

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Selda KOZAK ÖZDEMİR

**LİMON AĞAÇLARINDA UÇKURUTAN HASTALIĞI'NA
(*Phoma tracheiphila* KANC. & GHİK.) KARŞI MİKORİZAL
FUNGUSLAR VE DAYANIKLILIK TEŞVİK EDİCİLERİN
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

LİMON AĞAÇLARINDA UÇKURUTAN HASTALIĞI'NA (*Phoma tracheiphila* KANC. & GHİK.) KARŞI MİKORİZAL FUNGUSLAR VE DAYANIKLILIK TEŞVİK EDİCİLERİN ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Selda KOZAK ÖZDEMİR

DOKTORA TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Yeşim AYSAN
ÜYE

.....
Prof. Dr. Haşim KELEBEK
ÜYE

.....
Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA
ÜYE

.....
Doç. Dr. Davut SONER AKGÜL
ÜYE

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

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2016-5531

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

LİMON AĞAÇLARINDA UÇKURUTAN HASTALIĞI'NA (*Phoma tracheiphila* KANC. & GHİK.) KARŞI MİKORİZAL FUNGUSLAR VE DAYANIKLILIK TEŞVİK EDİCİLERİN ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Selda KOZAK ÖZDEMİR

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ
Yıl: 2019, Sayfa: 87
Jüri : Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ
: Prof. Dr. Yeşim AYSAN
: Prof. Dr. Haşim KELEBEK
: Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA
: Doç. Dr. Davut SONER AKGÜL

Bu çalışmada, limon ağaçlarında *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu Uçkurutan hastalığına karşı, Salisilik asit (SA), DL-β-amino-n-bütirik asit (BABA), Acibenzolar -S- methyl (ASM) ve Fosetyl-Al dayanıklılık teşvik edici kimyasalları ve *Glomus caledonium*, *Glomus clarium*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices* ve *Glomus mosseae* mikorizal funguslarının hastalık oluşumu ve bitkideki fenolik bileşikler üzerine etkinleri değerlendirilmiştir.

Farklı limon çeşitlerinin *Phoma tracheiphila*'ya duyarlılığının belirlendiği çalışmada, Kütdiken duyarlı; Enterdonat ve Mayer çeşitleri ise dayanıklı olarak belirlenmiştir.

Dayanıklılık teşvik edici kimyasallardan Fosetyl-Al, *in vitro* koşullarda patojenin miseliyal gelişimini 600 ppm dozda tamamen engellemiştir. *In vivo*'da ise hastalık gelişimine % 40 oranında etki ederek diğer kimyasallara göre en etkili kimyasal olmuştur. Bu kimyasalın sadece hesperidin miktarı üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Bunun yanında, ASM, patojen varlığında çalışmada değerlendirilen tüm fenolikler üzerinde en etkili kimyasal olarak bulunmuştur.

Glomus fasciculatum uygulaması, limon fidanları üzerinde hastalık oluşumu üzerine % 60 oranında etki etmiştir. Ayrıca bu fungus, patojen varlığında, incelemesi yapılan tüm fenolik bileşiklerin miktarında en yüksek artışa neden olmuştur. Bu nedenlerle *Phoma tracheiphila* ve fenolikler üzerinde en etkili mikorizal fungus olarak değerlendirilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu Uçkurutan hastalığının önlenmesine yönelik ümitvar sonuçlar elde edilmiştir. Bu konuda yapılacak olan yeni çalışmalarda, mikorizal fungus ve dayanıklılık teşvik edici kimyasal interaksyonlarının da incelenmesi bu hastalık ile mücadelede yeni bir yaklaşım sunabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Phoma tracheiphila*, Fenolik Bileşikler, *Glomus fasciculatum*, Fosetyl-Al, ASM

ABSTRACT

PhD THESIS

DETERMINATION OF EFFICACY OF MYCORRHIZAL FUNGI AND RESISTANCE INDUCERS AGAINST MALSECCO DISEASE (*Phoma tracheiphila* KANC. & GHİK.) IN LEMON TREES

