı, %47’si portakal, %28’i mandarin, %19’u limon ve %6’sı altıntop (greyfurt) şeklinde gerçekleşmiştir. Ürün esaslı değerlendirmede ülkemiz, mandarin üretiminde 4., altıntop ve limonda 8. ve portakalda ise 10. sırada yer almaktadır. Türkiye’de 2018 yılı itibarı ile turunçgil üretiminin, 1 milyon 900 bin ton portakal, 1 milyon 650 bin ton mandarin, 1 milyon 100 bin ton limon, 250 bin ton altıntop ve 2 bin 52 ton turunç olmak üzere toplam 4 milyon 293 bin ton olarak gerçekleştirildiği kaydedilmiştir (TUİK, 2018). Yaş meyve sebze ihracatı içerisindeki payı yaklaşık %42 düzeyinde olan turunçgiller, yaklaşık 2,2 milyar dolar olan toplam meyve-sebze ihracatımızın 849,6 milyon dolarını oluşturmaktadır (AKİB, 2017). Aynı kaynağa göre en çok ihraç edilen yaş meyve ve sebze ürünleri içerisinde ilk iki sırayı mandarin (%15), ve limon (%13) almaktadır. İllere göre ihracat değerleri ele alındığında, en fazla turunçgil ihracatını 307,2 milyon dolarlık ihracat değeri ve %36 pay ile Mersin gerçekleştirirken bunu, 218,2 milyon dolarlık ihracat ve %26 pay ile Hatay izlemiştir. (AKİB, 2017). Dünya turunçgil üretiminin yaklaşık yüzde 3.7’ sinin karşılandığı ülkemizde, 122 bin 634 hektar alanda üretim yapılmakta ve bu alanın %84’ ü Akdeniz Bölgesi’nde yer almaktadır. Bununla birlikte, ülkemizdeki üretim yönünden limon üretiminin %81’i, altıntopun %95’i, portakalın %52’si, mandarinin %72’si Doğu Akdeniz’den karşılanmaktadır. Akdeniz Bölgesi’nde ilk 5 sırada yer alan illerde üretim yapılan alan (dekar) ve miktarlar (ton) Şekil 1.2’de gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Akdeniz Bölgesinde turunçgil üretim alan (A, dekar) ve miktarının (B, ton) illere göre dağılımı (TUİK, 2018)

Ülkemizin turunçgil türlerine göre üretim değerleri incelendiğinde ise, 1 milyon 900 bin ton ile ilk sırayı portakal alırken bunu mandarin ve limon türleri takip etmiştir. (TUİK, 2018).



Şekil 1. 3. Türkiye’de turunçgil üretiminin (ton) türlere göre üretim miktarları. (TUİK, 2018)

Ülkemizde ve dünyada turunçgil üretim sürecinde fungus ve fungus benzeri organizmalar tarafından oluşturulan önemli hastalıklar bulunmaktadır. Bunların en önemlileri; kahverengi leke (*Alternaria alternata* f.sp. *citri*), uçkurutan (*Plenodomus tracheiphilus* (Petri) L.A. Gruyter, Aveskamp&Verkley.) ve kahverengi çürüklük ve gövde zamklanması (*Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian ve son zamanlarda daha çok dikkat çeken *Colletotrichum* türlerinin neden olduğu antraknoz hastalığıdır (EPPO, 2015; Guarnacia ve ark., 2017; Uysal ve ark., 2016; Avcı, 2018; Uysal ve Kurt, 2019a).

Antraknoz hastalığı, hem olgunlaşmakta olan hem de olgun bitki dokularında ve meyvelerde derim öncesi ve derim sonrası enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Colletotrichum* türlerinin neden olduğu bu hastalık, bitkisel üretimde pazar değerini %10-80 arasında değişen oranlarda azaltan ve ekonomik olarak önemli olan hastalıklardan birisi olarak kabul edilmektedir (Hadden ve Black, 1989; Bosland ve Votova, 2003). Dünya çapında birçok bitkiyi tahrip eden *Colletotrichum* cinsinin, yaklaşık olarak 600 türü bulunmaktadır (O’Connell ve ark., 2012). *Colletotrichum* türleri, tahıllar, baklagiller,

sebzeler, çok yıllık bitkiler ve meyve ağaçlarını içine alan birçok konukçu bitkide ekonomik olarak önemli ve bu konukçularda antraknoz hastalığına neden olan dünya çapında çok önemli bitki patojenlerindedir. Sera dışında yetişen odunsu bitkiler, süs bitkileri ve tropikal yapraklı birçok bitkiler, özellikle antraknoz hastalığından etkilenirler (Bailey ve Jeger, 1992). Konukçuları; kaktüs, huş ağacı, açelya, kamelya, siklamen, iğne yapraklılar, orkide, palmiye gibi süs ve orman bitkileri ve kuşkonmaz, muz, fasulye, biber, turunçgiller, kahve, kabakgiller, incir, üzüm, marul, mango, papaya, hurma, patates, ıspanak, çilek, domates gibi meyve ve sebze türleridir (Chase, 2011). Antraknoz, Yunanca'da kömür anlamına gelen bir kelimedenden türetilmiş olup, spor içeren koyu, çökük lezyonlar şeklinde karakterize edilen bitki hastalıklarının genel adı olarak ifade edilmektedir (Isaac, 1992).

Genellikle Antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum* türleri, fungus alemi, Ascomycota şubesi, Sordariomycetes sınıfı Phyllachorales takımı ve Phyllachoraceae familyası içerisinde yer almaktadır. Bu fungus, *Glomerella* cinsine bağlı türlerin anamorf evresi olarak bilinmektedir.

*Colletotrichum* cinsi, 1831 yılında Çek Cumhuriyeti'de Apiaceae familyasında ismi tam olarak bilinmeyen bir konukçu bitkinin gövdesi üzerinde *Colletotrichum lineocola* neden olduğu belirtiler şeklinde tanımlanmıştır (Corda, 1831). Araştırmacının morfolojik tanısına göre *C.lineocola* fusiform, falçata, uçları keskin şeffaf konidi ve kahverengi, mat ucu sivri setalar oluşturmuştur. Diğer türler, *Sphaeria* Haller ve *Vermicularia* Tode' nin üyeleri olarak tanımlanmış ve daha sonra *Colletotrichum* ile birleştirilmiştir. Duke 1982'de *Colletotrichum* cinsini karakterize eden *Sphaeria dematium* ve *Vermicularia* funguslarını detaylı bir şekilde araştırmıştır. *Vermicularia* ismi bazı araştırmacılara göre eğimli, kavisli sporlar olarak tanımlanmıştır (Wollenweber ve Hochapfel, 1949; Vassiljevski ve Karkulin, 1950). Fakat bu isim, von Arx'ın revizyonundan sonra kullanımdan kalkmıştır (Arx von, 1957). *Sphaeria dematium*' un orijinal tanımı, Persoon (1801) tarafından yapılan birkaç gözlemler sonucunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, gri benekler üzerinde hafif düzleşmiş küresel lezyonlar, merkezinde dik, sert, ayrık, tek renkli setalar gözlenmiştir. Bu fungus yaygın olarak ölü, kuru, otsu bitkilerden özellikle *Solanum tuberosum* üzerinde tespit edilmiştir. Daha sonraki tanımlamalarda *Colletotrichum dematium*' un koyu sert seta, falçata şeklinde konidiler ve dairesel ve eliptik apresoryumları saptanmıştır (von Arx, 1957; Sutton,1980;

Baxter ve ark., 1983). Sutton (1980)' a göre *C. dematium*'un konidileri sert kavisli ve en az 3 µm çapında olup bu özellikleri *C. capsici*' den ayırmak için kullanılmaktadır. *C. dematium*, birçok otsu bitkiler üzerinde gelişebilen polifag olarak düşünülür, fakat parazit formlarının konukçu durumu sınırlı düzeydedir.

Çizelge 1.1. Turunçgil tür ve çeşitleri ile ilişkili *Colletotrichum*'un tür kompleksleri ve türleri (Ramos ve ark., 2016)

Tür Grupları	<i>Colletotrichum</i> 'un türleri	Turunçgil türleri ve bitki organları	Kaynaklar
<i>C. acutatum</i>	<i>C. acutatum</i> s.s.	<i>Citrus</i> spp./çiçek, meyve	Damm ve ark. (2012a)
	<i>C. citri</i>	<i>C. aurantifolia</i> /sürgün	Huang ve ark. (2013)
	<i>C. godetiae</i>	<i>C. aurantium</i> / meyve	Damm ve ark. (2012a)
	<i>C. johnstoni</i>	<i>Citrus</i> sp./ meyve	Damm ve ark. (2012a)
	<i>C. limeticola</i>	<i>C. aurantifolia</i> /dal	Damm ve ark. (2012a)
	<i>C. simmondsii</i>	<i>Citrus</i> sp./yaprak	Peng ve ark. (2012)
<i>C. boninense</i>	<i>C. boninense</i> s.s.	<i>Citrus</i> spp./ meyve, yaprak	Damm ve ark. (2012b)
	<i>C. citricola</i>	<i>C. unchuu</i> / yaprak	Huang ve ark. (2013)
	<i>C. constrictum</i>	<i>C. limon</i> / meyve	Damm ve ark. (2012b)
	<i>C. karstii</i>	<i>C. limon</i> /dal, yaprak	Peng ve ark. (2012);
	<i>C. novae-zelandiae</i>	<i>C. paradisi</i> / meyve	Damm ve ark. (2012b)
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. gloeosporioides</i> s.s.	<i>Citrus</i> spp./dal, çiçek, meyve, yaprak, dal
<i>C. aenigma</i>		<i>Citrus</i> sp./ yaprak	Weir ve ark. (2012)
<i>C. brevisporum</i>		<i>Citrus</i> sp./ yaprak	Noireung ve ark. (2012); Peng ve ark. (2012)
<i>C. fructicola</i>		<i>C. reticulata</i> / yaprak <i>Fortunella margarita</i> /dal	Huang ve ark. (2013)
<i>C. murrayae</i>		<i>Citrus</i> sp./ yaprak	Peng ve ark. (2012)
<i>C. siamense</i>		<i>C. reticulata</i> / meyve,	Cheng ve ark. (2013)
<i>C. truncatum</i>	<i>C. truncatum</i> s.s.	<i>C. flamea</i> /sürgün <i>C. limon</i> /yaprak <i>C. reticulata</i> / yaprak	Huang ve ark. (2013); Cheng ve ark. (2014)
	<i>C. gigasporum</i>	<i>C. maxima</i> / yaprak	Noireung ve ark. (2012); Liu ve ark.. (2014)
	<i>C. tropicicola</i>	<i>C. maxima</i> / yaprak	Noireung ve ark. (2012)

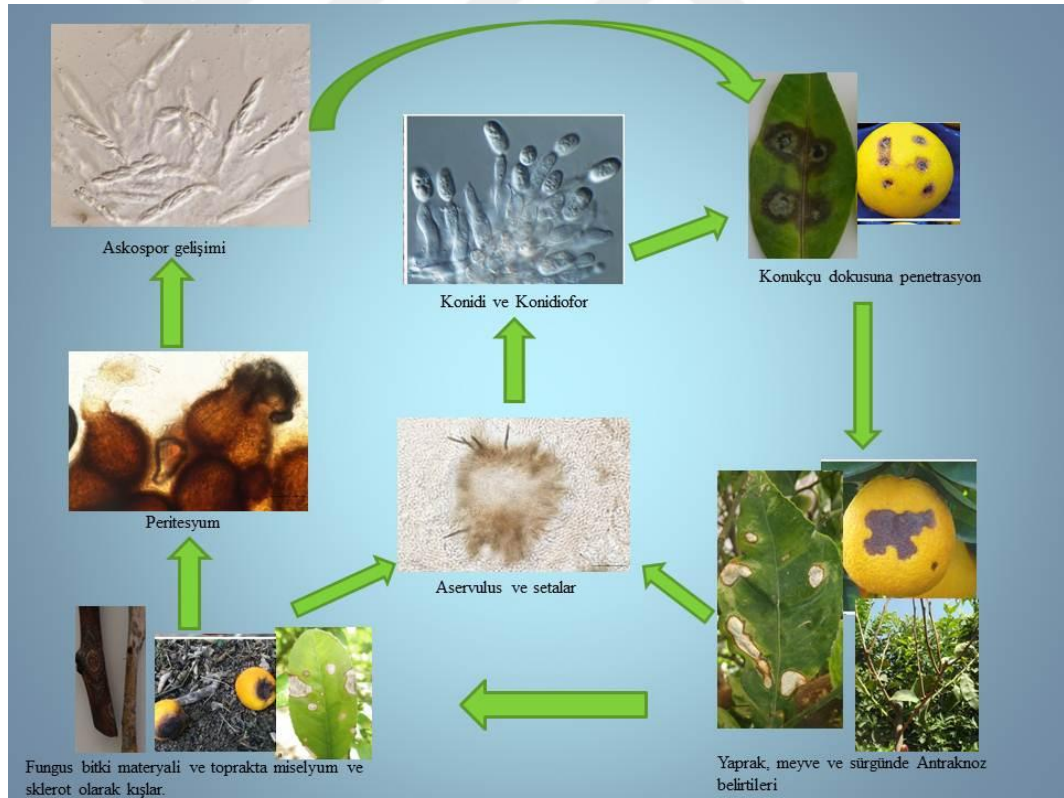
Von Arx (1957)' ye göre *C. dematium* yaygın şekilde ölü yapraklar üzerinde, soğan kabuğunda, meyve ağacı dallarında ve çürümüş meyvelerde, yaprak lekeleri ve antraknoz etmeni olarak ortaya çıkmaktadır. *C. dematium*, ayrıca insanlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır. Keratitis denilen gözde iltihapı neden olan bir hastalığa sebep olduğu bilinmektedir (Mendinatta ve ark., 2005). *C. lineocola* ve *C. dematium*' un yanısıra kavisli konidilere sahip *Colletotrichum* türleri farklı bitkilerin patojenleri olarak

kaydedilmiştir. Örneğin, farklı türler soya fasulyesi üzerinde *C. truncatum* (Backman ve ark., 1982), biber üzerinde *C. capsici* (Than ve ark., 2008) ve paskalya zambacı üzerinde *C. lili* şeklinde bildirilmiştir (Plakidas, 1944). Günümüzde bitki patolojisinde *Colletotrichum* cinsine bağlı türler, *C. gloeosporioides* (Cannon ve ark., 2008), *C. acutatum* (Marcelino ve ark., 2008) *C. boninense* (Damm ve ark., 2012b) ve *C. truncatum* (Damm ve ark., 2009) tür komplekslerinin üyeleri olarak kabul edilmektedir. *Colletotrichum* türlerinin yaşam biçimleri genel olarak nekrotrofik, hemibiyotropik, latent, pasif ve endofitik olarak sınıflandırılmakta olup hemibiyotropik en yaygın olanıdır. *Colletotrichum* türlerinin yaşam döngüsündeki farklılıklar konukçu bitki türleri, konukçunun fizyolojik olgunluğu ve çevresel koşullarına bağlıdır. *Colletotrichum* cinsine ait türlerin yaşam tarzları hakkında bilgi sahibi olmak, *Colletotrichum*'a ait türlerin ortama hakim olma riskini azaltmak için yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ve entegre hastalık kontrolü uygulamasına olanak sağlamaktadır (De Silva ve ark., 2016a). *Colletotrichum*'un az sayıdaki endofit olarak türleri hariç, diğerleri yaşam döngüsünde nekrotrofik bir evre geliştirir. Bunlar genellikle gerçek biyotrofik özellik göstermezler. Ancak, *Colletotrichum*'un birçok türü, yaşam şekillerinin başında biyotrofik bir aşama geçirebilir, bunu nekrotrofik bir yaşam tarzı takip eder ve bu nedenle hemibiotrofik olarak anılırlar. *Colletotrichum*'un farklı türleri arasındaki hemibiyotrofik yaşam derecesi, biyotrofitiden nekrotrofiye geçişin zamanlamasına, konukçunun gelişme evresine ve çevre koşullarına bağlıdır (De Silva ve ark., 2016b).

*Colletotrichum*'un bazı türleri ise meyvelerde derim sonrası enfeksiyon oluşturmadan önce yaşam şekillerinde latent olarak davranırlar. Avokado meyvesinde *C. gloeosporioides* ve bademde *C. acutatum* buna örnek olarak gösterilebilir (Prusky, 1996; Adaskaveg ve Förster, 2000). Birçok *Colletotrichum* türü bitkilerin birçok gruplarında yaşam döngülerinin bir kısmını veya çoğunu endofitler olarak geçirdiği bilinmektedir. *C. gloeosporioides*, *C. graminicola* ve *C. boninense* tür kompleksleri içinde yer alan türlerin bir çoğu endofitik olarak bilinmektedir (Bhagya ve ark., 2011; Damm ve ark., 2012b; Weir ve ark., 2012). *Colletotrichum* cinsine ait türlerin epifitik, saprofit, endofit ve patojen olarak çeşitli bitkilerde ortaya çıkması, dünya çapında yaygınlık göstermesi, önemli ekolojik ve ekonomik kaygıları beraberinde getirmektedir (Douanla-Meli ve Unger, 2017).

*Colletotrichum*'a ait türler, yaşamını tohumlar ve bitki artıkları üzerinde peritesyum, miselyum, aservulus ve seyrek olarak mikrosklerot halinde sürdürmektedirler (Pernezy ve ark., 2003). Bu türler, doğal olarak mikrosklerot üretmekte ve stres koşullarına maruz kaldıkları zaman ve kış boyunca toprakta dormant halde kalarak birçok yıllar canlılığını koruyabilmektedir (Pring ve ark., 1995).

Antraknoz etmeni *Colletotrichum* fungusu kışı bitki artıklarında peritesyum halinde geçirdikten sonra, uygun iklim koşulları oluştuğunda olgunlaşan peritesyumlardan açığa çıkan askuslarda bulunan askosporlar aracılığı ile ilk enfeksiyon oluşur. Enfeksiyon sonrası bitki dokusunun kuşatılması ile dokular ölür, yaprak ve meyveler üzerinde çökük alanlar oluşur, sürgünlerde ise geriye doğru ölüm belirtileri meydana gelir. Enfekteli alan üzerinde, fungusun eşeysiz üreme yapısı olan aservuluslar ortaya çıkar. Burada oluşan konidilerin etrafa yayılması ile ikincil enfeksiyonlar gelişir (Şekil 1.6).



Şekil 1. 4. *Colletotrichum*'a ait türlerin neden olduğu Antraknoz hastalığının yaşam döngüsü

*Colletotrichum* 'a ait türler ve biyotipleri, tek konukçuya bağlı olarak ortaya çıkan interaksyonlar yönünden değerlendirilmiştir. Örneğin; avokado ve mango' da *Colletotrichum acutatum* ve *C. gloeosporioides* türlerinin neden olduğu antraknoz, derim sonrası hastalıklar olarak meyveleri etkilemektedir. Çilek bitkisinin meyve ve diğer organları, antraknoza neden olan *C. fragariae*, *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* gibi türler tarafından enfektelenebilmektedir. Ayrıca, birçok konukçu üzerinde tek *Colletotrichum* türünün enfeksiyonunu görmek yaygın bir durum olarak kabul edilmektedir. Örneğin, *C. gloeosporioides* badem, avokado, elma ve çilek gibi çeşitli meyveleri hastalandırırken, *C. acutatum* türünün, avokado, çilek, badem, elma ve şeftali gibi geniş sayıdaki meyve türlerini enfekte ettiği bildirilmiştir (Freeman ve ark., 1998).

*Colletotrichum* 'un birçok türünün karmaşık yaşam döngüleri, çapraz enfeksiyon potansiyelleri geniş bir yelpazede konukçu türleri enfekte eder ve bu durum, neden oldukları hastalıklarla mücadelede büyük zorluklar yaratmaktadır (Phoulivong ve ark., 2012; De Silva ve ark., 2016b).

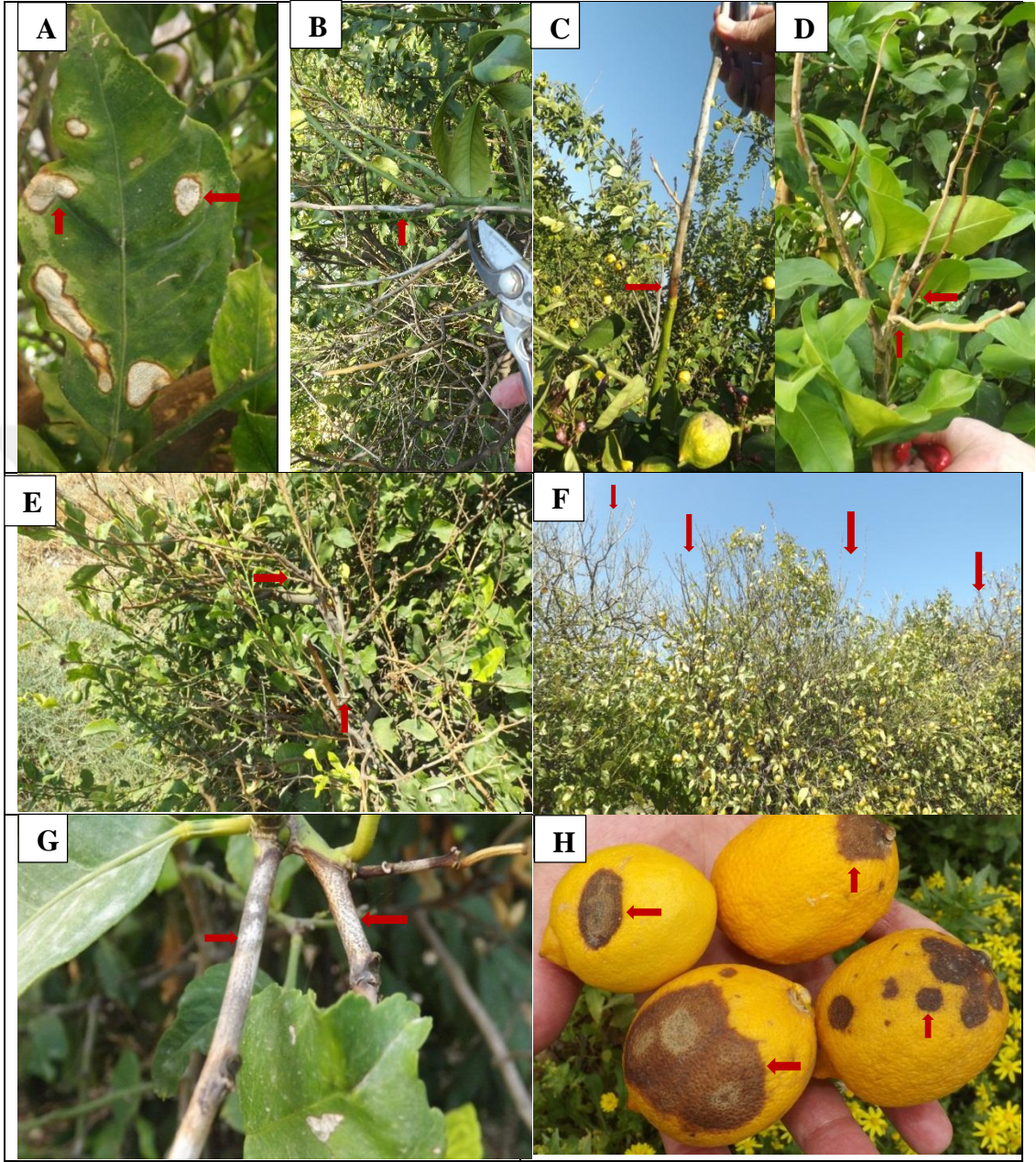
Çevresel faktörler hastalık epidemilerinin gelişiminde büyük rol oynar. Yağış miktarı ve süresi, ürün geometrisi, inokulum yaygınlığı arasındaki ilişkiler hastalık şiddetinin seviyesinde farklılıklara yol açar (Dodd ve ark., 1992). Sıcaklığın etkileri çoğunlukla yaprak ıslaklık süresi, nem, ışık ve rekabetçi mikrobiyota gibi faktörler ile ilişkilidir (Royle ve Butler, 1986). Yaprak ıslaklık süresi, konukçu üzerinde patojenin çimlenmesini, enfeksiyonunu ve gelişimini doğrudan etkiler. Genellikle enfeksiyon sıcak ve nemli havalarda oluşur. Sıcaklığın, 27°C' civarında olması ve yüksek nem (%80), antraknoz hastalığının gelişimi için en uygun koşullardır. *Colletotrichum* ' un türleri, konukçu dokularını enfekte ederken hücre içinde hemibiyotrof ve kütikula altında nekrotrofik yaşam tarzını kullanırlar. Ayrıca *Colletotrichum* 'un türleri arasında penetrasyon sırasında da farklılıklar gözlenir (Perfect ve ark., 1999).

*Colletotrichum* son zamanlarda ekonomik ve bilimsel olarak en önemli 10 bitki patojenleri listesinde yer almaktadır (Dean ve ark., 2012). Uluslararası düzeyde değerlendirildiğinde *Colletotrichum* türleri turunçgillerde birçok önemli hastalığa neden olmaktadır (Timmer ve ark., 2000, Lima ve ark., 2011).

Turunçgillerde antraknoz hastalığı sürgünlerde geriye doğru kuruma, yapraklarda leke, erken dönem yaprak ve meyve dökümleri, meyvelerde antraknoz belirtileri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Hastalık belirtilerine bitkilerin tüm vegetatif ve generatif



organlarında rastlanmaktadır (Şekil 1. 5).



Şekil 1. 5. Turunçgillerde *Colletotrichum* spp. türlerinin neden olduğu antraknoz hastalığının belirtileri; turunçgil yapraklarında tipik lezyonlar (A), sürgünlerde ve dallarda kuruma ve nekrozlar (B,C,D,E,F,G), meyvede lezyonlar (H).

Ölmekte olan yapraklar ve dallarda, patojenin koyu spor yatakları olan aservuluslar yer alır. Yapraklarda belirtiler bariz mor bir hat ile sınırlı açık ten rengi, az ya da çok yuvarlak, düz bir alan şeklinde oluşur ve bu alanlar üzerinde hastalığın ilerleyen evrelerinde siyah nokta şeklinde aservuluslar gözlenir. Meyvelerde antraknoz belirtileri

genellikle güneş yanığı, kimyasal yanık, böcek zararı, morarma veya uzun süreli depolama dönemleri gibi diğer etkenler tarafından oluşturulan yaralı meyvelerde meydana gelir. Lezyonlar, 1.5 mm veya daha büyük çapta siyah renkte olup, ıslak veya sisli havalarda, antraknoz sporları meyve üzerine ulaşır, kabukları enfekte ederler. Olgunlaşmamış meyvelerde ise donuk, kırmızımsı-yeşil çizgiler ve olgun meyvelerde kahverengi-siyah çizgiler (gözyaşı lekeleri) oluştururlar (Agostini ve ark.,1992). Çürüme genellikle sert ve kuru olmakla birlikte, yeterince derin olursa meyveyi yumuşatabilir. Nemli koşullarda bekletildiğinde, spor kütleleri somon rengine benzer pembe renkte, kuru olduğunda ise sporlar siyah- kahverengi bir renk alır. Ayrıca etilen uygulaması fungusun çoğalmasına yardımcı olur. Etilen salınımı fazla olması durumunda hastalık şiddeti artmakta ve hastalık depolama koşullarında da enfeksiyonunu sürdürmektedir (USDA; APHIS).

*Colletotrichum* 'un patojen türlerinin derim öncesi ve sonrası antraknoz etmeni olarak turunçgillerde önemli verim kayıpları ile sonuçlanan hastalıkların yaygınlığı araştırılmıştır. Turunçgil türlerinin önemli yetiştirme alanlarında ve dünya çapında pazarlanabilir ürünlerinde üretime zarar veren fungal hastalıklar ile uğraşma çabası birçok araştırmacının *Colletotrichum* 'un türlerine odaklanmasına yol açmıştır.

20. yüzyılın ilk yarısında *Colletotrichum* 'un birçok türleri, yalnızca konukçu patojen ilişkilerine dayanarak tanımlanmıştır (Johnston ve ark., 2005). Çünkü, DNA dizi analizleri kullanılmadan sadece misel ve konidi gibi çok değişkenlik gösteren morfolojik ve biyolojik özelliklerine göre yapılan çalışmalar, *Colletotrichum* 'un konukçu bitki ile ilişkisini açıklayamamıştır. ABD'nin Florida eyaletinde, turunçgil hastalıklarıyla ilişkili *C. gloeosporioides*'in yavaş gelişen portakal rengi (SGO), hızlı gelişen gri (FGG) ve key laym antraknoz (KLA) şeklinde 3 morfolojik türü tanımlanmıştır. Bunlardan, SGO izolatlarının çiçeklenme sonrası meyve dökümü (PFD; post-bloom fruit drop) hastalığının doğrudan nedeni olduğu belirlenmiştir (Agostini ve ark., 1992). Taksonomik tutarsızlıklardan dolayı *Colletotrichum* cinsi *C. acutatum* ve *C. gloeosporioides* olarak sırasıyla 31 ve 23 türe bölünmüş iki kompleks şeklinde yeniden düzenlenmiştir (Damm ve ark., 2012; Weir ve ark., (2012).

Turunçgillerde *Colletotrichum* 'un key laym antraknozunun (KLA) yanı sıra, diğer iki önemli hastalık olarak çiçeklenme sonrası meyve dökümü (PDF) ve hasat sonrası antraknoz ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. (Lahey ve ark., 2004). *C. gloeosporioides*

ve *C. acutatum* çiçek ve meyve dökülmesine yol açarken (Martinez ve ark., 2009; Lima ve ark., 2011; McGovern ve ark., 2012), *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii* ve *C. truncatum* derim öncesi ve sonrası meyve antraknozu (Weir ve ark., 2012; Huang ve ark., 2013; Aiello ve ark., 2015; Damm ve ark., 2012a) ve *C. limeticola* türünün ise key laym antraknozuna neden olduğu bilinmektedir. Bu patojenik türler, genellikle endofit veya latent etmenler olarak izole edilirler (Kumar ve Hyde 2004; Wang ve ark., 2008). Diğer *C. citricola* gibi türler ise turuncgillerin dokularını saprofitik olarak kolonize etmektedirler (Huang ve ark., 2013).

Akdeniz Bölgesi'nde limonda antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*' in patojenik ve moleküler karakterizasyonun araştırıldığı çalışmada, 2014-2015 yıllarında Hatay ve Mersin illerinde yılın farklı zamanlarında limonda önemli antraknoz belirtileri gözlenmiştir. Bu belirtiler geriye doğru kuruma, meyve dökümü, yapraklar üzerinde nekrotik lekeler, genç ve yaşlı sürgünler üzerinde aservulusların görülmesi şeklinde ortaya çıkmıştır. Fungusun pamuksu, soluk-gri ve turuncu renkte şeffaf miselyumlar oluşturduğu gözlenmiştir. Koch postulatlarını tamamlamak için *C. gloeosporioides*'in 5 izolat ile limon fidanlarının sürgünlerinde denemeleri yürütülmüştür. İnokulasyondan 30-40 gün sonra, limon ağaçlarındakine benzer belirtiler gözlenmiştir. Hastalık belirtileri, morfolojik karakterler ve patojenisiteye dayanarak fungus *C. gloeosporioides* olarak teşhis edilmiştir. Moleküler karakterizasyon için fungal DNA, miselyumdan ekstrakte edildikten sonra actin ve  $\beta$ -tubulin (TUB2) genleri, ACT512F-ACT793R ve T1- $\beta$ t2b primerleri ile çoğaltılmıştır. Sekanslar verileri, Gen bankası veritabanında BLAST aracılığıyla karşılaştırılmış ve *C. gloeosporioides* ile % 99 düzeyinde benzerlik göstermiştir (Uysal ve ark., 2016).

*Colletotrichum* tür komplekslerinin multilokus dizi analizleri (MLSA) kullanılarak yapılan son kapsamlı çalışmalarla turuncgillerde *Colletotrichum* çeşitliliği tanımı geliştirilmiş (Martinez ve ark., 2009; Damm ve ark., 2012a,b; Weir ve ark., 2012) ve turuncgiller ile ilgili olarak *Colletotrichum*'un en az 15 türünün olduğu bildirilmiştir (Damm ve ark., 2012a,b; Weir ve ark., 2012; Huang ve ark., 2013; Sharma ve ark., 2015). Turuncgillerde bilinen *Colletotrichum* çeşitliliği mekan olarak sınırlı örneklemeleden dolayı kısıtlı çalışmalara dayanmaktadır. Sonuç olarak, *Colletotrichum*'un türleri, turuncgil tür ve çeşitlerine ait meyvelerde kısmen de olsa bilinmektedir. *Colletotrichum* içerisindeki tür çeşitliliğinin daha iyi anlaşılması, turuncgil ticareti ile temel bilgileri

güçlendirecektir. Bu ürünlerde *Elsinoe* spp., *Plenodomus tracheiphilus* ve *Phyllosticta citricarpa* gibi türler için uygulanan karantina zorunlulukları bulunmaktadır. *Colletotrichum*'un dünya çapındaki konukçu ve patojenik değişkenliği nedeniyle turunçgil meyve türlerindeki fungus çeşitliliğinin üzerinde biyogüvenlik ve karantina için önemli etkiler doğurabilir (Douanla-Meli ve Unger, 2017).

Avrupa'nın turunçgil yetiştirilen ülkelerinde (Yunanistan, Malta, Portekiz, İspanya) 2015 ve 2016 yıllarında turunçgil bahçeleri, fidanlıklar ve ev bahçelerinde yapılan çalışmada (Guarnaccia ve ark., 2017), hastalıklı yaprak, yaprak sapı, dal ve meyvelerden *Colletotrichum*'un toplam 174 izolatu elde edilmiştir. Yedi genomik bölgeyi (ITS, GAPDH, ACT, CAL, CHS-1, HIS3, TUB2) kullanarak yapılan moleküler filogenetik analiz ve izolatlarını morfolojik karakterizasyonu sonucunda *Colletotrichum* izolatlarında üç büyük tür kompleksi belirlenmiştir. *C. gloeosporioides* ve iki yeni tür (*C. helleniense* ve *C. hystricis*); *C. gloeosporioides* tür kompleksi içerisinde yer alırken, *C. karstii*, *C. novae-zelandiae* ve iki yeni tür (*C. catinaense* ve *C. limonicola*); *C. boninense* tür kompleksine dahil edilmiştir. Böylece, turunçgillerde Antraknoz hastalığına neden olan patojen *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. boninense*, *C. acutatum* türleri içerisinde *Colletotrichum gloeosporioides* ve *C. karstii* en yaygın izole edilen türler ve bu türlerden *C. gloeosporioides* virülensliği en yüksek olan tür olarak kaydedilmiştir.

Son zamanlarda farklı Akdeniz ülkelerinde *Colletotrichum*'a bağlı türlerin neden olduğu şiddetli enfeksiyonlar, turunçgil üretimi açısından tehlike arz etmektedir. Özellikle, son yıllarda İtalya' da mandarin ve portakal türlerinin yaprak ve meyvelerinde hasat öncesi şiddetli antraknoz belirtileri (Aiello et al. 2015, Perrone ve ark., 2016), Tunus' da portakal ağaçlarının sürgünlerinde kurumalar (Rhaiem & Taylor 2016), ve Portekiz'de olgunlaşmamış ve olgun limon meyvelerinde şiddetli antraknoz enfeksiyonları kaydedilmektedir (Ramos ve ark., 2016).

Akdeniz Bölgesi'inde yürütülen çalışmada (Uysal ve Kurt, 2019), okitsu çeşidi mandarin ve kütdiken limon türlerinde antraknoz belirtileri gösteren hastalıklı dokulardan elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının morfolojik ve moleküler çalışmaları sonucunda etmen *Colletotrichum karstii* şeklinde tanımlanmış ve ülkemiz için ilk kayıt olarak bildirilmiştir.

Antraknoz hastalıklarının mücadelesinde yaygın ve pratik olarak fungusitler

kullanılmaktadır. Örneğin, çili biberinde antraknoz hastalığı için kimyasal olarak azoxystrobin (Quadris), trifloxystrobin (Flint) ve pyraclostrobin (Cabrio) gibi fungusitler önerilmektedir (Alexander ve Waldenmaier, 2002; Lewis ve Miller, 2003). Biyolojik savaşında *Pseudomonas fluorescens* kullanılarak hasat sonrası meyve hastalıklarının biyolojik kontrolü sağlanabilmektedir Antagonistik bakteriyel izolatlar (DGg13 ve BB133) *C.capsici*' nin kontrolünde etkili olduğu bulunmuştur (Intanoo ve Chamswarnng,2007).

Turunçgil üretim alanlarında antraknoz etmeni olarak *Colletotrichum*'a bağlı tür kompleksleri ve bunlara bağlı türlerin tanılanması ve bu türlere karşı mücadele yöntemlerinin araştırılması konusunda geniş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. *Colletotrichum*'un farklı türlerinin neden olduğu antraknoz hastalıkları, hem derim öncesi bahçe koşullarında hem de derim sonrası depo koşullarında önemli kayıplara neden olduğu için bu fungal patojen üzerinde bilimsel çalışma yapılması zorunlu duruma gelmektedir. *Colletotrichum* türlerinde aynı tür birçok bitkiyi enfekte edebilme yeteneğindedir. Ayrıca aynı bitki üzerinde birde fazla *Colletotrichum* türü de hastalık oluşturabilmektedir. Bu nedenle konukçu-patojen etkileşimini daha iyi anlamak için genetik çeşitlilik ve popülasyon yapısına göre bu tür komplekslerinin tanımlanması ve karakterize edilmesi son derece önemli bir aşamadır. Bu durumdan yola çıkarak *Colletotrichum* cinsine ait türlerin kesin tanısının son teknolojik cihazlar ve son tanı ve teşhis yöntemleri kullanılarak yapılması ve buna göre de mücadele yönteminin belirlenmesi gerekmektedir. Konvansiyonel morfo-kültürel karakterizasyon işlemlerinin yavaş ve zaman alıcı olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Matrix-Assisted Laser Desorption/IonizationTime- of- Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) parmak izi tekniği, mikroorganizmaların tanısı ve sınıflandırılmasında, klinik teşhislerdeki uygulamalarda, çevresel ve taksonomik araştırmalar ve gıda sürecindeki kalite kontrolünde kullanılan hızlı, hassas, doğru ve güvenilir bir araç olarak ortaya çıkmıştır. MALDI-TOF MS Biotyper parmak izi sistemi, dakikalar içerisinde bakteri, maya ve fungusların kesin teşhisini kolaylaştırdığı için araştırmacılara büyük olanaklar sağlamaktadır. Elde edilecek bu bilgiler fungal patojen türlerinin fungusit duyarlılığının izlenmesinin yanısıra dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve ıslahında faydalı olacaktır. Ayrıca, çiftçilerimiz açısından tam olarak bilinmeyen bu hastalıklar yanlış mücadele yöntemlerine ve kimyasal uygulamalara sebep olarak hem çevreye zarar verilmesine hem

de ürüne zarar verilerek ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ülkemiz açısından *Colletotrichum* türleri üzerine geniş kapsamlı bir çalışma yapmak ve çıkan sonuçlar doğrultusunda çiftçilerimiz bilgilendirmek ve gerekli önlemler almak sağlıklı ürün ve ekonomik kazanç için önem arz etmektedir.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yer alan Mersin, Adana ve Hatay illerinde turunçgillerde antraknoz etmeni *Colletotrichum* türlerinin morfolojik, patolojik ve moleküler karakterizasyonu ve fungusit duyarlılıklarını belirlemek için yürütülen bu çalışmada;

- (i) Bölgedeki ana turunçgil üretim alanlarındaki antraknoz etmeni *Colletotrichum*'un türlerine ait populasyonların örneklenmesi, temsili izolatların elde edilmesi ve izolasyonları,
- (ii) *Colletotrichum* izolatlarının morfolojik, patojenik, multilokus moleküler sekans ve MALDI-TOF MS tekniği ile analiz edilmesi,
- (iii) *Colletotrichum*'un türlerine ait izolatların, seçilen farklı fungusitlere karşı duyarlılıklarını *in vitro* koşullarda belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

*Colletotrichum*'a ait türlerin kesin tanınmasını yapmak için birçok yöntemler kullanılmaktadır. Geleneksel morfolojik yaklaşımlarda koloni, konidi ve apesoryumların şekli ve büyüklüğü önemlidir. Ayrıca, teşhis için fizyolojik durum, çeşitli besi yerlerinde gelişme oranları ve çeşitli karbon kaynaklarının asimilasyonu gerekli olmaktadır. Günümüzde moleküler çalışmalarda AFLP, RFLP gibi teknikler ile çoklu gen ilişkisinden yararlanılmaktadır (Damm ve ark., 2012; Cannon ve ark., 2012).

*Colletotrichum* için yapılan en son revizyonda *acutatum*, *boninense*, *dematium*, *gloeosporioides*, *graminicola*, *orbiculare*, *spaethianum* ve *truncatum* türleri tanımlanmıştır (Damm ve ark., 2012; Cannon ve ark., 2012 ; Weir ve ark., 2012).

*Colletotrichum*' un geleneksel metodlarla tanısında morfolojik farklılıkları dikkate alınmaktadır. Bu amaçla, koloni rengi, konidi şekli ve boyutu en uygun gelişme sıcaklığı, büyüme oranı, setanın varlığı ya da yokluğu, telemorf evresinin olup olmadığına göre morfolojik karakterler esas alınmaktadır. Moleküler karakterizasyon için ise, türlerin ayırımında başarılı şekilde kullanılan teknikler, ap-PCR, nükleer DNA polimorfizmi, ribozomal DNA (rDNA), mitokondriyal DNA (mDNA) ve A+T-rich DNA'dır. Bunlar *C. acutatum*, *C.gloeosporioides*, *C.coccodes*, *C.fragariae*, *C.kahawae*, *C.magna*, *C.orbiculare* ve diğer türlerin popülasyonları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Freeman ve ark., 1998).

Yeni Zelanda'da meyve çürüklükleri ile ilişkili *Colletotrichum* izolatları, arasındaki ilişkileri açıklığa kavuşturmak için morfolojik, kültürel ve rDNA dizisi yönünden verilerin uygulanabilirliği araştırılmıştır. Bunlar, hali hazırda kabul edilen *C. coccodes*, *C. musae*, *C. orbiculare* ve *Glomerella miyabeana* türlerinin yanı sıra 3 *C. acutatum* benzeri grupları ve 9 *C. gloeosporioides* benzeri grupları içermiştir (Johnston ve ark. 2005).

Ülkemizde, Rize ili ve ilçelerinde kivi yetiştirilen alanlarda kivi yapraklarında *Colletotrichum* fungusunun neden olduğu lezyonlardan *Colletotrichum*'a ait farklı türler izole edilmiştir. Fakat, *Colletotrichum* cinsinin hangi türleri izole edildiği kesin olarak bildirilmemiştir (Karakaya ve ark., 2012).

Türkiye'de ıspanakta ilk kez kaydedilen antraknoz etmeni *Colletotrichum spinaciae* Ellis & Halst'ın Akdeniz bölgesinde Mersin, Adana ve Hatay illerinden

izolatları toplanmıştır. Bu alanlarda %40-70 arasında hastalık oranı gözlenmiştir. Genç ve yaşlı yaprakların üst yüzeyinde oluşan küçük, dairesel, suda ıslanmış gibi lezyonların genişleyerek etrafında sarı haleler oluştuğu ve daha sonra klorotik ve nekrotik bir hale dönüştüğü saptanmıştır. Hastalıklı dokuların, ıspanak dekstroz agar (SDA) ve patates dekstroz agar (PDA) besi yerinde 25°C’ de 7 gün boyunca inkübasyonu sonucunda; pamuksu, beyaz-soluk gri miselyumlar ve etmenin eşeysiz üreme yapısı olan aservulusların oluştuğu belirlenmiştir. Daha sonra mikroskopik incelemeler sonucunda aservuluslar içinde koyu renkli seta yapıları ve konidiler bulunduğu kaydedilmiştir. Konidilerin ise 17 - 28 × 2.5 - 6 µm boyutlarında, şeffaf, pürüzsüz, falçata şeklinde her iki uca doğru konikleşen bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen fungal DNA ise, ACT512F-ACT793R ve T1-Bt2b primerleri kullanılarak karakterize edilmiştir (Kurt ve ark., 2016).

Ülkemizde, Batı Anadolu Bölgesi’nde 4 farklı yerde defnede (*Laurus nobilis* L.) fungal hastalık etmenlerinin saptanması bunların inokulum kaynakları konusunda yürütülen çalışmalarla ilk kez araştırılmıştır. Dallardan, yıllık sürgünlerden ve yapraklardan izolasyonlar sonucunda; *Botryosphaeria sarmentorum*, *Phomopsis* sp. ve *Phoma* sp. sıklıkla izole edilirken, *Seimatosporium lichenicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Hendersonula* sp., *Phomopsis* sp. A, *Paraconiothyrium* sp. ve *Colletotrichum dematium* daha az sıklıkla ortaya çıkmıştır (Göre ve Bucak, 2006).

Elazığ ili örtüaltı hıyar yetiştiriciliğinde 2011-2014 yıllarında görülen fungal patojenlerin köklerdeki yaygınlık oranları (%) *R. solani* (%9,3), *Fusarium solani* (%6,2) ve *F. oxysporum* (%6,5) şeklinde kaydedilmiştir. Yapraklarda ise *A. alternata* (%16,4), *D. bryoniae* (%10,8), *S. solani* (%5,5), *P. cucurbitacearum* (%2,7), *P. cubensis* (%27,5), *E. cichoracearum* (%9,6) ve *Colletotrichum lagenarium* (%10,2) olarak tespit edilmiştir. Bu patojenlerin hastalık şiddetleri; köklerde *R. solani* (%32,6), *F. solani* (%27,0) ve *F. oxysporum* (%21,0), bildirilirken yapraklarda ise *A. alternata* (%35,3), *D. bryoniae* (%20,0), *S. solani* (%28,1), *P. cucurbitacearum* (%15,9), *P. cubensis* (%36,5), *E. cichoracearum* (%20,3), *Colletotrichum lagenarium* (%11,8) olarak tespit edilmiştir (Mutlu ve ark., 2015).

*Colletotrichum*’ un elmalarda neden olduğu önemli iki yıkıcı hastalık, acı çürüklük ve *Glomerella* yaprak lekesidir. Acı çürüklük, derim öncesi ve sonrası elmalarda %50 oranında kayıplara neden olmaktadır. Elma acı çürüklüğünün tipik belirtileri; açık



kahverengi lezyonların daha sonra koyu renge dönüşmesidir. Tüm elma çeşitleri acı çürüklüğü hastalığına karşı duyarlıdır. *Glomerella* yaprak lekesi, enfeksiyondan en az iki gün sonra kırmızı lekeler halinde kendini gösterir, 7-10 gün içinde lekeler genişler ve düzensiz şekiller oluşturur (Velho ve ark., 2015).

Çin’ de kivide *Colletotrichum gloeosporioides*’in neden olduğu Antraknoz hastalığı ilk kez bildirilmiştir. Çin’in bazı bölgelerinde 2016 yılında genç ve olgun kivi yapraklarında tipik antraknoz belirtileri gözlenmiştir. Bu belirtiler düzensiz şekilli lezyonlar ile enfekteli yapraklar üzerinde kahverengi ve siyah lekeler şeklinde gözlenmiştir. PDA besi yerinde gelişen koloniler ilk önce beyaz daha sonra gri renge dönüşmektedir. Bu kolonilerde fazla miktarda üretilen konidiler şeffaf, tek hücreli, silindirik ve ortalama 10.45×3.56µm boyutlarında kaydedilmiştir. *Colletotrichum*’un 5 izolatının ITS, TUB2 ve GAPDH gen bölgelerine göre PCR çalışmaları yapılmıştır. Blast analizi sonucunda fungus ITS (ITS4/ITS5, KT004431) ve TUB (Bt2a/Bt2b, KC913205) genlerinin sekans verisi *Colletotrichum gloeosporioides* ile %99, GAPDH (GPD1/GPD2, HQ022581) ile %100 oranında benzerlik göstermiştir. Patojenisite denemeleri için, yaralanan sağlıklı yapraklar steril edilerek petri kaplarına yerleştirilmiştir. 10<sup>6</sup> konidi/ml konsantrasyonda spor süspansiyonu yapraklara inokule edilmiştir. İnkübasyondan sonra yapraklarda oluşan belirtiler bahçede gözlenen enfekteli yapraklarda oluşan belirtilere benzerlik göstermiştir (Li ve ark., 2017).

Türkiye’de nar bitkisinde *Colletotrichum gloeosporioides*’in neden olduğu antraknoz hastalığı ilk kez bildirilmiştir. 2017 yılında nar bahçelerinde hastalık oranı %15-22 arasında tespit edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, bu fungal patojeni morfolojik, moleküler özelliklerine ve patojenisiteye dayalı olarak karakterize etmektir. Hastalık belirtisi görülen yapraklarla ilişkili olarak kültürel ve morfolojik incelemeler ve DNA sekans verileri, patojenin *Colletotrichum gloeosporioides* olduğunu ortaya koymuştur (Uysal ve Kurt, 2018).

İtalya’da nar meyvelerinde derim sonrası çürüklüklere neden olan *Colletotrichum acutatum* etmeni ilk kez bildirilmiştir. Soğuk hava depolarındaki nar meyvelerinde antraknoz belirtileri 2016 yılında %11 oranında gözlenmiştir. Ortaya çıkan lezyonlar konsantrik, dairesel, kahverengi- siyah lekeler şeklinde olmuştur. PDA besi yerinde gözlenen koloniler, öncelikle beyazımsı, sonra pembe-somon rengini almıştır. Konidiler tekli, eliptik, fusiform, 11,26×4,22µm boyutlarında olmuştur. Moleküler analiz için

ITS5/ITS4, ACT512F/ACT783R, Bt2a/Bt2b, GDF1/GDF2 ve GSF1/GSR1 primerleri ile DNA bölgeleri çoğaltılmıştır. Koch postülatını tamamlamak için, Acco ve Wonderful çeşidi nar meyveleri steril edilip 5mm çapında yaralanmış ve bu yaralara PDA besi yerinde geliştirilen miselyal diskler yerleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra inokuleli meyvelerden, *C. acutatum* geriye izole edilmiştir (Mincuzzi ve ark., 2017).