Selda KOZAK ÖZDEMİR

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

Danışman : Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ
Yıl: 2019, Sayfa: 87
Jüri : Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ
: Prof. Dr. Yeşim AYSAN
: Prof. Dr. Haşim KELEBEK
: Assoc. Prof. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA
: Assoc. Prof. Dr. Davut SONER AKGÜL

In this study, against Mal secco disease caused by *Phoma tracheiphila* on lemon trees, Salicylic Acid (SA), DL-β-amino-n-butyric acid (BABA), Acibenzolar -S-methyl (ASM) and Fosetyl-Al resistance inducing chemicals and mycorrhizal fungi of *Glomus caledonium*, *Glomus clarium*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae*, their activity on disease formation and plant phenolic compounds was evaluated.

In the study that determined the susceptibility of different lemon varieties to *Phoma tracheiphila*, Kütdiken variety is were determined as susceptible; Enterdonate and Mayer varieties were determined as resistant.

Fosetyl-Al, one of the resistance inducing chemicals, completely inhibited the mycelial growth of the pathogen *in vitro* at a dose of 600 ppm. Also *in vivo*, it has been the most effective chemical compared to other chemicals, affecting 40% of disease development. This chemical was found to be effective only on the amount of hesperidin. However, ASM was found as the most effective chemical for all phenolics evaluated in the study in the presence of pathogen.

Glomus fasciculatum application, had a 60% effect on the disease formation on lemon seedlings. Also, in the presence of pathogen, this mycorrhizal fungus caused the highest increase in the amount of all phenolic compounds examined. For these reasons, it was evaluated as the most effective mycorrhizal fungi on *Phoma tracheiphila* and phenolics.

In this study, promising results have been obtained for the prevention of Mal secco disease caused by *Phoma tracheiphila*. In the new studies to be conducted on this object, examination of interactions between mycorrhizal fungus and resistance inducing chemicals, can serve a new approach to combating this disease.

Keywords: *Phoma tracheiphila*, Phenolic Compounds, *Glomus fasciculatum*, Fosetyl-Al, ASM

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Phoma tracheiphila (Kanc. & Ghik.)'nın neden olduğu Uçkurutan (Mal secco), Akdeniz bölgesinde limon yetiştiriciliği yapılan alanlarda limon ağaçlarının en önemli hastalığıdır (Anonymous, 2007). Bu patojenin ülkemizde de limonlarda ağaç ve verim kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Akteke, 1979; Dinç ve ark., 1980; Erkıılıç ve Çınar, 1989).

Patojen ana konukçusu olduğu limon ağaçlarında öncelikle sürgün ve yapraklarda kloroz şeklinde simptomlar oluşturmakta, takiben yapraklarda dökölme, sürgün ve dallarda kuruma ve geriye doğru ölüm gerçekleştirmektedir.

Phoma tracheiphila'nın mücadelesi ile ilgili bugüne kadar yapılan dayanıklı çeşit geliştirme, kimyasal mücadelenin araştırılması gibi çalışmalardan başarı elde edilememiştir. Günümüzde bu çalışmalara alternatif olarak değerlendirilebilecek mücadele yöntemleri arayışı sürmektedir. Bitkilerde fenolik bileşikler üzerine etki ederek dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirebilen bazı kimyasallar ve mikorizaların etkinliklerinin araştırılması bunlardan biridir.

Bu çalışmada, bazı dayanıklılık teşvik edici kimyasallarla mikorizaların Uçkurutan Hastalığının gelişimine ve limon bitkisindeki fenolik madde miktarlarına olan etkilerinin belirlenmesi, ayrıca patojen ve fenoliklerin miktarları arasındaki ilişkinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Adana ve Mersin illerinde yapılan survey çalışmalarında, limon bahçelerinde Uçkurutan hastalığı simptomlarını taşıyan ağaçlar gözlemlenmiş ve bu ağaçlardan alınan bitki örneklerinde izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, 15 farklı *Phoma tracheiphila* izolatı elde edilmiştir.

Elde edilen izolatlara, virülensliklerinin ve bitkide oluşturdıkları hastalık şiddetlerinin değerlendirilmesi amacıyla patojenite testleri yapılmıştır. Bu izolatlar, Kütdiken limon fidanlarında % 6,7 ve 86,7 arasında değişen oranlarda hastalık şiddeti yaratmışlardır. Seymenli, Çeşmeli 2 ve Dedepınarı 2 izolatları bitkide yüksek oranda hastalık görüntüsü oluşturmuş, hatta bazı tekerrürlerde ölüme neden

olmuştur. Bu izolatların oluşturdıkları hastalık şiddetleri sırasıyla %86,7, %73,3 ve %66,7 olarak ölçülmüştür. Patojenite sonuçlarına göre, bitkide oldukça tahripkar olan Seymenli izolatının tez çalışmasının diğer aşamalarında kullanılması uygun bulunmuştur.

Phoma tracheiphila izolatları, petride gelişimi, piknidyum, fialid ve fialokonidi yapılarına göre tanılanmıştır (Anonymous, 2015). Klasik olarak yapılan bu tanı çalışmalarına ek olarak, *Phoma tracheiphila* izolatları ile PCR çalışmaları yürütülmüş ve çalışma sonucunda *Phoma tracheiphila*'ya spesifik tüm primer çiftlerinden beklenen PCR ürün bantları görüntülenmiştir. Böylece klasik mikolojik yöntemlere göre *Phoma tracheiphila* olarak belirlenen izolatların tanılanması, PCR çalışmasıyla da desteklenmiştir.

Phoma tracheiphila'nın Enterdonat, Kütdiken, Mayer ve Yediveren limon çeşitlerinde oluşturduğu hastalık şiddeti değerlerinin belirlendiği çalışmada, Kütdiken (%88), *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu uç kurutan hastalığına en duyarlı çeşit olarak tespit edilmiştir. Yediveren ve Enterdonat çeşitlerinde yarattığı hastalık şiddeti ise sırasıyla %24 ve %12 olarak değerlendirilmiştir. Fungusun inokule edildiği Mayer çeşidi limon fidanlarında ise hastalık gelişimi görülmemiştir.

Bu tez çalışmasında, bitkilerde dayanıklılık teşvik edici özelliği olduğu bilinen Acibenzolar S-Methyl (ASM), DL-β-amino-n-butyric asit (BABA), Fosetyl-Al ve Salisilik asit (SA) kimyasallarının PDA besi ortamında *Phoma tracheiphila*'nın miseliyal gelişimine olan etkileri belirlenmiştir. ASM uygulaması *Phoma tracheiphila*'nın miseliyal gelişimini %2 ve %21,6 arasında değişen oranlarda azaltıcı etkide bulunmuştur. BABA, *Phoma tracheiphila*'nın miseliyal gelişmesini engelleyememiş, aksine gelişmeyi teşvik etmiştir. Fosetyl-Al, çalışmada kullanılan dayanıklılık teşvik ediciler arasında en etkili kimyasal olarak bulunmuştur. Patojen üzerindeki engelleyici etkisi 100 ppm konsantrasyonda bile %70,3 olmuş, 600 ppm'den sonra patojenin gelişimini tamamen durdurmuştur. SA ise patojen üzerinde %6,1 ile %51,9 arasında değişen oranlarda etki göstermiştir.

Limon fidanlarında *Phoma tracheiphila*'nın hastalık oluşturmasına etkilerini değerlendirmek amacıyla ASM, BABA, Fosetyl-Al ve SA kimyasallarının kullanıldığı çalışmada, Fosetyl-Al (%36) ve ASM (%40) kimyasalları, patojen üzerinde yüksek etkinlik göstermiştir. SA ve BABA kimyasallarının uygulandığı bitkilerde ise patojenin hastalık şiddeti değerleri sırasıyla % 44 ve % 52 oranlarında llmştir.

Mikorizal fungus inokulumlarındaki sporların elde edildiği izolasyonlar sonucunda 10 g toprakta bulunan spor miktarları tür bazında belirlenmiştir. İnokulumunda en yüksek miktarda spor bulunduran mikorizal fungus *Glomus caledonium* (254spor/10 g toprak) olmuştur. *Glomus intraradices* inokulumunda ise spor miktarı bir hayli az olarak gözlenmiş ve 149 spor/10 g toprak sayılmıştır.