Kaliforniya’da fıstık bahçelerinde *Colletotrichum fiorinia* ve *C. karstii* patojenlerinin neden olduğu antraknoz hastalığının ilk kez bildirilmiştir. 2010 ve 2016 yıllarında Kaliforniya’ nın farklı bölgelerinde fıstık ağaçlarının yaprak ve meyvelerinde şiddetli antraknoz belirtileri gözlenmiştir. Bu bölgelerden toplanan izolatlar, morfolojik olarak *C. acutatum* ve *C. boninense* kompleksine ait türler olarak tanımlanmıştır. ITS1-ITS4 ve Beta Tubulin (Bt2a-Bt2b) gen bölgelerine göre yapılan PCR ve dizileme sonucunda Tulare bölgesinden toplanan 2 izolat, *C. karstii* ve Glenn bölgesinden toplanan 5 izolat, *C. fioriniae* olarak belirlenmiştir. Patojenisite denemeleri için Joley, Red Aleppo, Sirora ve Kerman çeşitlerine ait 60 olgun fıstık meyvesi ve Red Aleppo, Golden Hills, Kerman çeşitlerinin 20 adet yaprakları şırınga iğnesi ile yaralanmıştır. Yaralanan meyveler  $5 \times 10^4$  konidi/ml konsantrasyondaki spor süspansiyonundan 10 µl olacak şekilde inoküle edildikten sonra 25°C’ de nem çemberinde inkübe edilmiştir. Meyvelerdeki hastalık oranı Joley’de %100, Red Aleppo’da %97, Sirora’da %93, Kerman’da %73 olarak belirlenmiştir. Yapraklardaki hastalık oranı ise Kerman ve Red Aleppo’da %90 ve Golden Hills’de %77,5 olarak saptanmıştır (Lichtemberg ve ark. 2017).

Çin’de *Colletotrichum fructicola*’nın neden olduğu ceviz antraknozu ilk kez bildirilmiştir. 2014 yılında Çin’in Shandong bölgesinde 2 ceviz bahçesinde antraknoz belirtileri gösteren 20 ceviz meyvesinde düzensiz şekilli, güneş yanığı lezyonlarına benzer kahverengi-siyah lekeler gözlenmiştir. PDA besi yerinde gelişen koloniler gri, pamuğumsu, sık dokulu kahverengimsi pigmentler oluşturmuştur. Konidiler tek hücreli, renksiz, ucu silindirik,  $15,2 \times 4,7$  µm boyutlarında kaydedilmiştir. Moleküler tanı için, ITS1/ITS2, ACTİN, GAPDH ve CHS-1 gen bölgelerine göre yapılan dizi analizleri sonucunda, ITS ve ACT dizileri *C. fructicola* ile %100, GAPDH ve CHS-1 dizileri ise %99 benzerlik göstermiştir. Patojenisite testleri için yaprak ve meyvelere  $10^6$  konidi/ml konsantrasyonda spor süspansiyonu inoküle edilmiş ve inokulasyondan 7 gün sonra

ortaya çıkan antraknoz belirtileri, bahçedeki lezyonlar ile benzerlik göstermiştir (Wang ve ark., 2018).

Hindistan'ın batı bölgesinde bulunan Maharashtra eyaletinde üzüm bağlarında antraknoza neden olan *Colletotrichum capsici*, ilk kez bildirilmiştir. Bu hastalık, Hindistan'ın sıcak ve nemli tropikal ve subtropikal alanlarında bulunan sofralık üzüm çeşitlerinde ekonomik olarak önemli bulunmuştur. Yaprak ve yaprak sapları üzerindeki küçük, koyu kahverengi lekelerden elde edilen *C. gloeosporioides*, morfolojik karakterlere dayanarak tanımlanmıştır. Beyaz, daha sonra koyu yeşil veya yosun yeşil renge dönüşen kolonilerde aservuluslar, hem dağınık hem de konsantrik halkalar halinde meydana gelmiştir. Fungusun konidileri,  $21,7 \times 5,1 \mu\text{m}$  boyutlarında ve falçata şeklindedir. Bu etmen, türe özel primerler kullanılarak moleküler olarak tanımlanmıştır. Patojenisite için,  $1 \times 10^6$  konidi/ml konsantrasyondaki spor süspansiyonu ile yapay inokulasyon yapılmış ve inokulasyondan 7 gün sonra reizolasyon gerçekleştirilmiştir (Sawant ve ark., 2012).

Sri Lanka' da Willard mangolarında ilk kez *Colletotrichum asianum*'un neden olduğu antraknoz hastalığının meyvelerde küçük, koyu kahverengi düzenli lekeler meydana getirdiği gözlenmiştir. Fungusun PDA ortamındaki kolonileri, başlangıçta beyaz, sonra merkezi grimsi yeşil olup, konidileri tek hücreli, şeffaf ve dikdörtgen şekilli olarak tanımlanmıştır. Etmenin izole edilen fungal DNA' sının ITS bölgesi için genel primerler ITS1 ve ITS4 kullanılmıştır. Patojenisite için, 5mm çapındaki miselyal diskler yaralanmış mango meyvelerine yerleştirilmiştir. İnokule edilmiş meyvelerde antraknozun tipik belirtileri görülmüştür. Meyvelerden yapılan reizolasyon sonucunda *Colletotrichum asianum* etmeninin patojen olduğu saptanmıştır (Krishnapillai ve ark., 2014).

Belçika'da çilek alanlarından toplanan *Colletotrichum* izolatları, genetik, morfolojik ve patolojik özelliklerine göre karakterize edilmiştir. Temsili olarak seçilen 211 izolata; %97'si *Colletotrichum acutatum*, %2'si *C. gloeosporioides* ve %1'i *C. coccodes* olarak belirlenmiştir. *C. acutatum* izolatlarının tür içi gruplara dağılımı; A2 (%33), A3 (%5), A4 (%50), A5 (%3) ve A7 (%6) şeklinde saptanmıştır. 146 izolataın seleksiyonu spor morfolojisi, gelişim oranı ve koloni rengindeki farklılıklar genetik gruplarda doğrulanmıştır. *C. acutatum* A2 ve *C. gloeosporioides*' in Belçika izolatlarının meyveler üzerindeki virülensliğinin çok yüksek olduğu kaydedilmiştir. Bitkinin tepe kısımlarına yapılan inokulasyonlarda *C.acutatum* A2 ve A5 grupları ile *C.*

*gloeosporioides*' in Amerikan izolatlarının virülensliğinin çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. *C.acutatum* A4 ve A7 grubu izolatları ile *C. gloeosporioides* in tüm Avrupa izolatlarının bitkinin tepe kısımda patojenik olmadıkları bildirilmiştir (Van Hemelrijck, 2010).

*Colletotrichum*'un bitki patojeni olarak çok önemli bir cins olduğu ve dünya çapında tropik ve subtropik bölgelerde önemli dağılım gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca, *Colletotrichum* cinsi içerisinde *C. coccodes*, *C. crassipes*, *C. dematium*, *C. gloeosporioides* ve *C. graminicola* türlerinin insanlarda enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir. En önemli patojen olan *C.gloeosporioides*' in neden olduğu gözde keratitits hastalığı katarakt ameliyatı geçiren bir hastanın ameliyattan 6 ay sonra gözünde enfeksiyon şeklinde gelişmiştir. Gözün kornea bölgesi kazınarak buradan *C.gloeosporioides* izolatı elde edilmiştir. Etkin ilaçlı tedavi yöntemi olarak, natamycin ve fluconazole kombinasyonu uygulanmıştır. Ayrıca, son zamanlarda *C.acutatum* türünün deniz kaplumbağalarında enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Yamamoto ve ark., 2001).

İsrail'de avokado (*Persea americana*) antraknoz etmeni *Colletotrichum*'un yeni türlerinin tanımı, epidemiyoloji ve patolojisi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bugüne kadar İsrail'de avokado bitkisini enfekte eden patojenler olarak bildiren *C. gloeosporioides sensu lato* ve *C. aenigma*, meyve bahçesinde taze sürgünlerin yanısıra kışın çoğunlukla taze ve kuru yapraklar üzerinde canlılığını sürdürmektedir. Bu çalışmada *Colletotrichum*'un 538 izolatının popülasyonlarının genetik çeşitliliğini değerlendirmek için önce morfoloji ve PCR çalışmaları esas alınarak karakterizasyon yapılmıştır. Daha sonra, ITS, ACT, ApMAT, CAL, CHS1, GAPDH, GS, HIS3, TUB2 gen kombinasyonlarının multilokus dizileri ile yürütülen filogenetik analizler; İsrail'de avokado antraknoz patojeni olarak *C. aenigma*, *C. alienum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. karstii*, *C. nupharicola*, *C. siamense*, *C. theobromicola* olarak daha önceden de bilinen 8 tür ve *C. perseae* olarak yeni bir tür tanımlanmıştır. (Sharma ve ark., 2017).

İspanya'da badem antraknozuna neden olan *Colletotrichum acutatum* izolatlarının morfolojik, patojenik ve moleküler karakterizasyonda; *Colletotrichum acutatum* tür kompleksi içerisinde yer alan *C. fioriniae* ve *C. godetiae* türlerinin bugüne kadar hastalık ile ilişki olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, Endülüs bölgesinde antraknozdan etkilenen

badem meyvesinden elde edilen *Colletotrichum* izolatları karakterize edilmiştir. Karşılaştırma için zeytin antraknozuna neden olan *Colletotrichum*'un 2 izolatı dahil edilmiştir. Morfolojik özellikler, izolatları koloni morfolojisine dayanan gruplara ayırmak için kullanılmıştır. Patojenisite denemesi sonucunda izolatların badem, zeytin ve elma meyvelerindeki virülenslik düzeyleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Moleküler karakterizasyon ile *Colletotrichum* izolatları, *C. fioriniae* ve *C. godetiae* olarak doğrulanmıştır. *C. acutatum* pembe- turuncu renkte koloni rengine sahip olup, *C. acutatum* tür kompleksi içinde yer alan *C. fioriniae*'nin pembe ve *C. godetiae*'nin ise gri koloni rengine sahip olduğu kaydedilmiştir. Böylece, *C. acutatum* tür kompleksi içinde yer alan ve badem antraknozuna neden olan *Colletotrichum*'un yeni türleri, ilk kayıt olarak bildirilmiştir (Lopez-Moral ve ark., 2017).

Avrupa'nın turunçgil yetiştirilen ülkelerinde (Yunanistan, Malta, Portekiz, İspanya) 2015 ve 2016 yıllarında turunçgil bahçeleri, fidanlıklar ve ev bahçelerinde hastalık belirtisi gösteren yaprak, yaprak sapı, dal ve meyvelerden *Colletotrichum*'un 174 izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların morfolojik karakterizasyonları ile birlikte ITS, GAPDH, ACT, CAL, CHS-1, HIS3 ve TUB2 gibi 7 genomik bölgeyi kullanarak multilokus filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir. *Colletotrichum*'un temsili izolatlar ile portakal meyvelerinde patojenisite denemesi yürütülmüştür. Sonuçta, *Colletotrichum* izolatları, 3 büyük tür kompleksinin üyeleri olarak tanımlanmıştır. Bunlardan *C. gloeosporioides* ve 2 yeni tür (*C. helleniense* ve *C. hystricis*), *C. gloeosporioides* tür kompleksine dahil edilirken, *C. karstii*, *C. novae-zelandiae* ve 2 yeni tür (*C. catinaense* ve *C. limoncola*), *C. boninense* tür kompleksi içerisinde yer almıştır. Böylece, *C. gloeosporioides*, *Colletotrichum karstii*, *C. boninense*, *C. acutatum* türleri turunçgillerde antraknoz hastalığına neden olan etmenler olduğu bildirilmiştir. Bu türler içerisinde *C. gloeosporioides* ve *C. karstii*, turunçgillerde en yaygın izole edilen türler olarak kaydedilmiştir. Bu türlerden *C. gloeosporioides*, virülensliği en yüksek olan tür olarak belirlenmiştir (Guarnaccia ve ark., 2017).

İthal edilen turunçgil meyvelerinde *Colletotrichum*'a ait türlerin filogenetik analiz ve *C. gigasporum* tür kompleksinin yeni bir türü ile ilgili yürütülen bir çalışmada, coğrafi olarak farklı 17 ülkeden 9 turunçgil meyve türünün belirti göstermeyen ve hastalıklı dokularından izole edilen *Colletotrichum* izolatlarının moleküler filogenetik çeşitliliği, kolonizasyonu ve yaygınlığı araştırılmıştır. *Colletotrichum*'un 454 izolatı, morfo kültürel

olarak karakterize edilmiş ve temsili bir morfo izolat alt grubu üzerinde ACT, ApMat, CHS-1, GAPDH, ITS, TUB2 genleri ile multilokus dizi analizleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense* olarak 3 türün tanımlanması yapılmış ve *Citrus maxima* turunçgil türünden yeni bir soy içeren endofitik izolatlar elde edilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak, *C. citri-maximae*, *C. gigasporum* tür kompleksinde ortaya çıkan yeni bir tür olarak tanımlanmıştır. *Colletotrichum*'un türlerinin dağılımı en fazla *Citrus sinensis* meyvelerinde olmak üzere turunçgil türleri arasında değişkenlik göstermektedir. Sonuç olarak, *C. gloeosporioides* en yaygın olarak kaydedilirken, bunu *C. siamense* izlemiştir. Ayrıca yeni türler hariç, *Colletotrichum*'un diğer tüm türleri turunçgil yapraklarını kolonize etmiş olup, meyveler üzerindeki genel çeşitliliğin yapraklardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Douanla-Meli ve Unger, 2017).

Çin'de turunçgillerle ilişkili olan *Colletotrichum*'a ait türlerin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmada, Çin'de turunçgil üretimi yapılan alanlarda *Citrus* ve *Fortunella* türlerinin yaprak, sürgün ve meyvelerinden *Colletotrichum*'un 312 izolatu elde edilmiştir. Tüm izolatların morfolojik karakterizasyonundan sonra ACT, TUB2, CAL, GAPDH, GS ve ITS gen bölgeleri kullanarak multilokus filogenetik analizler sürdürülmüştür. Bu izolatlar *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. acutatum* ve son olarak turunçgil türleri üzerinde çok nadir bulunan *C. truncatum* tür kompleksleri içerisinde yer almışlardır. Elde edilen bulgulara göre *C. gloeosporioides* tür kompleksi içerisinde *C. gloeosporioides* ve *C. fructicola*; *C. boninense* tür kompleksinde *C. karstii* ve yeni bir tür olan *C. citricola*; *C. acutatum* tür kompleksinde ise yeni bir tür olan *C. citri* dahil edilmiştir. Turunçgillerde antraknoza neden olan *C. gloeosporioides*, *C. fructicola* ve *C. truncatum*'un meyvelere yapılan inokulasyonları sonucunda patojen oldukları saptanmıştır (Huang ve ark., 2013).

Akdeniz Bölgesi'nde limonda antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*'in patojenik ve moleküler karakterizasyonu konusunda yapılan çalışmada (Uysal ve ark., 2016), 2014-2015 yıllarında Akdeniz Bölgesinde Hatay ve Mersin illerinde yılın farklı zamanlarında limon ağaçlarında önemli antraknoz belirtileri gözlenmiştir. Bu belirtiler geriye doğru kurama, meyve dökümü, yapraklar üzerinde nekrotik lekeler, genç ve yaşlı sürgünler üzerinde aservulus yapılarının görülmesi şeklinde ortaya çıkmıştır. Fungus pamuksu, soluk-gri ve turuncu renkte şeffaf miseller oluşturmuştur. Patojenisite denemeleri etmenin, 5 izolat ile limon fidanlarının

sürgünlerinde yürütülmüştür. İnokulasyondan 30-40 gün sonra, limon ağaçlarındakine benzer belirtiler gözlenmiştir. Hastalık belirtileri, morfolojik karakterler ve patojenisiteye dayanarak fungus *Colletotrichum gloeosporioides* olarak teşhis edilmiştir. Moleküler karakterizasyon için DNA, miselyumdan ekstrakte edilmiştir. Actin ve  $\beta$ -tubulin (TUB2) genleri, ACT512F-ACT793R ve T1- $\beta$ 2b primerleri ile çoğaltılmış ve sekanslanmıştır. Sekanslar, Gen bankası veritabanında BLAST aracılığıyla karşılaştırılmış ve *C. gloeosporioides* ile % 99 düzeyinde benzerlik göstermiştir.

Bermuda'da *C. gloeosporioides*'in turunçgillerde çiçeklenme sonrası meyve dökülmesine (PFD) neden olduğu bildirilmiştir. Turunçgillerde çiçeklenme sonrası meyve dökümünün ilk kez 1990' lı yıllarda Bermuda'da yaygın ve şiddetli bir salgın meydana getirdiği bilinmektedir. Hastalıktan kaynaklanan meyve kayıplarının portakal, altıntop, limon ve Tahiti laym türlerinde % 25-35 arasında olduğu tahmin edilmiştir. Çiçeklenme sonrası meyve dökülmesine neden olan fungusların *Colletotrichum gloeosporioides* veya *Colletotrichum acutatum* olabileceğini bildirilmişlerdir. *Colletotrichum*'un Bermuda izolatları hastalıklı portakal ağaçlarından, portakal, limon ve altıntop yapraklarından ve portakalda meyve dökümlerindeki tipik lezyonlarından elde edilmiştir. İzolatlar morfolojik (konidial boyut ve şekil ile koloni rengi), fizyolojik (24°C'de ve benomyl eklenmiş bir ortamda büyüme hızı), serolojik bir testten (ELISA) ve moleküler yöntemler ile karakterize edilmiştir. Serolojik ve moleküler teknikler, izolatların *C. gloeosporioides* oluşunu ortaya koymuştur. Bu rapor, *C. gloeosporioides*'in çiçeklenme sonrası meyve dökülmesine neden olan etmen olabileceğini doğrulamıştır (McGovern ve ark., 2012).

İtalya'da portakalda derim öncesi hastalıklara sebep olan *C.gloeosporioides* ve *C. karstii*' nin karakterizasyonu ve patojenisitesi ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. 2010-2013 döneminde Güney İtalya'nın Catania, Siracusa ve Enna illerinde 6 meyve bahçesindeki portakalın farklı çeşitlerinde derim öncesi belirtiler tespit edilmiştir. Fungusun 56 adet tek spor izolatu elde edilmiştir. Morfolojik ve moleküler analiz sonuçlarına göre; 44 izolat *C. gloeosporioides* ve 12 izolat ise *C. karstii* olarak tanımlanmıştır. *Colletotrichum* izolatlarının moleküler olarak tanınması, ITS1 ve ITS4 evrensel primerleri, spesifik TubGF1-TubGR ve GDF-GDR primerleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu primerlere göre elde edilen DNA dizileri, BLAST programı ile analiz edilmiştir. *C. gloeosporioides* ve *C. karstii*'nin temsili izolatlarını kullanarak Tarocco Scire' and 'Tarocco Nucellare'

çeşitlerinin meyvelerinde patojenisite denemeleri yapılmıştır. Deneme sonucunda ortaya çıkan belirtiler, bahçede gözlenen belirtiler ile benzerlik göstermiştir. (Aiello ve ark., 2015).

Brezilya'da turunçgillerde önemli seviyede kayba neden olan çiçeklenme sonrası meyve dökülmesi ile ilişkili *Colletotrichum* 'un türlerinin, GAPDH geninin dizi analizi ve multiplex PCR ile belirlenmesi konusunda bir çalışma yapılmıştır. Hastalık, ilk olarak *Colletotrichum gloeosporioides* ilişkili olarak bilinen daha sonra, *C.acutatum* ile bağlantılı olduğu saptanmıştır. Ancak, yeni türlerden, *C. abscissum*, 2015 yılında Brezilya'da PFD'nin etmeni olarak tanımlanmıştır. São Paulo eyaletinde, *Colletotrichum* ile ilişkili meyve bahçelerinde PFD hastalığı ile ilgili GAPDH intron bölgesinin dizi analizi sonucu 227 izolat tespit edilmiştir. Bunlardan, 172 izolat *C. abscissum* ve 55 izolat *C. gloeosporioides* olarak tanımlanmıştır. Morfolojik karakterler ve multilokus dizileme sonucunda etmen *C. abscissum* olarak kabul edilmiş ve bu türün Brezilya'da PFD hastalığı ile ilişkili *C. acutatum* tür kompleksindeki tek tür olduğu bildirilmiştir. *C. gloeosporioides* izolatlarının % 20'sinin benzimidazole grubu fungusitlerin yoğun olarak kullanıldığı bölgelerde söz konusu fungusitlere duyarlı olduğu bulunmuştur. Değerlendirilen bu izolatların, *in vitro*'da bu fungusite karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir (Silva ve ark., 2017).

Tunus'da 2009'un başından beri turunçgillerde dallarda antraknoz belirtileri ile ilişkili olan *C. gloeosporioides* konusunda yeni bir çalışma yayınlanmıştır. Tespit edilen etmenin kültürel ve morfolojik özellikleri, *C. gloeosporioides* olduğunu kanıtlamaktadır. Bu sonuçlar, internal spacer rDNA (ITS), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glutamine synthetase (GS) and ApMat lokus bölgeleri ve multilokus filogenetik analizler ile doğrulanmıştır. Yapılan patojenisite testlerine göre, izole edilen *C. gloeosporioides* turunçgillerin solmuş ince dalları ve yaprakları üzerinde tipik antraknoz belirtilerine sebep olmuştur (Rhaiem ve Taylor 2016).

Portekiz'de limon sürgünlerinde geriye doğru ölüm ile ilişkili *C. karstii* ve turunçgil antraknozunun ana etmeni *C. gloeosporioides*'in karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Portekiz'de turunçgil üretiminde son yirmi yılda antraknoz ile ilgili belirtilerin önemli kayıplara neden olduğu kaydedilmiştir. Bu belirtiler, *Colletotrichum gloeosporioides* olarak bildirilmiş olsa da diğer *Colletotrichum* türlerinin bu hastalığa sebep olduğu bilinmektedir. *Colletotrichum* izolatlarının temsili grubunun



patojenisitesi, morfolojik ve genetik değişkenlik karakterizasyonu; ISSR dizi profilleri ve DNA dizisi rDNA-ITS ve  $\beta$ -tubulin 2 gen bölgeleri ile birlikte çalışılmıştır. *C. karstii* (*C. boninense* tür kompleksi) ve *C. gloeosporioides* farklı turunçgil çeşitlerinin yaprak, dal, iek ve meyvelerin belirtilerinden elde edilmiştir. Ancak, *C. acutatum*, Amerika'da, turunçgil antraknozuyla ilişkili en yaygın tür olmasına rağmen bu çalışmada hiç tespit edilmemiştir. *C. gloeosporioides* yüksek sıklıkta (% 87) izole edilmesine karşın, *C. karstii* ise belirli coğrafi bölgelerde limonun dal ve yapraklarında daha sık gözlenmiştir. *C. gloeosporioides* sadece çiçeklerde saptanmıştır. Araştırıcılar, *C. karstii* ve *C. gloeosporioides*'in portakal iek ve meyveleri ile tatlı portakal, mandarin ve limon yapraklarında, referans olarak kullanılan *C. acutatum* turunçgil izolatlarının key laym iek ve yapraklarında patojen olduğunu bildirmişlerdir (Ramos ve ark., 2016).

Ülkemizde ise turunçgil antraknoz hastalığının mevcut durumunu tespit etmek için yapılan çalışmada, (Uysal ve Kurt, 2018) 2016-2017 yıllarında Mersin'in Erdemli ilçesinde turunçgil bahçelerinde önemli antraknoz belirtileri gösteren ağaçlarda örneklemeler yapılmıştır. Hastalıklı bitki örneklerinden yapılan izolasyon işlemleri sonucu elde edilen 25 fungal izolatın morfolojik ve moleküler karakterizasyonları sonucunda *Colletotrichum gloeosporioides* ve *C. karstii* şeklinde 2 tür tanımlanmıştır. Patojenisite denemeleri sonucunda, elde edilen tüm izolatlarının virü lent olduğunu olduğu ve hatta *C. gloeosporioides* izolatlarının, *C. karstii* izolatlarına göre virülensliğinin daha yüksek saptanmıştır. Ayrıca, en fazla hastalık oranı (%100) limonda kaydedilirken, dikenli yediveren limon çeşidi hastalığa karşı en duyarlı çeşit olarak tespit edilmiştir.

Türkiye'de mandarin (okitsu çeşidi) ve limon (küt diken çeşidi) eşitlerinde antaknoz belirtileri gösteren hastalıklı dokulardan elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının morfolojik ve moleküler çalışmaları sonucunda etmenin, *Colletotrichum karstii* olduğu ilk kez kaydedilmiştir. Bu türün morfolojik olarak  $11.54-16.0 \times 4.0-5.6$   $\mu$ m boyutlarında şeffaf, tek hücreli, silindirik şekilli, spor yapılarına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, moleküler olarak 4 farklı gen bölgesinin multilokus dizi analizleri ile doğrulanmıştır (Uysal ve Kurt, 2019).

Günümüzde, biyokimyasal kitleri, serolojik testler, nükleik asit hibridizasyon kökenli yöntemler (Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR); small subunit ribosomal RNA gen sekansı, tüm genom sekansı, multilokus sekanz tipi (MLST), amplified fragment

length polimorfizm (AFLP), and DNA-DNA hibridizasyonu (DDH) şeklinde teşhis yöntemleri mikroorganizmaların en güvenilir şekilde tanımlanmasını sağlar, ancak zaman alıcı, pahalı hem de modern mikrobiyolojik tekniklerde uzmanlık gerektirir (Rahi ve ark., 2016). Bu yöntemler içerisinde yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olanlar ile ucuz ve kısa sürede sonuç veren yöntemler tercih edilmektedir. Bu amaçla, Matrix-Assisted Laser Desorption/IonizationTime- of- Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) tekniği mikroorganizmaların güvenilir şekilde tanımlanmasını olanak sağlar.

Matrix-Assisted Laser Desorption/IonizationTime- of- Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) parmak izi, mikroorganizmaların tanısı ve sınıflandırılmasında, klinik teşhislerdeki uygulamalarda çevresel ve taksanomik araştırma ve gıda sürecindeki kalite kontrolünde kullanılan hızlı, hassas, doğru ve güvenilir bir araç olarak kabul edilmektedir. MALDI-TOF MS Biotyper parmak izi sistemi, dakikalar içerisinde bakteri, maya ve fungusların kesin teşhisini kolaylaştırdığı için araştırmacılara büyük olanaklar sağlamaktadır (Maier ve ark., 2006). Bir çok çalışmada incelendiği üzere ticari olarak kullanılan Bruker ve Shimadzu sistemleri ile maya izolatlarının teşhisi, sırasıyla %97.6 ve %96.1 oranlarında benzerlik göstererek başarılı bir tanılama işlemi gerçekleştirilmiştir (Carolis ve ark., 2014).

Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS), mikroorganizmaların hızlı tanımlanması ve sınıflandırılması için güvenilir araç olarak ortaya çıkmıştır. Bu bakımdan mikroskopik ve moleküler biyoloji yöntemlerine karşı güçlü bir mücadeleyi temsil etmektedir. Günümüzde ticari MALDI sistemleri biyolojik araştırma çalışmaları yanı sıra klinik tıp, biyoteknoloji ve endüstride teşhis uygulamaları için erişilebilir durumdadır. Bakteriyel biyotipte kullanılmaktadır, ancak mantarların analizi için çok sayıda deneysel strateji de geliştirilmiştir. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* veya *Trichoderma* gibi birçok mantar türleri ve ayrıca klinik örneklerinden (örn. *Candida albicans*) çeşitli mayalar MALDI-TOF MS tarafından başarıyla tanımlanmıştır. Ancak, şu anda sadece sınırlı sayıda matris bileşiği kullanılsa da funguslar için çok yönlü bir yöntem yoktur. Biyotropik fungal fitopatojenler, enfekteli bitki organlarından MALDI-TOF kütle spektrumlarının doğrudan elde edilmesi yoluyla tanımlanabilmektedir. Fungusların kütle spektrometrik peptid / protein mantarların profilleri, 1000 - 20 000 m / z bölgesindeki pikleri gösterir, burada benzersiz bir biyolojik

belirteç iyonları olarak görünür ve böylece örneklerin cins, tür veya izolat düzeyinde ayırımını sağlar (Chalupová ve ark., 2014).

Mayaların yol açtığı gıda bozulmaları, yüksek ekonomik kayıplara neden olduğundan, gıda ve gıda ile ilgili ürünlerle ilişkili mayaların hızlı ve doğru şekilde tanımlanması gıda endüstrisi için önemlidir. Bu çalışmada, gıda ile ilişkili mayaları tanımlamak için MALDI-TOF MS veritabanı oluşturulmuş ve daha sonra gıda ve gıda ile ilgili ürünlerden elde edilen 146 maya kültürü analiz edilmiştir. Türlerin %98'i log > 1.7 skor değerleri ile doğru bir şekilde tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS, türlerin çoğunu ayırt edebilmiş, ancak *Kazachstania telluris* ve *Mrakia frigida* gibi bazı tür kompleksleri için sınırlı bir çözüm üretmiştir. Buna rağmen, MALDI-TOF MS'nin gıda kaynaklı mayaların rutin tanımlanması ve doğrulanması için geçerli olduğunu göstermiştir, ancak referans veritabanlarının daha fazla güncellenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Quintilla ve ark., 2018).

Fungusların doğru tür ayırımı önemlidir, çünkü bazı türlerde spesifik antifungal duyarlılıkları vardı ve yanlış tanımlama yanlış tedaviyle sonuçlanabilir. Bu çalışmada, fungus kültürünün doğrudan yüzey analizi ile tanımlanması için, MALDI-TOF MS kullanılmıştır. Kültür koleksiyonu ile *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Mucorales*'in 55 türünü temsil eden türler, MALDI-TOF MS için bir referans veri tabanı oluşturulmuştur. MALDI BioTyper 2.0 mikrofleks yazılımı ile referans türlerin her biri için genç ve olgun kolonilerin profilleri ve türe özgü spektral parmak izleri elde edilerek analizler gerçekleştirilmiştir. Referans veri tabanında yer almayan türler hariç, izolatların % 96.8'i MALDI-TOF MS ile türlere göre tanımlanmıştır. Sonuç olarak, MALDI-TOF MS'in tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında fungusların rutin tanımlanması için uygun olduğunu bildirmişlerdir (Carolis ve ark., 2012).

Küflerin tanımlanması için hızlı tek adımlı ekstraksiyon yöntemi ile MALDI-TOF MS kullanımı ile ilgili çalışma yapılmıştır. Farklı oranlarda asetonitril ve formik asit içeren ekstraksiyon çözeltileri değerlendirilmiş, kültürler MALDI-TOF MS için daha sonra bir PowerLyzer yüksek güçlü boncuk esaslı homojenizatör ve süpernatantlar kullanılarak işlenmiştir. 106 klinik küf izolatının analizi, toplamda 30 dakika kadar ekstraksiyon süresinde iyi bir performans ile sonuçlanmıştır. Mevcut rutin protokollerle yapılan analizlerde ancak izolatların % 52.8' tanımlanırken MALDI-TOF MS protokolü ile %63,8' e varan bir tanımlama yapılmıştır. Rutin yöntemle göre hızlı yöntemin skor

karşılaştırmaları daha yüksek tekrarlanabilirlik göstermiştir. Hızlı ekstraksiyon yöntemi ile etkin analiz sağlanması sonucu, klinik küf analizleri ve planlı toplu işlemlerde MALDI-TOF MS cihazı teşhislerde daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Luethy ve Zelazny, 2018).

*Beauveria bassiana* ve *Beauveria pseudobassiana* entomopatojen türlerin hızlı bir şekilde tanımı için MALDI-TOF kütle spektrometrisinin kullanımı ile genetik analizleri karşılaştırmak ve elde edilen izolatlar ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgelerine göre dizilenmiştir. İzolatların protein analizinden elde edilen sonuçları ile dizi verileri *B. bassiana* ve *B. pseudobassiana* 'nın referans türleri ile karşılaştırılmıştır. Her iki analizin sonucunda dendrogram (filogenetik ağaç) oluşturulmuş ve sonuçlar yüksek derecede tutarlılık göstermiştir. MALDI-TOF MS *Beauveria* cinsi gibi çevre kaynaklı edinilen entomopatojen fungusların tanımlanmasında hızlı ve güvenilir bulunmuştur (Hricáková ve ark., 2018).

*Fusarium fujikuroi* tür kompleksi içinde ayırıcı tür olarak *Fusarium ficirescens*'in tanınması, MALDI-TOF MS aracılığıyla ve geleneksel formik asit-etanol ekstraksiyon yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen tüm spektrumlar ve analizler, MALDI Biotyper V 2.0 software kullanılarak Bruker Mikroflex platformunda değerlendirilmiştir. Sonuçta cihaz, *Fusarium*' un 3 izolatının 2.193, 2.200 ve 2.226 skoru ile güvenilir bir tanılama yapmıştır. Böylece *Fusarium ficirescens* ve diğer *Fusarium fujikuroi* türlerinin 13 izolatının, MALDI-TOF MS analizleri ile dendrogramı oluşturulmuştur (Al-Hatmi ve ark., 2016).

*Colletotrichum* türlerinin teşhisi hastalık mücadelesi yönünden önemlidir. Çünkü farklı *Colletotrichum* türleri için çeşitli kontrol yöntemleri kullanılmaktadır. Örneğin; benzimidazole fungusitine karşı *C.acutatum* orta düzeyde duyarlılık gösterirken oysa *C.gloeosporioides* yüksek düzeyde hassasiyet göstermiştir. Böylece doğru ve kesin tanı hastalık kontrolünde önemli bir yer tutmaktadır (Ramdial ve ark., 2016).

İsviçre'de kiraz ve vişnelerde antraknoz hastalığına karşı fungusitlerin etkinliği ve zamanı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Kirazlarda çiçeklenmeden sonra 10-14 gün arayla iki kez bakırlı fungusitlerin uygulanmasıyla antraknoza karşı etkinlik sağlanmıştır. Dithianon fungusitinin çiçeklenmeden sonra 2 hafta aralıklarla en az 2 kez uygulanmasının iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Polonya'da vişnede petal yapraklar dökülmeye başladıktan sonra 2 hafta aralıkla 3 uygulama yapılarak antraknoz oranı

azaltmıştır (Olszak ve Piotrowski,1985). Fungisitlerle yapılan 9 farklı ilaç içeren uygulamasında, thiophanate- methyl hariç, thiram, captan, carbendazim, mancozeb, dichlofluanid, etaconazole+captan, penconazole+captan ve bitertanol fungisitleri antraknoza karşı etkili bulunmuştur. Çek Cumhuriyeti'nde tebuconazole ile hasattan 1-2 hafta önce yapılan geç bir uygulama, vişne meyvelerinde antraknoz düzeyini azaltmıştır (Kloutvorova ve Egert, 2004).

Portakal 'da antraknoza neden olan *C. gloeosporioides*' e karşı QoI fungisitlerinin *in vitro* ve *in vivo* aktivitesini belirleme çalışmalarında; *C. gloeosporioides*'in 37 izolatu ve 3 farklı QoI fungusit (azoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin) kullanılmış ve besi ortamlarına salicylhydroxamic acid (SHAM) eklenmiştir. Bu çalışmada, QoI fungisitlere ön duyarlılık profili belirlenmiştir. Sicilya'da bahçelerden toplanan *C. gloeosporioides*'in 37 izolat EC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla SHAM eklenen ve eklenmeyen olarak azoxystrobin için 0.36-102 µgmL<sup>-1</sup>, trifloxystrobin için 0.047-0.49 µgmL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Pyraclostrobin'in EC<sub>50</sub> değerlerinin SHAM varlığında veya yokluğunda (sırasıyla 0.11 ve 0.14 µgmL – 1) benzerlik göstermiştir. 2013–2014 yılları arasında bahçede aynı fungusitler kullanılarak *in vivo* denemeleri yapıldıktan sonra derim öncesinde tatlı portakal üzerinde antraknoz enfeksiyonlarının, %83.7-92 ve hasat sonrası dönemde yaklaşık olarak %81-% 91.6 oranında azaldığı bildirilmiştir (Piccirillo ve ark., 2018).

Azoxystrobin, picoxystrobin, difenoconazole, thiophanate-methyl, mancozeb ve pyraclostrobin fungusitleri uzun yıllardır antraknoz hastalıklarının kontrol etmek için Çin'de kullanılmaktadır. Pyraclostrobin etken maddesi Çin' de 2016 yılında şili antaknozuna karşı kullanılmaya başlanmıştır. Bu fungusitlerin *C. acutatum*'un 40 izolatının misel gelişimine ve konidi çimlenmesine etkisi araştırılmış ve *in vivo* çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *In vitro* denemelerde pyraclostrobin ve azoxystrobin fungusun hem miselyal gelişimi hem de spor çimlenmesi, mancozeb ise sadece spor çimlenmesini ve difenoconazole ile thiophanate-methyl ise sadece miselyal gelişimin engellenmesinde etkili olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu fungusitlerin *C. acutatum*'u inhibe ettiğini göstermektedir. Pyraclostrobin sporlanmayı ve çim tübünün uzamasını engellediği belirlenmiştir. Pyraclostrobin'in inokulasyondan 72 saat kadar iyileştirici etki sağladığı ve 96 saate kadar ise koruyucu aktivite sağladığı gözlenmiştir. Ayrıca, tarla denemelerinde pyraclostrobin fungusitinin antraknozun oranını ve şiddetini azalttığı ve doğrudan da şilin pazarlanabilir verimini artırdığı saptanmıştır. Bu sonuçlar,

biber antraknozunun mücadelesi için pyraclostrobin fungisitinin yararlı bir kimyasal olduğunu kanıtlayan bir çalışma olmuştur (Gao ve ark., 2017) .

*Colletotrichum* türlerine karşı beş adet SDHI fungisitlerin engelleme etkisini belirlemek için yapılan çalışmada *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. cereale* ve *C. orbiculare*'nin izolatları, YBA agar besiyerinde fluxapyroxad, fluopyram ve boscalid'e karşı duyarlı bulunmuştur. Aksine, *C. orbiculare* hariç tüm izolatlar, penthiopyrad'a karşı nispeten duyarlı olarak tespit edilmiştir. Benzovindiflupyr tüm türlere karşı en yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. Bu fungusit, *C. orbiculare* ile inoküle edilmiş hıyar bitkilerinin yanı sıra elma ve şeftali meyvesinde *C. gloeosporioides* ve *C. acutatum* 'a karşı etkili bulunmuştur (Ishii ve ark., 2016).

Brezilya' da muzdan izole edilen *Colletotrichum musae* etmeninin thiophanate-methyl fungisitine karşı direncini belirlemek için yapılan çalışmada, *C. musae* 'nın 139 izolatının *in vitro* da thiophanate-methyl'e karşı duyarlılığı incelenmiştir. Miselyal gelişimde EC<sub>50</sub> değeri 0,003-48,73 µg / mL arasında değişkenlik göstermiştir. 0.003-4.84 µg / mL arasında değişen EC<sub>50</sub> değerleri ile 130 izolat duyarlı, 10,43-48,73 µg / mL arasında değişen EC<sub>50</sub> değerleri ile 9 izolat ise orta dirençli olarak gruplandırılmıştır. Ancak, dirençli ve yüksek dirençli izolat bulunamamıştır (Vieira ve ark., 2017).

Ülkemizde limonda Antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in DMI, SDHI, QoIs, amid, aniline ve dithiocarbamate gibi farklı kimyasal gruplardan farklı etki mekanizmalarına sahip bazı fungusitlere karşı duyarlılığını belirlemişlerdir. Farklı fungusitlerin *C. gloeosporioides*'in LC5 izolatının miselyal gelişimi engellemesi üzerine etkileri incelendiğinde, en düşük konsantrasyonlarda (0.01 µgml-1) en yüksek etkiyi gösteren fungusitler, sırasıyla fluopyram+tebuconazole, fluazinam, fluxapyroxad+difenoconazole ve dithianon+phosphorus acid %100-81.7 aralığında etkili bulunmuştur. Seçilen fungusitlerin konsantrasyonları yükseltildiğinde (10-100 µgml-1), tebuconazole, pyraclostrobin+metiram, kresoxim methyl ve dimethomorph+mancozeb %100-45.8 aralığında etki gösterebilmiştir. EC<sub>50</sub> değerleri üzerinden incelendiğinde en etkili fungusitlerin fluopyram+tebuconazole, fluxapyroxad+difenoconazole ve fluazinam'ın 0.001 µgml-1 EC<sub>50</sub> değerleri ile en etkili fungusitler olduğu belirlenmiştir. Konidiyal çimlenmesini engellemesi üzerine etkisi ve duyarlılığı incelendiğinde, 1 µgml-1 konsantrasyonun altında fungusun konidi çimlenmesinin fluopyram+tebuconazole, fluazinam, dithianon+phosphorus acid,

fluxapyroxad+difenoconazole ve kresoxim methyl+boscalid tarafından %90'a yakın değerlerde engellendiği saptanmıştır. Sonuç olarak en yüksek etkiyi, fluopyram+tebuconazole, fluazinam, fluxapyroxad+difenoconazole ve dithianon+fosforoz asit fungusitlerinin gösterdiği belirlenmiştir (Uysal ve Kurt, 2019).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada, antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum* izolatlarının elde edilmesinde hastalıklı bitki dokularının yüzey dezenfeksiyonu için %70'lik etanol, kültüre almak için patates dekstroz agar (PDA) besi ortamı ve steril kabin, izole edilen fungusun geliştirilmesi için inkübatör, kültürlerin saklanması için buzdolabı (+4°C), derin dondurucu (-80°C), morfolojik çalışmalar için patates dekstroz agar (PDA), Sentetik Nutrient Agar (SNA) ve Czapek dox agar (CDA) besi ortamları, stereo mikroskop ve DIC ataçmanlı trinoküler araştırma mikroskobu, moleküler çalışma için mini santrifüj, Qubit, ThermoCycler, Qiaxcel kapiler elektroforez, kütle spektrum analizleri için MALDI-TOF MS (matrix asisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry) gibi laboratuvar cihazları ve formik asit (FA), acetonitrile, trifluoroacetic asit (TFA), etil alkol gibi kimyasallar kullanılmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Hastalık Sürveyi

Antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum* türlerinin belirlenmesi ve örnekleme amacı ile 2016 (Eylül ve Kasım) 2017 (Ocak, Mart, Temmuz) yıllarında Mersin, Adana, Osmaniye ve Hatay illerini içine alan Doğu Akdeniz Bölgesi'nde limon, mandarin, portakal, altıntop, laym ve turunç gibi turunçgil tür ve anaçlarında sorvey çalışması yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yer alan turunçgil üretim alanlarında inceleme, gözlem ve örnekleme yapılan bahçelerin illere göre sayısal dağılımı



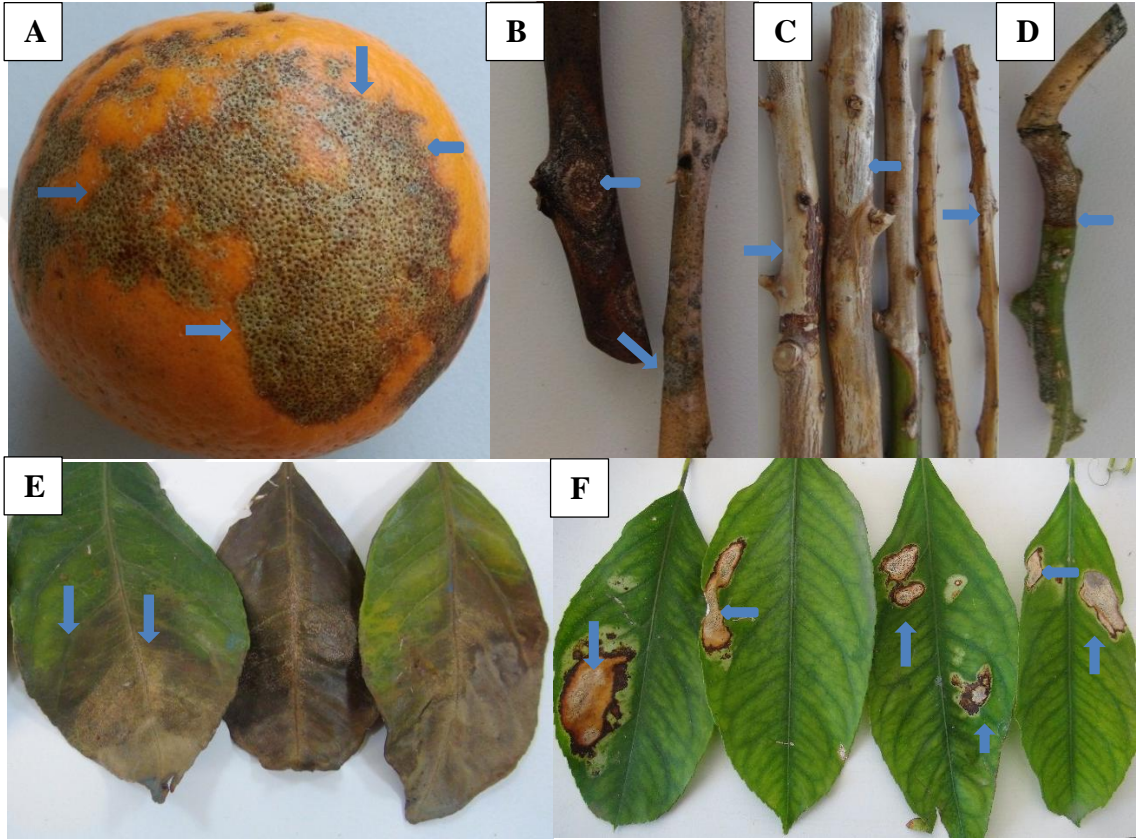
Bölgede sörvey yapılan 4 ilde 4.705 dekar alanda toplam 203 turunçgil bahçesinde incelemeler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1). Tesadüfi örnekleme yöntemine göre alınan her bir hastalıklı bitki örneği plastik torbalara yerleştirildikten sonra her bir bahçe için GPS bilgileri, bitki türü ve çeşidi kaydedilmiştir. Farklı illerde seçilen farklı turunçgil üretim alanlarından alınan hastalıklı bitki örnekleri, laboratuvara getirilerek izolasyonları yapılmıncaya kadar + 4° C’ de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Doğu Akdeniz Bölgesi’nde sörvey yapılan turunçgil alanlarında il düzeyinde dağılımı ve incelenen bahçe sayıları

Lokasyon	Ekim alanı(da)	Sörvey alanı(da)	İncelenen bahçe sayısı
<b>Adana</b>	<b>416.613</b>	<b>2.070</b>	<b>64</b>
Yüreğir	205.328	1.027	20
Seyhan	82.054	410	15
Kozan	76.093	381	8
Karataş	32.523	163	5
Yumurtalık	7.099	36	3
Ceyhan	4.367	22	3
Çukurova	4.017	20	3
İmamoğlu	1.624	8	5
Karaisalı	608	3	2
<b>Mersin</b>	<b>295.707</b>	<b>1.453</b>	<b>73</b>
Erdemli	93.220	466	22
Tarsus	85.157	426	12
Akdeniz	58.462	292	8
Silifke	22.525	113	20
Mezitli	20.942	105	6
Yenişehir	5.745	29	3
Toroslar	4.348	22	2
<b>Hatay</b>	<b>225.391</b>	<b>1.119</b>	<b>53</b>
Erzin	95.264	476	14
Dörtyol	72.670	363	18
Arsuz	25.671	128	5
Samandağ	18.482	92	9
Payas	4.730	24	3
Defne	4.635	23	2
Antakya	2.576	13	2
<b>Osmaniye</b>	<b>12.603</b>	<b>63</b>	<b>13</b>
Sumbas	4.977	25	5
Merkez	4.255	21	5
Toprakkale	1.620	8	1
Kadirli	940	5	1
Düziçi	811	4	1

### 3.2.2. *Colletotrichum* fungusunun izolasyonu

Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan sörveyler sırasında örneklenen ve antraknoz hastalığı ile enfekteli olduğundan kuşkulularak alınan hastalıklı bitkilerin yaprak, dal, sürgün ve meyvelerinden *Colletotrichum* türlerini izole etmek için bitki dokuları (Şekil 3.2), akan çeşme suyu altında yıkanmıştır.



Şekil 3.2. Hastalık etmeni fungusu belirlemek için laboratuvara getirilen enfekteli turunçgil organları; meyve (A), dal ve sürgünler (B), (C), (D), ve yaprak örnekleri(E), (F).