Mikorizal kolonizasyonun sağlandığı turunç ğr köklerinde izolasyonlar yapılmıştır. Buna göre köklerdeki mikorizal kolonizasyon tüm funguslarda %40'ın üzerinde gerçekleşmiştir. Köklerde en fazla kolonize olan mikorizal fungus, *Glomus caledonium* (%66) olurken, en az miktarda bulunan ise *Glomus mosseae* (% 42) olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında *Glomus fasciculatum* ve *Glomus clarium* da köklerde %57 oranında bulunmuştur.

Mikorizal fungusların *Phoma tracheiphila* zerine etkilerinin belirlendiği çalışmada, patojen üzerinde en fazla etkiyi, *Glomus fasciculatum* oluşturmuş ve bu mikorizanın uygulandığı bitkilerde hastalık şiddeti % 24 olarak belirlenmiştir. Bunu *Glomus caledonium* (%32,0) ve *Glomus intraradices* (36,0) takip etmiştir.

Mikorizal fungusların ve dayanıklılık teşvik edici kimyasalların bitkide bulunan hesperidin, limonin ve scoparone fenolik bileşiklerinin miktarına etkisini belirlemek amacıyla, bu uygulamalar patojen yokluğunda ve patojen varlığında olmak üzere iki farklı çalışmayla değerlendirilmiştir.

Dayanıklılık teşvik edici kimyasal uygulamaları yapılan tüm bitkilerde, hesperidin miktarı kontrolden yüksek ölçülmüş ve uygulamalar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur. Patojen yokluğunda kontrole göre hesperidin miktarını en fazla artıran Fosetyl-Al (225, 6 g/g) ve BABA (214,2 g/g)

olmuştur. Patojen varlığında yine Fosetyl-Al (282,6 µg/g) hesperidin üzerinde en etkili kimyasal olmuştur.

Bir diğer fenolik bileşik olan limonin üzerinde kontrole oranla kimyasal uygulamalarının artışa neden olduğu; fakat bu değişim oranının çok yüksek miktarlar olmadığı görülmüştür. Patojenin olmadığı durumda en yüksek artırıcı etkiyi Fosetyl- Al (21,4 µg/g) yaratmıştır. Patojen varlığında ise ASM (25,8 µg/g) uygulaması limonin miktarı üzerinde en etkili kimyasal olmuştur. Ayrıca, SA (24,3 µg/g) uygulamasının da bitkilerde limonin miktarında artışa neden olduğu görülmüştür.

Dayanıklılık teşvik edici kimyasalların patojen uygulanmadığı durumda scoparone miktarı üzerinde bir etkisi olmamıştır. Tüm uygulamalarda kontrole göre düşük miktarlar ölçülmüştür. Patojen varlığında ise ASM (3,22 µg/g) uygulaması tüm uygulamalara ve kontrole göre ciddi oranda yüksek etki göstermiştir.

Patojen yokluğunda, *Glomus fasciculatum* (343,6 µg/g) hesperidin miktarına en fazla etkiyi göstermiştir. Patojen varlığında, kontrol uygulamasında bile değişiklik olmamışken *Glomus fasciculatum* (455,9 µg/g) ve *Glomus caledonium* (450,6 µg/g) uygulanan bitkilerde en yüksek hesperidin miktarına ulaşılmıştır.

Patojen yokluğunda *Glomus mossea* (22,6 µg/g) ve *Glomus clarium* (22,2 µg/g) uygulamaları limonin miktarını kontrole oranla en fazla artıran mikorizal funguslar olmuştur. Patojen varlığında *Glomus fasciculatum* (23,4 µg/g) yine ön plana çıkmış ve oldukça yüksek seviyede limonin oluşumu sağlamıştır.