Enfeksiyon nedeni ile oluşmuş klorotik veya nekrotik dokuları içeren bitki parçaları, steril bir bistüri ile kesilmiştir. 4-5 mm büyüklüğündeki bu parçalar, % 75'lik etanolde 1 dakika süreyle yüzeyden dezenfekte edilmiştir (Zhang ve ark., 2015). Dezenfekte edilen bu doku parçaları, steril distile suda çalkalanıp durulandıktan sonra steril kurutma kağıtları arasında 1-2 saat kurumaya bırakılmıştır. Steril edilmiş bitki doku kesitleri içerisinde 250 mg/L oranında streptomisin sülfat eklenmiş PDA besi yeri içeren

petri kaplarına aktarılmıştır. Bu petri kapları, 25°C’de 5 gün boyunca inkübe edildikten sonra besi yerinde gelişen kolonilerden PDA’ya saflaştırmalar yapılmıştır (Aiello ve ark., 2015). Gelişen saf kolonilerden izolatların tek spor kültürleri hazırlandıktan sonra patojenisite kaybını önlemek için kuru steril filtre kâğıdında tanıları yapılmıncaya kadar -20°C’de ve 6 cm’lik petrilere PDA besi yerinde +4°C’ de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. Morfolojik Karakterizasyon

Turunçgil üretim alanlarından izole edilen ve tek spor kültürleri yapılan fungal izolatlar, Sutton, (1980) tarafından önerilen tür tanı anhatarlarından yararlanılarak tanımlanmıştır. Morfolojik parametreler, fungusun patates dekstroz agar (PDA), sentetik nutrient agar (SNA) ve czapek dox agar (CDA) besi yerlerinde koloni rengi, ters koloni rengi, apresoryum ve aservulus oluşumu, peritesyum üretimi, konidilerin şekil ve boyutları yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca izolatların eşeyli üreme yapılarına sahip olup olmadığı araştırılmıştır. *Colletotrichum*’un her bir türüne ait 20 izolat belirlenerek, bunların PDA ve CDA besi ortamlarındaki 1, 5, 7 ve 15 günlük koloni gelişimleri kaydedilmiştir. Bu amaçla, izolatların PDA besi yerinde 5 gün boyunca geliştirilen kolonilerinin kenar kısmından mantar delici yardımıyla alınan miselyal kesitleri, PDA ve CDA besi ortamları içeren petrilere (9 cm), miselyal kısım agar yüzeyine temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Her bir *Colletotrichum* izolatından 3 petri olacak şekilde kurulan denemede, kültürlerin 25 °C’de inkübasyonun 1, 5, 7 ve 15. gününde ortaya çıkan fungal koloni gelişimleri (mm) ölçülmüştür. Fungal izolatlarının konidilerinin, boyutlarını belirlemek için; PDA’da geliştirilen 7-10 günlük kültürlerden steril saf su ile spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Trinoküler araştırma mikroskobu (NİKON Eclipse Nİ-U Model Floresan DIC Ataçmanlı DS-Ri2) kullanarak 20 izolatın her birinden seçilen 35 konidinin boyutları (µm) kaydedilmiştir (Pardo-De la Hoz ve ark., 2015). Bununla birlikte *Colletotrichum* izolatlarının SNA besi yerinde oluşturduğu seta, aservulus, apresoryum şekilleri ve peritesyum yapıları (Agostini ve ark.,1992), 20 gün geliştirilen kültürlerden alınan en az 10 örnek ile trinoküler araştırma mikroskobunda (Şekil 3.3) yapılan inceleme ile kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.3. Antraknoz belirtileri gözlenen bitki dokularının stereo araştırma mikroskobu altında incelenmesi (A). *Colletotrichum* sp. türlerine ait mikroskobik yapıların trinoküler araştırma mikroskobu altında incelenmesi (B)

### 3.2.4. Moleküler Karakterizasyon

Turunçgil bitki tür ve çeşitlerinden izole edilen ve morfo-kültürel çalışmalarla karakterize edilen *Colletotrichum* izolatlarının kimliğini doğrulamak için PDA besi yerinde 5-7 gün boyunca geliştirilen fungal kültürlerden genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; kültürden alınan bir miktar fungal hif, 2 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak homojenizatör yardımıyla parçalanmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNeasy (250) Plant mini kit (QIAGEN) protokolü uygulanmıştır. Ekstrakte edilen genomik DNA'ların miktar ve kalitesi, Qubit 3.0 fluorometer cihazı ile ölçülmüştür. DNA kalitesi iyi olan örnekler için evrensel ve *Colletotrichum* için spesifik primerler kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. DNA amplifikasyonu için evrensel ve *Colletotrichum* için spesifik primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

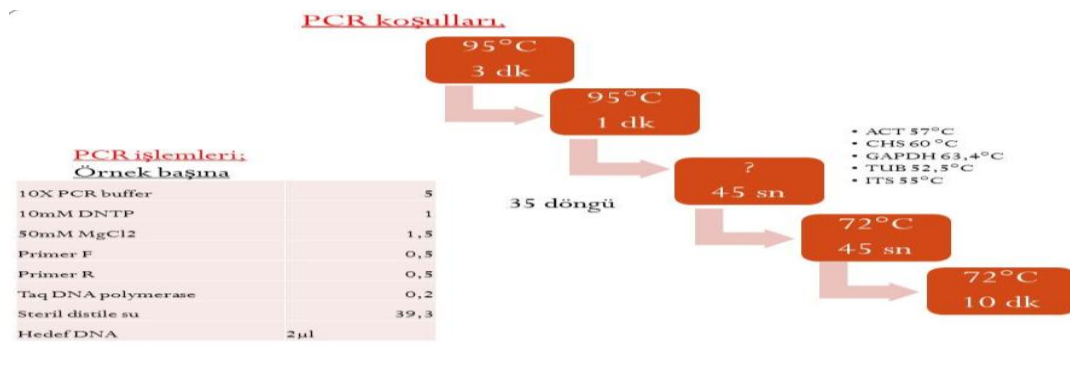
PCR amplifikasyon koşulları, 95°C' de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95°C' de 1 dk denatürasyon, annealing sıcaklığı Actin için 57°C, ITS için 55°C, GAPDH için 63,4°C, TUB2 için 52,5°C, CHS-1 için 60°C ile 72°C' de 45sn ve final adımı olarak 72°C' de 10 dk olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4). PCR ürünlerinin kalitesinin belirlenmesi için fungal DNA fragment analizi, Kapiler jel elektroforez (QIAGEN, QIAxcel Advanced system, Almanya) cihazı ile yapılmıştır. Bu amaçla, cihazda kartuş kartının kapillerleri için yıkama solüsyonları, cihaz içindeki bölmelerin ilgili yerlerine aktarılmıştır. Bunun için, WP kısma 8ml Qx Yıkama tamponu ve WI kısma yine aynı tampon çözeltiden 8ml aktarılmıştır. Bununla birlikte, BUF kısmına Qx DNA Separation tampondan 18ml eklenmiştir. Ayrıca, 12 adet tüpün herbirine 15µl Aligment marker ve üzerlerine 1 damla

mineral yağ eklenmiştir (Şekil 3.5). Son olarak, PCR örnekleri yerleştirilerek jel yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, cihaza ait QIAxcel Advanced ScreenGel yazılım programı kullanılarak DNA bantları değerlendirilmiştir.

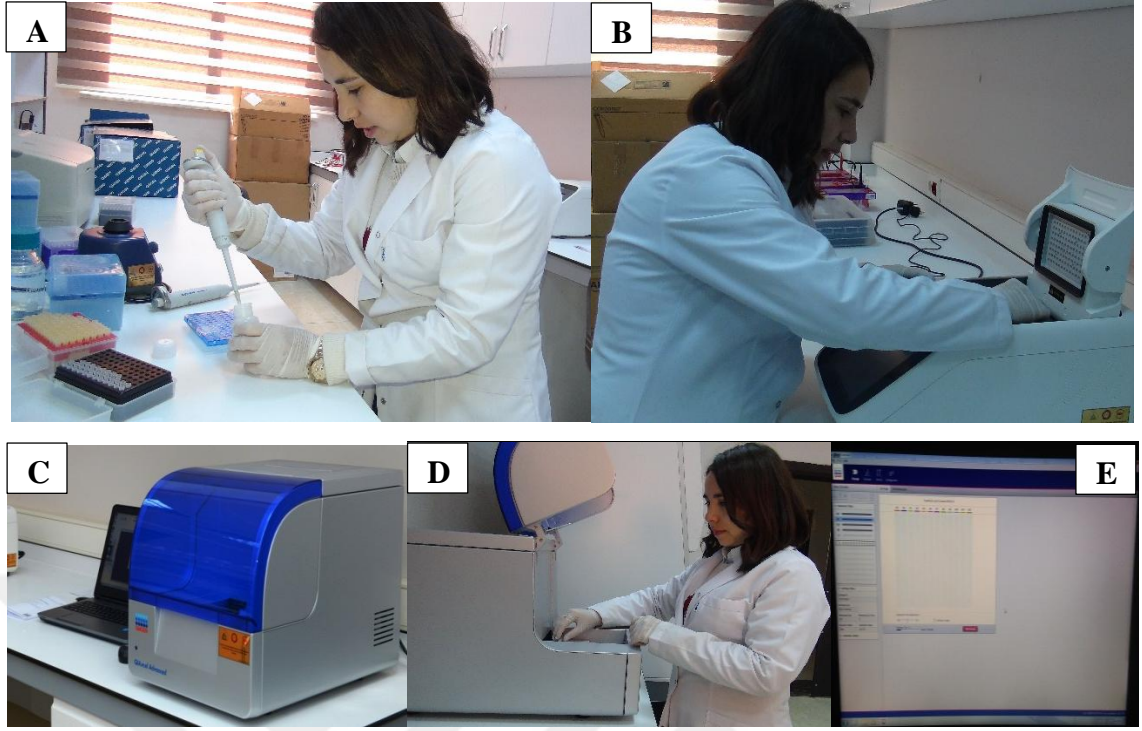
Çizelge 3.2. Multilokus dizi analizlerinde (MSLA) kullanılan evrensel ve farklı gen bölgelerine spesifik primerler hakkında ayrıntılı bilgi

Bağlanma Bölgesi	DNA fragment uzunluğu	Primer Adı	Nükleotid Dizilimi (5'→3') (Q- Bank)	Kaynak
Internal transcribed spacers (ITS) bölgesi	615bp	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	(White ve ark., 1990)
		ITS-4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
Actin (ACT) geni	316 bp	ACT-512F	5'-ATGTGCAAGGCCGTTTCGC-3'	(Carbone ve Kohn 1999)
		ACT-783R	5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3'	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) geni	308 bp	GDF1	5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	(Templeton ve ark., 1992)
		GDR	5'GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT	
Chitin synthase (CHS-1) geni	229 bp	CHS-79F	5'TGGGGCAAGGATGCTTGCAAGAAG	(Carbone ve Kohn 1999)
		CHS-345R	5'TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	
Beta Tubulin (TUB2) geni	716bp	Bt2b	5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'	(Glass ve Donaldson,
		T1	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGGC	

DNA amplifikasyonunda; her bir reaksiyon için 5 µl 10× enzim buffer, 10mM dNTP, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5µl primer, 0,2 µl Taq DNA polimeraz ve 2 µl(ng) DNA ile toplam 50µl olacak şekilde üzeri steril saf su ile tamamlanmıştır.



Şekil 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için örnek başına karışımlar ve amplifikasyon için belirlenen koşullar



Şekil 3.5. *Colletotrichum* kültürlerinden Plant mini kit ile genomik DNA izolasyonu (A) PCR amplifikasyonu (B), QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme cihazı (C), QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme cihazı kuyucuklarına PCR örneklerinin yerleştirilmesi (D), QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme cihazı yazılım programında jel görüntüleme çalışmaları (E)

Elde edilen DNA bandların kalitesine göre seçilen PCR ürünlerinin dizileme işlemi için, bu hizmeti veren özel bir firmadan hizmet alınmıştır. *Colletotrichum* izolatlarının PCR ürünlerine ait DNA nükleotid dizileri, NCBI (National Center for Biotechnology Information) kütüphanesinde yer alan BLASTn algoritmasını kullanarak (Boratyn ve ark., 2013) gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre tanısı yapılan izolatların, NCBI Genbankası kütüphanesinden erişim numaraları alınmıştır. *Colletotrichum*'un farklı türlerine ait izolatları, referans izolatlarla karşılaştırmak için (Çizelge 3.3), MEGA 7 programını kullanarak ITS, Actin, GAPDH, CHS-1 genleri için akrabalık derecelerine göre tekli ve birleştirilmiş halde moleküler filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir.

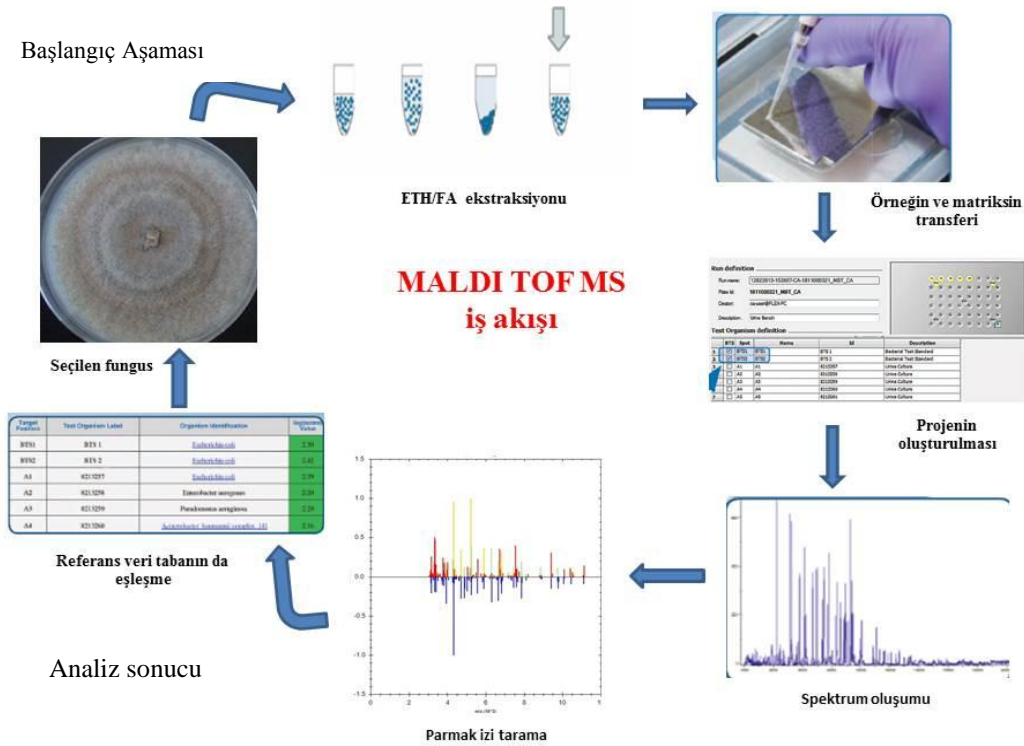
Maksimum likelihood yöntemi kullanılarak izolatlar arasındaki genetik mesafeyi gösteren dendrogram oluşturulmuş ve elde edilen filogenetik ağacın teyidi, 1000 tekrarlı olarak (Bootstrap, p-distance, pairwise deletion) yapılmıştır (Kumar ve ark., 2016).

Çizelge 3.3. NCBI veri tabanından alınarak filogenetik analizlerde kullanılan referans izolatlara ait konukçu bitki, kökeni ve Genbankası kayıtları

Tür	Kültür No.	Konukçu Türü	Menşei	GenBank erişim numaraları			
				ITS	ACT	GAPDH	CHS-1
<i>Colletotrichum acutatum</i>	CBS 142407 CPC 27005	<i>Citrus sinensis</i>	İtalya, Messina	KY856397	KY855968	KY856221	KY856133
<i>C. boninense</i>	GZAAS5.09505	<i>Citrus medica</i>	Çin	JQ247622	JQ247646	JQ247598	-
<i>C. citri</i>	CBS 134233	<i>Citrus aurantiifolia</i>	Çin	KC293581	KY855973	KC293741	KY856138
<i>C. citricola</i>	CBS 134228	<i>Citrus unchiu</i>	Çin	KC293576	KC293616	KC293736	KY856140
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 112999	<i>Citrus sinensis</i>	İtalya	JX010152	JX009531	JX010056	JX009818
<i>C. helleniense</i>	CPC 27108	<i>Citrus reticulata</i>	Yunanistan, Arta	KY856449	KY856022	KY856273	KY856189
<i>C. hystrix</i>	CBS 142411 CPC 28153	<i>Citrus hystrix</i>	İtalya, Catania	KY856450	KY856023	KY856274	KY856190
<i>C. johnstonii</i>	CBS 128532	<i>Citrus sp.</i>	Yeni Zelanda	JQ948443	JQ949764	JQ948774	JQ949104
<i>C. karstii</i>	CPC 27999	<i>Citrus limon</i>	Portekiz, Faro	KY856464	KY856037	KY856288	KY856205
<i>C. limetticola</i>	CBS 114.14	<i>Citrus aurantiifolia</i>	ABD, Florida	JQ948193	JQ949514	JQ948523	JQ948854
<i>C. limonicola</i>	CPC 27862	<i>Citrus limon</i>	Malta, Gozo	KY856473	KY856046	KY856297	KY856214
<i>C. novae-zelandiae</i>	CPC 27957	<i>Citrus limon</i>	Malta, Gozo	KY856478	KY856051	KY856302	KY856219
<i>C. tropicicola</i>	BCC 38877	<i>Citrus maxima</i>	Tayland	JN050240	JN050218	JN050229	-
<i>C. truncatum</i>	CBS 134232	<i>Citrus limon</i>	Çin	KC293580	KC293620	KC293740	KY856220
<i>C. fructicola</i>	CBS 238.49	<i>Ficus edulis</i>	Almanya	JX010181	JX009495	JX009923	JX009839
<i>C. asianum</i>	CBS 130418	<i>Coffea arabica</i>	Tayland	FJ972612	JX009584	JX010053	JX009867
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949	<i>Theobroma cacao</i>	Panama	JX010264	JX009489	JX010007	JX009870
<i>C. catinaense</i>	CBS 142416 CPC 28019	<i>Citrus sinensis</i>	Portekiz, Mesquita	KY856399	KY855970	KY856223	KY856135
<i>C. abscissum</i>	COAD 1876	<i>Citrus sinensis</i>	Brezilya	KP843124	KP843139	KP843127	KP843130
<i>C. constrictum</i>	CBS 128504	<i>Citrus limon</i>	Yeni Zelanda	JQ005238	JQ005586	JQ005325	JQ005412
<i>Phyllosticta paracitricarpa</i>	CPC 27	<i>Citrus limon</i>	Hollanda	KY855635	-	-	-
<i>Magnaporthe oryzae</i>	12.1.315	<i>Triticum aestivum</i>	Hollanda Brezilya	-	KY855690	-	-

### 3.2.5. MALDI-TOF MS (Matrix asisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry) Analizleri

Turunçgil üretim alanlarından elde edilen *Colletotrichum* türlerine ait izolatlar, PDA ortamında 5-7 gün süre ile geliştirilmiştir. Gelişen kültürler, Uysal ve ark. 2018'deki şekilde ortalama 8ml PDB (patates Dekstroz broth) sıvı besi yeri içeren tüplere aktarılmış ve rotatörde 2-3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra MALDI TOF MS analizleri için formik asit+etanol ekstraksiyon işlemlerine geçilmiştir. Bu amaçla, rotatörde geliştirilen sıvı besiyerindeki kültürden 1.5 ml eppendorf tüpüne aktarılmıştır (Şekil 3.6). Hazırlanan örnek, 13000 rpm' de 2 dk. santrifüj edildikten sonra, pellet dipte kalacak şekilde sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine HPLC değerinde 1ml saf su eklenip işlem tekrarlandıktan sonra peletin üzerine 300 µl HPLC değerinde saf su ekleyip vortekslenmiştir. Örneğe, 900 µl etanol ekleyip vortekslenmiş ve 13000 rpm' de 2 dk. santrifüj edildikten sonra etanol tamamen uzaklaştırılmış ve 37°C'de 5-10 dk. kurumaya bırakılmıştır.

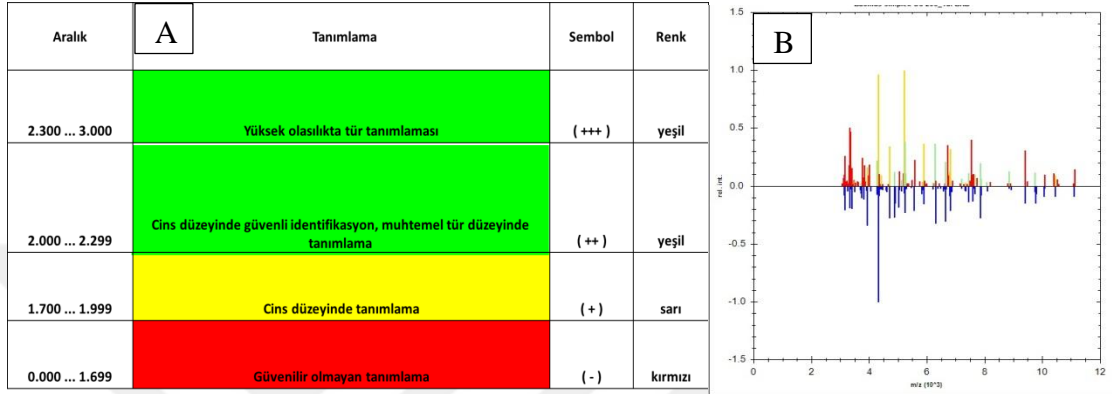


Şekil 3.6. MALDI-TOF MS analiz tekniğinde iş akışını gösteren diagram

Kuruyan pelletin üzerine aynı miktarlarda olacak şekilde, %70'lik formik asit ve asetonitril eklenip tekrar vortekslenmiştir. Son aşama olarak, 13000 rpm' de 2 dk. santrifüj işleminden sonra üste bulunan sıvı kısımdan 1µl alınıp, MALDI-TOF MS

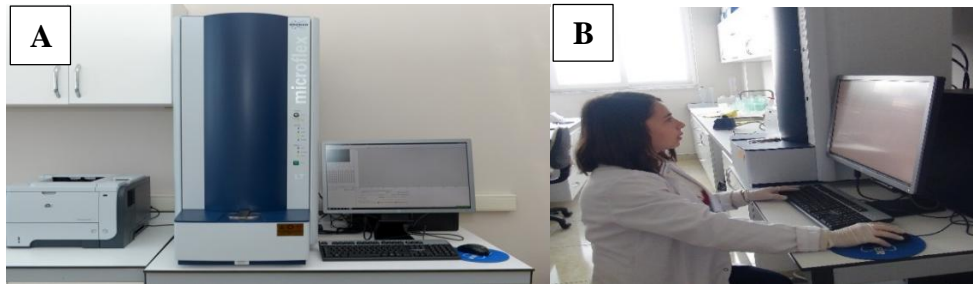


pleytinin kuyucuklarına yüklenerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örneğin üzeri, HCCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) matris sıvısı ile kaplandıktan sonra cihaza yüklenmiştir. Flex control yazılım programı ile elde edilen spektrumlar, MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) yazılımı ile karşılaştırılarak tanı işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. MALDI TOF MS cihazında MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programındaki tanı skalası (A) ve *Colletotrichum* izolatlarının protein profillerinin kütle spektrumları (B)

Analiz sonucunda; 2.300-3.000 (yeşil renk) arası skor değeri olasılığı, yüksek tür teşhisi; 2.000-2.299 (yeşil renk), güvenilir, cins düzeyinde ve muhtemel tür düzeyinde teşhis; 1.700-1.999 (sarı renk); muhtemel cins düzeyinde teşhis; 0.000-1699 (kırmızı renk), güvenilir teşhis olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. MALDI TOF MS cihazı (A) ve örnek analiz çalışmaları (B)

Bu çalışma sonucunda, fungusun birden fazla gen bölgesinin dizi analizleri ile birlikte morfolojik karakteristik özellikler, patojenisite denemeleri ve MALDI -TOF MS analiz sonuçlarına göre tanıları gerçekleştirilen *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerine

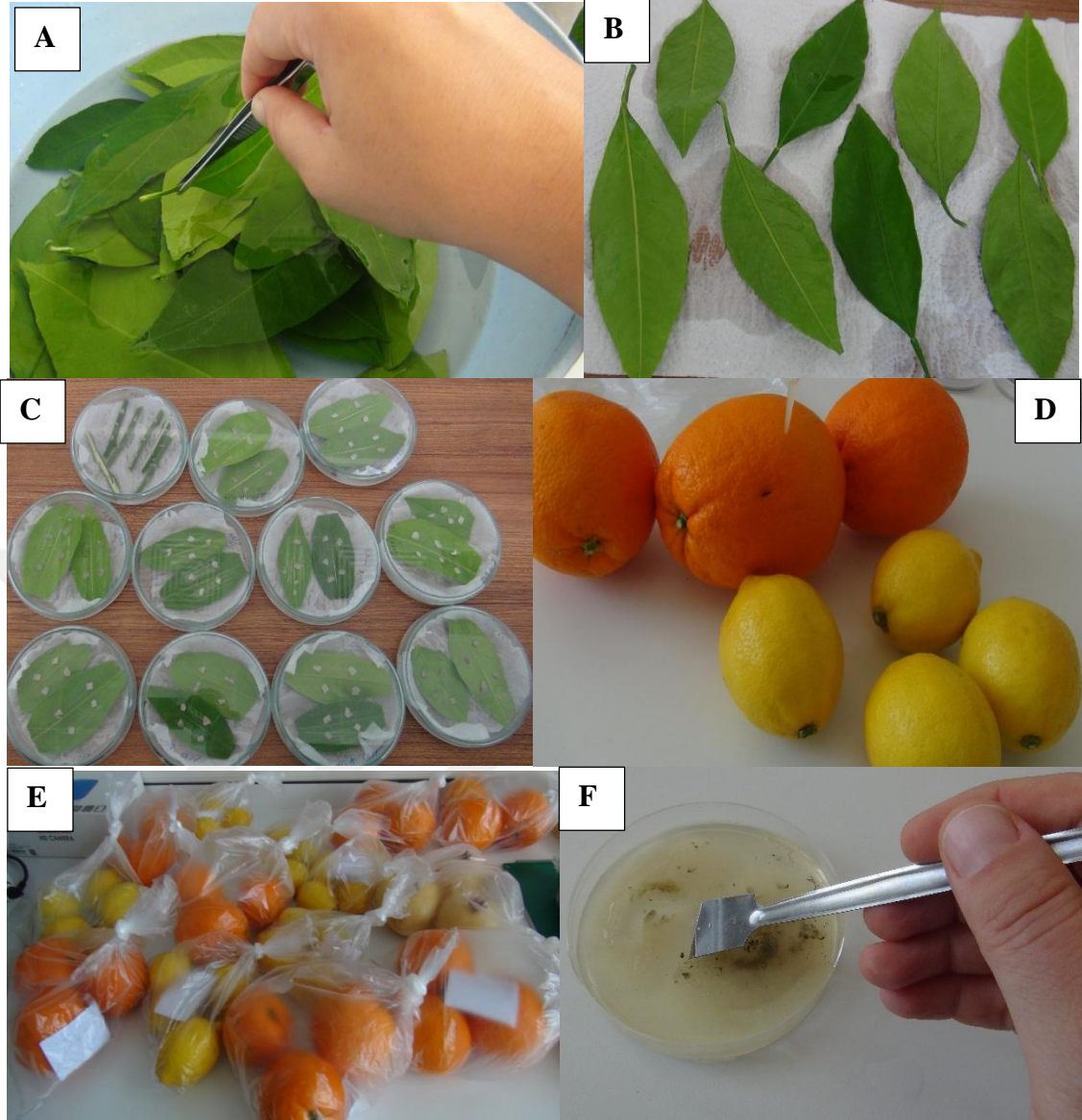
ait izolatların saf kültürleri, Hatay MKÜ BİSAK Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin kültür koleksiyonun özgün kodları ile saklanmaktadır.

### 3.2.6. Patojenisite Çalışmaları

Patojenisite çalışmaları 3 farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

(i) Yaprak ve sürgün uygulaması için; öncelikle sürgün ve yapraklar %5'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile dezenfekte edilip, steril saf su ile durulanmış ve fanlı kuru hava akımı uygulanarak kurutma kağıtları üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Bu yaprak ve sürgünler, içerisinde steril kurutma kağıdı bulunan petri kaplarına aktarılmış ve bunların üzerine, PDA besi yerinde 7 gün boyunca geliştirilen fungus kültürlerinden alınan, 5mm çapındaki miselyal diskler yerleştirilmiştir. Petri kapakları parafilm kullanılarak kapatılmış ve 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.9; A-B). İnkübasyondan 15 gün sonra lezyon alanları ölçülerek hastalık şiddetleri belirlenmiştir.

(ii) Meyve uygulaması için; Washington portakal ve Interdonato limon meyveleri, öncelikle %5'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile dezenfekte edilip steril saf su ile durulandıktan sonra fanlı kuru hava akımı uygulanarak kurutma kağıtları üzerinde kurumaya bırakılmıştır. İnokulasyon için kuruyan meyvelerin ekvatorial bölgelerine 5×5 mm çapında 3 adet yara açılmıştır. Spor süspansiyonunu hazırlamak için, fungal kültürü içeren petri kabına steril saf su eklenmiş ve miselyum yüzeyinden spatula yardımı ile kazıma yapılarak sporların suya geçmesi sağlanmıştır. Konidiyal süspansiyon, sporları miselyal parçalardan ayırmak için 2 katlı tülbentten süzülerek elde edilmiştir. *Colletotrichum* izolatlarının fungal PDA kültüründen hazırlanan spor süspansiyonu, haemocytometer yardımı ile  $1 \times 10^6$  konidi/ml konsantrasyona ayarlanmıştır. İnokulasyon işlemi, pipet yardımıyla her bir yaraya spor süspansiyonundan 50 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Deneme, Tesadüf Parselleri Deneme Deseninde 3 tekrarlı, her bir tekrarda 3 meyve olacak şekilde kurulmuştur. Kontrol meyvelere ise steril saf su uygulaması yapılmıştır. İnoküle edilen ve kontrol meyveler, polietilen torbalar içinde oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.9; C-D). İnokulasyondan 15 gün sonra meyvelerin hastalık şiddetleri ve lezyon alanları kaydedilmiştir.



Şekil 3.9. Turunçgil yapraklarının NaOCl (% 5) ile dezenfeksiyonu (A,B), kuruyan yaprakların petrilere yerleştirilmesi (C), ekvatorial bölgelerinden yara açılan meyvelere spor süspansiyonu inokulasyonu (D), spor süspansiyonu inoküle edilen meyvelerin polietilen torbalarda inkübasyonu (E), spor süspansiyonu hazırlanması (F)

(iii) Mandarin fidanlarına uygulama için; 6-8 aylık fidanlara spor süspansiyonu ile püskürtme şeklinde inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Deneme, Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre her tekrarda bir sürgün olmak üzere 3 tekrarlı olacak şekilde düzenlenmiştir. *Colletotrichum* izolatlarının  $1 \times 10^6$  konidi/ml konsantrasyona ayarlanmış spor süspansiyonları uygulanan fidanlar, polietilen torbalarla kapatılmıştır. Kontrol bitkilere sadece steril saf su uygulanmıştır. Polietilen torbalarla 2 gün kapalı tutulan fidanlar açılarak, doğal yetiştirme ortamında gelişmeye bırakılmıştır. İnokulasyondan bir

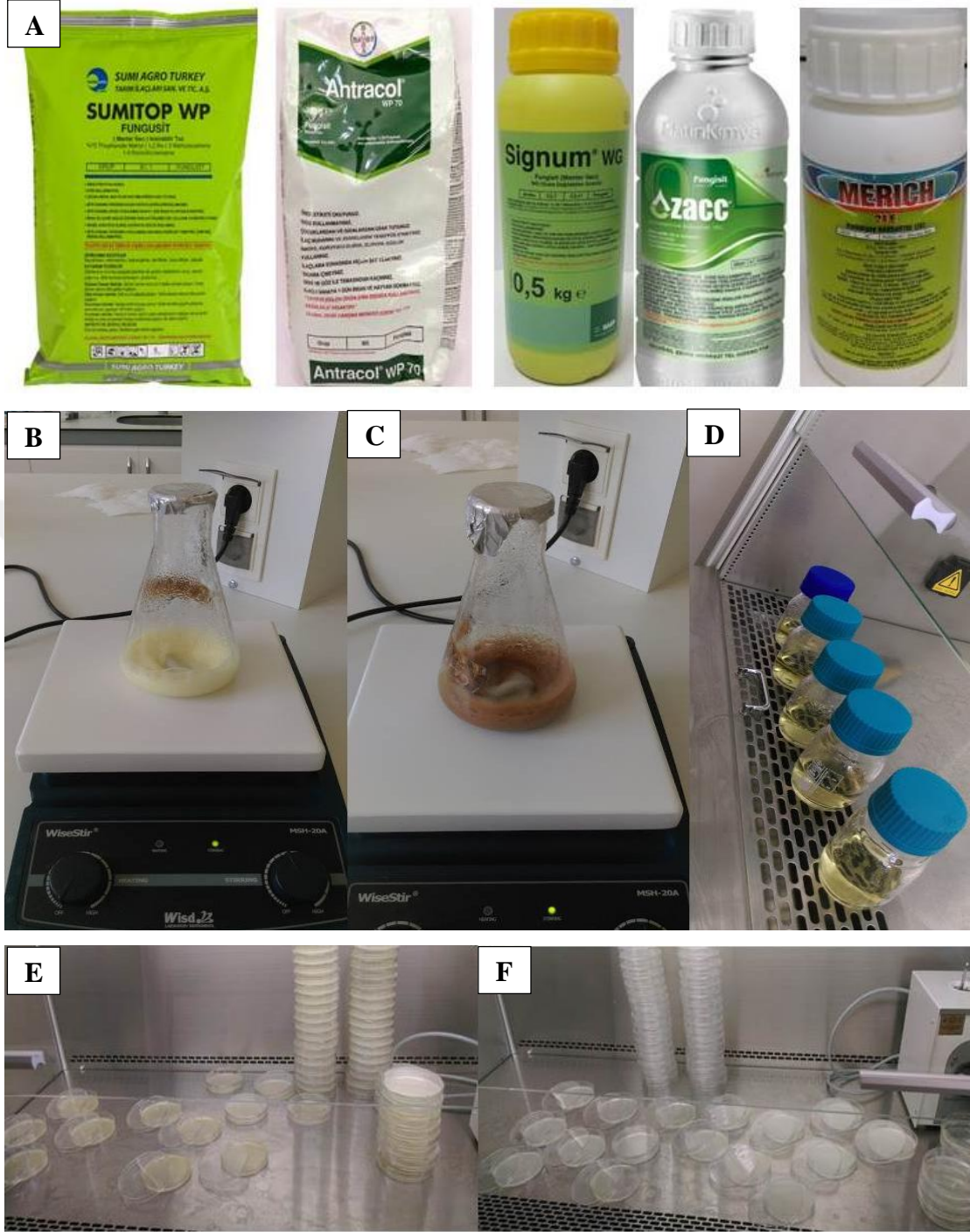
ay sonra, her bir izolat için hastalık oranı (%) [HO=(enfekteli inokulasyon noktası/toplam inokulasyon noktası)×100] formülüyle hesaplanmıştır (Guarnaccia ve ark. 2017). Tüm deneme sonuçlarında elde edilen veriler, SPSS istatistik yazılım program ile analiz edilmiş ve ortalamalar, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre karşılaştırılmıştır.

### 3.2.7. *Colletotrichum gloeosporioides* İzolatının Seçilen Fungisitlere Karşı *in vitro* Duyarlılık Denemeleri

Çalışmada kullanılan fungisitler (Çizelge 3.4); bakırlı fungisitler sınıfından bakır oksiklorür (Mass Bakır), dithiocarbamate'lerden propineb (Antracol), strobilurin sınıfından trifloxystrobin (Tugart), boscalid + pyraclostrobin (Signum) ve azoxystrobin (Ozacc), triazole'lerden, myclobutanil (Merich), benzimidazole'lerden carbendazim+chlorothalonil (Agricarde) ve thiophanate methyl (Sumitop) denemeye alınmıştır (Şekil 3.10). Denemenin bu aşamasında, *Colletotrichum gloeosporioides* türüne ait virülensliği yüksek olan LC5 izolatı kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. *In vitro* etkinlik denemelerinde kullanılan fungisitler, içerdikleri etken maddeler ve özellikleri

Ticari İsim	Firma	Etken Madde ve Oranı	Formulasyon
AGRICARDE	AGRIFERM	Carbendazim+ chlorothalonil (100g/L+450g/L)	SC
SIGNUM	BASF	Boscalid+ pyraclostrobin (%26,7+%6,7)	WG
TUGART	GÜNER	Trifloxystrobin (% 50)	WG
MERICH 24 E	AR -TEC	Myclobutanil 245 g	EC
SUMITOP	SUMI AGRO	Thiophanate Methyl % 70	WP
ANTRACOL	BAYER	Propineb % 70	WP
OZACC	PLATİN AGRO	Azoxystrobin 250 g/l	SC
MASS BAKIR	ERTAR	Metalik bakıra eşdeğer bakıroksiklorür % 50	WP



Şekil 3.10. *In vitro* etkinlik denemelerinde kullanılan ticari fungusit preparatları (A), steril suya eklenmiş fungusit solüsyonları, fungusit solüsyonları (B,C), 50 C°' ye kadar soğutulmuş PDA besi ortamları (D), fungusit eklenmiş PDA besi yerleri(E,F).

### 3.2.7.1. Miselyal Gelişim Denemesi

Çalışmada yer alan fungusitlerden farklı konsantrasyonlarda bakır oksiklorür (0.01,

0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100), propineb (0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10, 50), trifloxystrobin (0.01, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100), myclobutanil (0.001, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01), azoxystrobin (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10), thiophanate methyl (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1), boscalid + pyraclostrobin (1, 3, 5, 10, 40, 50), carbendazim+ chlorothalonil (0.001, 0.005, 0.01, 0.05) içeren katı besi ortamlarında radyal gelişmeyi ölçerek miselyal gelişimin engellenme oranı (%) saptanmıştır. *Colletotrichum*'nin tüm fungusitlere duyarlılığını belirlemek için standart olarak PDA kullanılmıştır. Her bir fungusitin belirli konsantrasyonları, 50°C' ye soğutulmuş PDA ortamına karıştırılmış ve petri kaplarına (15x100mm) dökülmüştür. Kontrol olarak herhangi bir fungusit içermeyen PDA'lı petriler kullanılmıştır. PDA' da 20°C'de 3 gün süreyle aktif olarak geliştirilmiş *Colletotrichum* kolonilerinin kenarlarından kesilmiş 5 mm çapındaki miselyal diskler mantar delici yardımı ile alınmış ve yaklaşık 10 ml PDA içeren Petri kaplarının orta kısmına miselyal kısım alta gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Kültürler, karanlıkta 20°C'de 3-7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca ortalama koloni çapları ölçülerek günlük radyal gelişme hesaplanmıştır. Deneme, her bir izolat fungusit konsantrasyonu için 3 kez tekrarlanmıştır.

### 3.2.7.2. Konidiyal Çimlenme Denemesi

Seçilen fungusitlerin *Colletotrichum gloeosporioides* izolatının konidi çimlenmesi üzerine etkisini belirlemek için, bakır oksikolorür (0.5, 1, 10, 50, 100), propineb (0.1, 0.5, 1, 3), trifloxystrobin (0.1, 0.5, 1, 3, 5), myclobutanil (0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.03), azoxystrobin (0.1, 0.3, 1, 3, 5), thiophanate methyl (0.5, 1, 3, 5, 10, 20), boscalid + pyraclostrobin (0.3, 0.5, 1, 2), carbendazim+ chlorothalonil (0.001, 0.003, 0.005, 0.008, 0.01)'in belirlenen konsantrasyonları uygun hacimleri su agarı (WA) besi yerine eklenmiştir. Her biri, 10 ml WA içeren Petri kaplarına 10µl konidi süspansiyonu damla halinde pipetle damlatılmıştır. Tüm denemeler, ayrı Petri kaplarında tekrar olacak şekilde her bir konsantrasyon için her bir izolatın 3 tekrarını içermiştir. Ayrıca fungusit uygulanmamış 3 tekrarlı kontrol Petri kapları oluşturulmuştur. Daha sonra konidileri çimlenmeye bırakmak için Petri kapları, karanlıkta 20°C' de 14-18 saat bekletilmiştir. Çimlenme oranı, bir konidinin en az 3 katı uzunluğa sahip ve normal görünümlü çim tüpleri içeren 100 konidi sayılarak belirlenmiştir.

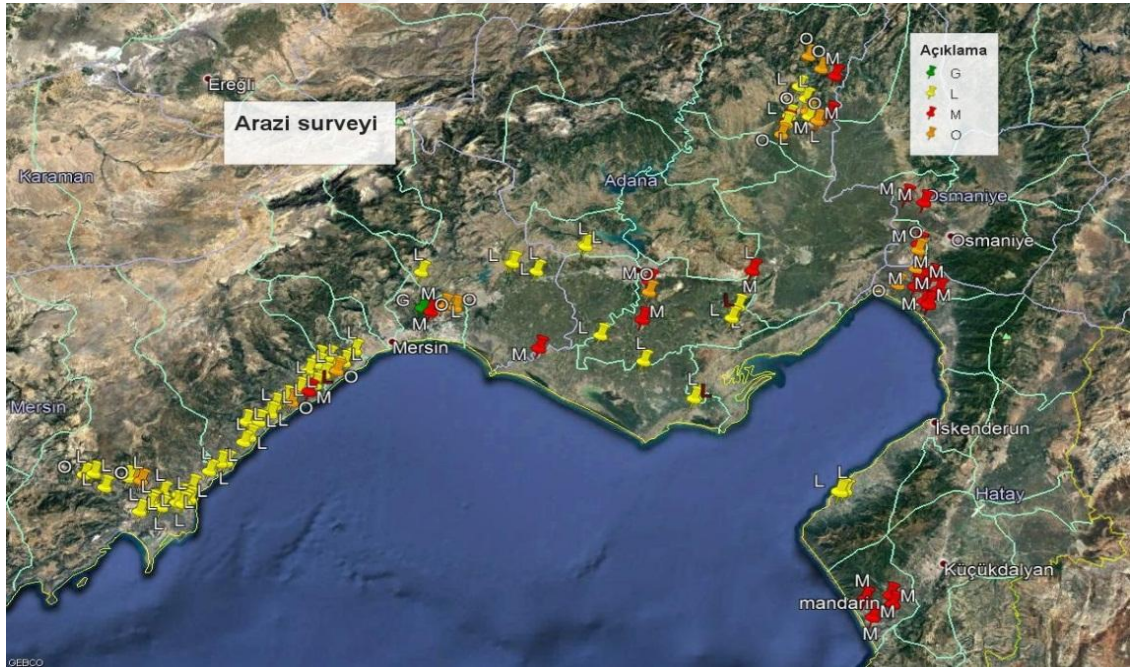
Denemeler, tesadüf parselleri deneme deseninde kurulmuş ve elde edilen tüm veriler, varyans analizine tabi tutularak ortalamalar, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $P>0.05$ ) karşılaştırılmıştır. Her bir fungusitin farklı konsantrasyonlarındaki etkinlikleri, Abbott formülü ile hesaplanmıştır. Bununla birlikte *Colletotrichum*'ın her bir izolatının  $EC_{50}$  değeri (spor çimlenmesi veya miselyal gelişimi %50 oranında azaltan etkili konsantrasyon), SPSS istatistik programı ile  $\log_{10}$  fungusit konsantrasyonuna karşı gelişimin engellenme oranı üzerinden regresyon analizi yapılarak hesaplanmıştır. Fungisit konsantrasyonları  $\mu\text{g}$  etken madde (e.m.)  $\text{ml}^{-1}$  olarak ifade edilmiştir.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Hastalık Sörveyi ve *Colletotrichum* Etmeninin İzolasyonuna Ait Sonuçlar

Çalışmanın yürütüldüğü Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yer alan Adana, Hatay, Mersin, Osmaniye illerinin turunçgil üretim alanlarında (Şekil 4.1) farklı tür ve çeşitlerde antraknoza neden olan *Colletotrichum* türlerinin ve bu türlerin genetik varyasyonun belirlenmesi amacı ile 203 bahçede hastalık örneklemeleri yapılmıştır. Sörvey yapılan 126 bahçede antraknoz hastalığı saptanmıştır (Çizelge 4.1). Hastalıklı bahçelerin illere göre dağılımı incelendiğinde, en fazla hastalık 58 adet bahçe ile Mersin'de belirlenirken, bunu 37 ile Hatay ve 25 bahçe ile Adana izlemiştir.



Şekil 4.1. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sörvey çalışmaları yapılan turunçgil üretim alanlarından elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının turunçgil türlerine göre dağılımları (G: Altıntop (Grapefruit); L: Limon; M: Mandarin; O: Portakal)

Söz konusu illerde limon, portakal, mandarin, ve altıntop gibi turunçgil türlerinde sürgünlerde uçkurutan benzeri ve geriye doğru kuruma, yapraklarda ve meyvelerde antraknoz lezyonlarını andıran belirtiler gösteren bitkilerden alınan örneklerden izolasyonlar yapılmıştır. Sonra, tanı işlemleri sonucuna göre antraknoz hastalığının Doğu



Akdeniz Bölgesi'nde toplam % 62,1 oranında yaygınlık gösterdiği saptanmıştır. Hastalık yaygınlık oranlarının iller düzeyindeki dağılımları incelendiğinde, antraknoz % 79,5 ile en fazla Mersin'de yaygın bulunurken, en az % 39,1 ile Adana'da tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu noktada dikkat çekici bir şekilde, Adana'da incelenen bahçe sayısı, Mersin iline yakın olmasına rağmen hastalık yaygınlığının daha az olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sorvey yapılan turunçgil alanlarında il düzeyinde antraknoz hastalığı yaygınlığı

Lokasyon	İncelenen bahçe sayısı	Hastalıklı bahçe sayısı	Hastalık yaygınlığı (%)
Yüreğir	20	5	25
Seyhan	15	2	13,3
Kozan	8	7	87,5
Karataş	5	4	80
Yumurtalık	3	-	0
Ceyhan	3	-	0
Çukurova	3	-	0
İmamoğlu	5	5	100
Karaisalı	2	2	100
<b>Adana</b>	<b>64</b>	<b>25</b>	<b>39,1</b>
Erdemli	22	22	100
Tarsus	12	5	41,7
Akdeniz	8	5	62,5
Silifke	20	19	95
Mezitli	6	6	100
Yenişehir	3	1	33,3
Toroslar	2	-	0
<b>Mersin</b>	<b>73</b>	<b>58</b>	<b>79,5</b>
Erzin	14	9	64,3
Dört Yol	18	17	94,4
Arsuz	5	2	40
Samandağ	9	9	100
Payas	3	-	0
Defne	2	-	0
Antakya	2	-	0
<b>Hatay</b>	<b>53</b>	<b>37</b>	<b>69,8</b>
Sumbas	5	1	20
Merkez	5	5	100
Toprakkale	1	-	0
Kadirli	1	-	0
Düziçi	1	-	0
<b>Osmaniye</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>46,1</b>
<b>DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ</b>	<b>203</b>	<b>126</b>	<b>62,1</b>

Bölgede turunçgil bahçelerinden alınan hastalıklı örneklerden yapılan izolasyonların sonucuna göre *Colletotrichum* izolatları elde edilmiş ve bunların illere göre

dağılımları ortaya konmuştur. Sonuçta, Mersin’de en fazla *Colletotrichum* izolatu (Çizelge 4.2) Erdemli ve Silifke ilçelerinde tespit edilmiştir. Toplam 59 izolattan 51’i limon, 3’ü mandarin, 4’ü portakal ve biri de altıntop’tan elde edilmiştir. Bu durumun, Mersin’de limon üretim alanlarının daha geniş ve hastalığın bu alanlarda uzun süredir yerleşik olduğundan kaynaklanmış olabileceği kanısını uyandırmaktadır.

Adana’da en fazla antraknoz izolatu Karaisalı, Kozan, Karataş ve İmamoğlu ilçelerindeki sörvey yapılan bahçelerden elde edilmiştir. Özellikle, Yüreğir ve Seyhan ilçelerinde incelenen bahçe sayısı fazla olmasına rağmen hastalıklı bahçe sayısı oldukça az bulunmuştur. Bu durumun, Adana’daki turunçgil üretiminin kapama bahçe şeklinde ve daha geniş bir alanda yapılması ve bakım işlemlerinin daha bilinçli bir şekilde yapılmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, toplanan *Colletotrichum* izolatların 16’sının limon, 4’ü mandarin, 4’ü portakal, biri de turunçtan elde edilmiştir. (Çizelge 4.3). Osmaniye’de yapılan sörveylerde ise incelenen 13 bahçeden 6’sında antraknoz hastalığı saptanmıştır. Elde edilen izolatlar mandarin ve portakal türlerinden eşit sayıda bulunmuştur (Çizelge 4.3).

İzolasyonlar sonucuna göre *Colletotrichum* izolatlarının Hatay ilindeki dağılımı değerlendirildiğinde ise, incelenen bahçelerde antraknoz hastalığının en fazla ortaya çıktığı ilçeler olan Dört Yol, Erzin ve Samandağ’da tespit edilmiştir. Hatay’da turunçgil üretimin en fazla yapıldığı bu ilçelerde hastalık yaygınlığının da fazla olması, izolatlar yönünden şaşırtıcı olmamıştır. Ayrıca, il düzeyinde toplanan *Colletotrichum* izolatlarının 6’sı limon, 30’u mandarin ve biri portakaldan elde edilmiştir. Hastalık yaygınlığının mandarin türünde daha fazla görülmesi, bu ilçelerde mandarin üretiminin daha yoğun yapılmasından kaynaklanmaktadır (Çizelge 4.4).

Çalışma kapsamında bu aşamada, elde edilen sonuçlara göre Doğu Akdeniz Bölgesi’nden toplanan *Colletotrichum* izolatlarının 73’ü limon, 48’i mandarin, 13’ü portakal, birisi altıntop ve birisi de turunçtan elde edilmiştir. Sörveyler sonucunda toplanan *Colletotrichum* izolatları, turunçgil türlerinin en fazla sürgün ve yapraklarından temin edilmiştir.

Çizelge 4.2. Mersin ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

İzolot Adı	Lokasyon	GPS koordinatları	Turunçgil türü	Turunçgil çeşidi	Alınan bitki organları		
					Sürgün	Yaprak	Meyve
LC1	Silifke	N 36° 26' 09.487" E 33°46' 48. 044"	Limon	Yediveren	+		
LC4	Tarsus	N 36° 52' 07.753" E 34°47' 36.212"	Limon	Interdonato	+		
LC12	Tarsus	N 36° 52' 07.753" E 34°47' 36. 212"	Limon	Yediveren	+		
LC10	Erdemli	N 36° 36' 50.694" E 34°17' 03.338"	Limon	Interdonato			+
LC6	Erdemli	N 36° 36' 50.694" E 34°17' 03.338"	Limon	Yediveren	+		
LC7	Erdemli	N 36° 37 59. 156" E 34° 19 01.768"	Limon	İnterdonato	+		
LC13	Erdemli	N 36° 37 59. 156" E 34° 19 01.768"	Limon	Yediveren			+
LC14	Yenişehir	N 36° 39' 59.098" E 34°23' 51.779"	Limon	İtalyan Memeli		+	
LC16	Silifke	N 36° 39' 59.098" E 34°23' 51.779"	Limon	İtalyan Memeli		+	
LC20	Tarsus	N 36° 39' 59.098" E 34°23' 51.779"	Limon	Yediveren	+		
LC22	Silifke	N 36° 22 45. 325" E 35° 53 63.664"	Limon	İtalyan Memeli		+	
LC45	Silifke	N 36° 37 59. 156" E 34° 19 01.768"	Limon	Yediveren	+		
LC49	Silifke	N 36° 37 59. 156"	Limon	Kütdiken	+		

Çizelge 4.2 (devam). Mersin ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

LC52	Silifke	N 36° 21' 43.840" E 34°01' 06.781"	Limon	Yediveren	+	
LC53	Silifke	N 36° 21' 43.840" E 34°01' 06.781"	Limon	Yediveren		+
LC55	Silifke	N 36° 25' 39.483" E 33°53' 38. 875"	Limon	Yediveren	+	
LC56	Silifke	N 36° 21' 03.606" E 34°58' 30.111"	Limon	Yediveren	+	
LC59	Erdemli	N 36° 28' 00.547" E 34°09' 16.515"	Limon	Yediveren		+
LC61	Erdemli	N 36° 28' 00.547" E 34°09' 16.515"	Limon	Yediveren	+	
LCK7	Erdemli	N 36° 31' 06.803" E 34°12' 01. 293"	Limon	Kütdiken		+
LCK6	Erdemli	N 36° 34' 14.299" E 34°12' 17.915"	Limon	Kütdiken		+
LCK2	Erdemli	N 36° 31' 06.803" E 34°12' 01.293"	Limon	Molla Memet	+	
LCK3	Mezitli	-	Limon	İtalyan Memeli		+
LCK4	Erdemli	N 36° 28' 00.547" E 34°09' 16.515"	Limon	Yediveren	+	
LCK5	Erdemli	N 36° 28' 00.547" E 34°09' 16.515"	Limon	Yediveren		+
LCK8	Mezitli	N 36° 25' 04.343" E 33°54' 53.310"	Limon	Yediveren	+	
LCK9	Mezitli	N 36° 26' 35.526" E 34°06' 25.091"	Limon	Yediveren	+	
LCK10	Mezitli	N 36° 20' 21.922"	Limon	Yediveren	+	

Çizelge 4.2 (devam). Mersin ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

LCK11	Erdemli	N 36° 39' 59.098" E 34°23' 51. 779"	Limon	Yediveren		+
LCK12	Erdemli	N 36° 39' 59.098" E 34°23' 51. 779"	Limon	Kütdiken		+
LCK15	Silifke	N 36° 20' 21.922" E 33°54' 54.898"	Limon	Kütdiken		+
LCK17	Mezitli	-	Limon	Yediveren	+	
LCK18	Mezitli	-	Limon	Kütdiken	+	
LCK19	Akdeniz	-	Limon	Yediveren	+	
LCK21	Akdeniz	-	Limon	Yediveren		+
LCK41	Silifke	N 36° 22' 45.428" E 34°02' 13. 509"	Limon	Yediveren		+
LCK42	Silifke	N 36° 22' 45.428" E 34°02' 13. 509"	Limon	İtalyan Memeli	+	
LCK43	Silifke	N 36° 24' 14.092" E 34°03' 07. 096"	Limon	İtalyan Memeli	+	
LCK46	Silifke	N 36° 25' 55.797" E 33°45' 03.540"	Limon	Yediveren	+	
LCK47	Silifke	N 36° 24' 14.092" E 34°03' 07.096"	Limon	Yediveren	+	
LCK48	Silifke	N 36° 34' 14.613" E 34° 14' 29.057"	Limon	Molla Memet		+
LCK50	Erdemli	N 36° 35' 29. 805" E 34° 16' 26. 438"	Limon	Yediveren	+	
LCK51	Silifke	N 36° 25' 55.797"	Limon	Eureka		+

Çizelge 4.2 (devam). Mersin ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

LCk54	Erdemli	N 36° 39' 59.098" E 34°23' 51. 779"	Limon	Yediveren		+
LCk57	Erdemli	N 36° 39' 59. 098" E 34°23' 51. 779"	Limon	Yediveren	+	
LCk58	Erdemli	N 36° 36' 50.694" E 34°17' 03.338"	Limon	Yediveren	+	
LCk60	Erdemli	N 36° 33' 41.219" E 34°15' 51. 121"	Limon	Yediveren	+	
LCk62	Erdemli	N 36° 33' 41.219" E 34°15' 51. 121"	Limon	Yediveren		+
LCk63	Erdemli	-	Limon	Yediveren	+	
MC1	Erdemli	-	Mandarin	Satsuma		+
MC3	Akdeniz	N 36° 34' 14.299" E 34°12' 17. 915"	Mandarin	Okitsu		+
MCK1	Erdemli	-	Mandarin	Satsuma		+
PC1	Tarsus	N 36° 52' 07.753" E 34°47' 36. 212"	Portakal	Washington		+
PC2	Akdeniz	N 36° 31' 06.803" E 34°12' 01. 293"	Portakal	Washington	+	
PC12	Silifke	N 36° 26' 09.487" E 33°46' 48. 044"	Portakal	Yafa	+	
PC13	Silifke	-	Portakal	Washington	+	
AC1	Akdeniz	-	Altıntop	Starruby		+

Çizelge 4.3. Adana ve Osmaniye ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

İzolat Adı	Lokasyon	GPS koordinatları	Turunçgil türü	Turunçgil çeşidi	Alınan bitki organları		
					Sürgün	Yaprak	Meyve
LC3	İmamoğlu	N 37° 21' 37.156" E 35°45' 43. 341"	Limon	Interdonato			+
LC2	İmamoğlu	N 37° 21' 37.156" E 35°45' 43. 341"	Limon	Interdonato			+
LC9	Karataş	N 36° 50' 08.896" E 35°19' 59. 002"	Limon	Interdonato			+
LC11	Kozan	N 36° 23' 34.210" E 35°49' 30.687"	Limon	Kütdiken			+
LC26	İmamoğlu	-	Limon	Enterdonat			+
LC27	Yüreğir	N 36° 55 17. 100" E 35° 04 25. 295"	Limon	Interdonato			+
LC28	Yüreğir	N 36° 22 53. 235" E 35° 53 04. 463"	Limon	Interdonato			+
LC29	Yüreğir	N 36° 55 17. 100" E 35° 04 25. 295"	Limon	Interdonato			+
LC30	İmamoğlu	N 37° 21' 53. 429" E 35° 45' 48. 002"	Limon	Interdonato			+
LC31	Karaisalı	N 36° 54 24. 504" E 36° 11 29. 776"	Limon	Meyer			+
LC32	Kozan	N 37° 21' 59. 285" E 35°51' 35. 558"	Limon	Interdonato			+
LC33	Karaisalı	N 36° 56' 02. 432" E 36° 08 54. 311"	Limon	Yediveren	+		
LC34	İmamoğlu	N 37° 21' 53. 429"	Limon	Interdonato			+

Çizelge 4.3. (devam) Adana ve Osmaniye ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

LC38	Yüreğir	N 36° 52' 08.933" E 35°36' 36. 106"	Limon	Interdonato		+
LCK36	Yüreğir	N 36° 52' 08.933" E 35°36' 36.106"	Limon	Interdonato		+
LCK37	Yüreğir	N 36° 50' 18.941" E 35°35' 31.963"	Limon	Interdonato		+
MC27	Kozan	N 37° 21' 59.285" E 35°51' 35.558"	Mandarin	Clementine		+
MC34	Karataş	-	Mandarin	Satsuma		+
MC36	Yüreğir	N 36° 52 19. 800" E 36° 09 41. 423"	Mandarin	Satsuma		+
MC37	Karataş	-	Mandarin	Murcott		+
TC1	Merkez	-	Turunç	Carizzo		+
PC4	Kozan	N 36° 56 02. 432" E 36° 08 54. 311"	Portakal	Valencia		+
PC8	Kozan	N 37° 21' 59.285" E 35°51' 35. 558"	Portakal	Washington		+
PC9	Kozan	N 37° 23' 34.210" E 35°49' 30. 687"	Portakal	Washington		+
PC10	Kozan	N 37° 23' 34. 210" E 35°49' 30. 687"	Portakal	Washington		+
PC11	Karataş	N 36° 54' 28.853" E 35° 21' 10. 423"	Portakal	Washington		+
MC26	Sumbas	N 36° 22 53. 235" E 35° 53 04. 463"	Mandarin	Clementine		+



Çizelge 4.3. (devam) Adana ve Osmaniye ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

MC33	Osmaniye/Merkez	N 37° 01' 45.659" E 36°08' 20. 740"	Mandarin	Satsuma	+
MC35	Osmaniye/Merkez	N 37° 00' 46. 463" E 36°08' 16. 635"	Mandarin	Okitsu	+
PC5	Osmaniye/Merkez	N 37° 09' 27.915" E 36°06' 30. 084"	Portakal	Washington	+
PC6	Osmaniye/Merkez	N 37° 08' 28.809" E 36°09' 38. 817"	Portakal	Washington	+
PC7	Osmaniye/Merkez	N 37° 22' 41.680" E 35°49' 48. 195"	Portakal	Washington	+

Çizelge 4.4. Hatay ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

İzolat Adı	Lokasyon	GPS koordinatları	Turunçgil türü	Turunçgil çeşidi	Alınan bitki organları		
					Sürgün	Yaprak	Meyve
LC15	Samandağ	N 36° 56' 15.181" E 35°21' 11. 937"	Limon	Interdonato	+		
LC5	Erzin	N 36° 22' 53. 235" E 35° 53' 04. 463"	Limon	Interdonato	+		
LC64	Erzin	N 36° 95' 13.070" E 36°22' 73. 190"	Limon	Interdonato	+		
LC65	Arsuz	N 36° 06' 56. 210" E 35° 56' 51. 174"	Limon	Interdonato	+		
LCK1	Erzin	-	Limon	Interdonato	+		
LCK23	Arsuz	N 36° 21' 47. 933"	Limon	Interdonato	+		

Çizelge 4.4. (devam) Hatay ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

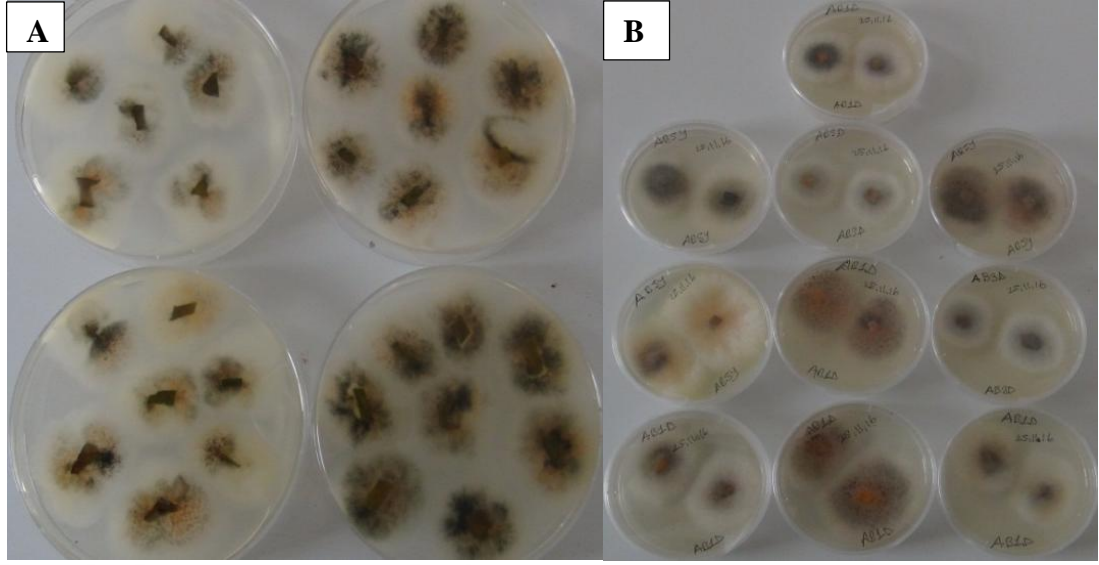
MC4	Samandağ	N 36° 50' 08. 896" E 35°19' 59. 002"	Mandarin	Okitsu	+	
MC5	Samandağ	N 36° 50' 08.896" E 35°19' 59. 002"	Mandarin	Okitsu		+
MC6	Samandağ	N 36° 50' 08.896" E 35°19' 59. 002"	Mandarin	Okitsu		+
MC7	Samandağ	N 36° 52 04 189" E 36° 09 35. 954"	Mandarin	Okitsu		+
MC8	Samandağ	N 36° 56' 15.181" E 35°21' 11. 937"	Mandarin	Okitsu	+	
MC10	Samandağ	N 36° 43' 34.146" E 35°20' 08. 766"	Mandarin	Satsuma	+	
MC11	Dörtyol	N 36° 54' 28.853" E 35° 21' 10.423"	Mandarin	Okitsu		+
MC14	Dörtyol	N 36° 07 28. 824" E 36° 01 05. 120"	Mandarin	Okitsu		+
MC15	Dörtyol	N 36° 07 28. 824" E 36° 01 05. 120"	Mandarin	Okitsu		+
MC16	Dörtyol	N 36° 06 10. 465" E 35° 37 28. 444"	Mandarin	Okitsu		+
MC17	Dörtyol	N 36° 06 10. 465" E 35° 37 28. 444"	Mandarin	Okitsu	+	
MC19	Dörtyol	N 36° 06 05. 833" E 35° 57 23. 833"	Mandarin	Early Pride	+	
MC20	Dörtyol	N 36° 06 05. 833" E 35° 57 23. 833"	Mandarin	Okitsu	+	
MC21	Erzin	N 36° 06 56. 210" E 35° 56 51. 174"	Mandarin	Okitsu		+
MC22	Erzin	N 36° 04 13. 880"	Mandarin	Okitsu		+

Çizelge 4.4. (devam) Hatay ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

MC24	Dörtyol	N 36° 04 13. 880" E 35° 58 05. 600"	Mandarin	Okitsu		+
MC25	Erzin	N 36° 21' 43. 840" E 34° 01' 06.781"	Mandarin	Okitsu		+
MC28	Dörtyol	-	Mandarin	Okitsu		+
MC29	Samandağ	N 36° 52 04 189" E 36° 09 35.954"	Mandarin	Satsuma		+
MC38	Dörtyol	-	Mandarin	Early Pride		+
MC39	Erzin	N 36° 04 13. 880" E 35° 58 05. 600"	Mandarin	Owari		+
MC40	Dörtyol	N 36° 52 04 189" E 36° 09 35. 954"	Mandarin	Satsuma		+
MC41	Dörtyol	-	Mandarin	Owari		+
MCK9	Samandağ	N 36° 56' 15.181" E 35°21' 11. 937"	Mandarin	Okitsu		+
MCK12	Dörtyol	N 36° 35 29 805" E 34° 16 26.438"	Mandarin	Okitsu		+
MCK13	Erzin	N 36° 22 53. 235" E 35° 53 04. 463"	Mandarin	Okitsu		+
MCK18	Dörtyol	N 36° 31 54 660" E 34° 13 01.866"	Mandarin	Okitsu		+
MCK23	Dörtyol	N 36° 21 25 273" E 33° 56 24.511"	Mandarin	Okitsu		+

Çizelge 4.4. (devam) Hatay ili Turunçgil üretim alanlarında yapılan sörveyler sonucunda elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının elde edildiği lokasyon, konukçu türü ve çeşitleri ve alındığı organlar

MCK31	Dörtyol	N 36° 23 13 601" E 33° 58 42.766"	Mandarin	Satsuma	+
MCK32	Dörtyol	N 36° 23 13 601" E 33° 58 42.766"	Mandarin	Satsuma	+
PC3	Erzin	N 36° 42 41 416" E 34° 27 13.672"	Portakal	Navelina	+

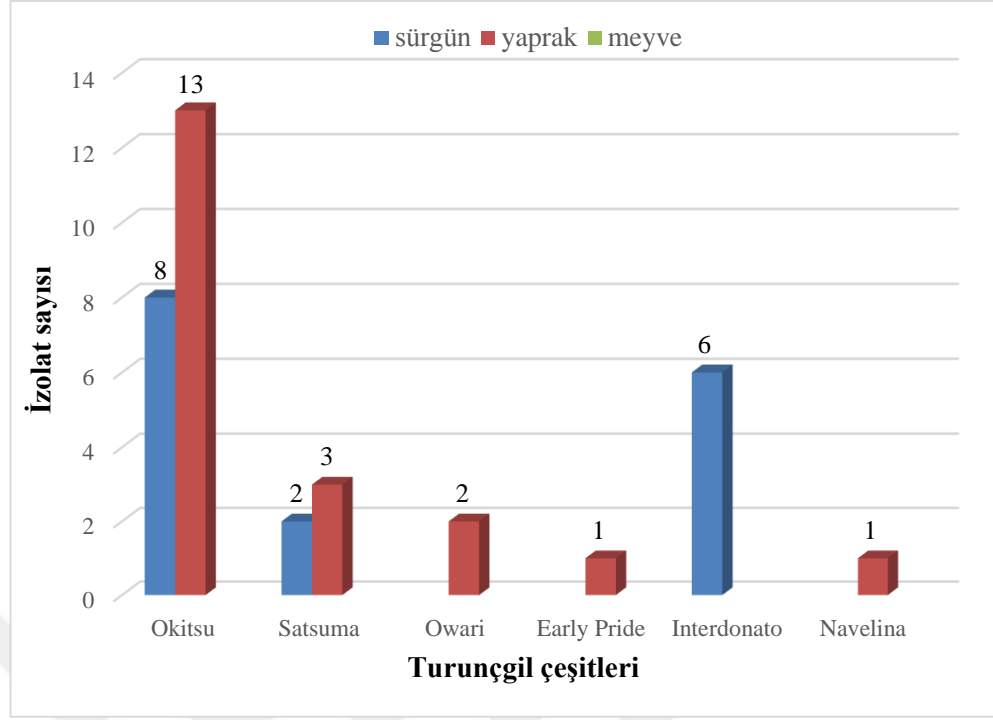


Şekil 4.2. *Colletotrichum* etmeninin izolasyonu sonucu gelişen koloniler (A), PDA besi ortamında geliştirilen saf *Colletotrichum* kültürleri (B)

Turunçgil bahçelerinde *Colletotrichum* enfeksiyonlarının neden olduğu ticari verim kayıpları nedeniyle elde edilen son bulgular ve tür kavramlarındaki değişiklikler, turunçgillerle ilişkili patojen tür çeşitliliği, onların ortaya çıkışı yaprak ve meyve hastalıkları ile ilişkilerini çalışmak için yeni stratejileri gerekli kılmıştır. Bununla birlikte turunçgil antraknozu ile ilişkili *Colletotrichum* türleri, son 20-30 yıldır tüm dünyada araştırmacıların belirgin ölçüde dikkatini çekmiştir (Ramos ve ark., 2016).

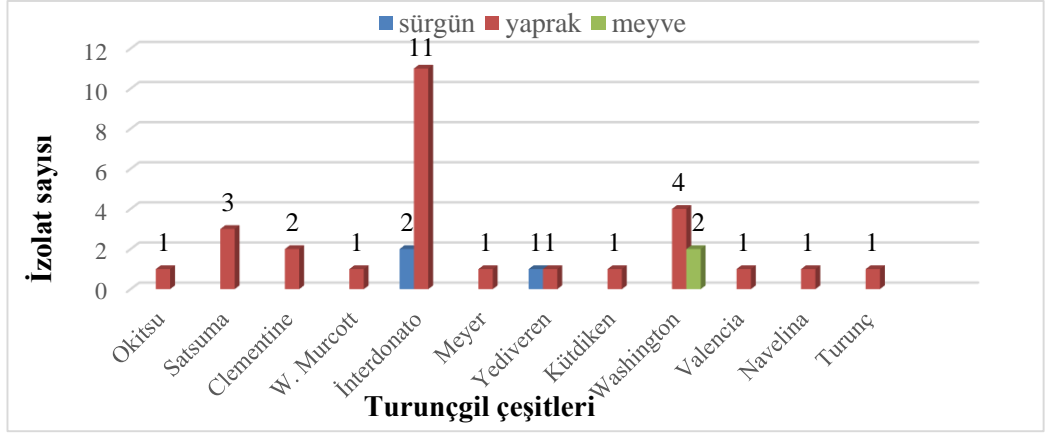
Benzer şekilde, Guarnaccia ve ark. (2017) çalışmalarında, 2015 ve 2016 yıllarında Avrupa'nın turunçgil yetiştirilen Yunanistan, Malta, Portekiz ve İspanya gibi ülkelerde yer alan turunçgil bahçeleri, fidanlıklar ve ev bahçelerinde antraknoz hastalığı yönünden inceleme yapmışlardır. Hastalık belirtisi gösteren yaprak, yaprak sapı, dal ve meyvelerden toplam 174 *Colletotrichum* izolatu elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, Çin'de turunçgil üretimi yapılan alanlarda *Citrus* ve *Fortunella* türlerinin yaprak, sürgün ve meyvelerinden toplam 312 *Colletotrichum* izolatları elde edilmiştir (Huang ve ark., 2013).

Antraknoz belirtilerinin, turunçgil konukçu türleri ve organlarına göre dağılımı incelendiğinde; Hatay'da en fazla *Colletotrichum* izolatu mandarin türüne ait okitsu ve satsuma çeşitlerinden elde edilmiş olup bunları limon ve portakal türleri izlemiştir. Bununla birlikte konukçu bitki organları açısından en fazla izolat, sürgün ve yapraklardan elde edilmiştir (Şekil 4.3).



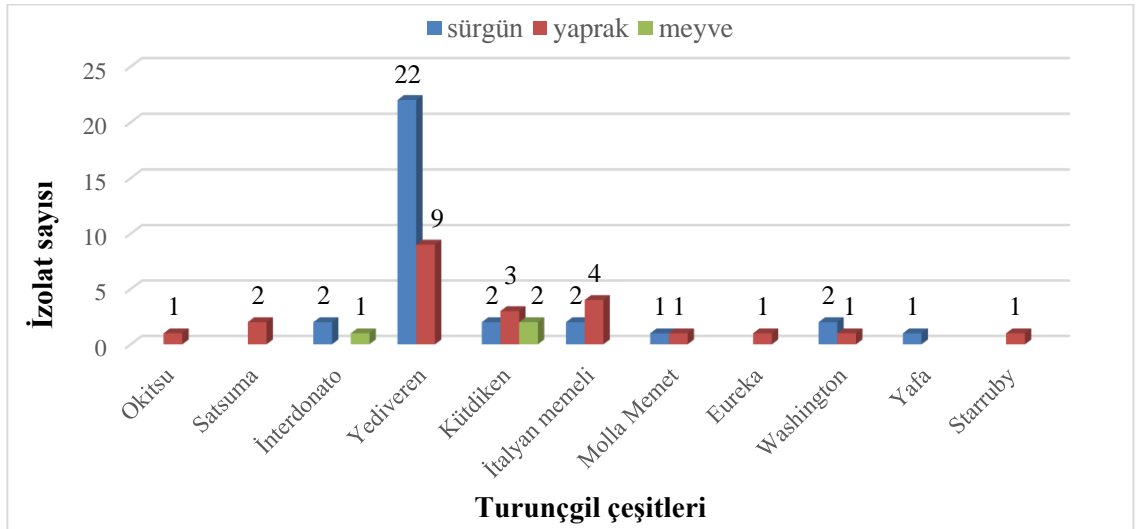
Şekil 4.3. Hatay ilinde turunçgil tür ve çeşitlerinden elde edilen izolatların vejetatif ve generatif organlara göre dağılımları. Tür ve çeşitler; mandarin (Okitsu, Satsuma, Owari, Early Pride), limon (İnterdonato) ve portakal (Navelina)

Adana ve Osmaniye illerinde ise turunçgil tür ve çeşitlerinde antraknoz belirtilerinin gözlemlendiği konukçu dokularının dağılımı değerlendirildiğinde (Şekil 4.4); en fazla izolat limon ve buna yakın olarak mandarin'den elde edilmiştir. Hastalığın bu illerde en fazla yapraklarda belirti oluşturduğu saptanmıştır. Hastalığa sürgünlerde fazla rastlanılmamasının sebebinin, uç sürgünlerde budama ve bakım işlemlerinin daha bilinçli ve zamanında yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, Adana'da yetiştirilen turunçgillerde çok farklı tür ve çeşitlerin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Böylece elde edilen izolat sayısında tür ve çeşit bazında değişiklik göstermektedir.



Şekil 4.4. Adana ve Osmaniye illerinde turunçgil tür ve çeşitlerinden elde edilen izolatların vejetatif ve generatif organlara göre dağılımları. Tür ve çeşitler; mandarin (Okitsu, Satsuma, Clementine, W. murcott), limon (Interdonato, Meyer, Yediveren, Kütdiken), portakal (Washington, Valencia, Navelina) ve Turunç

Mersin’de turunçgil tür ve çeşitlerinde antraknoz belirtilerinin gözleendiği konukçu tür ve dokularının dağılımı incelendiğinde (Şekil 4.5), en fazla izolatu yediveren çeşidi limonun sürgünlerinden elde edilmiştir. Mersin’de *Colletotrichum* limonun farklı çeşitlerinin yetiştiriciliğinin yapılmasından dolayı antraknoz hastalığının çeşitler bazında dağılımının da fazla olduğu gözlenmektedir. Antraknozun en fazla limon çeşitlerinin sürgünlerinde, mandarinde ise yapraklarda oluştuğu saptanmıştır.



Şekil 4.5. Mersin ilinde turunçgil tür ve çeşitlerinden elde edilen izolatların vejetatif ve generatif organlara göre dağılımları. Tür ve çeşitler; mandarin (Okitsu, Satsuma), limon (Interdonato, Yediveren, Kütdiken, İtalyan memeli, Molla memet, Eureka), portakal (Washington, Yafa) ve Altıntop (Starruby)

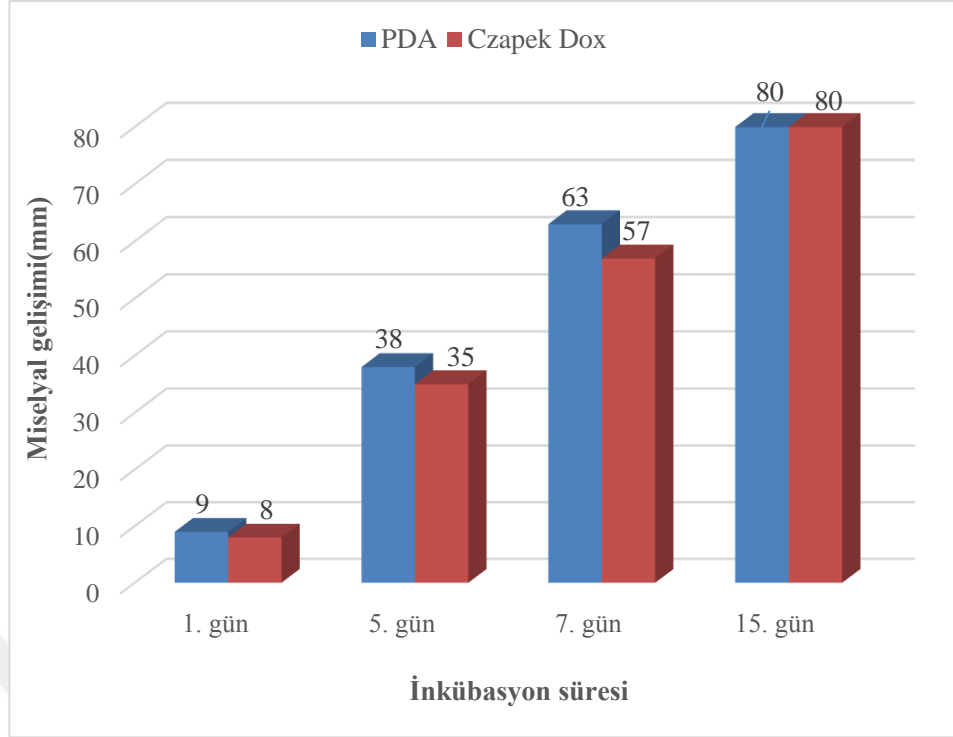
## 4.2. Morfolojik Karakterizasyon

Antraknoza neden olan *Colletotrichum*'un tür ve/veya türlerine ait izolatlarını elde etmek için Adana, Hatay, Mersin ve Osmaniye illerinde yapılan örnekleme sırasında alınan hastalıklı bitkilerinden yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen kültürlerde öncelikle grimsi renkte başlayan daha sonra turuncu renge dönüşen pigmentlere sahip koloniler gözlenmiştir. Ayrıca, bazı izolatların kolonilerinde yapışkanimsı, turuncu renkte conidiomata benzeri yapıların olduğu gözlenmiştir. İleri aşamalarda kültürlerde fungusun eşeysiz üreme yapısı olan aservulusların oluştuğu tespit edilmiştir. Bazı izolatlarda ise şeffaf- krem rengi ve olgunlaşan kültürde az miktarda aservulus olduğu kaydedilmiştir.

Bu aşamada, izole edilen her bir *Colletotrichum* izolatı, morfolojik olarak Sutton (1980) tarafından önerilen dikotomik anahtarlar kullanılarak teşhis edilmiştir. Buna göre fungusun koloni rengi, ters koloni rengi ve büyüme oranı gibi kültürel karakter, apresoryum, konidilerinin şekil ve büyüklüğü ve aservulus oluşturup oluşturmadığı, peritesyal yapıları gibi morfolojik özellikleri; PDA, SNA ve CDA besi ortamlarında değerlendirilmiş ve 2 farklı izolat grubuna ait olduğuna karar verilen sonuçlar elde edilmiştir.

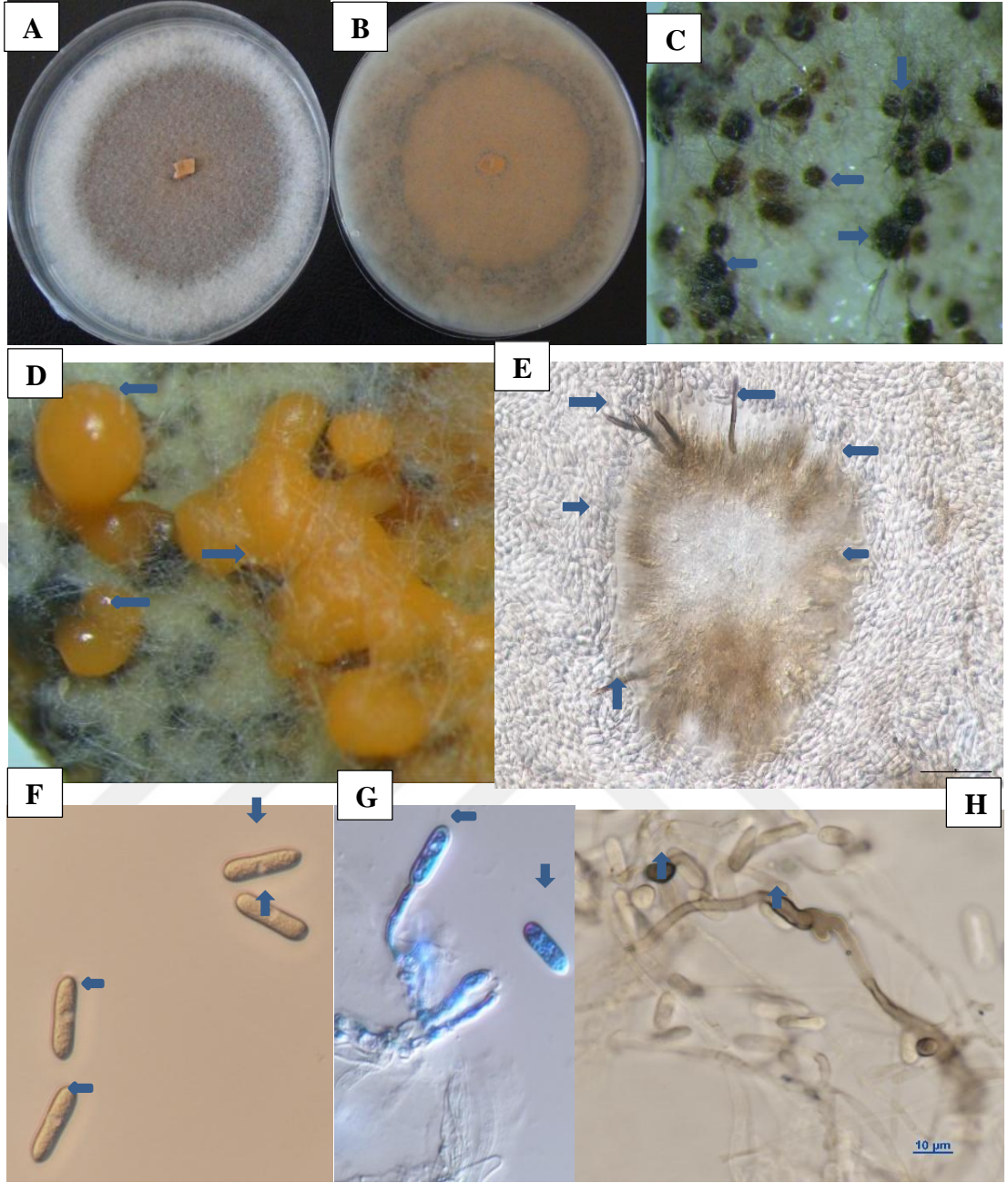
Morfolojik özellikleri tanımlamak için ilk aşamada; PDA ve CDA besi yerlerinde ortalama gelişim hızına sahip olan izolatlar, 25°C' de 7 günlük inkübasyon sonucunda 63 mm koloni çapına ulaşırken aynı besi yerlerinde 25°C' de 15 günlük inkübasyon sonucunda 80 mm koloni gelişimi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



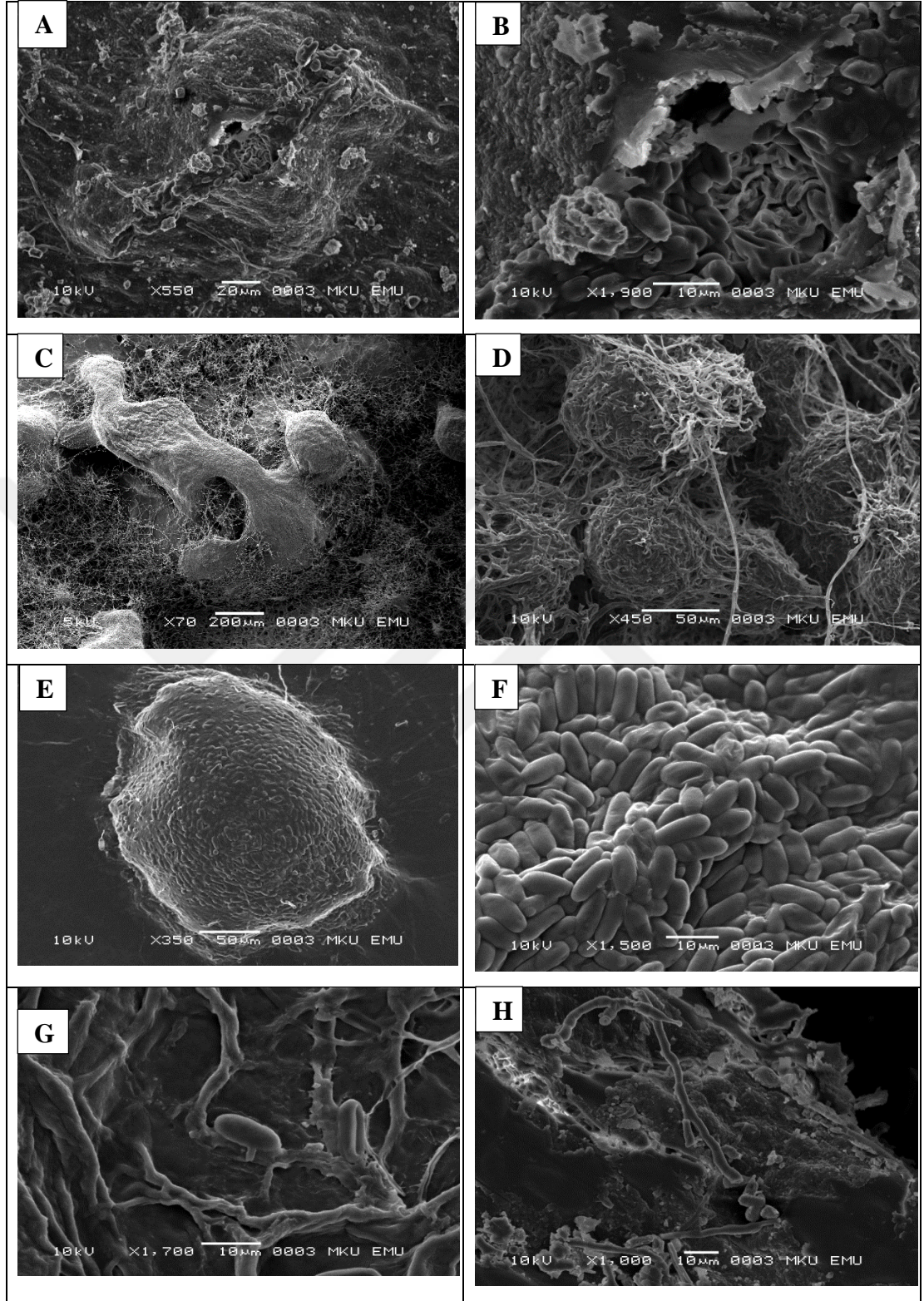


Şekil 4.6. *C. gloeosporioides*'in PDA ve CDA agar besi ortamlarındaki miselyal gelişimleri (mm)

Ayrıca bu izolatlar, PDA'da beyaz hifsel gelişim sonrasında gri renge dönüşerek havai miselyumlar oluşturan koloniler meydana getirmiştir. Bu miselyumlar arasında, turuncu renkte conidiomata yapıları ile siyah renkli eşeysiz üreme organları olan aservuluslar gözlenmiştir. Her iki besi yerindeki kültürlerde oluşan bu aservulus yapılarında, 7. günden itibaren konidilerin üretilmeye başlandığı kaydedilmiştir (Şekil 4.7). Bu konidilerin silindirik, şeffaf, bölmesiz, ortalama  $17,6 \times 4,3 \mu\text{m}$  boyutlarında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kültürlerin SNA besi yerinde 4 haftalık inkübasyonu sonucunda açık kahverengi, düzensiz, pürüzsüz şekilli ve  $11,2 \times 5,5 \mu\text{m}$  boyutlarında appresoryumlar oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Bu izolatların yer aldığı grupta peritesyum benzeri herhangi bir eşeyli üreme yapısı gözlenmemiştir. Ayrıca, taramalı elektron mikroskopunda (SEM) teşhis için gerekli karakteristik özelliklerin ayrıntılı görünüşleri morfolojik verileri desteklemiştir (Şekil 4.8). Elde edilen bu izolatlar, morfolojik karakterlere dayanarak geçici olarak bu aşamada, *C. gloeosporioides* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.7. *C. gloeosporioides*'in PDA besi yerinde 25°C'de 7 günlük gelişme süresi sonucunda petrilerde üstten (A) ve alttan (B) koloni gelişimleri, aservulus (C), conidiomata (D), aservulus-setae-konidi (E), konidi (F), konidi-konidiofor (G), SNA besi yerinde 4 haftalık inkübasyon sonucu ortaya çıkan apresoryumlar (H)

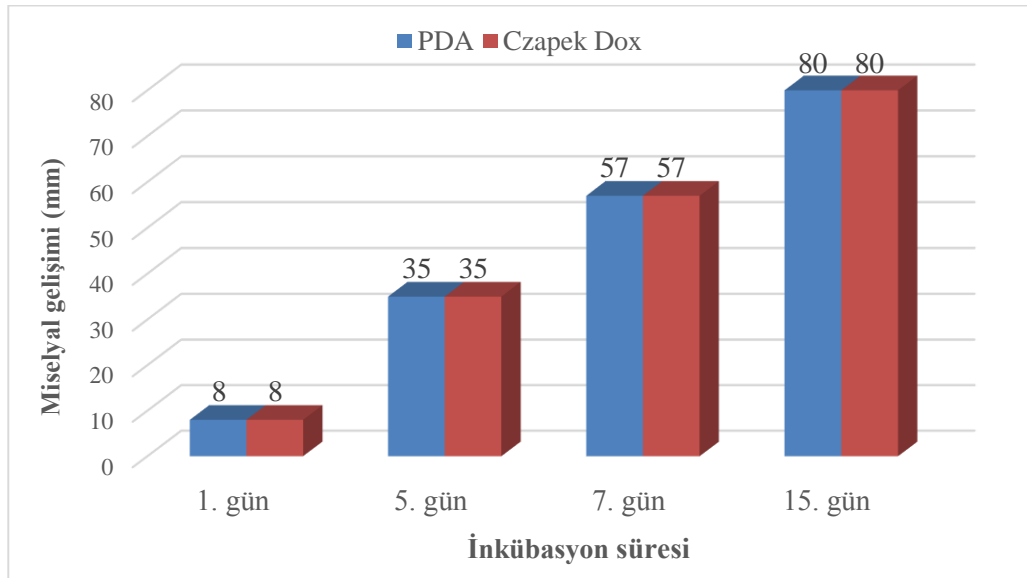


Şekil 4. 8. *C. gloeosporioides*'in gelişimin farklı evreleri. Yaprak dokusunda aservulus (A×70,B×450), conidiomata (C×70), PDA besi ortamında aservulus (D×450), SNA besi ortamında aservulus (E×350), konidi (F×1.500), çim tübü oluşturmuş Konidi (G×1.700), hif (H×1.000) (Taramalı elektron mikroskobu -SEM, Scanning Electron Microscope)

Çizelge 4.5. *Colletotrichum* izolatlarının morfolojik parametrelere göre karakteristik özellikleri

Türler	Konidilerin Şekil ve Boyutu	Apresoryumların Şekil ve Boyutu	PDA'da Koloni özellikleri	PDA'da Miselyal gelişim(mm)
<i>C. gloeosporioides</i>	Silindirik, şeffaf, bölmesiz Ort:17,6x4,3 Sdt hata:0,13	Açık kahverengi, düzensiz, pürüzsüz şekli 11.2 × 5,5 µm	İlk önce beyaz gri, sonra koyu gri ve turuncu	63,0mm/7 gün 25°C
<i>C. karstii</i>	Silindirik, tek bölmeli, şeffaf düz Ort:14,6x4,0 Std hata:0,17	Açık kahverengi, düzenli, hafif yuvarlak, pürüzsüz şekli 9,6 × 6,7 µm	Beyaz, grimsi koloni, ters koloni açık sarı	57,0mm/7 gün 25°C

Turunçgil üretim alanlarından izole edilen ve PDA ve CDA agar besi yerlerinde ortalama hızda gelişim gösteren bazı izolatların, 25°C' de 7 günlük inkübasyon sonucunda 57 mm koloni çapına ulaştığı tespit edilmiştir. Aynı besi yerlerinde kültürlerin, 25°C' de 15 günlük inkübasyon periyodu sonucunda 80 mm'lik gelişim gösterdiği kaydedilmiştir (Şekil 4.9).

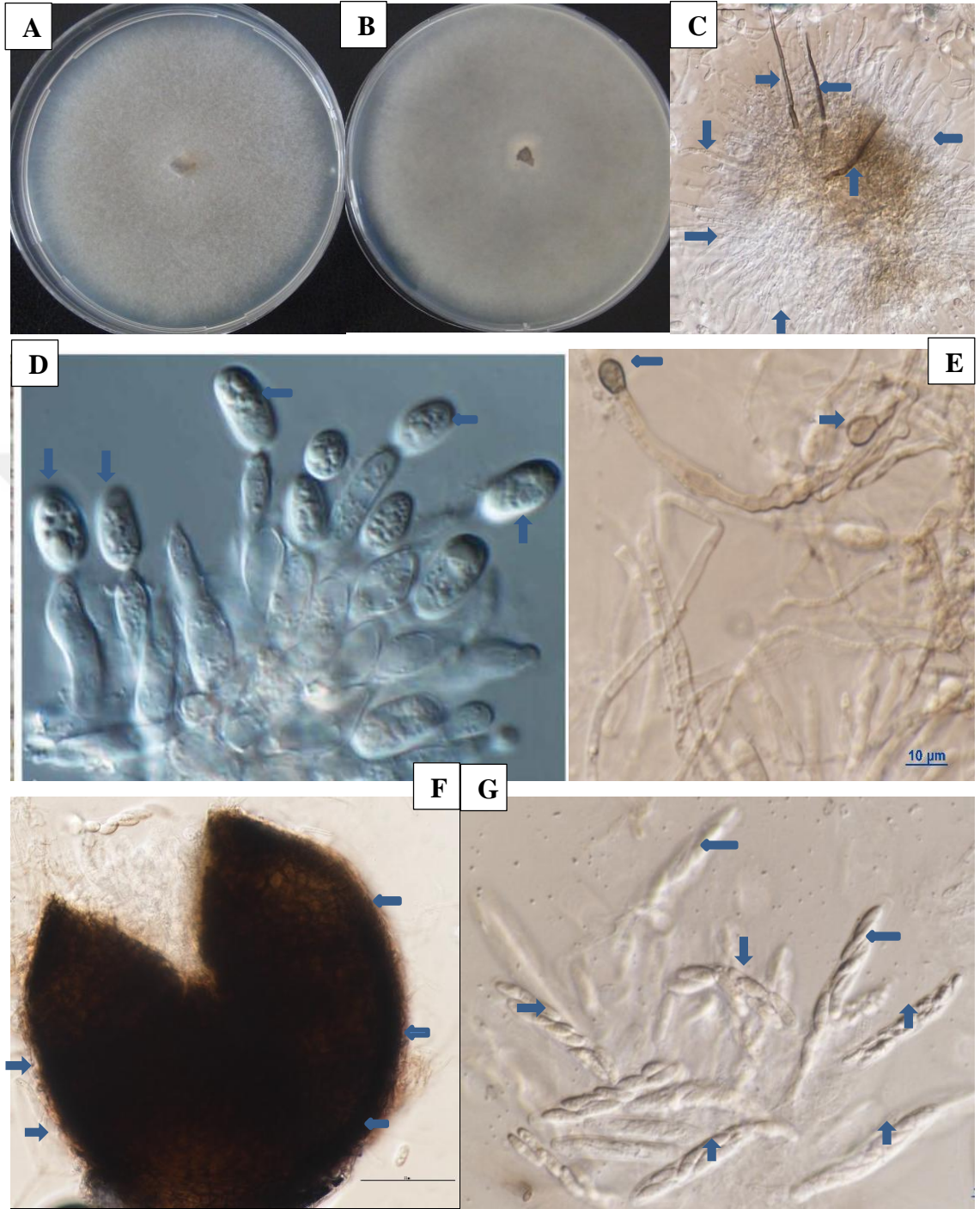


Şekil 4. 9. *C. karstii*'in PDA ve CDA agar besi ortamlarındaki miselyal gelişimleri (mm)

Bu izolatların, PDA'da beyaz, grimsi koloni, ters koloni açık sarı ve kültür üzerinde az miktarda siyah renkli eşeysiz üreme organı olan aservulus ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Bu izolat grubunun, *C. gloeosporioides* türünden farklı olarak miselyal gelişim sırasında yapışkanimsı, turuncu renkte herhangi bir conidiomata yapısı oluşturmadığı gözlenmiştir. İzolatların her iki besi yerinde gelişen kültürlerinde 7. günden itibaren aservuluslarda konidiler üretilmeye başlandığı tespit edilmiştir. Bu izolatların konidilerinin, *C. gloeosporioides* türünün konidilerine göre daha kısa, silindirik, tek bölmeli, şeffaf, düz (Şekil 4.10), ortalama 14,6x4,0µm boyutlarında olduğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.5). SNA besi yerinde 4 haftalık inkübasyon sonucunda bu *Colletotrichum* izolatlarının, düzensiz şekilli, kahverengi, 9,6 × 6,7 µm boyutlarında appresoryumlar oluşturduğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.5). Ayrıca bu besi ortamında, *Colletotrichum*'un eşeyli üreme yapısı olan peritesyumlar, ve bu peritesyumlarda askuslar ve her askus 6-8 adet askospor gözlenmiştir (Şekil 4.10). Bu morfolojik verilerden yola çıkılarak bu izolatların *Colletotrichum karstii* türüne ait olduğu sonucuna varılmıştır.

Guarnaccia ve ark., (2017) yapmış oldukları morfolojik karakterizasyonlarda, PDA ve SNA besi yerlerinde koloni karakterleri ve pigment üretimini 10 gün boyunca SNA'da değerlendirmişlerdir. Koloni renklerine göre gruplandırılmış kültürlerde, periyodik olarak ascomata, conidiomata ve seta'nın gelişimi değerlendirilerek koloni çapları 7 ve 10 gün sonra ölçülmüştür. Fungal yapıların morfolojik sonuçlarına göre, turunçgillerde antraknoz etmeni *Colletotrichum* türlerini, *C. gloeosporioides* ve iki yeni tür (*C. helleniense* ve *C. hystricis*); *C. gloeosporioides* tür kompleksi içerisinde yer alırken, *C. karstii*, *C. novae-zelandiae* ve iki yeni tür (*C. catinaense* ve *C. limonicola*); *C. boninense* tür kompleksine dahil edilmiştir.

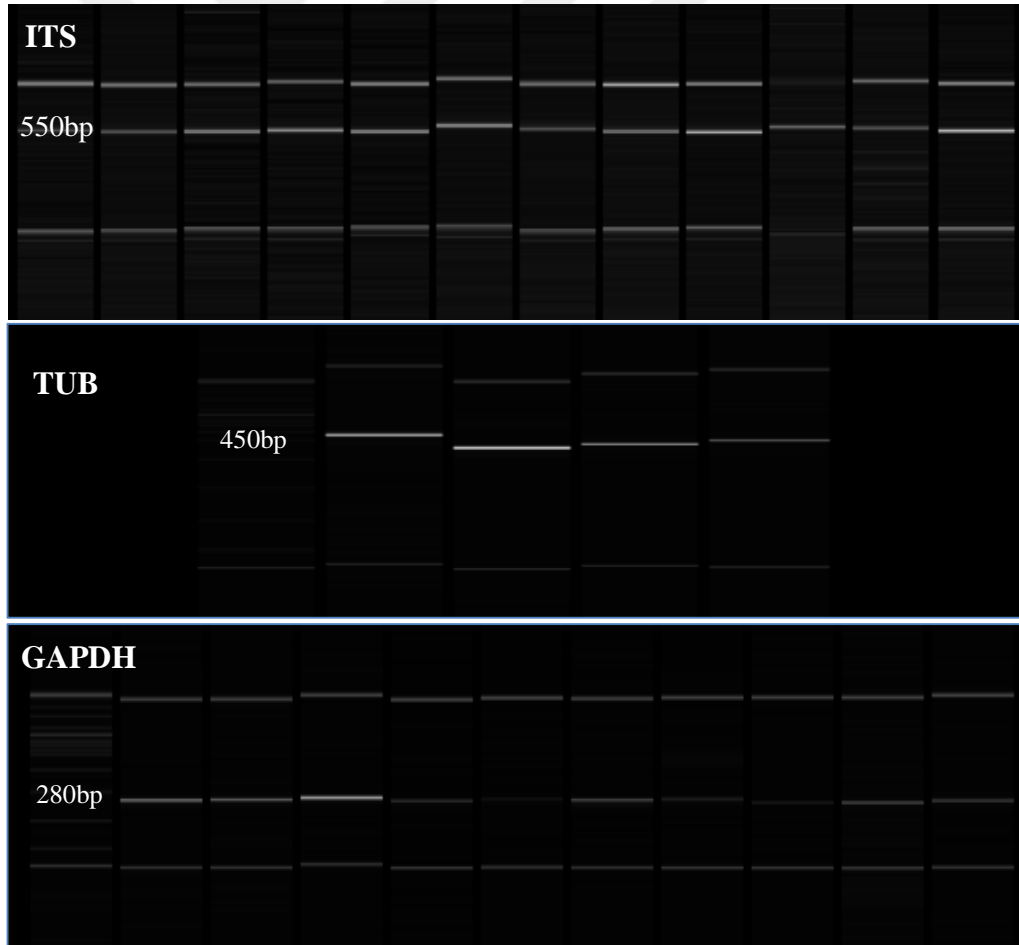
Bu çalışmadan bildirilen sonuçlarla uyumlu bir şekilde mevcut araştırmamızdan elde edilen veriler gösteriyor ki turunçgil antraknozundan sorumlu ana fungusların *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* olduğunu, bunların 2 farklı tür kompleksi içerisinde yer aldıkları göstermektedir.