Patojen yokluğunda *Glomus fasciculatum* (6,63 µg/g) uygulamasında yüksek seviyede scoparone ölçülürken; diğer uygulamalarda bu fenolik bileşik düşük seviyelerde bulunmuştur. Patojen-mikorizal fungus interaksiyonunda, *Glomus clarium* ve *Glomus fasciculatum* en etkili mikorizalar olmuş ve bu uygulamalarda scoparone miktarları sırasıyla 6,43 µg/g ve 6,35 µg/g ölçülmüştür.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca maddi ve manevi olarak beni her koşulda destekleyen, yapıcı fikirleriyle bana çok kıymetli katkılar sunan sayın hocam Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin maddi olarak destekleyicisi olan ÇÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, bölümün tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan ÇÜ Bitki Koruma Anabilim Dalı Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tez çalışmasında, limon fidanlarının yetiştirilmesi konusunda yardımlarını esirgemeyen ÇÜ Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne ve Naim SALHAOĞULLARI'na teşekkür ederim.

Bakteriyoloji laboratuvarının imkanlarını bana sunan ve yapıcı ve yönlendirici katkılarıyla her zaman beni destekleyen sayın Prof. Dr. Yeşim AYSAN'a teşekkür ederim.

Mikorizal funguslarla ilgili olarak tüm yöntemleri öğrenmemi sağlayan ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen sayın Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA'ya teşekkür ederim.

Çalışmada kullandığım moleküler tanı yöntemlerini bana öğreten ve bu konuda her türlü yardımı benden esirgemeyen sayın Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR'a teşekkür ederim.

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Gıda Mühendisliği laboratuvarı bünyesinde bulunan HPLC cihazını kullanmamı sağlayan ve bizzat çalışmalarını yürüten sayın Prof. Dr. Haşim KELEBEK'e teşekkür ederim.

Tüm tez çalışmam boyunca, yanımda olan sevgili arkadaşlarım, Ziraat Yük. Müh. Gönül İNAN TOPAL, Ziraat Yük. Müh. Sema ŞAHBAZ, Ziraat Müh. Aysel Zübeyde ERDEVİL ve Ziraat Müh. Sıddıka UYSAL'a ve mikoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her koşulda destekçim olan kıymetli anne-babam Ümmügül-Cevdet KOZAK ve sevgili ablam Ceyda ÇAKIR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi olarak her zaman yardımcım olan sevgili kayınpederim ve kayınvalidem Nihat-Sultan ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Sevgi ve sabırları için sevgili eşim Özgür Mehmet ÖZDEMİR'e ve canım kızım Polen ÖZDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. <i>Phoma tracheiphila</i> İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	7
2.2. Mikorizal Funguslar İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	11
2.3. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasallar İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	12
2.4. Fenolik Bileşikler İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinden <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın İzolasyonu	23
3.2.2. <i>Phoma tracheiphila</i> İzolatlarının Klasik ve Moleküler Tanısı.....	24
3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu	24
3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları.....	25
3.2.3. Patojenite Testleri.....	26
3.2.4. Limon Çeşitlerinin <i>Phoma tracheiphila</i> 'ya Duyarlılığının Belirlenmesi	27
3.2.5. Laboratuar Çalışmaları.....	27
3.2.6. Sera Denemeleri İçin Yapılan Ön Hazırlıklar	28

3.2.6.1. Mikorizal Fungus İnokulumunun Üretilmesi	28
3.2.6.2. Mikorizal Fungus Türlerinin İnokulumundaki Spor Yoğunluklarının Belirlenmesi	29
3.2.6.3. Limon Fidanlarının Yetiştirilmesi	30
3.2.7. Sera Denemeleri	31
3.2.7.1. Turunç Çöğürlerinde Mikorizal Fungusların Kolonizasyonunun Belirlenmesi	31
3.2.7.2 Mikorizal Fungusların <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	31
3.2.7.3. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	33
3.2.8. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasallar ve Mikorizal Fungusların Fenolik Bileşikler Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	39
4.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinden <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın İzolasyonu ve Patojenitesi.....	39
4.2. <i>Phoma tracheiphila</i> İzolatlarının Klasik ve Moleküler Tanısı	42
4.3. Limon Çeşitlerinin <i>Phoma tracheiphila</i> 'ya Duyarlılığının Belirlenmesi	45
4.4. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların <i>in vitro</i> ' da <i>Phoma tracheiphila</i> Üzerine Etkileri	47
4.4.1 Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişmesi Üzerine Etkileri	47
4.4.2. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Limon Fidanlarında <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkileri	53
4.5. Mikorizal Fungusların <i>Phoma tracheiphila</i> Üzerine Etkileri	56
4.5.1. Mikorizal Fungus Üretimi ve Turunç Çöğürlerindeki Kolonizasyonu	56