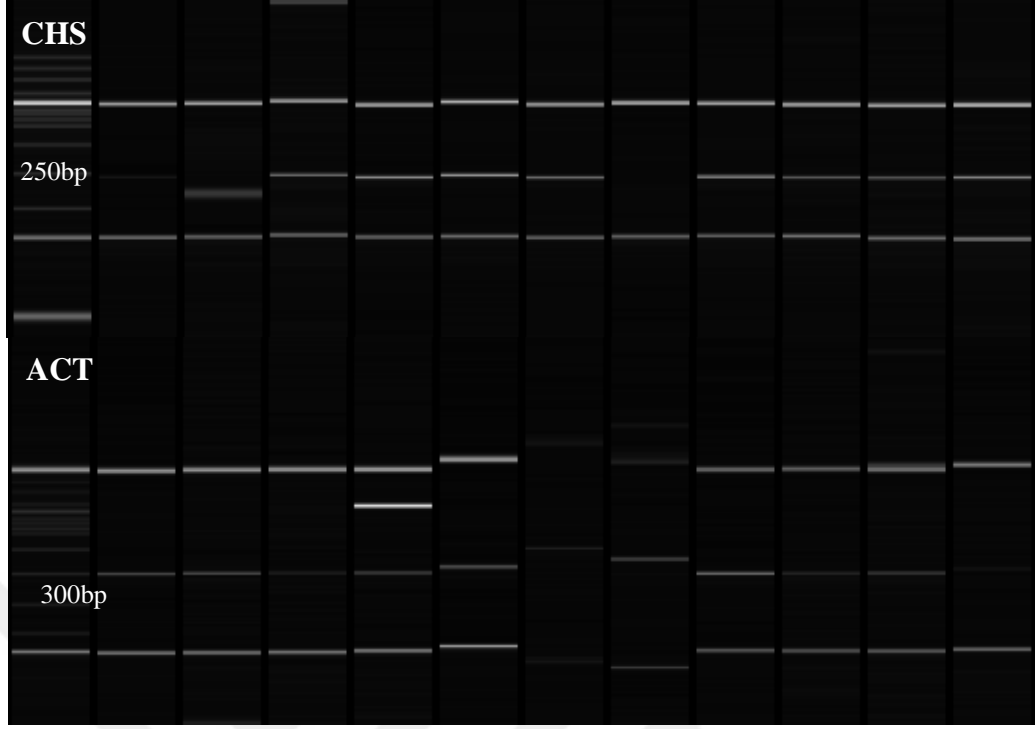
Şekil 4.10. *C. karstii*'nin PDA besiyerinde 25°C'de 7 günlük gelişme süresi sonucunda petriyelerde üstten (A) ve alttan (B) koloni gelişimleri, aserulus-setae-konidi (C), konidiofor (D), ve SNA besiyerinde 4 haftalık inkübasyon sonucu ortaya çıkan apresoryumlar (E), Peritesyum (F), Askus ve askosporlar (G).

#### 4.4. Moleküler Karakterizasyon

*Colletotrichum* cinsine bağlı türlerin bu aşamada yapılan karakterizasyonu için gerçekleştiren moleküler filogenetik analizler için öncelikle yapılan fungal DNA izolasyonları sonucunda 20-40 ng/µl arasında değişen miktarlarda genomik DNA elde edilmiştir. Bu genomik DNA'lardan ITS (internal transcribed spacer), ACT (Actin), GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) , CHS (Chitin synthase) genlerine ait evrensel ve spesifik primerler kullanılarak multilokus filogenetik dizi analiz (MLSA) alışmaları gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyon çalışmaları ile çoğaltılan DNA rnlerinden ITS, ACT, TUB, GAPD ve CHS genlerine ait primerler ile, sırasıyla 550, 300, 450, 280 ve 250 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir (şekil 4.11).



şekil 4.11. Farklı primerlere göre PCR sonuçlarının QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme programında DNA bant görüntüleri



Şekil 4.11 (devam). Farklı primerlere göre PCR sonuçlarının QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme programında DNA bant görüntüleri

İzolasyonlar sonucu elde edilen tüm izolatların bu genler ile PCR çalışmaları, 29 izolatın 5 primer ile 100 izolatın GAPDH primeri ile elde edilen PCR ürünleri için de dizi işlemleri yürütülmüştür. *Colletotrichum* türlerine ait 100 izolatın diğer primerlerle elde edilen PCR ürünleri, jel görünümündeki baz büyüklükleri esas alınarak değerlendirilmiştir. NCBI veri tabanından BLAST programı ile yapılan karşılaştırma sonucunda *Colletotrichum gloeosporioides* türüne ait 87 ve *Colletotrichum karstii* türüne bağlı 42 izolat tanımlanmıştır. *Colletotrichum* izolatları, BLAST programı sonunda eşleşme gösteren izolatlarla arasında %99-100 arasında değişen bir nükleotid benzerlik oranı göstermiştir (Çizelge 4.6; Çizelge 4.7).

Ayrıca çalışmada, multilokus dizi (MLS) analizi sonucu belirlenen türlere ait 29 izolat, NCBI Gen bankasında depolanarak bu izolatlar için erişim numaraları alınmıştır (Çizelge 4.8).



Çizelge 4.6. Farklı turunçgil türlerinden elde edilen *Colletotrichum gloeosporioides* türüne ait izolatların GAPDH primeri ile dizi analizleri ve BLAST benzerlikleri (%)

<b>İzolat</b>	<b>Konukçu türü</b>	<b>Genbankası benzerlik (%)</b>
LCg1	Limon	KP943528 %100
LCg3	Limon	KX578776 %100
LCg4	Limon	KX620243 %100
LCg2	Limon	KX620243 %100
LCg13	Limon	KX620243 %100
LCg15	Limon	KX620243 %100
LCg5	Limon	KX620238 %100
LCg8	Limon	KX620243 %100
LCg9	Limon	KX786447 %100
LCg10	Limon	KX620243 %100
LCg11	Limon	KX620243 %100
LCg6	Limon	KX620243%100
LCg7	Limon	KX578785 %100
LCg13	Limon	HM034807 %100
LCg14	Limon	KX578781 %100
LCg16	Limon	HM034807 %100
LCg20	Limon	KX620243 %100
LCg22	Limon	KX620238 %100
LCg26	Limon	KX620243 %100
LCg27	Limon	KX620243 %100
LCg28	Limon	KX620243 %100
LCg29	Limon	KX620243 %100
LCg30	Limon	KX578781 %100
LCg31	Limon	KX620243 %100
LCg32	Limon	KY271051 %100
LCg33	Limon	KY271051 %100
LCg34	Limon	KY271051 %100
LCg39	Limon	KY271051 %100
LCg40	Limon	KY271051 %99
LCg38	Limon	KX786447 %100

Çizelge 4.6. (devam) Farklı turunçgil türlerinden elde edilen *Colletotrichum gloeosporioides* türüne ait izolatların GAPDH primeri ile dizi analizleri ve BLAST benzerlikleri (%)

LCg45	Limon	KY271051 %100
LCg49	Limon	KY271051 %100
LCg52	Limon	KY271051 %100
LCg53	Limon	KY271051 %100
LCg55	Limon	KY271051 %100
LCg56	Limon	KY271051 %100
LCg59	Limon	FJ972582 %100
LCg61	Limon	KM053196 %99
LCg64	Limon	JQ005239 %100
LCg65	Limon	JQ005239 %100
MCg4	Mandarin	KY271051 %100
MCg5	Mandarin	KY271051 %100
MCg6	Mandarin	KY271051 %100
MCg1	Mandarin	KY271051 %100
MCg3	Mandarin	KY271051 %100
MCg7	Mandarin	KY271051 %100
MCg8	Mandarin	KY271051 %100
MCg10	Mandarin	KY271051 %100
MCg11	Mandarin	KY271051 %100
MCg14	Mandarin	KY271051 %100
MCg15	Mandarin	KY271051 %100
MCg16	Mandarin	KY271051 %100
MCg17	Mandarin	KX866447 %100
MCg19	Mandarin	KP943528 %100
MCg20	Mandarin	KC293715 %100
MCg21	Mandarin	KY271051 %100
MCg22	Mandarin	KY271051 %100
MCg24	Mandarin	KY271051 %100
MCg25	Mandarin	KY271051 %100
MCg26	Mandarin	KY271051 %100

---

MCg27	Mandarin	KY271051 %100
MCg28	Mandarin	KY271051 %100
MCg29	Mandarin	HM034807 %100
MCg33	Mandarin	KX786447 %100
MCg34	Mandarin	KY271051 %100
MCg35	Mandarin	HM034807 %100
MCg36	Mandarin	KX786447 %100
MCg37	Mandarin	KY271051 %100
MCg38	Mandarin	KY271051 %100
MCg39	Mandarin	KY271051 %100
MCg40	Mandarin	KY271051 %100
MCg41	Mandarin	KY271051 %100
TCg1	Turunç	KY271051 %100
PCg1	Portakal	HM034807 %100
PCg2	Portakal	KY271051 %100
PCg3	Portakal	KY271051 %100
PCg4	Portakal	KY271051 %100
PCg5	Portakal	KY271051 %100
PCg6	Portakal	KX786447 %100
PCg7	Portakal	KX786447 %99
PCg8	Portakal	KY271051 %100
PCg9	Portakal	KY271051 %100
PCg10	Portakal	KY271051 %100
PCg11	Portakal	KY271051 %100
PCg12	Portakal	KY271051 %100
PCg13	Portakal	KP943528 %100
ACg1	Altıntop	KY271051 %100

---

Çizelge 4.7. Farklı turunçgil türlerinden elde edilen *Colletotrichum karstii* türüne ait izolatların türlerinin GAPDH primeri ile dizi analizler ve BLAST benzerlikleri (%)

<b>İzolat</b>	<b>Konukçu türü</b>	<b>Genbankası benzerlik (%)</b>
LCK1	Limon	MF979074 % 100
LCK7	Limon	MF979074 % 100
LCK6	Limon	MF979074 % 100
LCK2	Limon	MF979074 % 100
LCK3	Limon	MF979074 % 100
LCK4	Limon	KX578772 % 99
LCK5	Limon	KP729611 % 100
LCK8	Limon	KP729611 % 100
LCK9	Limon	MF979074 % 100
LCK10	Limon	MF979074 % 100
LCK11	Limon	MF979074 % 100
LCK12	Limon	MF979074 % 100
LCK15	Limon	MF979074 % 100
LCK17	Limon	MF979074 % 100
LCK18	Limon	MF979074 % 100
LCK19	Limon	KY986897 % 100
LCK21	Limon	KY986897 % 100
LCK23	Limon	KY039986 % 100
LCK36	Limon	KY986897 % 100
LCK41	Limon	KY986897 % 100
LCK37	Limon	KY986897 % 100
LCK42	Limon	KY039986 % 100
LCK43	Limon	MF543065 % 100
LCK46	Limon	KY039986 % 100
LCK47	Limon	KY039986 % 100
LCK48	Limon	KY039986 % 100
LCK50	Limon	KY986897 % 100
LCK51	Limon	KY986897 % 100
LCK54	Limon	KY986897 % 100
LCK57	Limon	KM055654 % 100

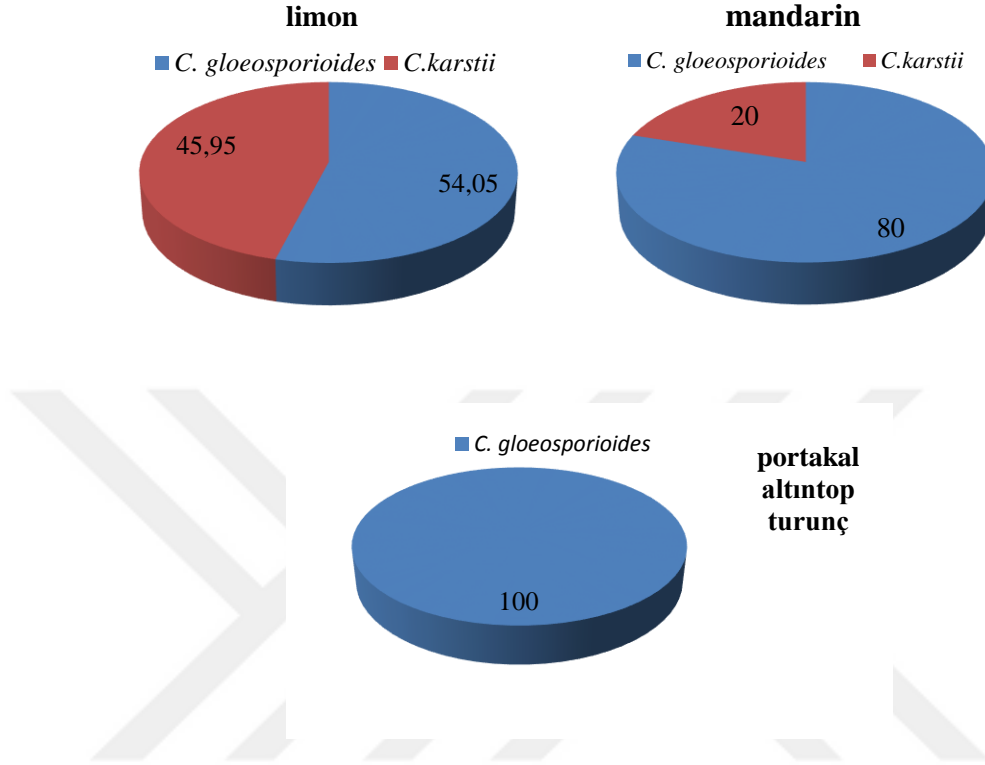
Çizelge 4.7. (devam) Farklı turunçgil türlerinden elde edilen *Colletotrichum karstii* türüne ait izolatların türlerinin GAPDH primeri ile dizi analizler ve BLAST benzerlikleri (%)

LCk58	Limon	KY986897 % 100
LCk60	Limon	KY986897 % 100
LCk62	Limon	KY986897 % 100
LCk63	Limon	KY986897 % 100
MCK1	Mandarin	KY986897 % 100
MCK9	Mandarin	KY039986 % 100
MCK12	Mandarin	KY039986 % 100
MCK13	Mandarin	KY039986 % 100
MCK18	Mandarin	KY039986 % 100
MCK23	Mandarin	KY986897 % 100
MCK31	Mandarin	KY986897 % 100
MCK32	Mandarin	KY986897 % 100

Moleküler karakterizasyon çalışmalarından sonra turunçgil bahçelerinden elde edilen *Colletotrichum* türlerinin turunçgil konukçu türlerine göre dağılımları incelendiğinde (Şekil 4.12) limonda *C. gloeosporioides*'in 40 izolatu (%54,05) ve *C. karstii*'nin ise 34 izolatu (%45,95) tanımlanmıştır. Mandarin türünde ise *C. gloeosporioides*'in 32 (%80) ve *C. karstii*'nin 8 izolatu (%20) karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, portakalda 13, altıntop ve turunç türünde birer izolat olmak üzere toplam 15 izolat (%100), *C. gloeosporioides* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuca göre limonda *Colletotrichum*'un 2 türüne ait izolat sayısının birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir.

*Colletotrichum* cinsine ait tür kavramlarının anlaşılmasına yönelik son gelişmeler, birçok taksonun tekli türlerden ziyade tür kompleksleri olarak değerlendirilmesine yol açmıştır (Weir ve ark., 2012). Özellikle *C. gloeosporioides* tür kompleksi, günümüzde turunçgillerle ilişkili olduğu bildirilen ek türleri de içine alan 30'dan fazla türü içermektedir (Huang ve ark., 2013; Peng ve ark., 2012). Bu bağlamda multilokus gen dizi analizlerinin içinde bulunduğu polifazik yaklaşımları esas alan çalışmalar, turunçgil antraknozu ile ilişkili *Colletotrichum*'a ait türlerin *C. gloeosporioides* tür kompleksinde yer aldığını, ancak *C. boninense*, *C. acutatum* ve

daha seyrek olarak *C. truncatum* tür kompleksi içinde de yer alabildiğini göstermiştir (Huang ve ark. 2013; Hyde ve ark. 2014).



Şekil 4.12. *Colletotrichum* türlerine bağlı izolatların turunçgil konukçu türlerine göre dağılımı (%)

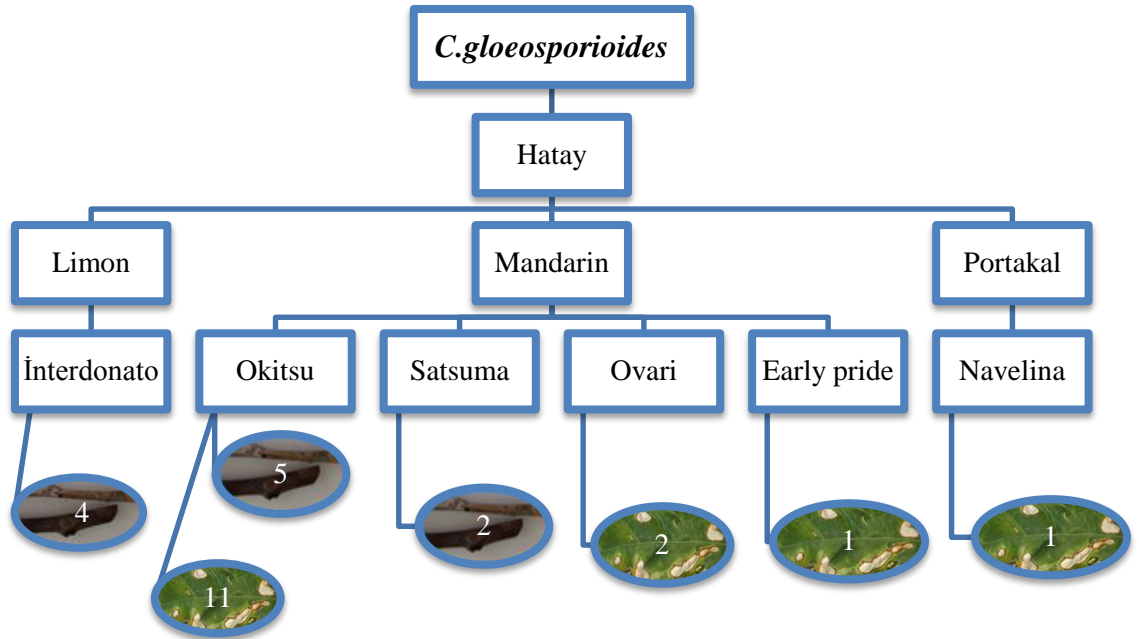
Çalışmamızda izlediğimiz yöntem ve buna bağlı elde ettiğimiz bulgularla uyumlu olarak Avrupa’da turunçgil üretimi alanlarındaki antraknoz hastalığı ile ilişkili *Colletotrichum* çeşitliliğinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonla ilk kez ortaya konmuştur (Guarnacia ve ark., 2017; Douanla-Meli ve Unger, 2017). Benzer genomik bölgelerinin multilokus filogenetik dizi analizleri sonucunda *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense* şeklinde elde edilen veriler, çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları doğrular nitelikte olmuştur.

Son zamanlarda benzer şekilde, İtalya’da portakalda derim öncesi hastalık etmeni *Colletotrichum*’un türlerini tespit etmek için yapılan çalışmada, fungusun 56 tek spor izolatu elde edilmiştir (Aiello ve ark., 2015). Bu izolatların, ITS1 ve ITS4 evrensel primerleri ile spesifik TubGF1-TUbGR ve GDF-GDR primerleri kullanarak yapılan moleküler ve morfolojik analizler sonucunda *C. gloeosporioides*’in 44 ve *C.*

*karstii*'nin 12 izolatu tanımlanmıştır. Bu veriler çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları büyük oranda destekler nitelikte bulunmuştur.

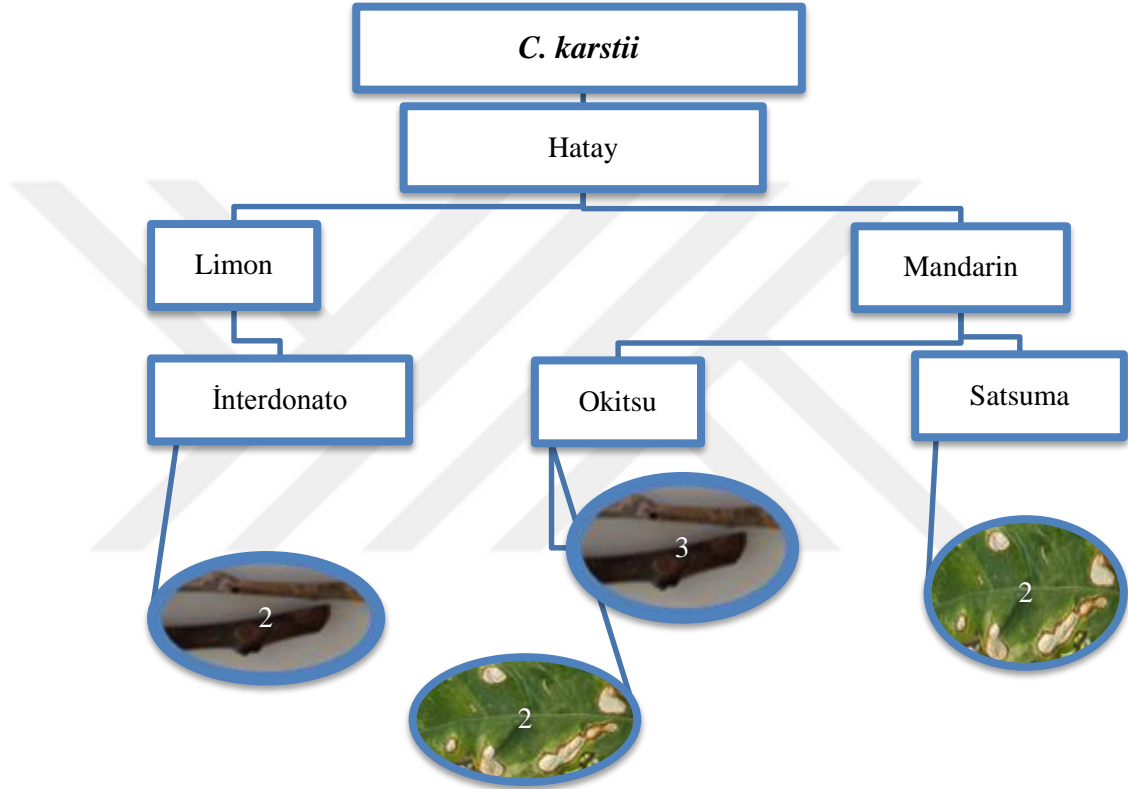
Benzer şekilde Huang ve ark., (2013), Çin'de turunçgil üretimi yapılan alanlarda *Citrus* ve *Fortunella* konukçu bitki türlerinin yaprak, sürgün ve meyvelerinden *Colletotrichum*'un 312 izolatını elde etmişlerdir. Araştırmacılar hem morfolojik hem de moleküler filogenetik multilokus analizler sonucunda, *C. gloeosporioides* tür kompleksi içerisinde *C. gloeosporioides* ve *C. fructicola*, türlerinin; *C. boninense* tür kompleksi içerisinde ise *C. karstii* ve yeni bir tür olan *C. citricola* türlerinin yer aldığı bildirmişlerdir. Turunçgil türlerinde *Colletotrichum*'un farklı türlerinin (*C. fructicola* ve *C. citricola*) bulunduğu mevcut çalışma, sonuçlarımızı büyük oranda doğrulamaktadır.

İl düzeyinde *Colletotrichum* 'a ait türlerin dağılımı incelendiğinde (Şekil 4.13); Hatay ilinde turunçgil tür ve çeşitlerine göre, *C. gloeosporioides*, sadece interdonato çeşidi limonun sürgünlerinden elde edilirken, dört farklı mandarin çeşidinde hem sürgün hemde yapraklarda kaydedilmiştir. Söz konusu tür portakalda naveline çeşidinin sadece yaprağından elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Hatay ilinde *C.gloeosporioides* türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları.

Bir diğerk tür olan *Colletotrichum karstii*, sadece yine limonun interdonato çeşidinin sürgünlerinden elde edilirken (Şekil 4.14), mandarinin iki farklı çeşidinin (okitsu ve satsuma) hem yaprak hem de sürgünlerinde saptanmıştır. Hatay ilinde turunçgil antraknoz etmenleri olarak kaydedilen *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerinin, turunçgil türlerinin sürgün ve yapraklarından elde edilen izolat sayılarının birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir.

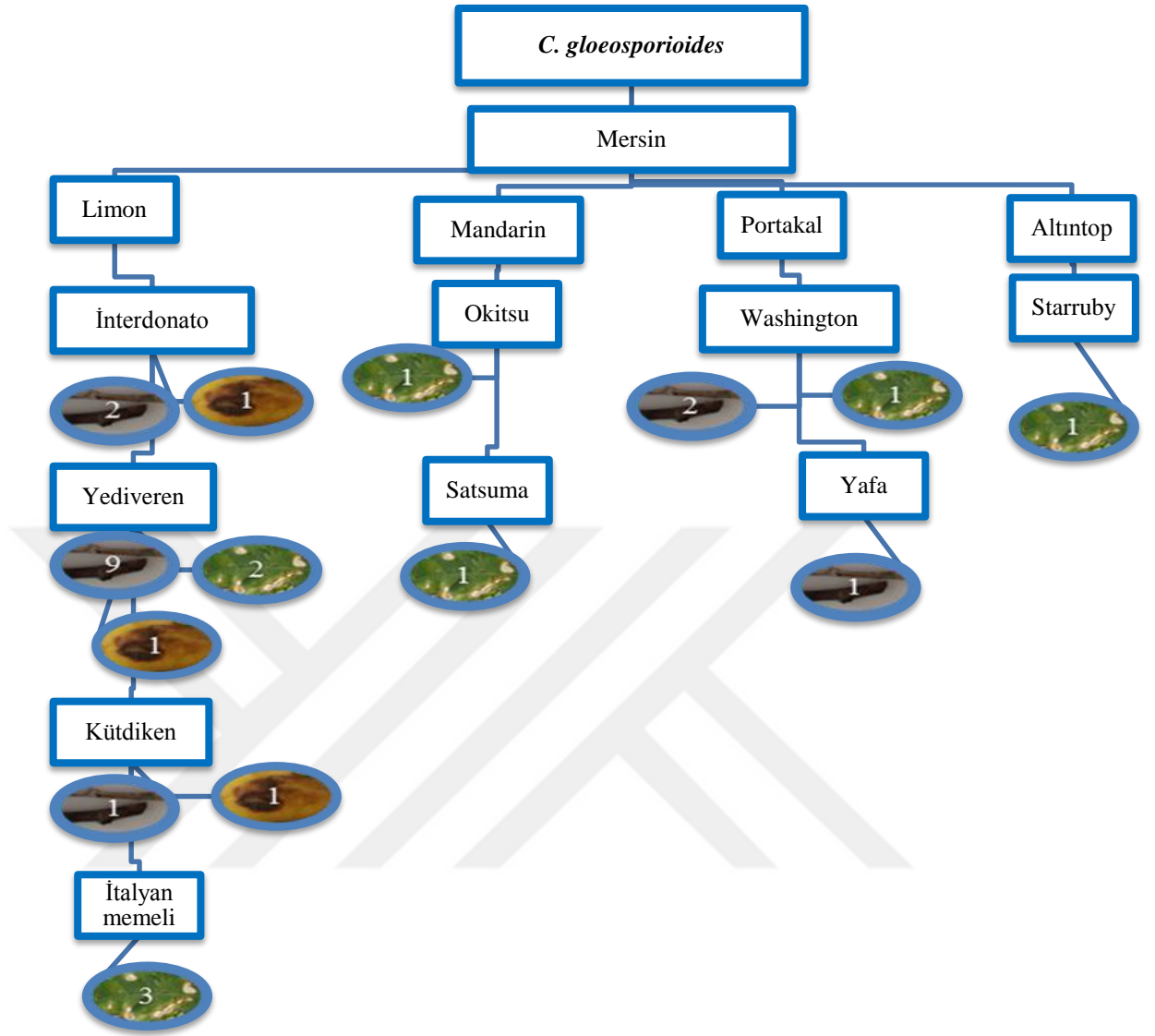


Şekil 4.14. Hatay ilinde *C.karstii* türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları.

Mersin’de turunçgil tür ve çeşitlerine göre *Colletotrichum*’un tür çeşitliliği incelendiğinde (Şekil 4.15), *C. gloeosporioides* türü; limon, mandarin, portakal ve altıntop türlerinde bulunmuştur.

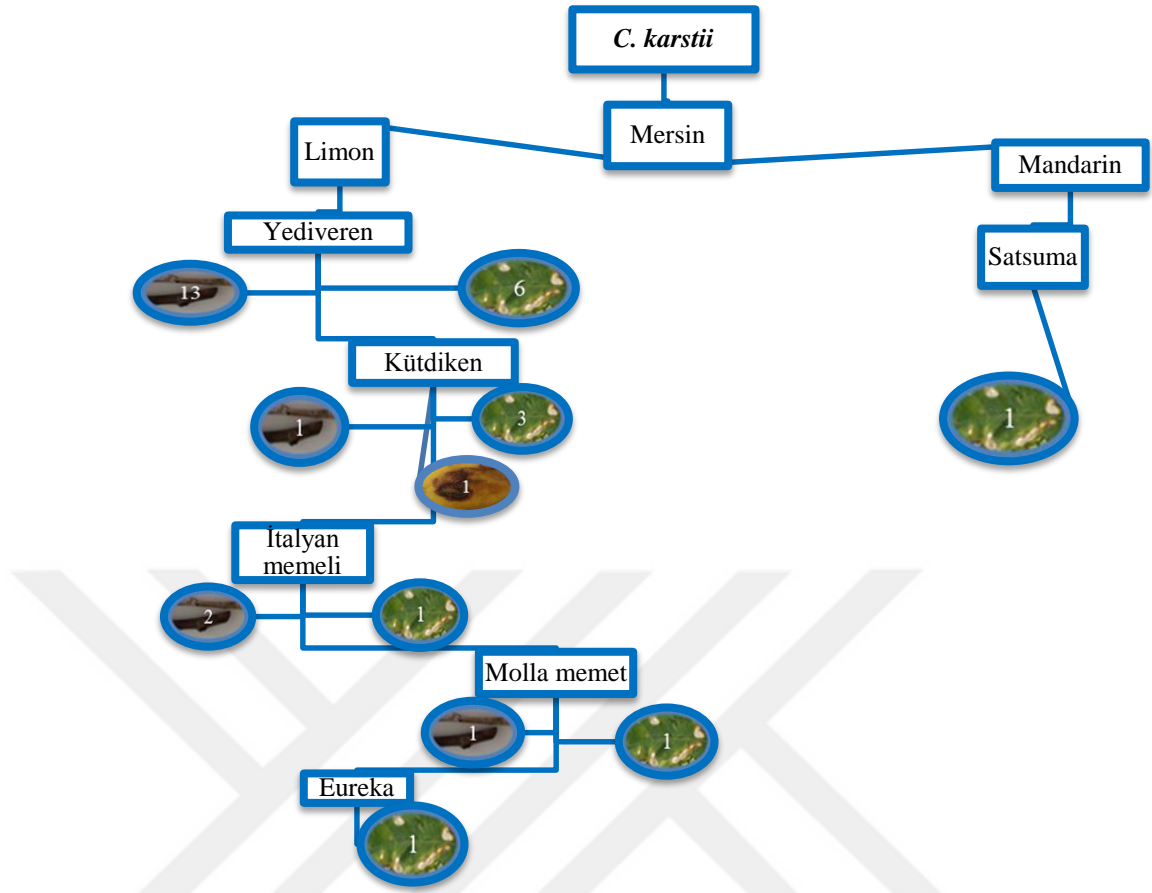
Bu fungal tür, en fazla limonun 4 çeşidinde sürgün, yaprak ve meyvelerden elde edilmiştir. *C. gloeosporioides*, mandarinin Okitsu ve Satsuma çeşitlerinin sadece yapraklarından elde edilirken, Washington ve Yafa portakalların hem sürgün hemde yapraklarından izole edilmiştir. Altıntopda ise sadece StarRuby çeşidinin yaprağında saptanmıştır (Şekil 4.15).





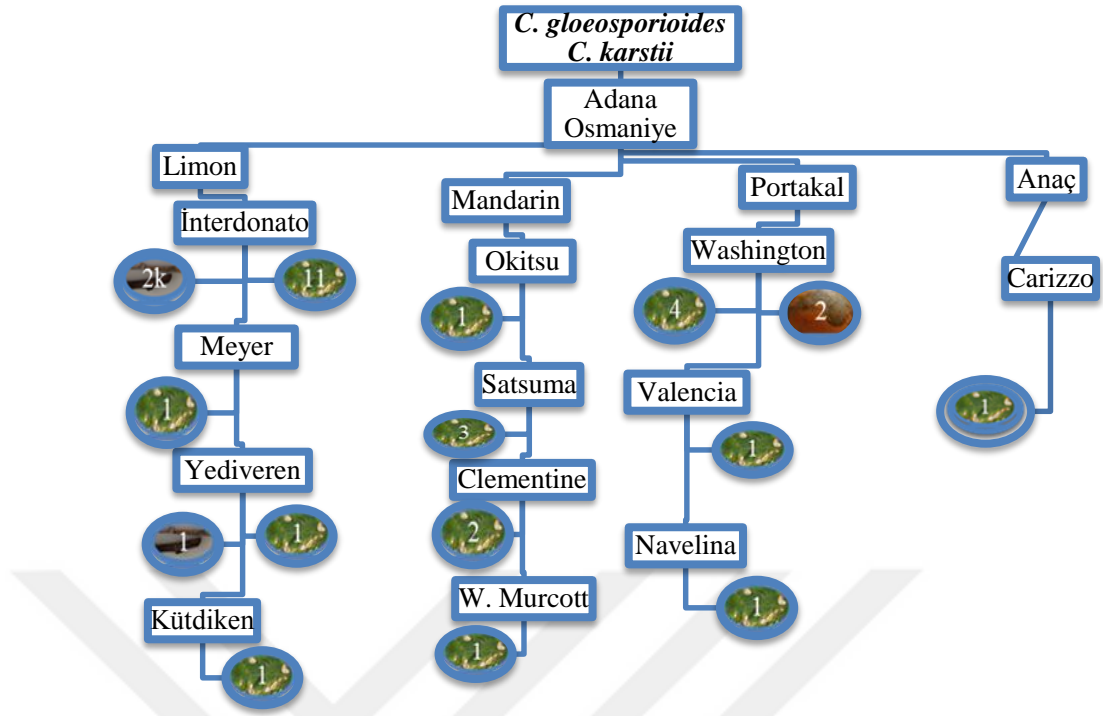
Şekil 4.15. Mersin ilinde *C.gloeosporioides* türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları

Bölgede turunçgillerde tespit edilen bir diğer antraknoz türü olan *C. karstii*, Mersin' in turunçgil üretim alanında sadece limon ve mandarin türlerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Bu tür, 5 farklı limon çeşidinde en fazla sürgünde olmak üzere, yaprak ve meyvelerde saptanmıştır. Bu patojen mandarin türünün sadece satsuma çeşidinin yaprağından izole edilmiştir.



Şekil 4.16. Mersin ilinde *C.karstii* türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları

Turunçgil *Colletotrichum* türlerinin Adana-Osmaniye illerinde turunçgil tür ve çeşitlerine göre dağılımı incelendiğinde (Şekil 4.17), her turunçgil türünün birden fazla farklı çeşitlerinde antraknoz etmeni *Colletotrichum* türlerine rastlanmıştır. Turunçgil türlerinden limon ve mandarinde 4, portakalda 3 farklı çeşit ve bir adet Carrizo anacının en fazla yapraklarında olmak kaydıyla yaprak ve meyvelerden izole edilmiştir. Büyük çoğunluğu yapraklardan elde edilen, antraknoz etmeninin tümünün *C. gloeosporioides* olduğu belirlenmiştir. *C. karstii* ise, sadece interdonato limon çeşidinin sürgünleri üzerinde saptanmıştır. Antraknoz etmeni *Colletotrichum* türlerinin Adana ilinde turunçgil sürgünlerinde az rastlanılmasının sebebi olarak, turunçgil bahçelerinin budama ve ilaçlama gibi bakım işlemlerinin dengeli ve düzenli yapılması gösterilebilir. Çünkü genel itibari ile bahçelerde ağaçların sürgünlerinde uç kurutan (*Plenodomus tracheiphilus*) ve dal yanıklığı (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) benzeri geriye doğru ölüm belirtilerine de rastlanılmamıştır.



Şekil 4.17. Adana ve Osmaniye illerinde *C. gloeosporioides* ve *C.karstii* türüne ait izolatların turunçgil tür ve çeşitlerinin organları düzeyindeki dağılımları

Benzer bir çalışmada (Ramos ve ark., 2016), *Colletotrichum karstii* (*C. boninense* tür kompleksinin bir üyesi) ve *C. gloeosporioides* türlerinin, farklı turunçgil çeşitlerinin yaprak, dal, çiçek ve meyvelerinde neden olduğu belirtiler tanımlanmıştır. Mevcut çalışmada, *C. gloeosporioides* yüksek oranda (% 87) izole edilmesine karşın, *C. karstii* ise belirli coğrafi bölgelerde limonun sürgün ve yapraklarında daha sık tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerden farklı olarak, *C. gloeosporioides* türü ise sadece çiçeklerde saptanmıştır. Ayrıca araştırmacılar, turunçgil *C. karstii* ve *C. gloeosporioides* türlerinin, tatlı portakal çiçekleri ve meyveleri ile tatlı portakal, mandarin ve limonun yapraklarında patojen olduklarını bildirmişlerdir. Bu bulguların elde ettiğimiz verileri destekler nitelikte olduğu görülmektedir.

*Colletotrichum*'a ait türlerin moleküler filogenetik analiz çalışmaları için mevcut araştırmada 22 izolat ve NCBI veri tabanından 20 referans izolat seçilmiştir. Konukçu bitki türlerine göre izolatların 16'sı mandarin, 5'i limon ve biride portakal'dan alınmıştır. Dizi analizleri sonucu elde edilen Genbankası erişim numaraları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Sonuçta *C. gloeosporioides*' e ait 23 ve *C. karstii*'ye bağlı 6 izolata erişim numarası alınmıştır.

Çizelge 4.8. *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerinin ACTIN, GAPDH, CHS, TUB ve ITS genomik bölgelerine göre yapılan dizi analizleri sonucunda alınan GenBankası Erişim Numaraları

Tür Adı	İzolat Kodu	Konukçu türü	Genbankası Erişim Numaraları				
			ACTIN	GAPDH	CHS	TUB	ITS
<i>C. gloeosporioides</i>	MC15	Mandarin	MF480746	MG951770	MG951805	MH156770	MH156746
<i>C. gloeosporioides</i>	MC16	Mandarin	MF480747	-	MG951806	MH156771	MH156747
<i>C. gloeosporioides</i>	MC8	Mandarin	MF616518	MG951776	MG951813	MH156772	MH156749
<i>C. gloeosporioides</i>	MC13	Mandarin	MF616519	MG951783	MG951814	MH156773	MH156750
<i>C. gloeosporioides</i>	LC1	Limon	MF480745	MG951769	-		MG966508
<i>C. gloeosporioides</i>	MC3	Mandarin	MF616512	MG951779	MG951816	MH156775	MH156751
<i>C. gloeosporioides</i>	MC10	Mandarin	MF616513	MG951780	MG951817	MH156776	MH156752
<i>C. gloeosporioides</i>	LC5	Limon	MF616514	MG951781	MG951819	MH156777	-
<i>C. gloeosporioides</i>	MC2a	Mandarin	MF616517	MG951785	MG951821	MH156779	MH156753

Çizelge 4.8. (devam) *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerinin ACTIN, GAPDH, CHS, TUB ve ITS genomik bölgelerine göre yapılan dizi analizleri sonucunda alınan GenBankası Erişim Numaraları

<i>C. gloeosporioides</i>	MC5	Mandarin	MG272474	MG951786	MG951822	MH156780	MH156754
<i>C. gloeosporioides</i>	LC1	Limon	MF480745	MG951769	-		MG966508
<i>C. gloeosporioides</i>	LC3	Limon	MG272475	MG951787	MG951823	-	MH051304
<i>C. gloeosporioides</i>	MC1	Mandarin	MG387952	MG951772	MG951824	MH156781	MH156755
<i>C. gloeosporioides</i>	MC3b	Mandarin	MG387954	MG951775	MG951826	-	MH156758
<i>C. gloeosporioides</i>	MC11	Mandarin	MG951835	MG951790	MG951829		MH156763
<i>C. gloeosporioides</i>	OC1	Portakal	MF616510	MG951777	MG951827	MH156784	MH156759
<i>C. gloeosporioides</i>	MC14	Mandarin	MG951837	MG951792	MG951831	-	MH156761
<i>C. gloeosporioides</i>	MC12	Mandarin	MG951836	MG951791	MG951830	-	MH156760
<i>C. gloeosporioides</i>	MC3a	Mandarin	MG387956	MG951773	-	MH156786	MH156756
<i>C. gloeosporioides</i>	LC1b	Limon	MF616511	MG951789	MG951815	-	-

Çizelge 4.8. (devam) *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerinin ACTIN, GAPDH, CHS, TUB ve ITS genomik bölgelerine göre yapılan dizi analizleri sonucunda alınan GenBankası Erişim Numaraları

<i>C. gloeosporioides</i>	LC9	Limon	MF616516	MG951778	MG951828	MH156774	MH051305
<i>C. gloeosporioides</i>	MC17	Mandarin	MG951839	MG951794	MG951833	-	MH156762
<i>C. gloeosporioides</i>	LC8	Limon	MG951838	MG951793	MG951832	MH156785	MG966509
<i>C. karstii</i>	MCK6	Mandarin	MF511181	MG951782	MG951807	-	MH156748
<i>C. karstii</i>	LCK6	Limon	MF511182	-	MG951808	-	MH051303
<i>C. karstii</i>	LCK7	Limon	MF616515	MG951784	MG951820	MH156778	
<i>C. karstii</i>	LCK2	Limon	MG387953	MG951788	-	MH156782	MH051306
<i>C. karstii</i>	MCK1a	Mandarin	MG387955	MG951774	MG951825	MH156783	MH156757
<i>C. karstii</i>	LCK1a	Limon	MF511180	MG951771	MG951818	-	MG966510

Filogenetik analiz için, ITS geni kullanılarak maksimum likelihood yöntemi ile oluşturulan dendrogramda (Şekil 4.18), bu çalışmada saptanan izolatlar ile NCBI veritabanında seçilen izolatlar arasında farklılık olduğu gözlenmektedir. Çalışmada elde edilen *Colletotrichum* izolatlar dendrogramda ayrı bir grup şeklinde yer almaktadır. Bu şekilde ITS gen bölgesine göre *Colletotrichum* izolatları tür bazında ayırt edilememiştir.

Actin genine spesifik primerlerle elde edilen dizi analizi ile çizilen dendrogramda (Şekil 4.19), *Colletotrichum* türlerine ait izolatlar iki ayrı gruba ayrılarak *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* referans izolatları ile ayrı gruplar oluşturmuştur.

GAPDH ve CHS genleri, *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerinin moleküler tanısı için kullanılan spesifik gen bölgeler olduğundan, seçilmiş olan *Colletotrichum*' a ait izolatlar, *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerine ait kayıtlı referans izolatları ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.20; Şekil 4.21).

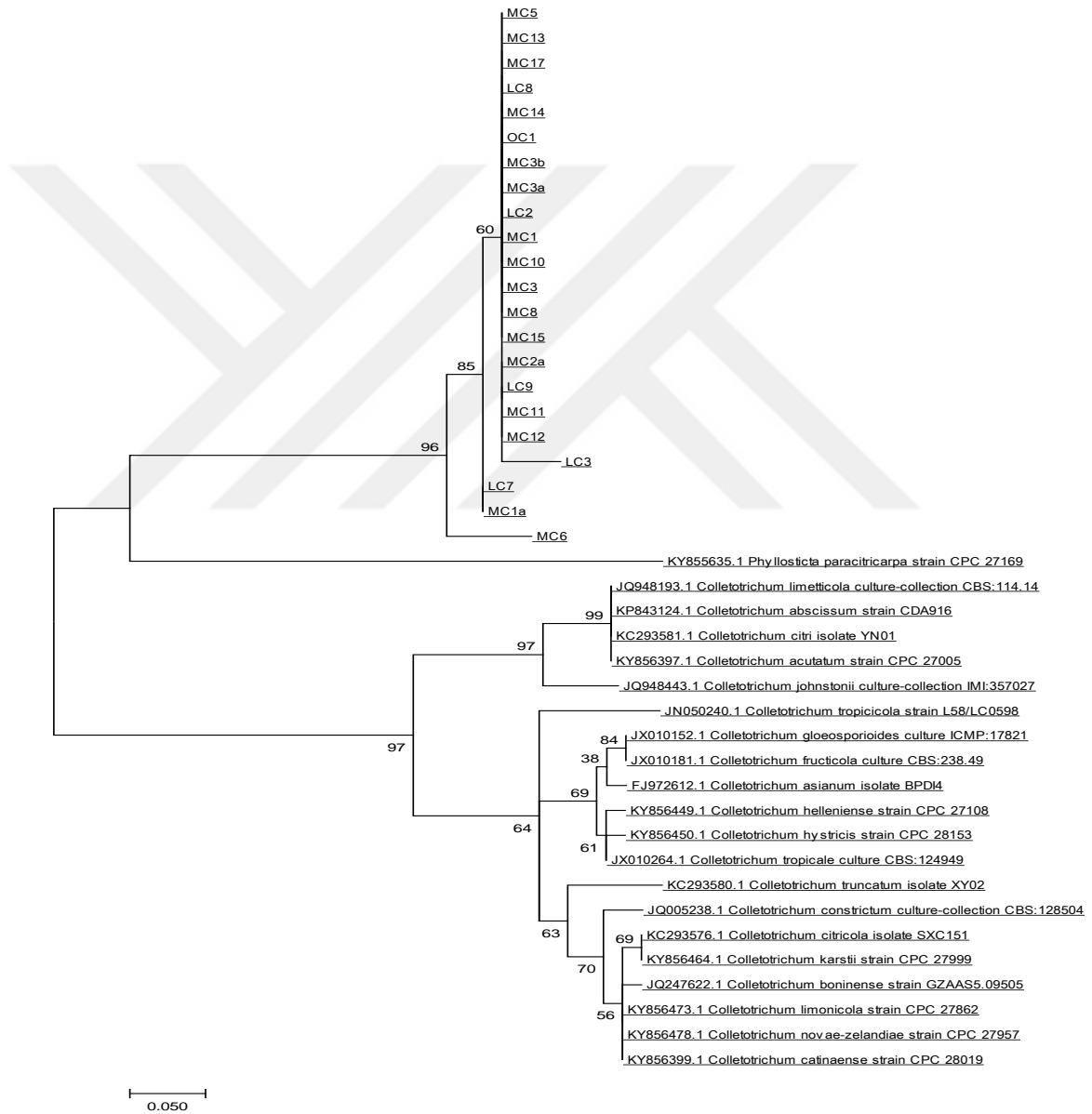
*Colletotrichum* türlerinin ACTIN, GAPDH, CHS ve ITS gen bölgelerine göre oluşturulan kombinasyon halindeki dendrogramda (Şekil 4.22) görüleceği gibi izolatlar, *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* şeklinde iki gruba ayrılmıştır. Bu filogenetik analizde kullanılan temsili 22 izolattan 3'ü *C. karstii* grubunda, 19 izolat ise *C. gloeosporioides* grubunda yer almıştır. *C. gloeosporioides* ana grubu altında ayrılan izolatlardan birkaç izolat ana gruptan küçük alt gruplara ayrılmıştır. Bunu durum, *C. gloeosporioides* tür kompleksi içerisinde ortaya çıkan morfolojik oluşumlar ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Son zamanlarda *Colletotrichum* tür komplekslerinin sistematik çalışmalarında, tanınabilir fenotipik karakterlerle birlikte multilokus filogenisini vurgulayarak tür tanısında polifazik bir yaklaşım kullanılmaya başlanmıştır.

Benzer şekilde, Rhaiem ve Taylor (2016) elde ettikleri, *C. gloeosporioides* izolatlarının, kültürel ve morfolojik özellikleri internal spacer rDNA (ITS), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glutamine synthetase (GS) ve ApMat lokus bölgeleri ve multilokus dizilerini kullanarak filogenetik analizler ile doğrulamışlardır.

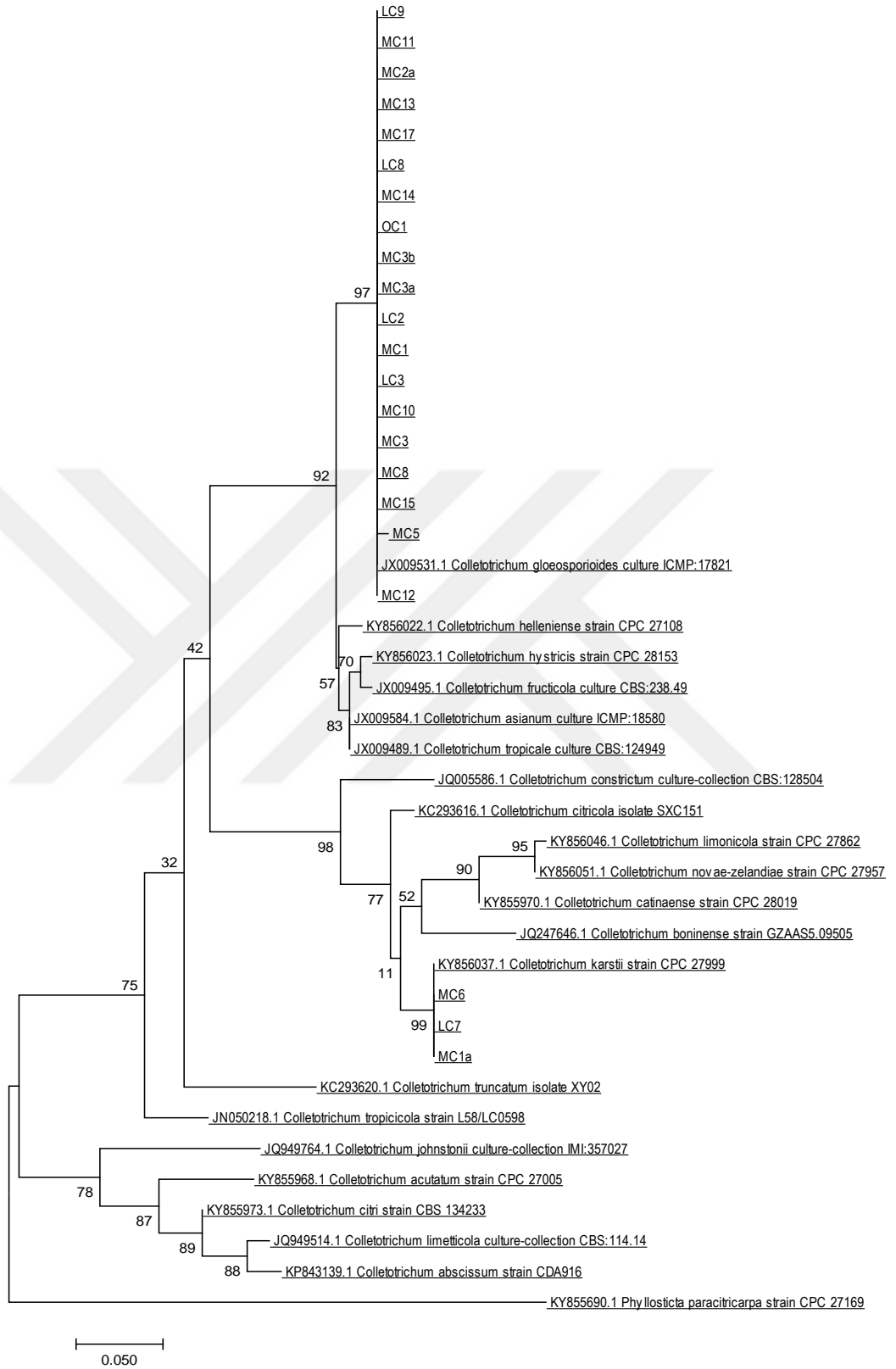
Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar gösteriyor ki Akdeniz Bölgesi'nde turunçgil üretim alanlarında görülen Antraknoz hastalığı etmenlerinin *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* olduğu ilk kez birden fazla tanı yöntemi ile ayrıntılı olarak bu çalışma ile ortaya konmuştur. *Colletotrichum*'un yeni taksonomik sınıflandırması ışığı altında, antraknozda

sorumlu etmenlerin/patojenlerin fungal populasyon yapısını aydınlatmak ve tanımlamak dikkate değer bir durum olarak ifade edilebilir. Bu ayrıca turunçgil antraknoz hastalığının yönteminde daha fazla araştırma ve uygulama için hızlı ve güvenilir tanı araçlarının gerekli olduğunun altını çizmektedir. Diğer bir ifadeyle, multilokus dizi analizleri ve virülenslik denemeleri ile elde edilen bilgilere dayanarak *Colletotrichum*-turunçgil interaksyonlarına yönelik daha fazla araştırma için yararlı bir alt yapı oluşturabilecektir.

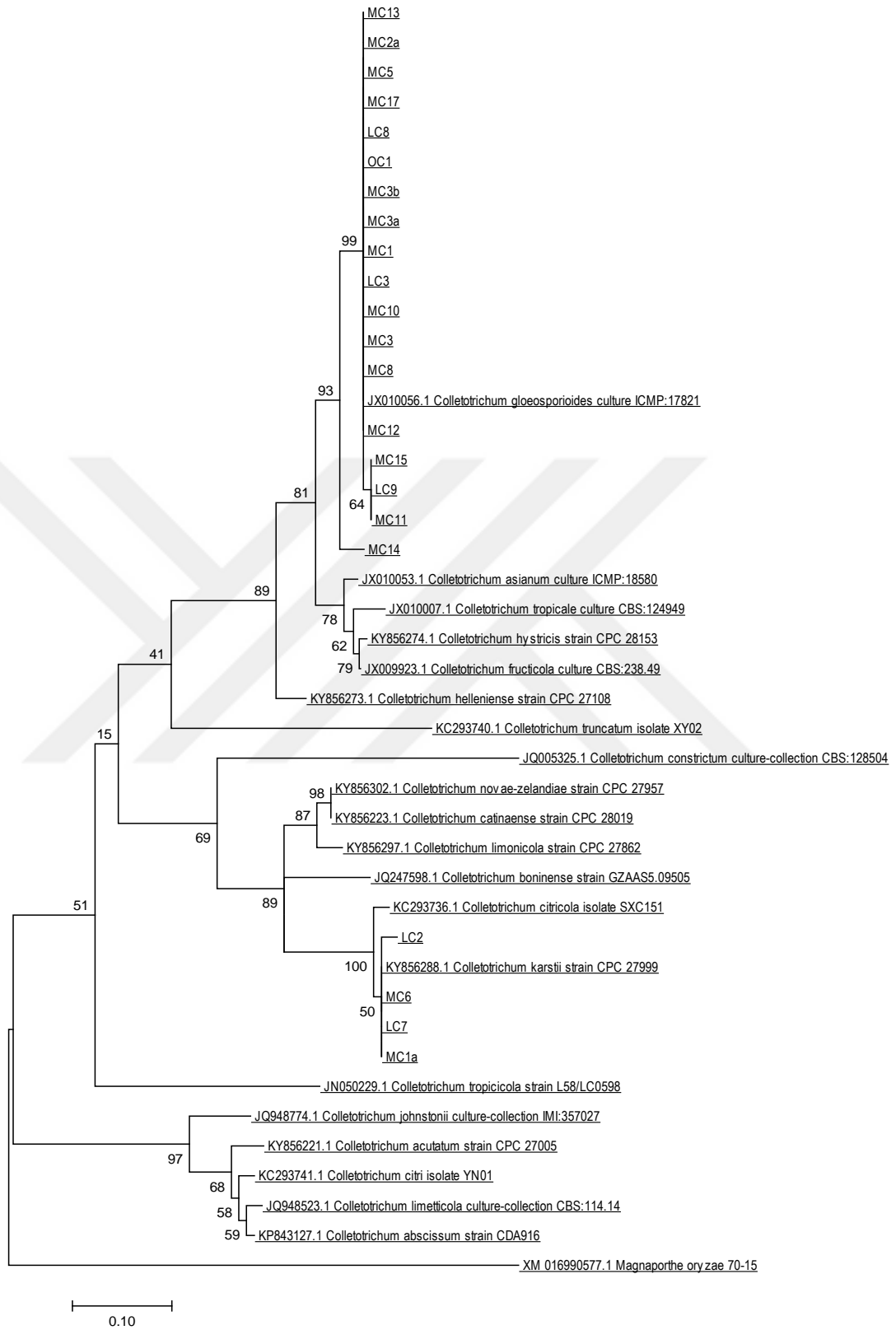


Şekil 4.18. Turunçgil türlerinden elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının ITS gen dizisine ait dendrogramı

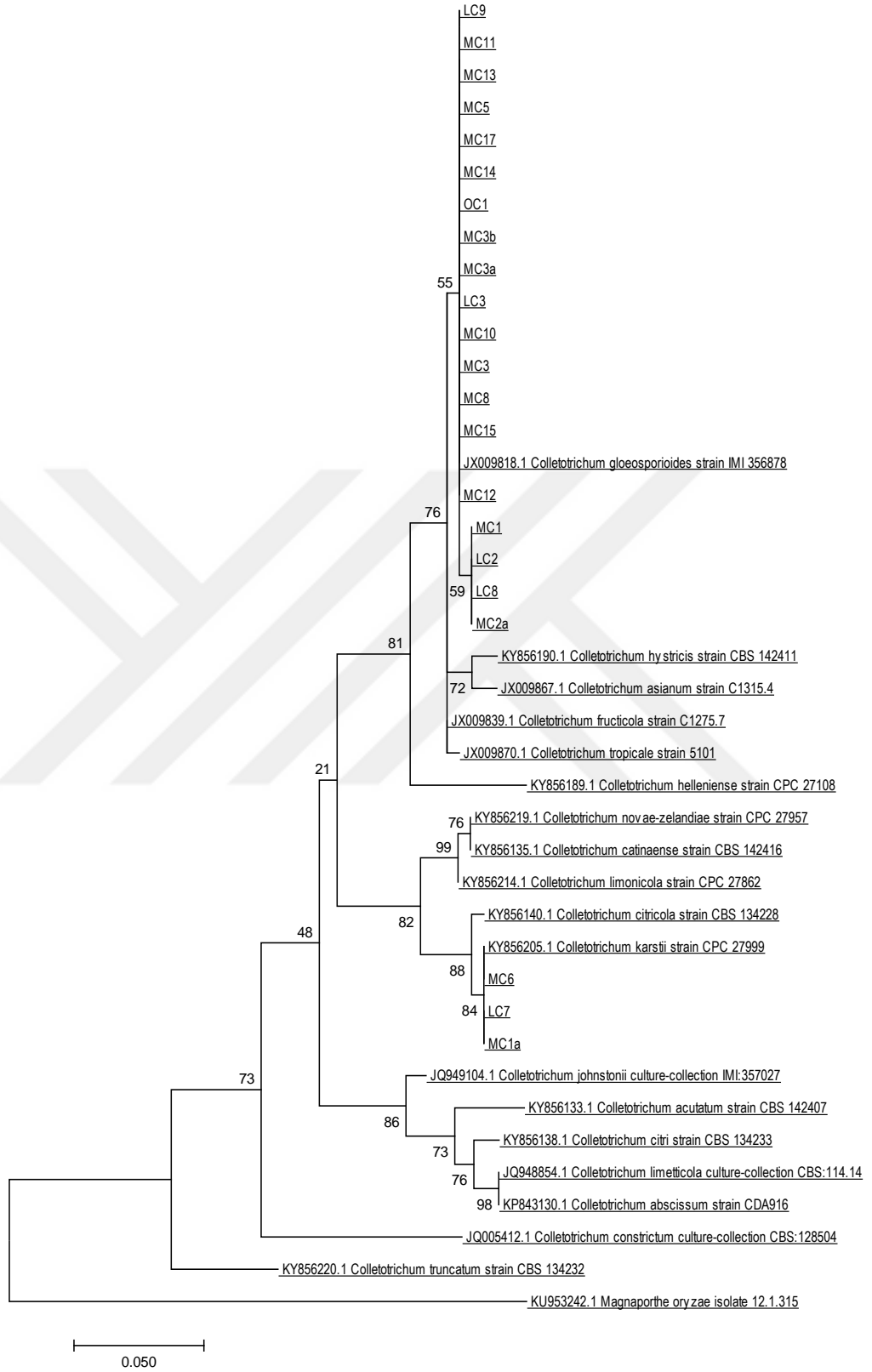




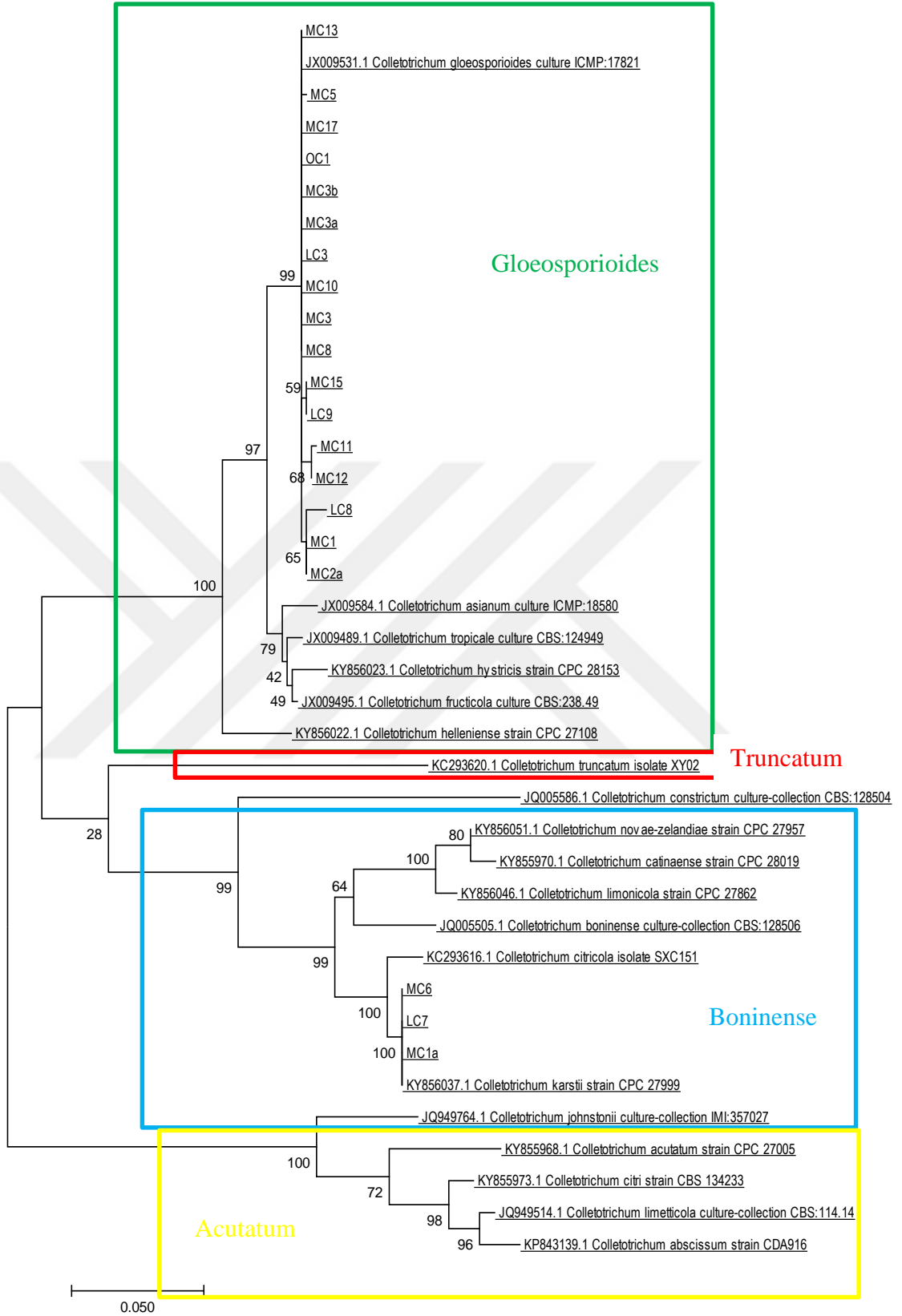
Şekil 4. 19. Turunçgil türlerinden elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının Actin gen dizisine ait dendrogramı



Şekil 4.20. Turunçgil türlerinden elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının GAPDH gen dizisine ait dendrogramı



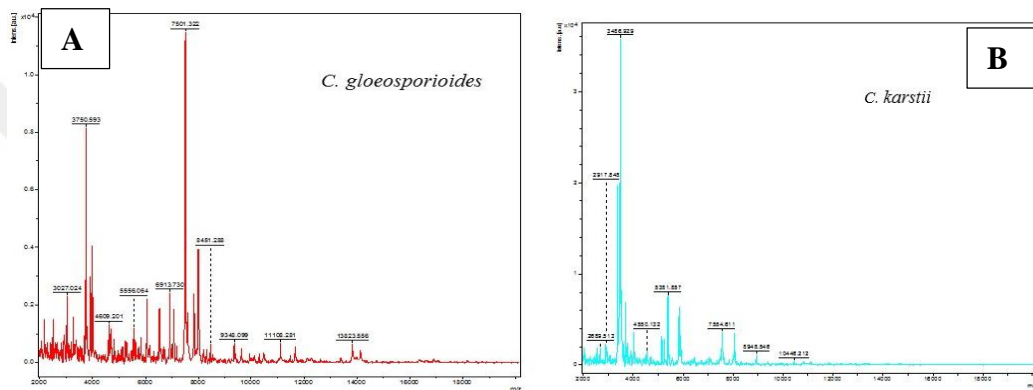
Şekil 4.21. Turunçgil türlerinden elde edilen *Colletotrichum* izolatlarının CHS gen dizisine ait dendrogramı



Şekil 4. 22. Turunçgil türlerinden edilen edilen *Colletotrichum* izolatlarının ITS, ACT1, GAPDH ve CHS gen dizilerinin kombinasyonu ile oluşturulan dendrogram

#### 4.5. MALDI-TOF MS (Matrix asisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry) Analizleri

MALDI-TOF MS, bu çalışmada incelenen turunçgil *Colletotrichum* izolatlarının sınıflandırılmasında kullanılan bir diğer analitik tekniktir. Bu amaçla, etanol-formik asit ekstraksiyonundan sonra cihaza yüklenmiş ve Flex kontrol yazılımı ile spektrumlar alınmıştır (Şekil 4.23). Bu spektrumlar, Maldi Biotyper Real-Time Classification (RTC) ile karşılaştırılarak tanı işlemi gerçekleştirilmiştir.

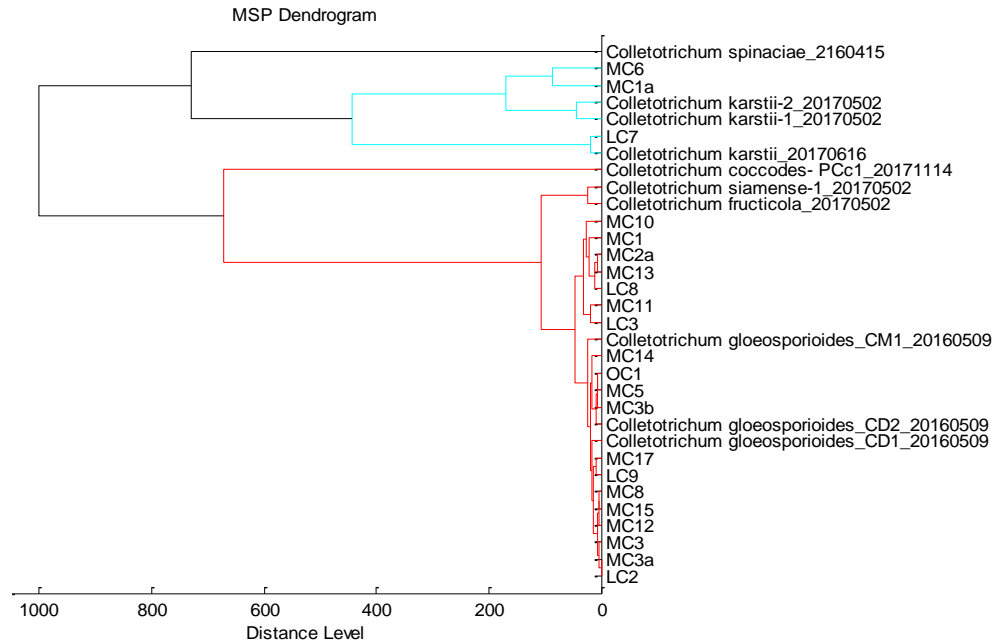


Şekil 4.23. MALDI Biotyper 3.0 programı kullanılarak tür tanısı yapılan turunçgil antraknoz etmeni *C. gloeosporioides* ve *C. karstii*'in temsili izolatlarının MSP dendrogramı ile temsili *C. karstii* (mavi) ve *C. gloeosporioides* (kırmızı) izolatlarının MALDI-TOF MS spektrumları

Protein parmak izi tanısına göre yapılan MALDI TOF MS sonucunda farklı turunçgil türlerinden alınan temsili izolatlardan dendrogram çizilmiştir. Teşhis sonucunda *C. gloeosporioides* türü ile eşleşme gösteren izolatlar, daha önce turunçgillerden izole edilip moleküler olarak kesin tanısı ortaya konan referans *C. gloeosporioides* türü ile aynı grupta yer almıştır. Bununla birlikte, *C. karstii* türü ile eşleşme gösteren izolatların, aynı şekilde referans *C. karstii* türü ile aynı grupta yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.24)

Böylece, MALDI TOF MS verileri, *Colletotrichum* izolatlarının gen bölgelerinin multilokus dizileme ile tür düzeyinde elde edilmiş olan filogenetik analiz sonuçlarını doğrulamıştır. MALDI TOF MS ile ilgili olarak önerilen metot, incelenen *Colletotrichum* izolatlarının hızlı ve güvenilir ayrımı ve sınıflandırılmasında uygun bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak MALDI biyotipleme, *Colletotrichum* türlerinin yol açtığı

turunçgil antraknoz hastalığının rutin tanısı için ekonomik bir araç olarak düşünülmektedir.



Şekil 4.24. MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* izolatların MALDI Biotyper 3.0 programı kullanılarak oluşturulan MSP dendrogramı

MALDI TOF MS tekniği ile *Colletotrichum* türlerinin tanısının yapılması, çalışmamızda yer alan filogenetik analiz sonuçlarının doğrular niteliktedir. Bu şekilde *Colletotrichum* cinsine ait türleri moleküler işlemlerinden önce protein analizine göre ön bir tanı işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, *Colletotrichum*'a ait türlerinin tanılanmasında MALDI TOF MS tekniğinin kullanılması ülkemizde ilk olma özelliği taşımaktadır.

Tüm izolatlar değerlendirildiğinde, *C. gloeosporioides*'in 54 izolatu ile *C. karstii*'nin 30 izolatu 2.300-3.000 (yeşil renk) arası skor değerleri, *C. gloeosporioides*'in 18 izolatu ile *C. karstii*'nin 12 izolatu 1.700-1.999 (sarı renk) skor değerleri şeklinde gruplandırılmıştır (Çizelge 4.9).

Fungusların tanısında kullanılan MALDI TOF MS tekniği ile yapılan, *Fusarium fujikuroi* tür kompleksi içinde ayırıcı tür olarak *Fusarium ficicrenscens*'in tanılanması, çalışmamızla benzer şekilde formik asit-etanol ekstraksiyon yöntemi ile analiz edilmiştir.

Elde edilen tüm spektrumlar ve analizler, MALDI Biotyper V 2.0 yazılımı kullanılarak Bruker Mikroflex platformunda değerlendirilmiştir. Sonuçta cihaz, *Fusarium*' un 3 izolatı 2.193, 2.200 ve 2.226 skoru ile güvenilir bir tanılama yapmıştır. (Al-Hatmi vd. 2016).

Çizelge 4. 9. MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında analiz sonuçları

İzolat	Konukçu	Tür tanısı	Değer
LC1	Limon	<i>C. gloeosporioides</i>	2.463
LC3	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.324
LC4	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.021
LC2	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.915
LC13	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.861
LC15	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.098
LC5	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.203
LC8	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.022
LC9	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.246
LC10	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.376
LC11	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.400
LC6	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.302
LC7	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.00
LC13	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.129
LC14	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.098
LC16	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.412

Çizelge 4.9. (devam) MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında analiz sonuçları

LC20	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.203
LC22	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.733
LC26	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.246
LC27	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.223
LC28	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.913
LC29	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.814
LC30	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.401
LC31	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.913
LC32	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.765
LC33	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.123
LC34	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.099
LC39	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.434
LC40	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.203
LC38	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.778
LC45	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.333
LC49	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.222
LC52	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.344
LC53	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.324
LC55	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.00
LC56	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	1.789
LC59	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.022



Çizelge 4.9. (devam) MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında analiz sonuçları

LC61	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.246
LC64	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.247
LC65	Limon	<i>C.gloeosporioides</i>	2.376
LCK1	Limon	<i>C.karstii</i>	2.110
LCK7	Limon	<i>C.karstii</i>	2.233
LCK6	Limon	<i>C.karstii</i>	1.788
LCK2	Limon	<i>C.karstii</i>	1.766
LCK3	Limon	<i>C.karstii</i>	2.343
LCK4	Limon	<i>C.karstii</i>	2.000
LCK5	Limon	<i>C.karstii</i>	2.212
LCK8	Limon	<i>C.karstii</i>	2.367
LCK9	Limon	<i>C.karstii</i>	2.022
LCK10	Limon	<i>C.karstii</i>	2.255
LCK11	Limon	<i>C.karstii</i>	1.900
LCK12	Limon	<i>C.karstii</i>	2.444
LCK15	Limon	<i>C.karstii</i>	1.789
LCK17	Limon	<i>C.karstii</i>	1.666
LCK18	Limon	<i>C.karstii</i>	2.078
LCK19	Limon	<i>C.karstii</i>	1.861
LCK21	Limon	<i>C.karstii</i>	2.000
LCK23	Limon	<i>C.karstii</i>	2.098

Çizelge 4.9. (devam) MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında analiz sonuçları

LCK36	Limon	<i>C.karstii</i>	2.427
LCK41	Limon	<i>C.karstii</i>	2.443
LCK37	Limon	<i>C.karstii</i>	2.900
LCK42	Limon	<i>C.karstii</i>	2.246
LCK43	Limon	<i>C.karstii</i>	2.123
LCK46	Limon	<i>C.karstii</i>	2.376
LCK47	Limon	<i>C.karstii</i>	2.232
LCK48	Limon	<i>C.karstii</i>	1.912
LCK50	Limon	<i>C.karstii</i>	1.978
LCK51	Limon	<i>C.karstii</i>	2.466
LCK54	Limon	<i>C.karstii</i>	2.325
LCK57	Limon	<i>C.karstii</i>	2.000
LCK58	Limon	<i>C.karstii</i>	1.914
LCK60	Limon	<i>C.karstii</i>	1.863
LCK62	Limon	<i>C.karstii</i>	2.121
LCK63	Limon	<i>C.karstii</i>	2.099
MC4	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.421
MC5	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.212
MC6	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.734
MC1	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.249
MC3	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.387

Çizelge 4.9. (devam) MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında analiz sonuçları

MC7	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.999
MC8	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.876
MC10	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.899
MC11	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.344
MC14	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.444
MC15	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.799
MC16	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.229
MC17	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.097
MC19	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.423
MC20	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.303
MC21	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.711
MC22	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.222
MC24	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.455
MC25	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.253
MC26	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.934
MC27	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.924
MC28	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.021
MC29	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.128
MC33	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.321
MC34	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.055
MC35	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.232

Çizelge 4.9. (devam) MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında analiz sonuçları

MC36	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.344
MC37	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.111
MC38	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.264
MC39	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.129
MC40	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	2.427
MC41	Mandarin	<i>C.gloeosporioides</i>	1.733
MCK1	Mandarin	<i>C.karstii</i>	2.247
MCK9	Mandarin	<i>C.karstii</i>	2.264
MCK12	Mandarin	<i>C.karstii</i>	1.910
MCK13	Mandarin	<i>C.karstii</i>	1.861
MCK18	Mandarin	<i>C.karstii</i>	2.022
MCK23	Mandarin	<i>C.karstii</i>	2.366
MCK31	Mandarin	<i>C.karstii</i>	2.212
MCK32	Mandarin	<i>C.karstii</i>	2.200
TC1	Turunç	<i>C.gloeosporioides</i>	2.204
PC1	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	2.246
PC2	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	2.247
PC3	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	2.376
PC4	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	2.554
PC5	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	1.990
PC6	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	2.023

Çizelge 4.9. (devam) MALDI TOF MS cihazında tür tanısı yapılan *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* izolatlarının MALDI Biotyper Real-Time Classification (RTC) programında analiz sonuçları

PC7	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	1.966
PC8	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	1.861
PC9	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	2.00
PC10	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	1.999
PC11	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	1.733
PC12	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	2.122
PC13	Portakal	<i>C.gloeosporioides</i>	1.990
AC1	Altıntop	<i>C.gloeosporioides</i>	1.876

#### 4.6. Patojenisite Çalışmaları

Patojenisite denemesinin meyve, yaprak ve sürgün uygulamalarında; Interdonato limon, satsuma mandarin ve Washington portakal çeşitlerinde ortalama lezyon uzunlukları ve hastalık şiddeti belirlenmiştir.

Interdonato limonun meyve uygulamasında *C. gloeosporioides*' in, *C. karstii* türüne göre en yüksek oran olan 43,0 mm ile daha fazla lezyon uzunluğuna neden olduğu tespit edilmiştir. Hastalık şiddeti yönünden değerlendirildiğinde *C. gloeosporioides* türünde yine daha yüksek hastalık şiddeti belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Yaprak uygulaması incelendiğinde; her iki *Colletotrichum* türünde birbirine yakın lezyon uzunluğu kaydedilirken *C. karstii* türünün, *C. gloeosporioides* türüne göre daha fazla lezyon uzunluğu oluşturduğu saptanmıştır. Hastalık şiddeti değerleri yönünden incelendiğinde, her iki türün birbirine yakın oranlarda lezyonlara neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 25).

Çizelge 4.10. *C. gloeosporioides* türüne ait temsili izolatların, Interdonato limon meyve, yaprak ve sürgünlerini kullanarak yürütülen patojenisite denemesinin sonuçları

İzolat kodu	Meyve		Yaprak		Sürgün	
	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti(%)	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti (%)	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti (%)
LC5	38,6±0,8 kl	66,6	20,3±1,5 bc	75	30,3±1,5d	77,7
LC9	38,6±0,6 kl	55,5	10,0±5,0 ab	75	28,3±1,2cd	66,6
LC3	38,6±0,8 kl	66,6	10,3±5,2 ab	50	29,3±0,6cd	100
LC2	31,6±1,8 g-l	44,4	17,6±1,5 bc	100	16,6±1,2a-d	55,5
LC8	35,0±2,5 j-l	33,3	10,0±5,0 ab	25	3,3±3,3a	100
LC1	31,6±0,8 f-l	33,3	10,3±5,2 ab	50	18,6±3,4 a-d	100
LC14	36,6±2,0 j-l	22,2	17,0±1,0 bc	100	6,6±3,3ab	33,3
LC4	34,0±2,6 h-l	44,4	19,3±0,6 bc	25	28,3±1,2cd	100
LC32	30,6±2,4 e-l	55,5	17,6±1,5 bc	75	29,3±0,6cd	55,5
LC7	28,6±4,3 d-k	66,6	20,6±0,6 bc	50	30,3±1,45d	100
LC13	39,0±2,6 kl	100	19,3±0,6 bc	25	28,3±1,2cd	66,6
LC15	43,0±0,5 l	77,7	17,6±0,3 bc	75	29,3±0,6cd	66,6
LC16	22,3±1,2 b-i	33,3	20,0±1,0 bc	75	10,6±1,2 a-d	44,4
LC20	34,0±2,4 h-l	44,4	21,3±1,0 c	50	23,6±0,6a-d	100
LC22	35,6±1,0 j-l	55,5	23,3±0,3 c	100	28,0±0,6cd	44,4
LC10	33,0±0,8 g-l	100	17,6±1,0 bc	50	29,6±0,3cd	77,7
LC11	20,3±0,8 b-f	44,4	10,0±5,0 ab	100	24,3±1,5b-d	66,6
LC6	34,3±0,8 i-l	55,5	10,3±5,2 ab	75	3,3±4,0a	100
LC26	35,0±1,0 j-l	55,5	10,3±5,0 ab	100	21,6±3,3a-d	66,6
LC33	33,0±0,8 g-l	66,6	17,6±0,6 bc	75	29,3±0,3cd	100

\*Sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine (p=0,05) göre birbirinden önemli ölçüde farklıdır

Sürgün denemesinde; *C.gloeosporioides* türünün yüksek oranda lezyon uzunluğuna yol açtığı kaydedilirken hastalık şiddeti yönünden her iki türde benzer oranlarda hastalık değerleri saptanmıştır. Limonun Interdonato çeşidinin meyve, yaprak ve dallarını kullanarak yürütülen denemelerde, lezyonlu alanlarda *Colletotrichum* türlerinin eşeysiz üreme yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.25). Sonuçta; *C.gloeosporioides*' in LC5 (%66,6, %75, %77,7) ve *C. karstii*' nin LCk36 (%66,6,% 75,% 100) izolatlarının, en yüksek virülenslik düzeyine sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *C. karstii* türüne ait temsili izolatlarının, Interdonato limon meyve, yaprak ve sürgünlerini kullanarak yürütülen patojenisite denemesinin sonuçları

İzolat kodu	Meyve		Yaprak		Sürgün	
	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti (%)	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti (%)	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti (%)
LCK7	16,3±4,3 b-d*	66,6	19,3±5,0 ab	100	19,3±3,3 a-d	100
LCK1	16,6±4,3 b-d	55,5	17,0±0,6 bc	75	17,6±3,4 a-d	77,7
LCK6	22,3±0,8 b-i	55,5	19,3±0,3 bc	100	18,3±3,0 a-d	88,8
LCK2	10,0±2,4 ab	33,3	20,6±1,5 bc	50	3,3±1,5 a	55,5
LCK3	13,0±4,0 a-c	33,3	20,6±0,3 bc	100	4,0±1,0 ab	44,4
LCK4	19,3±2,4 b-f	55,5	19,3±0,6 bc	50	3,3±1,2 a	33,3
LCK5	21,6±0,8 b-i	44,4	20,3±0,3 bc	100	9,3±3,4 a-c	55,5
LCK8	12,3±2,4 a-c	33,3	19,6±0,6 bc	50	17,6±4,0 a-d	100
LCK9	21,6±0,8 b-i	55,5	20,0±1,5 bc	50	21,6±0,6 a-d	100
LCK10	15,3±4,0 bc	55,5	19,6±0,6 bc	50	11,0±1,5 a-d	100
LCK11	15,6±0,8 bc	44,4	20,3±0,6 bc	100	13,3±1,2 a-d	88,8
LCK12	20,6±0,8 b-g	55,5	17,6±5,0 bc	100	17,6±2,2 a-d	77,7
LCK15	24,6±0,8 c-j	55,5	19,6±1,5 bc	100	18,3±3,3 a-d	66,6
LCK17	16,0±1,4 bc	44,4	24,0±0,3 c	50	7,3±1,5 ab	100
LCK18	3,3±2,4 a	22,2	24,0±0,3 c	75	18,0±3,3 a-d	100
LCK19	9,6±2,0 ab	22,2	24,6±0,3 c	50	17,3±3,3 a-d	100
LCK21	14,6±0,8 a-c	44,4	17,6±1,5 bc	100	19,3±1,5 a-d	55,5
LCK23	18,6±0,8 b-e	66,6	20,0±0,6 bc	50	17,6±3,4 a-d	100
LCK36	21,3±1,0 b-i	66,6	19,6±0,6 bc	75	18,3±3,3 a-d	100
LCK41	22,3±0,8 b-i	44,4	17,6±5,0 bc	100	10,0±1,5 a-d	66,6

\*Sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine (p=0,05) göre birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

Satsuma mandarin meyvelerinde yürütülen virülenslik çalışmalarında her iki *Colletotrichum* türünün lezyon uzunlukları birbirine yakın bulunmuştur. Hastalık şiddeti değerleri açısından *C. karstii* izolatları, daha yüksek değere sahip olmuştur. Bu çalışmada *C. karstii*'nin MCK9 (%88,8, %75, %100) ve *C. gloeosporioides*'in MC4 (%88,8, %50, %100) izolatları, yüksek hastalık oranı sergilemişlerdir. Yaprak denemelerinde, her iki *Colletotrichum* türünün lezyon uzunlukları ve hastalık şiddeti değerleri birbirine yakın olup, MCK13 izolatı en virulent izolat olarak saptanmıştır. Sürgün denemesinde, her iki türde izolatlar arasında farklılıklar olduğu göze çarpmaktadır. Özellikle *C.karstii*'nin

MCK13 izolatı, meyve ve yaprak uygulamasında yüksek hastalık şiddeti göstermesine rağmen sürgün denemesinde düşük oranda virülenslik sergilemiştir. Öte yandan *C.gloeosporioides*' in MC3(%44,4, %75, %11,1) ve MC7(%22,2, %75, %11,1) izolatlarının virülensliği çok düşük bulunmuştur. Tüm uygulamalarda virülenslik düzeyi en yüksek olan izolat, *C. gloeosporioides*'in MC4 izolatı olmuştur (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türlerine ait temsili izolatlarının, satsuma mandarin meyve, yaprak ve sürgünlerini kullanarak yürütülen patojenisite denemesinin sonuçları

İzolat kodu	Meyve		Yaprak		Sürgün	
	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti (%)	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti (%)	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti (%)
MC4	24,0±0,6 c-f*	88,8	17,6±1,5 b-d	50	26,3±0,8 e-g	100
MC5	14,0±7,0 a-e	55,5	10,0±5,0 ab	75	25,3±2,3 d-g	77,7
MC6	13,0±0,8 a-e	44,4	10,3±5,17 a-c	75	27,6±1,5 e-g	100
MC1	8,3±4,2 ab	22,2	17,6±1,5 b-d	100	8,3±4,4 a-c	66,6
MC3	21,0±0,6 b-f	44,4	10,0±5,0 ab	75	3,3±3,3 a	11,1
MC7	8,3±4,2 ab	22,2	10,3±5,2 a-c	75	4,0±4,0 a	11,1
MC8	21,3±0,3 b-f	44,4	20,0±0,6 c-e	100	30,3±1,5 f	100
MC10	11,3±5,7 a-c	55,5	21,3±0,8 d-f	100	28,3±1,2 e-g	77,7
MC11	13,3±0,3 a-e	44,4	23,3±0,3 d-f	100	29,3±0,6 fg	77,7
MC14	16,3±0,3 a-f	33,3	17,6±1,5 b-d	100	25,3±2,3 d-g	66,6
MC15	21,6±0,6 b-f	33,3	10,0±5,0 ab	75	21,6±0,6 b-g	77,7
MC16	7,0±7,0 a	11,1	10,3±5,2 a-c	50	13,0±6,5 a-e	44,4
MC17	24,3±0,3 c-f	55,5	17,0±1,0 b-d	75	21,6±0,6 b-g	100
MC19	29,0±0,3 f	66,6	19,3±0,8 b-e	100	30,3±0,6 f	88,8
MC20	23,3±0,3 c-f	66,6	5,0±5,0 a	25	28,3±0,6 e-g	100
MC21	15,3±0,3 a-f	44,4	17,6±1,0 b-d	50	29,3±1,2 fg	66,6
MC22	8,3±4,2 ab	22,2	10,0±5,0 ab	50	24,0±0,6 c-g	100
MC24	16,0±0,3 a-f	55,5	10,3±5,2 a-c	50	13,6±3,3 a-f	100
MC25	14,0±5,7 a-e	66,6	17,6±0,8 b-d	75	21,6±0,6 b-g	77,7
MC37	16,3±4,2 a-f	100	10,0±5,0 ab	75	13,6±1,2 a-f	44,4
MCK1	15,3±0,3 a-f	66,6	9,3±6,5 a-c	25	17,0±0,3 b-d	100
MCK9	26,0±0,3 ef	88,8	19,3±0,8 b-e	75	17,6±4,4 a-g	100
MCK12	15,3±7,0 a-f	66,6	19,3±5,2 b-e	75	18,3±4,0 a-g	100
MCK13	24,0±0,3 c-f	77,7	24,0±0,3 d-f	100	3,3±5,4 a	22,2

\*Sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine (p=0,05) göre birbirinden önemli ölçüde farklıdır



Bununla birlikte satsuma mandarinin meyve, yaprak ve sürgün denemeleri sonucunda lezyonlu alanlarda, *Colletotrichum* türlerinin eşeysiz üreme yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.25).

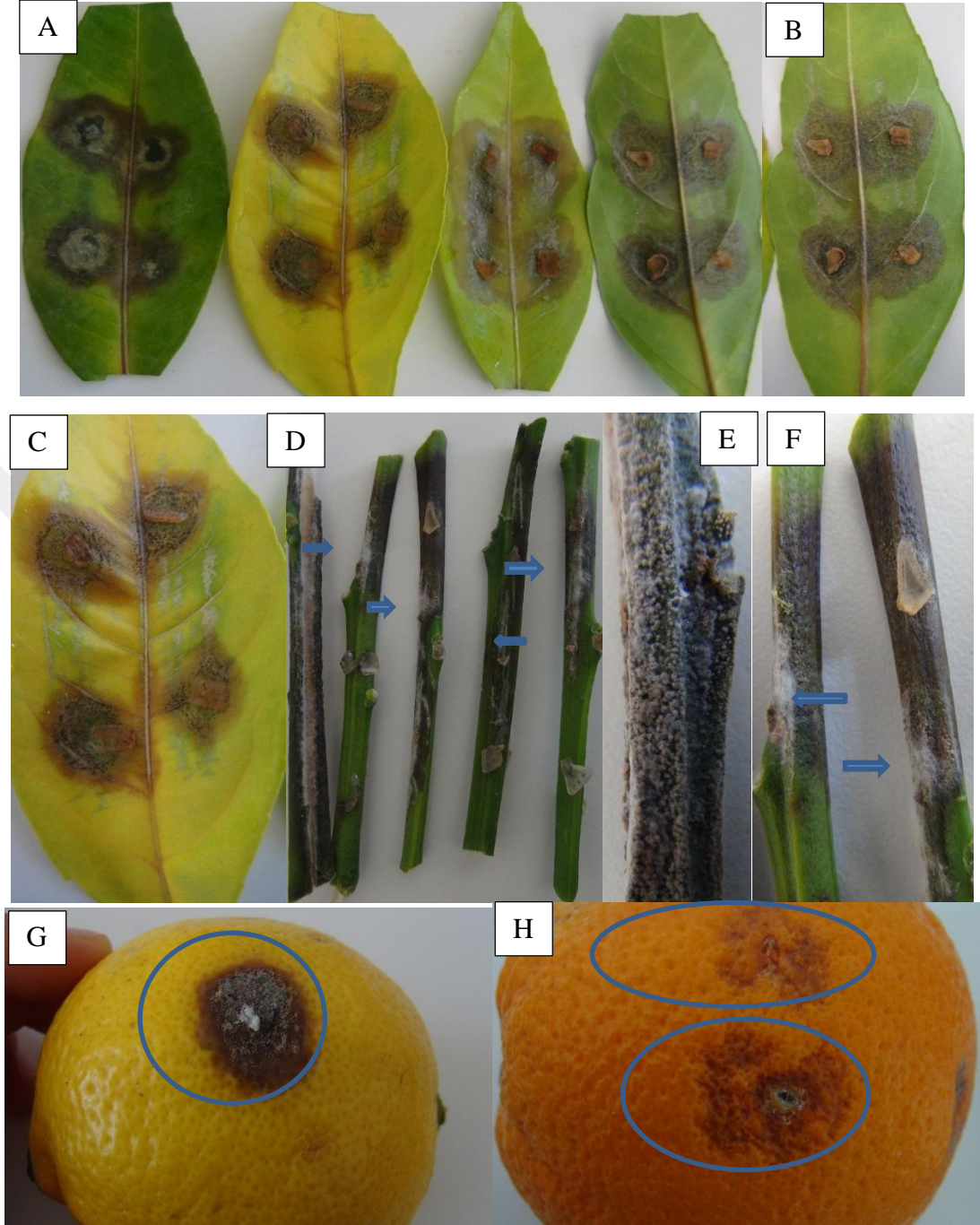
Çizelge 4.13. *C. gloeosporioides* türünün ait temsili izolatlarının, Washington portakal meyve, yaprak ve sürgünlerini kullanarak yürütülen patojenisite denemesinin sonuçları

İzolat kodu	Meyve		Yaprak		Sürgün	
	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti(%)	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti(%)	Ort. Lezyon uzunluğu (mm±SE)	Hastalık şiddeti(%)
PC1	6,0±0,5 a*	22,2	28,0±1,7 d	100	3,3±3,3 a	44,4
PC2	7,0±3,5 a	22,2	13,6±0,6 ab	25	16,3±0,8 bc	100
PC3	3,3±1,7 a	11,1	21,3±0,8 cd	100	0,0±0,0 a	0
PC4	9,6±0,8 a	33,3	20,3±0,3 bc	75	8,3±4,4 ab	44,4
PC5	6,6±3,3 a	22,2	21,0±1,2 cd	100	3,3±3,3 a	33,3
PC6	5,3±0,8 a	22,2	21,3±0,8 cd	100	4,0±4,0 a	33,3
PC7	21,3±0,8 b	100	8,0±4,0 a	25	8,3±4,4 ab	66,6
PC8	7,3±0,8 a	44,4	20,0±0,5 bc	100	3,3±3,3 a	55,5
PC9	11,3±0,6 a	44,4	21,0±0,8 cd	100	4,0±4,0 a	55,5
PC10	24,0±5,5 b	100	7,0±3,5 a	25	3,3±3,3 a	44,4
PC11	6,6±3,3 a	33,3	23,0±0,5 cd	100	7,3±3,7 ab	66,6
PC12	9,0±4,5 a	22,2	8,0±4,0 a	25	19,0±1,5 c	100
PC13	7,0±3,5 a	11,1	7,0±3,5 a	25	19,0±0,5 c	100

\*Sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine (p=0,05) göre birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

Portakalda, sadece *C. gloeosporioides* türü elde edildiği için bu tür ile ilgili denemeler kurulmuştur. Washington portakal uygulamalarında, meyvelerden elde edilen PC7 ve PC10 izolatları, meyve denemelerinde yüksek düzeyde virulent olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.13).

Yaprak denemesinde, genel olarak virülenslik yüksek olurken, sürgün uygulamasında PC2 (%100), PC12(%100) ve PC13(%100) izolatları hariç diğer izolatlarda virülenslik düşük olarak saptanmıştır. PC2, PC12 ve PC13 izolatları, sürgünlerden izole edildiği için daha yüksek oranda virülenslik göstermişlerdir.

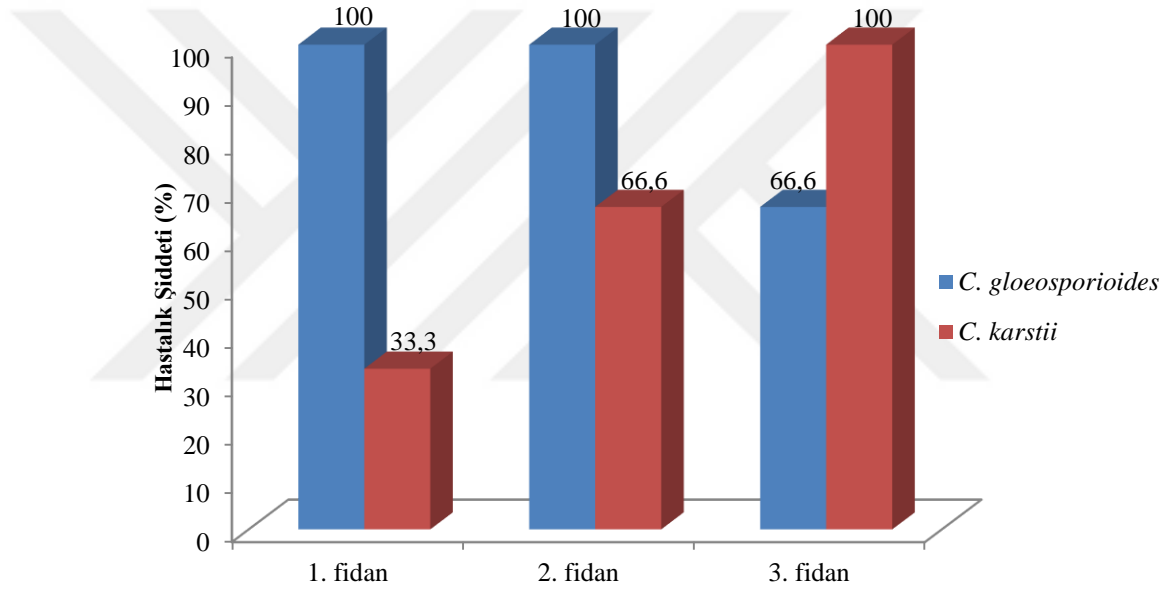


Şekil 4.25. Mandarin (satsuma), limon (interdonato), portakal (washington) turunçgil türlerinde patojenisite çalışmaları; yapraklar (A,B,C), sürgün (D,E,F) ve limon (G), portakal (H) meyvelerinde lezyon gelişimleri

Patojenisite denemelerinde en virulent olarak belirlenen her iki türden birer izolat seçilerek *in vivo* fidan uygulaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4. 26). Bu amaçla, *C. gloeosporioides* türü için LC5 *C. karstii* türü için MCK9 izolatu seçilmiştir. Her iki izolat

için üçer adet mandarin fidanı ve her fidanın 3 ayrı dalı tekerrür olarak kullanılmıştır. Püskürtme şeklinde inokulasyon çalışmaları sonucunda 1 ay sonra deneme değerlendirilmiş ve her iki türde birbirine yakın sonuçlar vermiştir.

Şekil 4.26' da belirtildiği gibi hastalık şiddeti en fazla *C. gloeosporioides* türüne ait LC5 izolatında saptanmıştır. Mandarin dallarında kurumalar bahçede gözlenen belirtilere benzer şekilde oluşmuştur. Yapraklarda oluşan lezyonlarda bahçe sörveylerinde karşılaşılan belirtilere benzer antraknoz belirtileri gözlenmiştir. Ayrıca fidanlarda yaprak saplarında önce sararma şeklinde belirtiler oluşup, sonra yaprak dökümü de gerçekleşmiştir (Şekil. 4.27).