4.5.2. Mikorizal Fungusların <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkileri.....	59
4.6. Limon Fidanlarında Fenolik Bileşiklerin Değişimlerinin Belirlenmesi.....	62
4.6.1. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Fenolik Bileşikler Üzerine Etkileri	62
4.6.2. Mikorizal Fungusların Fenolik Bileşikler Üzerine Etkileri.....	66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
5.1. Sonuçlar	73
5.2. Öneriler	76
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	87



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. PCR Çalışmasında Kullanılan Primer Bilgileri	24
Çizelge 4.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinden Elde Edilen <i>Phoma tracheiphila</i> İzolatları	41
Çizelge 4.2. <i>Phoma tracheiphila</i> İzolatlarının Bitkide Oluşturduğu Hastalık Şiddeti Değerleri.....	41
Çizelge 4.3. Limon Çeşitlerinin <i>Phoma tracheiphila</i> 'ya Duyarlılıkları.....	46
Çizelge 4.4. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Farklı Konsantrasyonlarının <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimine Etkisi.....	48
Çizelge 4.5. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkisi.....	54
Çizelge 4.6. Mikorizal Fungus Stok Kültüründe Bulunan Spor Miktarı (10 g Toprak)	57
Çizelge 4.7. Mikorizal Fungus Türlerinin Turunç Çöğürlerinin Köklerinde Oluşturduğu Kolonizasyon Oranları	57
Çizelge 4.8. Mikorizal Fungusların <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkisi.....	59
Çizelge 4.9. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Hesperidin Miktarı Üzerine Etkisi	62
Çizelge 4.10. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Limonin Miktarı Üzerine Etkisi	64
Çizelge 4.11. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Scoparone Miktarı Üzerine Etkisi	65
Çizelge 4.12. Mikorizal Fungusların Hesperidin Miktarı Üzerine Etkisi	67
Çizelge 4.13. Mikorizal Fungusların Limonin Miktarı Üzerine Etkisi	69
Çizelge 4.14. Mikorizal Fungusların Scoparone Miktarı Üzerine Etkisi.....	70



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	<i>Phoma tracheiphila</i> İzolatlarının Limon Fidanlarına İnokulasyonu İşlemi (Cork Borer ile Limon Fidanlarında Yara Açılması (A), Miseliyal Diskin Yerleştirilmesi (B), Bölgenin Islak Pamuk İle Sarılması (C), İnokulasyon Alanının Alüminyum Folyo İle Kapatılması (D)).....	27
Şekil 3.2.	Mısır Bitkisinde Mikorizal Fungus İnokulumunun Üretilmesi	29
Şekil 3.3.	Mikoriza İnokulasyonu Yapılan Turunç Çöğürlerinin Yetiştirilmesi	30
Şekil 3.4.	Turunç Çöğürleri Köklerinde Mikorizal Fungus Kolonizasyonunun Belirlenmesi (Turunç Köklerinin Temizlenmesi (A), Köklerin Parçalara Ayrılması (B), Tüplere %10'luk KOH Çözeltisi Eklenmesi (C), Binoküler İncelemesi İçin Hazırlanan Kökler (D))	32
Şekil 3.5.	<i>Phoma tracheiphila</i> İnokulasyonu Yapılmış Limon Fidanları (A), Mikorizalı Limon Fidanları (B)	33
Şekil 3.6.	<i>Phoma tracheiphila</i> İnokulasyonu Yapılmış Limon Fidanları (A) ve Dayanıklılık Teşvik Edicilerin Uygulanması (B).....	34
Şekil 3.7.	Örneklerin Parçalanması (A), Toz Haline Getirilmesi (B),Solüsyonun Çalkalayıcıda Karıştırılması (C) ve Santrifüj İşleminden Sonra HPLC Okumasına Hazır Hale Getirilmesi (D).....	35
Şekil 3.8.	Fenolik Bileşiklerin HPLC Analizlerinde Kullanılan Elüsyon Sistemi (Taşıyıcı fazların zamana bağlı değişimi (1); B fazının süreye bağlı değişimi (2)).....	37
Şekil 3.9.	Çalışmaların Yürütüldüğü HPLC-ESI-DAD-MS/MS Cihazı	37
Şekil 4.1.	Uçkurutan Nedeniyle Ölen Bir Limon Ağacı (A) ve Patojenin İletim Demetlerindeki Renklenmesi (B)	40