Şekil 4.26. *Colletotrichum* türlerinin Satsuma mandarin fidanlarındaki patojenisite denemesinde kaydedilen hastalık şiddeti (%) değerleri

Türkiye’de turunçgil üretimi ile bağlantılı *Colletotrichum* tür çeşitliliğinin moleküler karakterizasyonla birlikte patojenik olarak ilk kez ortaya konması önemli bir aşamadır. Benzer bir çalışmada, *Colletotrichum* izolatlarının, patojenisite denemelerini seçilen temsili izolatlar ile sadece portakal meyvelerinde gerçekleştirilmiş (Guarnaccia ve ark., 2017) ve *Colletotrichum gloeosporioides* virülensliği en yüksek olan tür olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, çalışmamızda elde ettiğimiz verileri büyük oranda doğrular nitelikte bulunmuştur.

Asya’da turunçgil antraknozu ile ilişkili yeni patojenler konusunda çeşitli raporlar yayımlanmıştır. Bununla birlikte sonuçlarımıza benzer şekilde *C. gloeosporiodes*, Çin’de büyük oranda baskın patojen olarak (Huang ve ark., 2013) veya Gana’da tanımlanmış olan tek patojen olarak bildirilmiştir (Honger ve ark., 2016). Hatta İtalya’da *C. gloeosporiodes*, *C. karstii*'den daha sık ve daha virüent olarak bulunmuştur (Aiello ve ark., 2014).

Buna karşılık ülkemizde turunçgillerde ilk kez tarafımızdan bildirilen antraknoz etmeni *C. karstii* (Uysal ve Kurt, 2019), son yıllarda Avrupa’da bazı turunçgil çeşitleri ve bitki organları yönünden en az *C. gloeosporiodes* kadar virüent olarak belirtilmiştir (Guarnaccia ve ark., 2017). Son gelinen bilimsel aşama dikkate alındığında bu çalışma, hem ülkemizdeki turunçgil antraknoz hastalığının mevcut durumu hemde bu hastalığa neden olan *Colletotrichum*’a bağlı türlerin varlığını ve taksonomik en son verilerini ortaya koyması ile dikkate değer bir araştırma olarak düşünülebilir.



Şekil 4. 27. Mandarin (satsuma) fidanlarına yapılan patojenisite denemelerinde sürgünlerde oluşan hastalık belirtileri



Şekil 4. 27 (devam). Mandarin (satsuma) fidanlarına yapılan patojenisite denemelerinde sürgünlerde oluşan hastalık belirtileri

#### 4. 7. *Colletotrichum gloeosporioides* İzolatının Seçilen Fungisitlere Karşı *in vitro* Duyarlılık Denemeleri

Farklı etki mekanizmalarına sahip 8 fungusite ait ticari preparatların, *in vitro*'da *C. gloeosporioides*'in misel gelişmesi ve konidi çimlenmesi üzerine etkilerini belirlemek için, fungisitlerin farklı konsantrasyonları kullanılarak fungusun duyarlılık düzeyleri belirlenmiştir.

##### 4.7.1. Miselyal gelişim denemesi

Bu aşamada, bakır oksiklorür' ün 0.01, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  propineb'in 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10, 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  trifloxystrobin'in 0.01, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  myclobütanil'in 0.001, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  azoxystrobin'in 0.003, 0.01, 0.03  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  0.1, 0.3, 1, 3, 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  thiophanate methyl'in 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  carbendazim+ chlorothalonil'e 0.001, 0.005, 0.01, 0.05  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , boscalid + pyraclostrobin'nin 1, 3, 5, 10, 40, 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyonlarında *C. gloeosporioides*'in LC5 izolatının miselyal gelişimine olan etkileri incelenmiştir.

Çalışma sonucunda, bakır oksiklorür'ün  $1.0 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonunda fungusun ortalama miselyal gelişimi, 72,6 mm olmasına karşın 100 katı arttırıldığında bu gelişme, 62,3 mm olarak kaydedilmiştir. Propineb'in en düşük  $0,1 \text{ mgml}^{-1}$  konsantrasyonunda, fungusun ortalama miselyal gelişiminin 70,6 mm, en yüksek konsantrasyonda ise 40,6 mm olarak belirlenmiştir. Trifloxystrobin'in en düşük  $0,01 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonunda, fungusun ortalama miselyal gelişimi 50,6 mm, en yüksek konsantrasyon olan  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ise 13,0 mm olduğu gözlenmiştir. Araştırılan literatürde *Colletotrichum*' un farklı türlerine karşı etkili sonuç alınmış olduğu bilinen myclobutanil fungusiti denemede kullanılmıştır. En düşük konsantrasyon olan  $0,001 \mu\text{gmL}^{-1}$  de 39,3 mm miselyal gelişimi gösterirken, 10 kat arttırıldığında 4,6 mm miselyal gelişimi ile tamamen engellemeye yakın olduğu gözlenmiştir. Strobilurin grubuna ait fungusitler *Colletotrichum* türlerine karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bu gruba ait bir diğer fungusit olan azoxystrobin'in geniş bir konsantrasyon aralığı denemede çalışılmıştır. Buna göre azoxystrobin'in en düşük konsantrasyonu  $0,003 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de miselyal gelişim oranı 46,6 mm iken en yüksek konsantrasyon olan  $10 \text{ mg.ml}^{-1}$  de ise 13,6 mm miselyal gelişim oranı gözlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren thiophanate methyl'in miselyal gelişimi duyarlılık çalışmasında, en düşük  $0,005 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonda 78,6 mm miselyal gelişim ile en yüksek  $1,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonda 0,0 mm olduğu belirlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren bir karşım fungusit carbendazim+ chlorothalonil en düşük konsantrasyon olan  $0,001 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de 46,0 mm miselyal gelişim oranı, en yüksek  $0,05 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonda 0,0 mm miselyal gelişim oranı gözlenmiştir. Strobilurin grubuna giren karşım fungusit boscalid + pyraclostrobin en düşük konsantrasyon  $1.0 \mu\text{gmL}^{-1}$  de miselyal gelişim 54,0 mm iken en yüksek konsantrasyonda 9,6 mm miselyal gelişim oranı belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Bakır oksiklorür' ün kontroldeki ortalama fungal gelişimi ile kıyaslandığında en düşük konsantrasyonda yaklaşık % 1, en yüksek konsantrasyonda ise, %21,4 oranında engelleme oranı saptanmıştır. Konsantrasyonların artmasına rağmen engelleme oranları % 50 etkiyi bile gösterememektedir. Buna göre, sonuçlar izolatin bu fungusite duyarlılığının az olduğunu ortaya koymaktadır. Propineb'in ayrıca en düşük konsantrasyonda engelleme oranı % 11,7 iken en yüksek konsantrasyonda engelleme oranı % 49,2 olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.14. Fungisitlerin farklı konsantrasyonlarında *C. gloeosporioides* izolatinın ortalama miselyal gelişimleri (mm)

<b>Trifloxystrobin</b>								
<b>Kontrol</b>	<b>0,01</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	
80,0±0,0e*	50,6±0,6d	50,0±0,0d	49,0±0,57d	45,0±0,0c	43,6±0,67c	31,6±0,88b	13,0±1,0a	
<b>Bakıroksiklorür</b>								
<b>Kontrol</b>	<b>0,01</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	
80,0±0,0c	79,3±0,67c	71,6±1,67b	71,6±1,67b	72,6±1,45b	71,0±1,0b	69,3±0,67b	62,3±1,2a	
<b>Azoxystrobin</b>								
<b>Kontrol</b>	<b>0,003</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
80,0±0,0h	46,6±0,33g	43,6±0,33f	35,3±0,33e	32,6±0,33d	32,0±0,0d	28,3±0,33c	24,0±0,57b	13,6±0,33a
<b>Propineb</b>								
<b>Kontrol</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	
80,0±0,0g	70,6±0,67f	65,0±0,0e	63,3±0,88e	53,3±0,88d	50,0±0,0c	47,0±1,0b	40,6±0,67a	
<b>Thiophanate - methyl</b>								
<b>Kontrol</b>	<b>0,005</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>		
80,0±0,0e	78,6±0,67e	78,0±1,15e	59,3±0,67d	29,3±0,67c	14,3±0,67b	0,0±0,0a		
<b>Carbendazim+chlorothalonil</b>								
<b>Kontrol</b>	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>				
80,0±0,0e	46,0±1,0d	19,3±0,67c	13,3±0,88b	0,0±0,0a				
<b>Myclobutanil</b>								
<b>Kontrol</b>	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>	<b>0,006</b>	<b>0,008</b>	<b>0,01</b>		
80,0±0,0g	39,3±0,67f	25,6±0,67e	14,6±0,33d	13,3±0,33c	9,6±0,33b	4,6±0,33a		
<b>Boscalid+ pyraclostrobin</b>								
<b>Kontrol</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>40</b>	<b>50</b>		
80,0±0,0g	54,0±0,57f	48,0±1,15e	36,0±0,57d	32,3±0,33c	25,3±0,33b	9,6±0,33a		

\*Herbir satır içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine (p=0,05) göre birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

Buna göre bu fungusitin en yüksek konsantrasyonunda engelleme oranı %50'nin altına düştüğü gözlenmiştir. Fungusun bu fungusite karşı az da olsa duyarlı olduğu gözlenmiştir. Trifloxystrobin'in engelleme oranları kontrole göre kıyaslanırsa en düşük konsantrasyonda % 37,5, en yüksek konsantrasyonda ise % 83,8 olarak saptanmıştır. Buna göre fungusitte en yüksek konsantrasyonda büyük oranda engelleme olduğu gözlenmiştir. Myclobutanil'in engelleme oranlarında, 0,001µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda %50,8 oranı, en düşük konsantrasyonda %50'den fazlasını etkilediği gözlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda ise %94,2 ile yüksek bir engelleme oranı olduğu saptanmıştır. Ayrıca, denemede çalışılan diğer fungusitler içerisinde en düşük konsantrasyonla en yüksek engelleme oranına sahip fungusit olduğu gözlenmiştir. Azoxystrobin'in en düşük konsantrasyonda %50' ye yakın engelleme oranı belirlenmiş, en yüksek konsantrasyon olan 10 µg.ml<sup>-1</sup> de % 82,9 oranı ile oldukça yüksek bir sonuç gözlenmiştir. Böylece, diğer Strobilurin grubuna giren fungusitler arasında düşük konsantrasyonda en yüksek engelleme oranına sahip olduğu da saptanmıştır. Thiophanate methyl'in engelleme oranları incelendiğinde, 0,005 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda % 1,7 oranı ile düşük olduğu gözlenirken

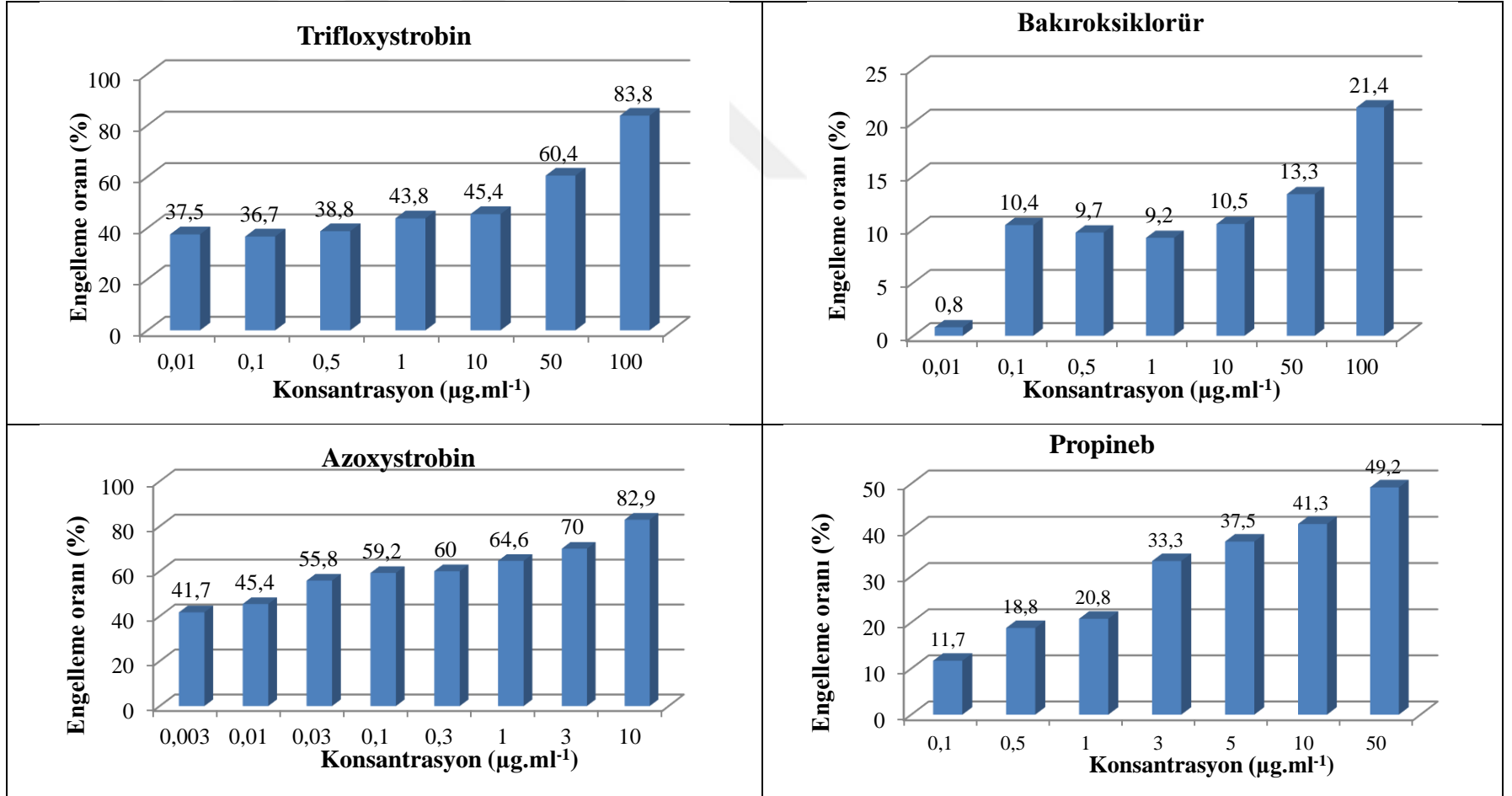
konsantrasyonları arttırdığımızda 1,0 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda % 100 bir engelleme oranı ile tamamen engelleyen konsantrasyon bulunmuştur. Carbendazim+ chlorothalonil en yüksek 0,05 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda %100 engelleme olduğu saptanmıştır. Boscalid + pyraclostrobin'in engelleme oranına bakılınca, en düşük konsantrasyonda %32,5 iken en yüksek konsantrasyonda %87,9 olarak saptanmıştır. Konsantrasyonlar arttıkça kademeli olarak engelleme oranının arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.28; Şekil 4.29).

Limonda Antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in DMI, SDHI, QoIs, amid, aniline ve dithiocarbamate gibi farklı kimyasal gruplardan farklı etki mekanizmalarına sahip bazı fungusitlere karşı duyarlılığı belirlenmiştir (Uysal ve Kurt, 2019). Çalışmamızda kullanılan *C. gloeosporioides*'in LC5 izolatının miselyal gelişimi engellemesi üzerine farklı fungusitlerin etkileri incelendiğinde, en düşük konsantrasyonlarda (0.01 µgml<sup>-1</sup>) en yüksek etkiyi gösteren fungusitler, sırasıyla fluopyram + tebuconazole, fluazinam, fluxapyroxad + difenoconazole ve dithianon + phosphorus acid %100-81.7 aralığında etkili bulunmuştur. Seçilen fungusitlerin konsantrasyonları yükseltildiğinde (10-100 µgml<sup>-1</sup>), tebuconazole, pyraclostrobin+metiram, kresoxim methyl ve dimethomorph+mancozeb %100-45.8 aralığında etki gösterebilmiştir.

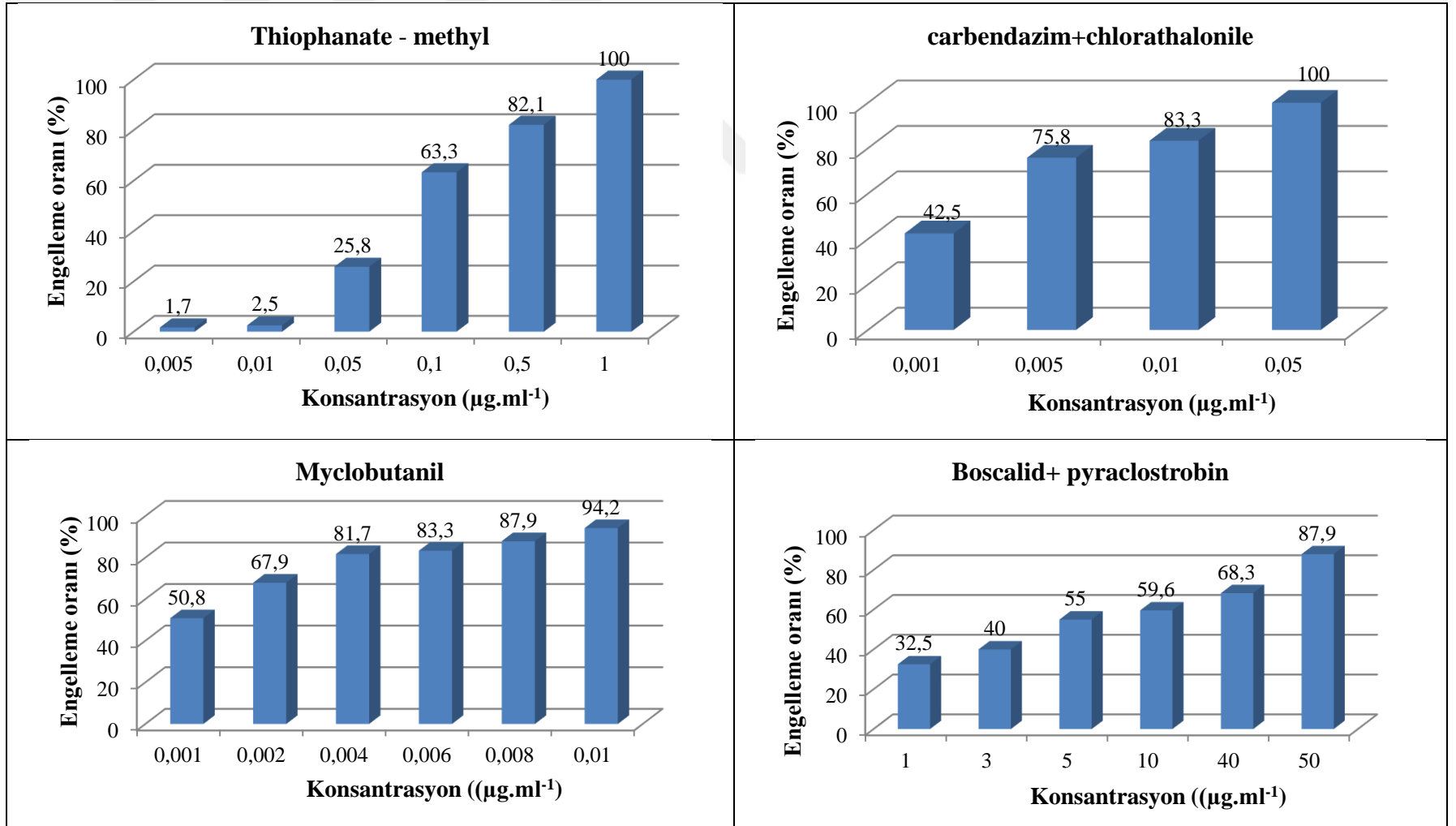
Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, çili biberinde *C. acutatum*'un neden olduğu antraknoz hastalığının mücadelesi için strobilurin grubu fungusitleri olan azoxystrobin (Quadris), trifloxystrobin (Flint) ve pyraclostrobin (Cabrio) kullanılmış ve etkili bulunmuştur. (Alexander ve Waldenmaier, 2002; Lewis ve Miller, 2003). Bizim çalışmamızda benzer fungusitler, *C. gloeosporioides*'e karşı kullanılmış ve %80'nin üzerinde engelleme olduğu saptanmıştır. Aynı fungusitlerin *Colletotrichum* cinsine ait farklı türlerinin neden olduğu enfeksiyonları kontrol altına aldığı gözlenmiştir.

İsviçre'de kiraz ve vişnelerde antraknoz hastalığına karşı fungusitlerin etkinliği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Dokuz adet fungusit içeren uygulamada, thiophanate- methyl hariç, thiram, captan, carbendazim, mancozeb, dichlofluanid, etaconazole+captan, penconazole+captan ve bitertanol fungusitleri antraknoza karşı etkili olduğunu saptamışlardır (Olszak ve Piotrowski,1985). Çek Cumhuriyeti'nde tebuconazole ile hasattan 1-2 hafta önce geç bir uygulama vişne meyvelerinde antraknoz miktarını azaltmıştır (Kloutvorova ve Egert, 2004).

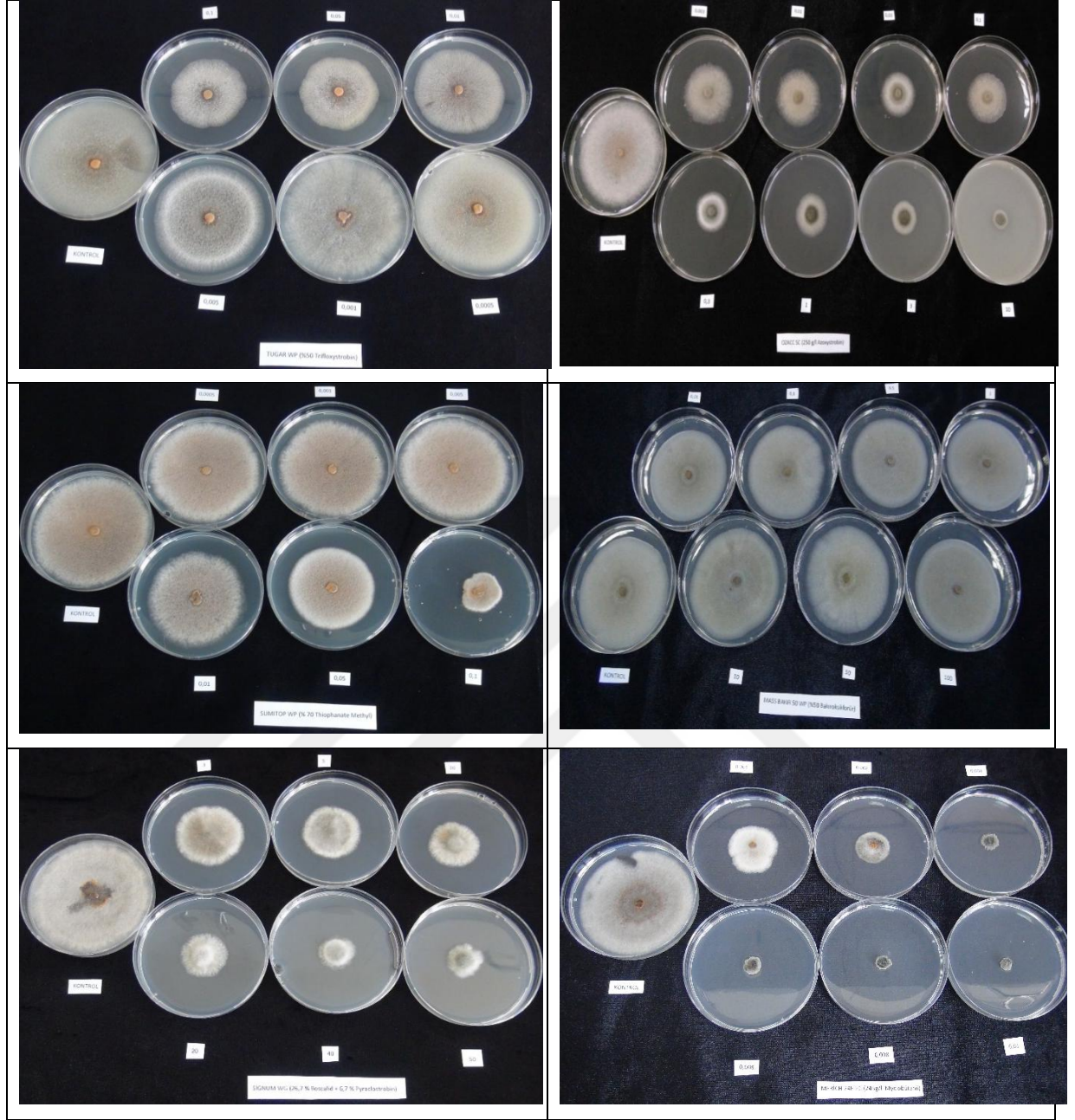




Şekil 4. 28. Seçilmiş olan bazı fungusitlerin, *C. gloeosporioides*'in miselyal gelişimi üzerine in vitro etkileri (%)



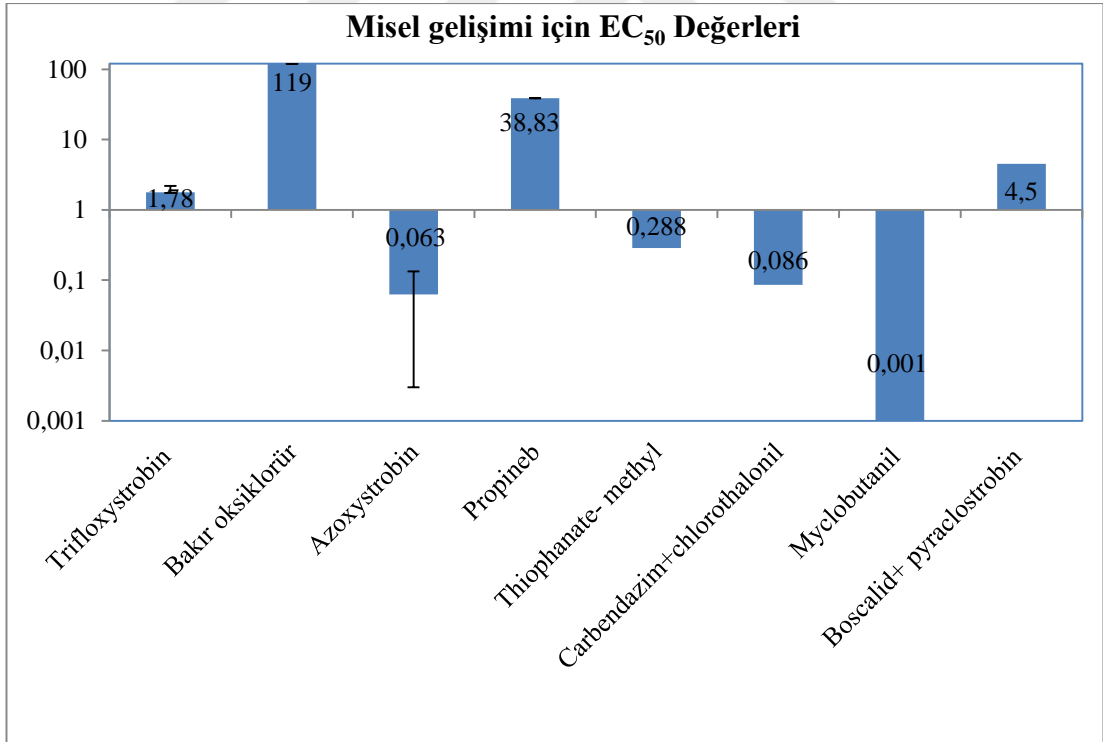
Şekil 4. 28.(devam) Seçilmiş olan bazı fungusitlerin, *C. gloeosporioides*'in miselyal gelişimi üzerine *in vitro* etkileri (%)



Şekil 4. 29. *C. gloeosporioides* izolatının trifloxystrobin (A), azoxystrobin (B), thiophanate methyl (C), bakıroksiklorür (D), boscalid+ pyraclostrobin (E), myclobutanil (F), eklenmiş PDA besi yerinde koloni gelişimleri

Miselyal gelişimi için  $EC_{50}$  değerleri incelendiğinde, bakır oksiklorür' ün,  $119 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  konsantrasyon ile en yüksek  $EC_{50}$  değerine sahip fungusit olarak belirlenmiştir. Propineb'in  $EC_{50}$  değerlerine incelendiğinde, ise  $38,83 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$  ile yüksek olarak değerlendirilebilir. Trifloxystrobin'in  $EC_{50}$  değeri, fungusitin  $1,78 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  olarak, düşük konsantrasyonda bile etkili olabildiği saptanmıştır. Myclobutanil'in  $EC_{50}$  değeri

incelendiğinde ise, 0,001 konsantrasyon ile denemede çalışılan diğer fungusitler içerisinde en düşük konsantrasyonda etkili sonuç veren fungusit olduğu ve fungusun bu fungusite çok duyarlı olduğu belirlenmiştir. Azoxystrobin'in EC<sub>50</sub> değeri, 0,063 µg.ml<sup>-1</sup> ile düşük bir konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Denemede çalışılan diğer Strobilurin grubuna giren fungusitler içerisinde fungusun en çok duyarlılık gösterdiği fungusittir. Thiophanate methyl'in EC<sub>50</sub> değerine göre, 0,288 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyon ile sıfırın altında değerle etkili olduğu göze çarpmaktadır. Böylece, *C.gloeosporoides* fungusunun bu fungusite duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren bir karışım fungusit carbendazim+ chlorothalonil'in EC<sub>50</sub> değeri ise 0,086 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonu ile düşük konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir. Strobilurin grubuna giren karışım fungusit boscalid + pyraclostrobin EC<sub>50</sub> değeri 4,5 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Strobilurin grubuna ait fungusitler içerisinde miselyal gelişim duyarlılık çalışması açısından en az etkili fungusit olarak belirlenmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Fungisitlerin farklı konsantrasyonlarında *C. gloeosporoides* izolatının miselyal gelişimi için hesaplanan EC<sub>50</sub> değerleri

Uysal ve Kurt, (2019)'da limonda Antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in DMI, SDHI, QoIs, amid, aniline ve dithiocarbamate gibi farklı kimyasal gruplardan farklı etki mekanizmalarına sahip bazı fungusitlere karşı duyarlılık çalışmasında, EC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde, en etkili fungusitlerin fluopyram+tebuconazole, fluxapyroxad+difenoconazole ve fluazinam'ın 0.001 µgml<sup>-1</sup> EC<sub>50</sub> değerleri ile en etkili fungusitler olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda olduğu gibi, bu fungusitlere *C. gloeosporioides*'in oldukça duyarlılık göstermesi çalışmamızı destekler niteliktedir.

Brezilya'da muzdan izole edilen *Colletotrichum musae* etmeninin thiophanate-methyl fungusitine karşı reaksiyonunu belirlemek için yapılan çalışmada, *C. musae*'nin 139 izolatının *in vitro* da thiophanate-methyl'e karşı duyarlılığı incelenmiştir. Miselyal gelişimde, EC<sub>50</sub> değeri 0.003-48.73 µg.ml<sup>-1</sup> arasında değişkenlik göstermiştir. Bu fungusit, çalışmamızda *C. gloeosporioides*'e karşı miselyal gelişim denemelerinde, 0,288 µg.ml<sup>-1</sup> EC<sub>50</sub> değeri ile duyarlı olduğu saptanmış, konidiyal çimlenme denemelerinde ise 4,61 µg.ml<sup>-1</sup> EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir. 0.003-4.84 µg.ml<sup>-1</sup> arasında değişen EC<sub>50</sub> değerleri ile 130 izolat duyarlı, 10.43-48.73 µg.ml<sup>-1</sup> arasında değişen EC<sub>50</sub> değerleri ile 9 izolat ise orta dirençli olarak gruplandırılmıştır. Sonuç olarak, EC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde, *C. musae* türüne göre *C. gloeosporioides*'in daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (Vieira ve ark., 2017).

Benzer çalışmada, portakal'da antraknoza neden olan *C. gloeosporioides*'e karşı QoI fungusitlerinin *in vitro* çalışmalarında; *C. gloeosporioides*'in 37 izolatı ve 3 farklı QoI fungusit azoxystrobin, pyraclostrobin ve trifloxystrobin kullanılmıştır. *C. gloeosporioides*'in 37 izolat EC<sub>50</sub> değerleri azoxystrobin için 0.36-102 µg.ml<sup>-1</sup>, trifloxystrobin için 0.047-0.49 µg.ml<sup>-1</sup> Pyraclostrobin'in EC<sub>50</sub> değerlerinin 0.14 µg.ml<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Aynı fungusitler, çalışmamızda limon bitkisinden elde edilen *C. gloeosporioides*'in izolatına karşı azoxystrobine daha duyarlı, diğer fungusitlerde bu çalışmaya göre daha dayanıklı olduğu saptanmıştır. Buna göre, aynı *Colletotrichum* türünün farklı konukçulardan elde edilen izolatlarının fungusitlere karşı duyarlılıklarında farklılık saptanmıştır (Piccirillo ve ark., 2018).

#### 4.7.2. Konidial çimlenme denemesi

Bu aşamada, farklı konsantrasyonlardaki ( $\mu\text{gml}^{-1}$ ) bakır oksiklorür 0.5, 1, 10, 50, 100  $\mu\text{gml}^{-1}$ , propineb 0.1, 0.5, 1, 3  $\mu\text{gml}^{-1}$ , trifloxystrobin 0.1, 0.5, 1, 3, 5  $\mu\text{gml}^{-1}$ , myclobutanil 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.03  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  azoxystrobin 0.1, 0.3, 1, 3, 5  $\mu\text{gml}^{-1}$ , thiophanate methyl 0.5, 1, 3, 5, 10, 20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  carbendazim+ chlorothalonil 0.001, 0.003, 0.005 0.008, 0.01  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  boscalid + pyraclostrobin 0,3, 0,5, 1, 2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  fungusitlerine karşı *C. gloeosporioides*'in LC5 izolatının konidial gelişmelerinin duyarlılıkları incelenmiştir.

Bakır oksiklorür' ün 1.0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonunda fungusun konidial çimlenmesine etkileri incelendiğinde, en düşük konsantrasyon ile en yüksek konsantrasyon arasında farklılık gözlenmemektedir. Propineb'in en düşük konsantrasyonunda (0,1  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ), fungusun ortalama konidial çimlenme oranı %62,6 iken en yüksek konsantrasyonda hiçbir çimlenme gözlenmemiştir. Trifloxystrobin incelendiğinde ise, en düşük 0,1  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonunda, fungusun ortalama konidial çimlenme oranı %82,6 iken, en yüksek konsantrasyon olan 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  ise 0,0 olduğu gözlenmiştir. Myclobutanil fungusitinin etkileri incelendiğinde, en düşük konsantrasyon olan 0,004  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'de %74,6 oranında konidial çimlenme gözlenirken, 10 kat arttırıldığında %14,6 oranı saptanmıştır. Azoxystrobin'in en düşük konsantrasyonu 0,01  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'de konidial çimlenme oranı %81,6 iken en yüksek konsantrasyon olan 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'de ise 0,0 oranında olduğu gözlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren thiophanate methyl'in konidial çimlenme duyarlılık çalışmasında, en düşük 0,5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonda %90,3 konidial çimlenme ile en yüksek 20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonda %16,0 oranı olduğu belirlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren bir karşım fungusit carbendazim+ chlorothalonil en düşük konsantrasyon olan 0,001  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'de %46,0 oranında çimlenme oranı gözlenirken, konsantrasyon 10 kat arttığında, yani 0,01  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'de %0,0 konidial çimlenme oranı gözlenmiştir. Boscalid + pyraclostrobin en düşük konsantrasyon 0,3  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'de ortalama konidial çimlenme oranı %40,3 iken en yüksek konsantrasyon 2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ 'de ise %0,0 oranı belirlenmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. *C. gloeosporioides* izolatının fungusitlerin farklı konsantrasyonlarındaki ortalama konidi çimlenmeleri (%)

<b>Trifloxystrobin</b>						
<b>Kontrol</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	
100±0,0f*	82,6±0,3e	72,6±1,45d	48,3±0,8c	18,3±0,8b	0,0±0,0a	
<b>Bakıroksiklorür</b>						
<b>Kontrol</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	
100±0,0f	93,0±1,7e	86,3±0,8d	74,3±0,8c	70,0±0,0b	61,0±1,0b	
<b>Azoxystrobin</b>						
<b>Kontrol</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	
100±0,0f	81,6±0,8e	72,6±1,45d	30,3±0,33c	17,6±0,33b	0,0±0,0a	
<b>Propineb</b>						
<b>Kontrol</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>		
100±0,0e	62,6±1,45d	52,6±1,45c	31,0±1,0b	0,0±0,0a		
<b>Carbendazim+chlorathalonile</b>						
<b>Kontrol</b>	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>	<b>0,008</b>	<b>0,01</b>	
100±0,0f	46,0±1,0e	30,3±0,3d	21,0±0,57b	12,0±1,0b	0,0±0,0a	
<b>Myclobütanil</b>						
<b>Kontrol</b>	<b>0,004</b>	<b>0,006</b>	<b>0,008</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	
100±0,0f	74,6±0,3e	61,6±0,8d	50,6±0,6c	38,3±0,8b	14,6±0,3a	
<b>Boscalid+ pyraclostrobin</b>						
<b>Kontrol</b>	<b>0,3</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>		
100±0,0e	40,3±1,0d	30,3±0,3c	20,6±0,3b	0,0±0,0a		
<b>Thiophanate methyl</b>						
<b>Kontrol</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
100±0,0g	90,3±0,3f	76,0±2,08e	64,0±0,57d	42,6±1,45c	30,3±1,45b	16,0±1,0a

\*Sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine (p=0,05) göre birbirinden önemli ölçüde farklıdır.

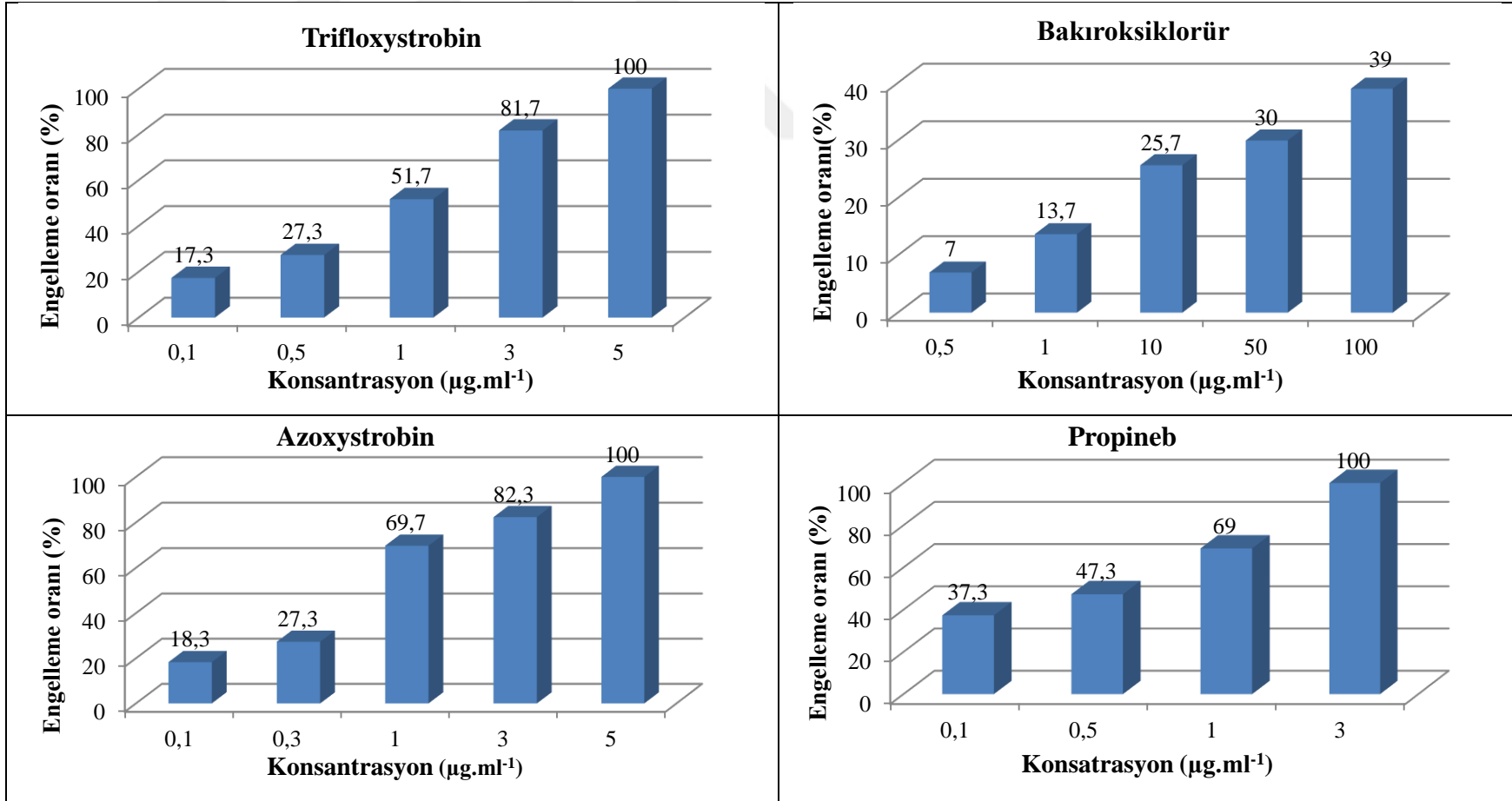
Konidial çimlenme engelleme oranları incelendiğinde; Bakır oksiklorür' ün  $1.0 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonda %13,7 oranında, konsantrasyonu 100 kat arttırıldığında çimlenmeyi engelleme %39 oranında kalmıştır. Buna göre, sonuçlar fungusun bu fungusite duyarlılığının az olduğunu ortaya koymaktadır. Bakırlı preparatlar koyucu amaçlı fungusitler olarak kullanılması hastalığı tedavi etmekte yetersiz kalmaktadır. Propineb'in en düşük konsantrasyonda ( $0,1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) engelleme oranı % 37,3 iken en yüksek konsantrasyonda ( $3 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) engelleme oranı % 100 olarak saptanmıştır. Fungisit, fungusun misel gelişimine göre konidial çimlenmeyi daha fazla engellemiştir. Trifloxystrobin engelleme oranlarına bakılınca en düşük konsantrasyonda % 17,3, en yüksek konsantrasyonda ise % 100 olarak saptanmıştır. Myclobutanil engelleme oranlarında,  $0,004 \mu\text{g.ml}^{-1}$  konsantrasyonda %25,3 oran ile en düşük konsantrasyonda ise %85,3 oranında olduğu gözlenmiştir. Azoxystrobin'in

en düşük konsantrasyonda %18,3 engelleme oranı belirlenmiş, en yüksek konsantrasyon olan 5 µg.ml<sup>-1</sup>'de % 100 oranı ile tamamen engelleme gözlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren thiophanate methyl'in engelleme oranlarına bakılırsa, 0,5 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda % 9,7 oranı ile düşük olduğu gözlenirken, konsantrasyonları arttırmamızda % 90,3 bir engelleme oranı ile yüksek engellemeye gözlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren bir karışım fungusit carbendazim+ chlorothalonil engelleme oranlarına bakılınca, en yüksek konsantrasyonda %100 engelleme olduğu saptanmıştır. Boscalid + pyraclostrobin engelleme oranına bakılınca, en düşük konsantrasyonda %59,7 ile en düşük konsantrasyonda bile engelleme oranı %50'yi geçmiştir. En yüksek konsantrasyonda %100 olarak saptanmıştır (Şekil 4.31; Şekil 4.32).

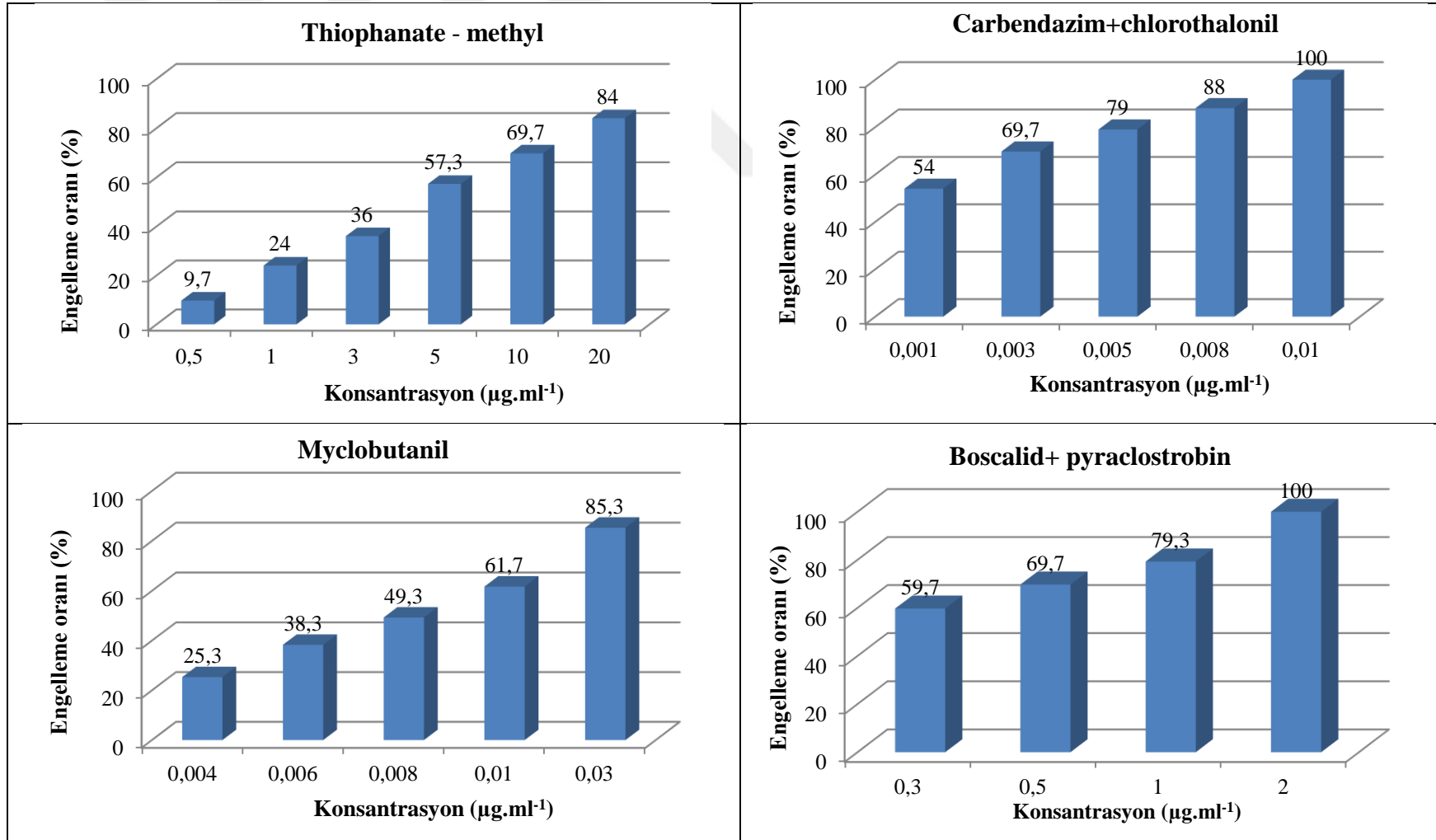
Çin'de azoxystrobin, picoxystrobin, difenoconazole, thiophanate-methyl, mancozeb ve pyraclostrobin fungusitleri, *Colletotrichum acutatum*'un neden olduğu antraknoz hastalıklarının kontrol etmek için Çin'de kullanılmaktadır. *In vitro* denemelerde pyraclostrobin ve azoxystrobin hem miselyal gelişimi hem de spor çimlenmesi, mancozeb ise sadece spor çimlenmesini ve difenoconazole ile thiophanate-methyl ise sadece miselyal gelişimin engellenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu fungusitlerin çalışmamızda *C. gloeosporioides*'i engellediği gibi *C. acutatum*'u inhibe ettiğini göstermektedir. Pyraclostrobin sporlanmayı ve çim tübünün uzamasını engellediği belirlenmiştir. Pyraclostrobin inokulasyondan 72 saat kadar iyileştirici etki sağladığı ve 96 saate kadar ise koruyucu aktivite sağladığı kaydedilmiştir (Gao ve ark., 2017). Pyraclostrobin'in boscalid ile karışımını kullandığımız çalışmamızda yüksek oranda etki gösterdiği belirlenmiştir.

Uysal ve Kurt, (2019)'da yapmış oldukları çalışmada kullanılan fungusitlerin *C. gloeosporioides*'in LC5 izolatının konidyal çimlenmesini engellemesi üzerine etkisi ve duyarlılığı incelendiğinde, 1 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonun altında fungusun konidi çimlenmesinin fluopyram+tebuconazole, fluazinam, dithianon+phosphorus acid, fluxapyroxad+difenoconazole ve kresoxim methyl+boscalid tarafından %90'a yakın değerlerde engellenmenin saptanması, çalışmamızdaki bakıroksiklorür hariç diğer fungusitlerdeki sonuçları desteklemektedir.