Şekil 4.2.	<i>Phoma tracheiphila</i> İzolatlarının Bitkide Oluşturduğu Hastalık Şiddeti Değerleri (%).....	42
Şekil 4.3.	<i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Klasik Tanısında Değerlendirilen Koloni Görüntüsü (A) ve Fialokonidi Yapısı (B).....	43
Şekil 4.4.	ITS1-ITS4 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonucunda Elde Edilen 550 bp lik DNA Bantları (M: 100bp DNA marker)	43
Şekil 4.5.	P.trach ITSr - P.trach ITSf Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonucunda Elde Edilen 389 bp lik DNA Bantları (M: 100bp DNA marker).....	44
Şekil 4.6.	Pt-FOR, Pt-REV2 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonucunda Elde Edilen 378 bp lik DNA Bantları (M:100bp DNA marker).....	44
Şekil 4.7.	β .tubulin primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonucunda Elde Edilen 1070 bp lik DNA Bantları (M: 1 kb DNA marker).....	44
Şekil 4.8.	<i>Phoma tracheiphila</i> İzolatlarına Ait Filogenetik Ağaç	45
Şekil 4.9.	Limon Çeşitlerinin <i>Phoma tracheiphila</i> 'ya Duyarlılıkları	47
Şekil 4.10.	ASM'nin Farklı Dozlarının <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi	49
Şekil 4.11.	ASM'nin <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi.....	49
Şekil 4.12.	BABA'nın Farklı Dozlarının <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi	50
Şekil 4.13.	BABA'nın <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi.....	50
Şekil 4.14.	Fosetyl-Al'nin Farklı Dozlarının <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi	51
Şekil 4.15.	Fosetyl-Al'nin <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi	51

Şekil 4.16. SA'nın Farklı Dozlarının <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi	52
Şekil 4.17. SA'nın <i>Phoma tracheiphila</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi.....	52
Şekil 4.18. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların <i>Phoma tracheiphila</i> Üzerine Etkisi	54
Şekil 4.19. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasal Uygulaması Yapılan Bitkilerde <i>Phoma tracheiphila</i> İnfeksiyonunun Gelişimi	55
Şekil 4.20. Köklerde Mikorizal Kolonizasyon	58
Şekil 4.21. Mikorizal Fungusların <i>Phoma tracheiphila</i> Üzerine Etkisi	61
Şekil 4.22. Mikorizal Fungus Uygulaması Yapılan Bitkilerde <i>Phoma tracheiphila</i> İnfeksiyonunun Gelişimi.....	61
Şekil 4.23. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Hesperidin Miktarı Üzerine Etkisi	63
Şekil 4.24. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Limonin Miktarı Üzerine Etkisi	64
Şekil 4.25. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Scoparone Miktarı Üzerine Etkisi	65
Şekil 4.26. Mikorizal Fungusların Hesperidin Miktarı Üzerine Etkisi.....	68
Şekil 4.27. Mikorizal Fungusların Limonin Miktarı Üzerine Etkisi.....	69
Şekil 4.28. Mikorizal Fungusların Scoparone Miktarı Üzerine Etkisi	71



SİMGELER VE KISALTMALAR

ASM	: Acibenzolar-S-Methyl
BABA	: β - amino-N-butyric Asit
Fosetyl-Al	: Fosetyl Alüminyum
SA	: Salisilik Asit
PDA	: Patates Dekstroz Agar
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
FAO	: Food And Agriculture Organisation
%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
g	: Gram
l	: Litre
ppm	: Part Per Million
N	: Normal
KOH	: Potasyum Hidroksit