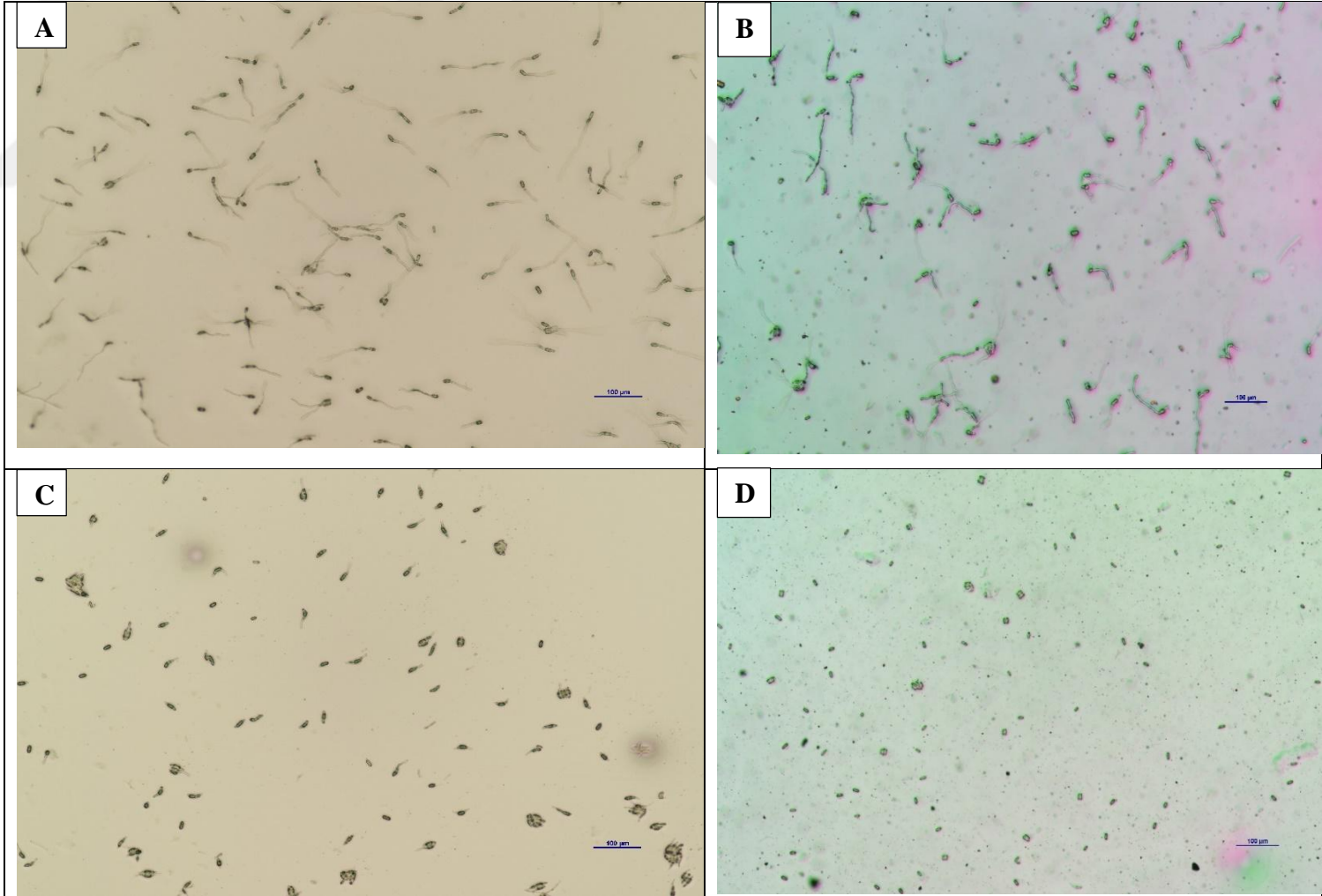




Şekil 4. 31. Seçilmiş olan bazı fungusitlerin, *C. gloeosporioides*'in konidi çimlenmesi üzerine in vitro etkileri (%)

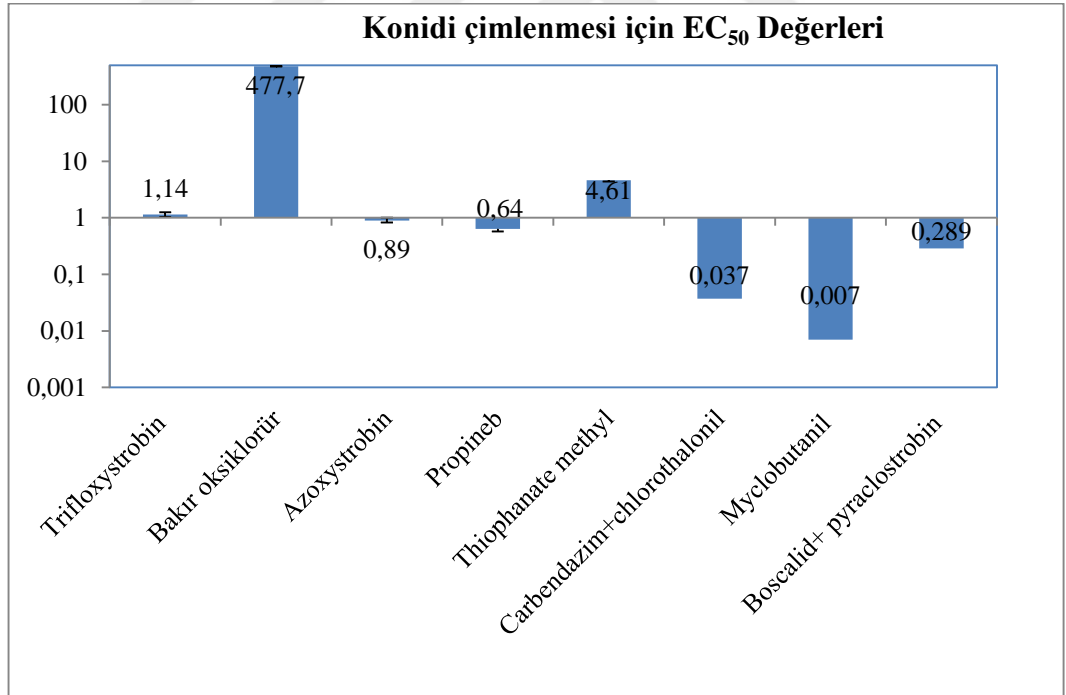


Şekil 4. 31. (devam) Seçilmiş olan bazı fungusitlerin, *C. gloeosporioides*'in konidi çimlenmesi üzerine *in vitro* etkileri (%)



Şekil 4.32. Konidi çimlenme denemelerinin kontrol (A) ve etkili dozların (B,C,D) trinoküler araştırma mikroskobu altında görünümü

Konidi çimlenmesi için EC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde, Bakır oksiklorür' ün EC<sub>50</sub> değerleri 477,7 µg.ml<sup>-1</sup> oranı ile oldukça yüksek bir değer göze çarpmaktadır. Propineb'in EC<sub>50</sub> değeri ise 0,64 µg.ml<sup>-1</sup> ile oldukça düşük olarak değerlendirilebilir. Trifloxystrobin'in EC<sub>50</sub> değerine bakılınca, bu fungusitin 1,14 µg.ml<sup>-1</sup> olarak düşük konsantrasyonda etkili olduğu saptanmıştır. Myclobutanil'in EC<sub>50</sub> değeri 0,007 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyon ile denemede çalışılan diğer fungusitler arasında en düşük konsantrasyonda etkili sonuç veren fungusit olduğu saptanmıştır (Şekil 4.33). Böylece, fungusun bu fungusite duyarlı olduğu belirlenmiştir. Azoxystrobin'in EC<sub>50</sub> değerine bakılırsa, 0,89 µg.ml<sup>-1</sup> ile 0' dan düşük konsantrasyonda etkili olduğu göze çarpmaktadır. Çalışmada kullanılan fungusitler arasında konidi çimlenmesi EC<sub>50</sub> değeri en düşük fungusit olarak belirlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren thiophanate methyl'in EC<sub>50</sub> değerine göre, 4,61 µg.ml<sup>-1</sup> değerle etkili olduğu gözlenmiştir. Benzimidazole grubuna giren bir karşım fungusit carbendazim+ chlorothalonil EC<sub>50</sub> değeri ise 0,037 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonu ile düşük konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir. Boscalid + pyraclostrobin'in EC<sub>50</sub> değeri 0,289 µg.ml<sup>-1</sup> konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 33. Fungisistlerin farklı konsantrasyonlarında *C. gloeosporioides* izolatının konidi çimlenmesi için hesaplanan EC<sub>50</sub> değerleri

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

*Colletotrichum* cinsine bağlı *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türleri tarafından 2016 ve 2017 yıllarında limon, mandarin, portakalın ağırlıklı olduğu altıntop ve turunç gibi turunçgil tür ve çeşitlerinin sürgünlerinde oluşturulan uçkurutan benzeri geriye doğru ölüm, meyveler ve yapraklarda antraknozu andıran belirtiler gözlenmiştir. Doğu Akdeniz bölgesinde turunçgil yetiştiriciliğin yapıldığı, Hatay, Adana, Osmaniye ve Mersin illerinde bu hastalığın görülmesi sebebiyle, hastalık etmenlerinin morfolojik, patojenik, moleküler karakterizasyonu ve tür teşhisinde yeni teknolojik cihaz olan MALDI TOF MS ile tanınması bu araştırma ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen örneklerden yapılan izolasyonlarda 161 *Colletotrichum* izolatu elde edilmiştir. Toplanan bu izolatlardan 72'si limon, 40'ı mandarin, 13'ü portakal, 1 adeti altıntop ve biride turunçtan elde edilmiştir. İzolasyonlar sonucu elde edilen kültürlerde öncelikle grimsi renkte başlayan sonrada turuncu renge dönüşen pigmentler gözlenmiştir. Bazı izolatların kolonilerinde yapışkanimsı, turuncu renkte conidiomata yapılarının ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Olgunlaşan kültürlerde patojenin üreme yapısı aservulusların oluştuğu gözlenmiştir. Bazı izolatlarda ise şeffaf-krem rengi ve olgunlaşan kültürde az miktarda aservulus olduğu belirlenmiştir. 3.

Koloni rengi, konidi şekil ve boyutları ile eşeyli üreme yapıları ve apresoryum yapılarına göre morfolojik tanı karakterleri esas alınarak *Colletotrichum* cinsine ait *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* türleri tanımlanmıştır.

Fungusun morfolojik özelliklerini doğrulamak için yürütülen moleküler filogenetik analizler sonucu limonda 40 izolatın *C. gloeosporioides* ve 34 izolatın *C. karstii* olduğu tespit edilmiştir. Mandarinde ise 32 izolat *C. gloeosporioides* ve 8 izolat *C. karstii* olarak saptanmıştır. Portakaldan 13 izolat, altıntopdan 1 izolat ve turunçtan 1 izolat, *C. gloeosporioides* türüne bağlı olarak belirlenmiştir. Dört genin birlikte kullanılarak yapılan filogenetik analizle kombine şeklinde oluşturulan dendrogramda, bu çalışmada kullanılan izolatlar *C. gloeosporioides* ve *C. karstii* şeklinde iki gruba ayrılmıştır. Buna göre kullanılan 22 izolattan 3'ü *C. karstii* grubunda, 19'u *C. gloeosporioides* grubunda yer almıştır.

Fungal türlerin morfolojik ve moleküler karakterizasyonunu desteklemek için yürütülen MALDI TOF MS analiz sonucunda, *C. gloeosporioides* türünde 63 izolat; *C. karstii* türünde ise; 30 izolat 2.000-2.299 (yeşil renk) arası değer güvenilir tür düzeyinde teşhis şeklinde tür tanısı yapılmıştır. *C. gloeosporioides* türünde 25 izolat; *C. karstii*

türünde 12 izolat 1.700-1.999 (sarı renk) arası değer muhtemel cins düzeyinde teşhis, şeklinde tanımlama yapılmıştır. Patojenisite denemesinde, *C. gloeosporioides* türü için LC5, *C. karstii* türü için MCK9 izolatu seçilmiştir. *C. gloeosporioides* türüne bağlı LC5 izolatu ve *C. karstii*'nin LCK36 izolatının daha virulent oldukları belirlenmiştir. *C. karstii*'nin MCK9 ve *C. gloeosporioides* türünde MC4 izolatları yüksek hastalık oranı göstermişlerdir.

Fungisit duyarlılık denemelerinde etkili miselyal gelişim ve konidial çimlenme şeklinde iki aşamalı olarak yapılan çalışmalarda, *C. gloeosporioides* fungusunun denemelerdeki tüm fungusitlere karşı oldukça duyarlı olduğu gözlenmiştir. Denemede kullanılan fungusitler içerisinde, myclobutanil, boscalid+pyraclostrobin, trifloxystrobin, carbendazim+ chlorothalonil ve thiopmate methly en etkili fungusitler olduğu saptanmıştır.

Bu araştırma, ülkemizde turunçgil antraknoz hastalığı ile ilişkili *Colletotrichum* türlerinin tanınması ve mücadelesi konusunda yapılan en geniş kapsamlı çalışmadır. *Colletotrichum* türlerinin neden olduğu antraknoz hastalıkları, hem derim öncesi hem de derim sonrası önemli kayıplara neden olduğu için bu cins üzerinde bilimsel çalışma yapılması önem arz etmektedir. *Colletotrichum* türlerinde aynı tür birçok bitkiyi enfekte edebilme yeteneğindedir. Ayrıca aynı bitki üzerinde birde fazla *Colletotrichum* türü de hastalık oluşturabilmektedir. Ayrıca, çiftçilerimiz açısından tam olarak bilinmeyen bu hastalık, yanlış mücadele yöntemlerine ve kimyasal uygulamalara sebep olarak hem çevreye zarar verilmesine hem de ürüne zarar verilerek ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ülkemiz açısından *Colletotrichum* türleri üzerine geniş kapsamlı bir çalışma yapmak ve çıkan sonuçlar doğrultusunda çiftçilerimiz bilgilendirmek ve gerekli önlemler almak sağlıklı ürün ve ekonomik kazanç için önem arz etmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler hem bilimsel olarak hemde turunçgil üreticileri açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışma ile, yıllardır turunçgillerde göz ardı edilen antraknoz hastalığının enfeksiyon şekli ile mücadelesi ve en önemlisi üreticiler tarafından tam olarak tanınmadığı ortaya çıkmıştır. Üreticiler tarafından uçkurutan (*Phoma tracheiphila*) olarak bilinen hastalığın artık geri planda kaldığı ve yerini antraknoz (*Colletotrichum* spp.) hastalığına bıraktığı yapılan arazi gözlemleri ve laboratuvar analizleri ile kesinlik kazanmıştır.

Sonuçta, *Colletotrichum*'a ait türlerin turunçgillerdeki popülasyon yapısının morfolojik, genetik ve patojenik karakterizasyonu ve diğer bölgelerdeki türlerle karşılaştırılması, antraknoz hastalığının etiolojisinin daha iyi aydınlatılması ve etkili

hastalık yönetim stratejilerinin geliştirilmesinin teşvik edilmesinde zorunludur. Ayrıca, turunçgillerde hastalıklara karşı dayanıklı çeşit geliştirme ve ıslah çalışmaları yürüten araştırmacıların, önemli bir patojen grubu olarak *Colletotrichum* türlerinin potansiyel tehlikesini göz önüne almaları faydalı olacaktır. Bu konuyla ilgili zirai mücadele teknik talimatların düzenlenmesi, standart ilaç deneme metodlarının oluşturulması ve bu hastalıkla ilgili ilaç ruhsatlama çalışmalarının teşvik edilmesi öncelikli konular arasında yer almalıdır.



## KAYNAKLAR

- Abera, A., Lemessa, F., Adunga, G., 2016. Morphological Characteristics of *Colletotrichum* Species Associated with Mango (*Mangifera indica* L.) in Southwest Ethiopia. **Food Science and Quality Management** (Online) Vol.48,
- Alexander, S. A, Waldenmaier CM., 2002. Management of Anthracnose in Bell Pepper. Fungicide and Nematicide Tests. **New Fungicide and Nematicide Data Committee of the American Phytopathological Society**. Vol. 58.. p. 49.
- Al-Hatmi, A.M.S., Mirabolfathy, M., Hagen, F., Normand, A., Stielow, B., Karami-osbo, R., Van Diepeningen, A., Meis, J., De Hoog, G., 2016. DNA barcoding, MALDI-TOF, and AFLP data support *Fusarium ficicrescens* as a distinct species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Fungal Biology**. 120:265-278.
- Adaskaveg, J.E. and Förster, H., 2000. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction (eds. D. Prusky, S. Freeman and M.B. Dickman). **APS Press**, St Paul, Minnesota: 317-336.
- Agostini, J.P., Timmer, L.W., Mitchell, D.J., 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology** 82:1377-1382.
- Aiello, D., Carrieri, R., Guarnaccia, V., Vitale, A., Lahoz, E., Polizzi, G., 2015. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* causing preharvest disease on citrus sinensis in Italy. **Journal of Phytopathology**.163:168-177.
- AKIB, 2017. Akdeniz Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği. Çalışma Raporu 1-24.
- Akgün C., 2006. Turunçgiller Sektör Profili. Dış Ticaret Şubesi Uygulama Servisi <http://kobi.mynet.com/pdf/turunçgiller.pdf> (01.07.2006).
- Anonymous, 2015. European and Mediterranean Plant Protection Organization (**EPPO**), [https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo\\_publications](https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_publications)
- Anonymous, 2017. **FAOSTAT**, World Production Data. Statistics of Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.faostat.fao.org>.
- Anonymous, United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service (**USDA**) <https://www.usda.gov>.
- Anonim, 2018. **Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)**, Bitkisel Üretim İstatistikleri, <http://www.tuik.gov.tr>
- Arx, J.A. von., 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. **Phytopathologische Zeitschrift** 29: 413-468.
- Avcı, S.E., 2018. Yeni Kurulan Turunçgil Bahçelerinde Fungal Patojenlerin Belirlenmesi Ve Çeşit Duyarlılıklarının Saptanması. **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**. ADANA.
- Bailey, J.A., Jeger, M.J., 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. **Commonwealth Mycological Institute**, Wallingford, p.388.
- Backman, P.A., Williams J.C. and Crawford, M.A., 1982. Yield losses in soybeans from anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease** 66: 1032-1034



- Baxter, A.P., Westhuizen, G.C.A. van der and Eicker, A., 1983. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. **South African Journal of Botany** 2: 259-289.
- Isaac, S., 1992. Fungal Plant Interaction. Chapman and Hall Press, London, p.115.
- Bhagya, N., Sheik, S., Sharma, S.M., Chndrashekar, K.R., 2011. Isolation of endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from *Salacia chinensis* and its antifungal sensitivity. **Journal of Phytology**. 3, 20-22.
- Bosland, P.W., Votana, E.J., 2003. Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. **CAB International**, England, p.233.
- Campoverde, E.V., Palmateer, A.J., 2012. *Colletotrichum sansevieriae* causing Anthracnose of *Sansevieria trifasciata* 'Laurentii' ve 'Moonshine' in South Florida. Proc. Fla. State. **Horticultural Society**. 125:359-360.
- Cannon, P.F, Buddie AG, Bridge PD. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycotaxon** 104: 189–204.
- Carolis, E. D., Posteraro, B., Lass-Flo, C., Vella, A., Florio, A. R., Torelli, R., Girmenia, C., Colozza, C., Tortorano, A. M., Sanguinetti M., Fadda, G., 2012. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinic Microbiology Infect** 2012; 18: 475–484.
- Carolis, E.D., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, Spanu, T., Fiori, B., Posteraro, B., Sanguinetti, M., 2014. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **J. Infect Dev. Ctries** 819:1081-1088.
- Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., Šebela, M., 2014. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances** 32:230–241.
- Chase, A.R., 2011. *Colletotrichum* is a Common Diseases. **Greenhouse Management**.
- Cheng, B.P., Huang, H., Song, X. B., Peng, A. T., Ling, J. F., & Chen, X., 2013. First report of *Colletotrichum siamense* causing leaf drop and fruit spot of *Citrus reticulata* Blanco cv. Shiyue Ju in China. **Plant Disease**, 97(11), 1508.
- Corda, A.C.I., 1831. Die Pilze Deutschlands. In: Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen 3 (ed. J. Sturm). **Abt., tab. 21-32. Nürnberg; Sturm** 12: 33-64.
- Damm, U., Woudenberg J.H.C, Cannon P.F, Crous P.W., 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity** 39: 45-87.
- Damm, U., Cannon P.F, Woudenberg J.H.C, Crous P.W, 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology** 73:37-113
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H., Johnston, P.R., Weir, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G., Crous, P.W., 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Stud. Mycology**. 73, 1-36.
- Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology** 13: 414–430.

- De Silva, N.I., Lumyong, S., Hyde, K.D., Bulgakov, T., Phillips, A.J.L., Yan, J.Y., 2016b. Mycosphere Essays 9: Defining biotrophs and hemibiotrophs. **Mycosphere** 7, 545-559
- De Silva, D.D., Crous, P.W., Ades, P.K., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., 2016. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **fungus biology reviews** 31:155-168.
- Dodd, J.C., Estrada, A., Jeger, M.J. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics. In: Bailey JA, Jeger MJ, editors. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford: **CAB International**; 1992. pp. 308–325.
- Douanla-Meli, C., Unger, J.G., 2017. Phylogenetic study of the *Colletotrichum* species on imported citrus fruits uncovers a low diversity and a new species in the *Colletotrichum gigasporum* complex. **Fungal Biology** 121:858-868.
- Duke, M. M., 1928. The genera *Vermicularia* Fr. and *Colletotrichum* Cda. Transactions of the **British Mycological Society** 13: 156-184.
- Fitzell, R.D., Peak, C.M., Darnell, R.E., 1984. A model for estimating infection levels of anthracnose disease of mango. **Ann. Appl. Biology**. 104:451-458.
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E., 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**. 82 (6): 596-605.
- Gao, Y.Y., He, L.F., Li, B.X., Mu, W., Lin, J., Liu, F., 2017. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to six fungicides and reduction in incidence and severity of chili anthracnose using pyraclostrobin **Australasian Plant Pathology**. 46:521–528.
- Göre, M.E., Bucak, C., 2006. Batı Anadolu Bölgesi'nde Defnede (*Laurus Nobilis* L) Fungal Hastalık Etmenlerinin Saptanması Anadolu, **J. of AARI** 16 (1) 2006, 42 - 53.
- Guarnaccia, V., Groenewald, J.Z., Polizzi, G., Crous, P.W. 2017. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. **Persoonia** 39: 32–50.
- Hadden, J.F., Black, L.L., 1989. Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. Proceeding of the International Symposium on Integrated Management Practices: Tomato and peper production in the tropics. **Asian Vegetable Research and Development Centre**. Taiwan, p.189-199.
- Honger J.O., Offei, S.K., Oduro, K.A., Odamtten, G.T., 2016. Identification and molecular characterisation of *Colletotrichum* species from avocado, citrus and pawpaw in Ghana. **South African Journal of Plant and Soil**. Vol 33, No.3
- Hřicáková, N., Medo, J., Hleba, L., Barta, M., Maková, J., 2018. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in rapid identification of *Beauveria bassiana* and *Beauveria pseudobassiana*. **Journal of Central European Agriculture**, 19(2), p.394-407.
- Huang, F, Chen G.Q, Hou X, Fu Y.S, Cai L, Hyde K.D, Li H.Y, 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. **Fungal Diversity** 61: 61e74.
- Intanoo, W, Chamswarnng C. 2007. Effect of Antagonistic Bacterial Formulations for Control of Anthracnose on Chilli Fruits; **Proceeding of the 8th National**

- Plant Protection Conference.** Phisanulok, Thailand: Naresuan University. pp. 309–322.
- Ishii, H., Zhen, F., Hu, M., Lib, X., Schnabel, G., 2016. Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletotrichum* species. **Pest Management Science** 72: 1844–1853.
- Johnston, P. R., & Jones, D., 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. **Mycologia**, 89(3), 420–430.
- Johnston, P. R., Pennycook, S. R., & Manning, M. A., 2005. Taxonomy of fruit rotting fungal pathogens: what's really out there? **New Zealand Plant Protection**, 58, 42–46.
- Karakaya, A., Çelik, A., Yıldırım, R. Atmaca. D., 2012. Rize İlinde kivilerde görülen önemli fungal hastalıkların belirlenmesi. **Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu** (Proje Numarası: 08B4347002). 34 s.
- Krishnapillai, N., Wilson Wijenatnam K.S., 2014. First report of *Colletotrichum asianum* causing anthracnose on Willard mangoes in Sri Lanka. **New Biological Reports**, 29.
- Kloutvorova, J., Egert, P., 2004. New possibilities for protecting stone fruits with the fungicide Horizon 250 EW. **Online Courier**.
- Kumar, D. S. S, Hyde K. D, 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity** 17: 69-90.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Evolutionary Genetics Analysis**. 33(7):1870–1874.
- Kurt, Ş., Uysal A., Akgül D.S., 2016. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum spinaciae* on Spinach in the Mediterranean Region of Turkey. **Plant Disease** 100(1).
- Lahey, K. A., Yuan, R., Burns, J. K., Ueng, P. P., Timmer, L.W., Chung, K. R. 2004. Induction of phytohormones and differential gene expression in citrus flowers infected by the fungus *Colletotrichum acutatum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 17, 1394-1401.
- Lewis, I.M.L, Miller, S.A., 2003. Evaluation of Fungicides and a Biocontrol Agents for the Control of Anthracnose on Green Pepper Fruit, **New Fungicide and Nematicide Data Committee of the American Phytopathological Society**; 2003. p. 62.
- Li, L., Pan, H., Chen M. Y., Zhang, S.J., Zhong, C.H., 2017. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on Kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China. **Plant Disease**. Vol. 101. Nu. 12. Page: 2151.
- Lichtemberg, P.S.F., Moral, J. Morgan, D.P., Felts, D.G., 2017. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum fioriniae* and *C. karstii* in California Pistachio Orchards. **Plant Disease**. Vol. 101. Nu. 7. Page. 1320.
- Lima, WG, Sposito MB, Amorim L, 2011. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology** 131: 157–165.
- Lopez-Moral, A., Raya-Ortega, M.C., Agust'ı-Brisach, C., Roca, L.F., 2017. Morphological, Pathogenic, and Molecular Characterization of *Colletotrichum acutatum* Isolates Causing Almond Anthracnose in Spain. **Plant Disease** Vol.101. 2034-2045.

- Luethy, P. M., Zelazny, A.M., 2018. Rapid one-step extraction method for the identification of molds using MALDI-TOF MS. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 91:130–135.
- Liu, F., Cai, L., Crous, P. W., Damm, U., 2014. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. **Persoonia**, 33: 83–97.
- Maier, T., Klepel, S., Renner, U., Kostrzewa, M., 2006. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. **Nature Publishing Group**.
- Marcelino, J., Giordano R, Gouli S., 2008. *Colletotrichum acutatum* var. *fioriniae* (teleomorph: *Glomerella acutata* var. *fioriniae* var. nov.) infection of a scale insect. **Mycologia** 100: 353–374.
- Martinez, E.P, Hio J.C, Osorio J.A, Torres M.F, 2009. Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. **Agronomia Colombiana** 27: 211-218.
- McGovern, R.J, Seijo T.E, Hendricks K, Roberts P.D., 2012. New report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing postbloom fruit drop on citrus in Bermuda. **Canadian Journal of Plant Pathology** 34: 187-194.
- Mendiratta, D.K., Thamke, D., Shukla, A.K. and Narang, P., 2005. Keratitis due to *Colletotrichum dematium* - a case report. **Indian Journal of Medical Microbiology** 23: 56-58.
- Mincuzzi, A., Ippolito, A., Sanzani, S.M., 2017. First Report of *Colletotrichum acutatum* Sensu Stricto Causing Postharvest Rot on Pomegranate Fruit in Italy. **Journal of Plant Pathology** 99(3), 799-818.
- Mutlu, G., Kırbağ, S., Üstüner, T., 2015. Elazığ ili örtüaltı hıyar yetiştiriciliğinde görülen fungal hastalıkların belirlenmesi. **Bitki Koruma Bülteni** 55(4): 341-360.
- Noireung, P., Phoulivong, S., Liu, F., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Jones, E. B. G., Bahkali, A. H., Hyde, K. D. 2012. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Cryptogamie Mycologie**, 33(3), 347–362.
- O’Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**. 44(9):1060-5
- Olszak, M. Piotrowski, S., 1985. Studies of the control of tart cherry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fruit Science Reports**. 12, 155-161.
- Pardo-De la Hoz, C.J., Calderon, C., Rincon, A.M., Cardenas, M., Danies, G., Lopez-Kleine, L., Restrepo, S., Jimenez, P., 2015. Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree Tomato and mango crops in Colombia. **Plant Pathology**.65:227-237.
- Peng, L.J., Yang, Y.L., Hyde, K.D., Bahkali, A.H., Liu, Z.Y., 2012. *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. **Cryptogamie Mycologie**, 33(3), 267–283.
- Perfect, S.E, Hughes HB, O’Connell RJ, Green JR. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**. 1999;27(2-3):186–198.

- Pernezny, K., Roberts, P.D., Murphy, J.F., Goldberg, N.P., 2003. Compendium of pepper Diseases. **The American Phytopathological Society**, St.Paul, Minnedota, p.73.
- Perrone, G, Magistà D, Ismail AM. 2016. First report of *Colletotrichum kahawae* subsp. *ciggaro* on mandarin in Italy. **Journal of Plant Pathology** 98: 12.
- Phoulivong, S., McKenzie, E., Hyde, K., 2012. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. **Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.** 2, 99-111.
- Plakidas, A.G. (1944). Black Scale: a disease of Easter lily bulbs. **Phytopathology** 34: 556-571.
- Piccirilloa, G., Carrieria, R., Polizzib, G., Azzaroc, A., Lahoza, E., Fernández-Ortuñod, D., Vitaleb, A., 2018. *In vitro* and *in vivo* activity of QoI fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing fruit anthracnose in *Citrus sinensis*. **Scientia Horticulturae**. 236:90–95.
- Pring, R.J., Nash, C., Zakaria, M., Bailey. J.A., 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 46:137-152.
- Prusky, D., 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. Annual. Reviews. **Phytopathology**. 34, 413.
- Quintillaa, R., Koleckaa, A., Casaregolad, S., Daniele, H.M., Houbrakena, J., Kostrzewaf, M., Boekhouta, T., Groenewalda M., 2018. MALDI-TOF MS as a tool to identify foodborne yeasts and yeast-like fungi. **International Journal of Food Microbiology**. 266:109–118.
- Rahi, P., Prakash O., Shouche Y.S., 2016. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI- TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. **Frontiers Microbiology**. Aug 30;7:1359.
- Ramos, A.P, Talhinhass P, Sreenivasaprasad S, 2016. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C. karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. **Phytoparasitica**. 44: 549–561.
- Ramdial, H. Hosein, F. N., Rampersad, S. N., 2016. Detection and Molecular Characterization of Benzimidazole Resistance Among *Colletotrichum truncatum* Isolates Infecting Bell Pepper in Trinidad. **Plant Diseases**. Vol.100 no:6:1146-1152.
- Rhaiem, A, Taylor PW. 2016. *Colletotrichum gloeosporioides* associated with anthracnose symptoms on citrus, a new report for Tunisia. **European Journal of Plant Pathology**. 146: 219–224.
- Royle, D.J., Butler, D.R., 1986. Epidemiological Significance of Liquid Water in Crop Canopies and its Role in Disease Forecasting. In: Ayres, P.G., Boddy, L. (Eds.), Water, Fungi and Plants. **Cambridge University Press, Cambridge**, p.139-156.
- Sharma, M., Kulshrestha, S., 2015. *Colletotrichum gloeosporioides*: An Anthracnose Causing Pathogen of Fruits and Vegetables. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, Vol. 12(2).
- Sharma, G., Maymon, M., Freeman, S., 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with

- avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports). **Scientific Reports** 7: 15839.
- Silva, A. O., Savi, D. C., Gomes, F. B., Gos, F. M. W. R., Silva Jr, G. J., Glienke, C., 2017. Identification of *Colletotrichum* species associated with postbloom fruit drop in Brazil through GAPDH sequencing analysis and multiplex PCR. **European Journal of Plant Pathology** 147:731–748.
- Sutton, B.C., 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Aservuli and Stromata. Kew, UK: **Commonwealth Mycological Institute**.
- Swant, I.S., Narkar, S.P., Shetty, D.S., Upadhyay, A., Swant, S.D., 2012. First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose on grapes in Maharashtra, India. **New Disease Reports**, 25.
- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O. and Taylor, P.W.J. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology** 57: 562-572.
- Timmer, L.W, Garnsey SM, Graham JH. 2000. Compendium of Citrus diseases (second edition). **The American Phytopathological Society**.
- Uysal, A., Kurt, Ş., Akgül, D.S., 2016. Akdeniz Bölgesi Limon Bahçelerinde Antraknoz Hastalığına Neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*' in Patojenik ve Moleküler Karakterizasyonu. **Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi**, 5-8 Eylül, Konya, s. 597.
- Uysal, A., ve Kurt, Ş., 2018a. An Important Fungal Disease on Citrus Orchards in Erdemli: Anthracnose. **International Erdemli Symposium**. 19-21 April Mersin/Turkey
- Uysal, A., Kurt, Ş., Soylu E.M., Kara M., Soylu S., 2018. Evaluation of the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Identification of Some Plant Fungal Pathogenic Species. **International Agricultural Science Congress**. 09-12 May Van/Turkey.
- Uysal, A., Kurt, Ş., 2018b. *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose on pomegranate in Turkey. **Australasian Plant Dis. Notes**. 13:19.
- Uysal, A., Kurt, Ş., 2019a. First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on citrus in the Mediterranean region of Turkey. **Journal of Plant Pathology** <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00215-0>.
- Uysal, A., Kurt, Ş., 2019b. *In vitro* sensitivity of anthracnose disease agent, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., to some fungicides on lemon. **Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin**. 59 (1) : 53-62.
- Van Hemelrijck, W., Debode J., Heungens K., Maes, M., Creemers P., 2010. Phenotypic and genetic characterization of *Colletotrichum* isolates from Belgian strawberry fields. **Plant Pathology**. 59, 853-861.
- Vassiljevski, N.I. and Karakulin, B.P. (1950). Fungi imperfecti Parasitici: Pars II. Melanconiales. **Academiae Scientiarum URSS**, Moscow and Leningrad.
- Velho, A.C., Alaniz, S., Casanova, L., Mondino, P., Stadnik, M.J., 2015. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with applediseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology** 119:229-244.
- Vieira, W.A.S., Lima, W.G., Nascimento, E.S., Michereff, S.J., Reis, A., Doyle, V.P., Camara, M.P.S., 2017. Thiophanate Methyl Resistance and Fitness

- Components of *Colletotrichum musae* isolates from Banana in Brazil. **Plant Disease**. 101:1659-1665.
- Wang, Y.T, Lo HS, Wang PH, 2008. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*. **Botanical Studies** 49: 39e43.
- Wang, Q.H., Li, D.W., Duan, C.H., Liu, X.H., Niu, S.G., Hou, L.Q., Wu, X.Q., 2018. First Report of Walnut Anthracnose Caused by *Colletotrichum fructicola* in China. **Plant Disease**. Vol. 102. Nu. 1. Page. 247.
- Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U., 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycology*. 73, 115-180.
- Wollenweber, H.W. and Hochapfel, H. (1949). Beiträge zur Kenntnis parasitärer und saprophytischer Pilze. VI. *Vermicularia*, *Colletotrichum*, *Gloeosporium*, *Glomerella* und ihre Beziehung zur Fruchtfäule. **Zeitschrift für Parasitenkunde** 14: 181-268.
- Kurt, Ş., Uysal, A., Akgül, D.S., 2016. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum spinaciae* on Spinach in the Mediterranean Region of Turkey. **Plant Disease**. 100: 219.
- Yamamoto, N., T. Matsumoto, and Y. Ishibashi. 2001. Fungal keratitis caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Cornea** 20:902–903.
- Zhang, P.F., Zhai, L.F., Zhang, X.K., Huang, X.Z., Hong, N., Xu, W., Wang, G., 2015. Characterization of *Colletotrichum fructicola*, a new causal agent of leaf black spot disease of sandy pear (*Pyrus pyrifolia*). **European Journal Plant Pathology**. 143:651-662.

## ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1990 yılında Fethiye’ de doğdu. İlkokul ve Ortaokul öğrenimini Muğla ilinin Seydikemer ilçesinde, lise öğrenimini ise Fethiye ilçesinde tamamladı. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Mühendisliği Bölümü’nü 2008 yılında kazandı. 2011 yılının yaz aylarında Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nde staj eğitimi gördü. Üniversiteden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yılın Eylül ayında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim dalında yüksek lisansa başladı. 2014 Aralık ayında Bitki Koruma Anabilim Dalından Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu. 2015 Ocak ayında Doktora eğitimine başladı. 2015 Ekim ayında DOĞAKA güdümlü proje kapsamında desteklenen Bitki Sağlığı Kliniği’nin Kurulması Projesinde proje personeli olarak çalıştı. 2018 Ocak ayında TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesinde Bursiyer olarak çalıştı.



## EKLER

### EK1

#### Patates Dekstroz Agar(PDA)'nın hazırlanışı

Kabukları soyulmuş ve küp şeklinde doğranmış 200g patates, içinde saf su bulunan beherde yumuşayınca kadar haşlanmıştır. Daha sonra, patatesler süzgeçten geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Elde edilen sıvı içine saf su ilave edilerek 1 litreye tamamlanmış ve bu karışıma 20g/l dekstroz ve 20g/l agar ilave edilerek otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

#### Sentetik Nutrient Agar (SNA) ortamının hazırlanışı

1 litre ortam için, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g KNO<sub>3</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5g KCl, 0,2g Glukoz, 0,2g Sakkaroz, 20g Agar karıştırılmış ve üzeri saf su ile tamamlanarak 121°C'de 15 dk otolavda steril edilmiştir.

### EK2

*C. gloeosporioides* ve *C. karstii*'ye ait spor ölçümleri

İzolat	Konukçu türü /Alınan doku	Konidi uzunluğu(µm)			Konidi genişliği(µm)			Konidi şekli
		max	min	ort	max	min	ort	
MC1a	Mandarin/yaprak	18.41	16.43	17.42	5.97	3.77	4.87	Silindirik,hafif ince
MC1b	Mandarin/yaprak	18.24	16.20	17.00	5.47	3.33	4.40	Silindirik,hafif ince
MC2a	Mandarin /dal	16.30	14.80	15.50	6.63	4.42	5.20	Silindirik,biraz kalın
MC3a	Mandarin/yaprak	17.41	16.43	17.42	5.45	3.44	4.44	Silindirik,hafif ince
MC4a	Mandarin/yaprak	18.56	16.49	17.00	5.66	3.32	4.65	Silindirik,hafif ince

MC4 b	Mandarin/yaprak	17.4 1	15.4 3	16.4 6	4.9 7	4.2 3	5.0 1	Silindirik,hafif ince
MC5 a	Mandarin/dal	19.4 5	14.4 8	17.6 7	4.5 5	3.8 8	4.9 8	Silindirik,hafif ince
MC5 b	Mandarin/dal	17.9 8	16.4 3	17.3 4	5.2 1	3.2 3	3.8 7	Silindirik,hafif ince
MC6 a	Mandarin/yaprak	16.2 5	14.5 6	14.8 0	6.6 5	4.4 0	5.0 0	Silindirik,biraz kalm
MC6 b	Mandarin/yaprak	16.2 0	14.7 6	13.5 8	5.5 5	4.2 1	4.4 5	Silindirik,biraz kalm
MC7 a	Mandarin/dal	18.9 8	15.4 3	16.4 8	5.0 0	3.6 0	4.8 7	Silindirik,hafif ince
MC8 a	Mandarin/dal	19.3 1	16.5 5	17.0 6	5.3 4	3.0 0	4.2 1	Silindirik,hafif ince
LC1 a	Limon/dal	18.3 4	16.0 0	17.2 3	5.4 5	3.7 7	4.8 7	Silindirik,hafif ince
LC1 b	Limon/dal	18.2 4	16.1 1	17.0 4	5.4 7	3.2 3	4.4 6	Silindirik,hafif ince
LC2 a	Limon/dal	16.3 0	14.8 0	15.5 0	6.6 3	4.4 2	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
LC2 b	Limon/dal	17.4 1	16.4 3	17.4 2	5.4 5	3.4 4	4.4 4	Silindirik,hafif ince
LC3	Limon/dal	18.5 6	16.4 9	17.0 0	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif
LC4	Limon/ yaprak	16.3 0	14.8 0	15.5 0	6.6 3	4.4 2	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
PC1	Portakal/ dal	17.4 1	16.4 3	17.4 2	5.4 5	3.4 4	4.4 4	Silindirik,hafif ince
PC2a	Portakal/ yaprak	18.5 6	16.4 9	17.0 0	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
PC2 b	Portakal/ yaprak	16.3 0	14.8 0	15.5 0	6.6 3	4.4 2	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
MC1 a	Mandarin/dal	17.4 1	16.4 3	17.4 2	5.4 5	3.4 4	4.4 4	Silindirik,hafif ince
MC2 a	Mandarin/yaprak	18.5 6	16.4 9	17.0 0	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
MC2 b	Mandarin/yaprak	16.3 0	14.8 0	15.5 0	6.6 3	4.4 2	5.2 0	Silindirik,biraz kalm

MC3 a	Mandarin/yaprak	18.3 4	16.4 3	17.4 4	5.9 7	3.7 7	4.8 8	Silindirik,hafif ince
MC3 b	Mandarin/yaprak	18.2 4	16.2 0	17.0 0	5.6 7	3.3 5	4.4 1	Silindirik,hafif ince
LC1 a	Mandarin/yaprak	16.6 6	14.0 1	15.5 8	6.6 3	4.8 8	5.7 8	Silindirik,biraz kalm
LC1 b	Mandarin/yaprak	17.8 7	16.5 3	17.3 8	5.0 0	3.4 1	4.2 3	Silindirik,hafif ince
MC1 a	Mandarin/dal	18.5 5	16.4 4	17.4 0	5.6 6	3.3 2	4.5 2	Silindirik,hafif ince
MC1 b	Mandarin/dal	16.4 6	14.8 0	15.5 0	6.6 3	4.4 4	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
MC2	Mandarin/yaprak	18.4 9	16.4 4	17.2 1	5.4 5	3.0 0	4.4 9	Silindirik,hafif ince
MC3	Mandarin/yaprak	18.5 6	16.4 9	17.2 3	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
MC4 a	Mandarin/yaprak	16.3 0	14.8 0	15.5 0	5.6 3	4.4 2	5.0 1	Silindirik,biraz kalm
MC4 b	Mandarin/yaprak	17.4 9	16.4 3	17.5 6	6.4 5	3.8 9	5.4 4	Silindirik,hafif ince
MC4 c	Mandarin/yaprak	18.5 6	16.4 5	17.0 0	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
MC5 a	Mandarin/dal	16.2 1	14.7 8	15.5 3	6.8 9	4.4 2	5.6 7	Silindirik,biraz kalm
MC5 b	Mandarin/dal	18.5 1	15.9 9	17.4 2	5.9 9	3.6 1	4.8 8	Silindirik,hafif ince
MC6 a	Mandarin/yaprak	18.3 4	16.2 5	17.0 1	5.4 7	3.3 0	4.3 9	Silindirik,hafif ince
MC6 b	Mandarin/yaprak	16.7 0	14.8 3	15.5 0	6.6 3	4.4 2	5.2 1	Silindirik,biraz kalm
TC1	Turunç/ yaprak	17.9 1	16.6 6	17.4 2	5.4 5	3.4 9	4.4 4	Silindirik,hafif ince
LC1	Limon/ yaprak	18.5 6	16.4 1	17.0 9	5.6 4	3.3 9	4.6 5	Silindirik,hafif ince
LC2	Limon/ yaprak	16.9 0	14.8 0	15.5 5	6.2 3	4.4 4	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
LC3	Limon/ yaprak	17.4 1	16.4 4	17.4 2	5.4 4	3.4 4	4.5	Silindirik,hafif ince
LC4	Limon/ yaprak	18.6 6	16.5 5	17.4 3	5.6 0	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince

LC5	Limon/ yaprak	16.7 6	14.9 8	15.6 5	6.6 3	4.4 8	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
LC6	Limon/ yaprak	17.9 8	16.2 1	17.4 3	5.4 5	3.2 1	4.5 5	Silindirik,hafif ince
LC7	Limon/ meyve	18.5 5	16.4 6	17.1 0	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
LC8	Limon/ meyve	16.6 6	14.2 3	15.2 2	6.6 3	4.4 4	5.2 1	Silindirik,biraz kalm
LC9	Limon/dal	18.4 1	16.4 3	17.4 2	5.9 7	3.2 3	4.8 8	Silindirik,hafif ince
LC1 0	Limon/dal	18.2 4	16.2 0	17.4 0	5.4 7	3.9 8	4.8 0	Silindirik,hafif ince
LC1 1	Limon/dal	16.3 3	14.8 6	15.5 0	6.6 3	4.4 2	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
LC1 2	Limon/dal	17.4 1	16.4 3	17.4 2	5.4 5	3.4 3	4.4 4	Silindirik,hafif ince
LC1 3	Limon/dal	18.5 6	16.4 9	17.0 0	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
LC1 4	Limon/dal	16.2 3	14.8 0	15.5 0	6.6 3	4.4 2	5.2 2	Silindirik,biraz kalm
LC1 5	Limon/dal	18.4 1	16.4 3	17.4 2	5.4 5	3.4 4	4.4 5	Silindirik,hafif ince
LC1 6	Limon/dal	18.5 4	16.4 9	17.0 0	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
LC1	Mandarin/yapr ak	18.5 9	16.4 9	17.0 9	5.6 6	3.3 2	4.6 6	Silindirik,hafif ince
LC2	Limon/dal	16.2 1	14.8 0	15.1 0	6.6 3	4.4 5	5.1 1	Silindirik,biraz kalm
PC1	Portakal/ yaprak	18.4 1	16.4 3	17.4 2	5.9 9	3.7 1	4.8 7	Silindirik,hafif ince
MC1	Mandarin/yapr ak	18.2 4	15.2 0	17.0 9	5.4 7	3.3 3	4.3 0	Silindirik,hafif ince
LC1	Limon/ yaprak	16.3 0	14.8 5	15.1 4	6.7 8	4.4 2	5.2 9	Silindirik,biraz kalm
LC2	Limon/ yaprak	15.4 1	16.4 3	17.4 2	5.4 5	3.4 4	4.4 4	Silindirik,hafif ince
MC2	Mandarin/yapr ak	18.5 6	16.4 4	17.1 9	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
AC1	Altıntop/ yaprak	16.3 0	14.8 9	15.6 0	6.0 9	4.4 1	5.2 0	Silindirik,biraz kalm

LC3 a	Limon/ yaprak	17.4 1	15.4 3	17.4 2	5.4 5	3.2 1	4.4 4	Silindirik,hafif ince
LC3 b	Limon/ yaprak	18.5 5	16.5 0	17.0 0	5.6 6	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
PC2	Portakal/ dal	16.3 1	14.3 4	15.5 0	6.0 0	4.4 2	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
LC4	Limon/dal	17.4 1	16.6 7	17.4 2	5.3 7	3.2 9	4.5 6	Silindirik,hafif ince
LC5	Limon/dal	18.5 6	16.4 6	17.4 0	5.6 6	3.3 2	4.6 3	Silindirik,hafif ince
LC6 a	Limon/dal	16.3 0	14.8 0	15.5 9	6.6 3	4.0 9	5.2 4	Silindirik,biraz kalm
LC6 b	Limon/dal	18.4 5	16.4 6	17.4 2	5.9 9	3.7 7	4.8 7	Silindirik,hafif ince
LC7	Limon/dal	17.3 1	16.2 4	17.0 0	5.4 7	3.3 3	4.4 1	Silindirik,hafif ince
LC8	Limon/dal	16.3 9	14.9 0	15.5 0	6.6 8	4.4 4	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
LC9 a	Limon/dal	17.0 9	16.4 3	17.4 2	5.4 5	3.4 4	4.6 7	Silindirik,hafif ince
LC9 b	Limon/dal	18.5 6	16.4 9	17.3 4	5.0 9	3.3 2	4.6 5	Silindirik,hafif ince
LC9 c	Limon/dal	16.3 6	14.8 7	15.5 0	6.6 3	4.4 9	5.0 9	Silindirik,biraz kalm
LC1	Limon/yaprak	17.4 1	16.4 3	17.4 2	5.1 0	3.4 4	4.4 9	Silindirik,hafif ince
LC2	Limon/yaprak	18.5 6	16.4 9	17.0 9	5.6 6	3.3 3	4.6 5	Silindirik,hafif ince
LC3	Limon/meyve	16.7 7	14.8 9	15.5 0	6.4 3	4.4 2	5.2 0	Silindirik,biraz kalm
LC4	Limon/dal	17.9 0	16.5 1	17.4 2	5.4 4	3.4 4	4.6 6	Silindirik,hafif ince
LC1	Limon/yaprak	18.5 6	16.4 9	17.1 7	5.5 5	3.2 9	4.6 5	Silindirik,hafif ince
LC2	Limon/dal	16.9 8	14.9 1	15.1 9	6.0 9	4.4 2	5.4 3	Silindirik,biraz kalm
LC3	Limon/yaprak	18.0 9	16.4 3	17.4 2	5.9 7	3.7 9	4.8 1	Silindirik,hafif ince
TC1	Turunç/yaprak	18.2 9	16.2 4	17.0 5	5.4 7	3.3 5	4.3 0	Silindirik,hafif ince

LC1	Limon/yaprak	16.30	14.80	15.71	6.63	4.42	5.20	Silindirik,biraz kalın
LC2	Limon/yaprak	17.73	16.43	17.42	5.45	3.44	4.44	Silindirik,hafif ince
MC1	Mandarin/yaprak	18.56	16.49	17.03	5.66	3.32	4.65	Silindirik,hafif ince
PC1	Portakal/yaprak	16.35	14.89	15.50	6.63	4.42	5.20	Silindirik,biraz kalın
LaC1	Laym/yaprak	17.87	16.19	17.42	5.45	3.44	4.32	Silindirik,hafif ince
LC1	Limon/yaprak	18.56	16.49	17.16	5.66	3.29	4.65	Silindirik,hafif ince
LC2	Limon/meyve	16.65	14.91	15.50	6.63	4.42	5.21	Silindirik,biraz kalın
LC3	Limon/dal	17.41	16.43	17.42	5.45	3.41	4.44	Silindirik,hafif ince
LC1	Limon/yaprak	18.56	16.18	17.27	5.66	3.34	4.31	Silindirik,hafif ince
MC1	Mandarin/yaprak	16.55	14.80	15.61	6.63	4.49	5.18	Silindirik,biraz kalın
MC2	Mandarin/yaprak	17.55	16.43	17.42	5.97	3.77	4.87	Silindirik,hafif ince
LC1	Limon/yaprak	18.24	16.20	17.00	5.47	3.33	4.40	Silindirik,hafif ince
LC2	Limon/yaprak	16.45	14.80	15.50	6.81	4.42	5.20	Silindirik,biraz kalın
LC3	Limon/yaprak	17.41	16.43	17.42	5.45	3.12	4.41	Silindirik,hafif ince
MC1	Mandarin/yaprak	18.56	16.49	17.10	5.66	3.32	4.65	Silindirik,hafif ince
MC2	Mandarin/yaprak	16.31	14.10	15.50	6.63	4.56	5.19	Silindirik,biraz kalın
MC1	Mandarin/yaprak	17.09	16.43	17.42	5.45	3.44	4.44	Silindirik,hafif ince
MC2	Mandarin/yaprak	18.67	16.49	17.99	5.77	3.32	4.65	Silindirik,hafif ince