1. GİRİŞ

Limon (*Citrus limon* L.), dünyada ve ülkemizde geniş alanlarda üretimi yapılan, tadı, kokusu ve asidik özellikleri ile tercih edilen bir turunçgil türüdür. Arjantin, İspanya, İran, ABD, İtalya, Türkiye, Mısır, Yunanistan, Güney Afrika, Kıbrıs, Fas ve İsrail limon yetiştiriciliği ve ihracatında önemli payları olan ülkeler olarak sıralanmaktadır (FAO, 2012). Bunlardan Arjantin ve İtalya, limon suyu ihracatında başı çekerken diğer ülkeler de taze meyve ihracatında etkili olmaktadır.

Türkiye’de yetiştirilen limon miktarı (1.100.000 ton), toplam turunçgil üretiminin (4.902.052 ton) yaklaşık %20’sini oluşturmaktadır. Bu üretimin önemli bir kısmı ihraç edilmektedir (TÜİK, 2018). Ülkemizde limon üretiminin en fazla yapıldığı yerler Mersin ve Adana illeridir. Bu bölgede yoğun olarak, Kütdiken, Eureka, Enterdonat, Mayer, Lamas ve İtalyan memeli çeşitlerinin üretimi yapılmaktadır.

Phoma tracheiphila (Kanc. & Ghik.)’nın neden olduğu Uçkurutan Hastalığı, Akdeniz bölgesinde limon yetiştiriciliği yapılan alanlarda limon ağaçlarının en önemli hastalığıdır (Anonymous, 2007). Bu patojenin ülkemizde de benzer şekilde limonlarda ağaç ve verim kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Akteke, 1979; Dinç ve ark., 1980; Erkılıç ve Çınar, 1989). Patojen, *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, ve *Severina* cinslerine ait türlerde tespit edilmiş olmasına rağmen, en şiddetli zararının limon (*Citrus limon*), citron (*Citrus medica* L.), lime (*Citrus latifolia* Tan.), ve bergamot (*Citrus bergamia* Risso)’ta olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ticari olarak en çok yetiştiriciliği yapılan tür olan limon, patojenin ana konukçusu durumundadır.

İlk olarak 1889 yılında Yunanistan’ın Chios ve Poros Adası’nda tespit edilen bu hastalığın etmeni 1929 yılında Petri tarafından belirlenmiştir. Petri’nin *Deuterophoma tracheiphila* olarak isimlendirdiği bu patojen, daha sonra

Kantschaveli and Gikachvili tarafından *Phoma* cinsine ait olduğu tespit edilerek ismi değiştirilmiştir (Migheli ve ark. 2009).

Uluslararası literatürde Mal secco olarak bilinen bu hastalık, 14 ve 28 °C sıcaklıklarda gelişme gösterebilmektedir. Hastalığın belirtileri, sürgün ve yapraklarda kloroz şeklinde görülmeye başlamakta, takiben yapraklarda dökülme, sürgün ve dallarda kuruma ve geriye doğru ölüm şeklinde ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu hastalıktan etkilenen dal ve gövdeler kesildiğinde gözlenen turuncu-kırmızı renklenme de hastalığın tipik görüntüsünü oluşturmaktadır. Etmen, trakeomikoz bir patojen olması nedeniyle iletim demetlerinde ilerleyerek gelişmekte ve ağaç yaşına bağlı olarak birkaç ay ya da yıl içerisinde ağacı ölüme götürmektedir (Nigro ve Salerno, 2011).

Hastalıktan etkilenen kuru dallarda veya bitki artıkları üzerinde doku içerisine gömülü olarak bulunan şişe veya küre şeklindeki piknidiumlar ve bitki artıkları patojenin inokulum kaynaklarını oluşturmaktadır. Bu nedenle, patojen ana gövdede kolonize olmadığı sürece infekteli sürgünlerin dikkatlice budanması, bahçeden çıkarılarak yakılması bu hastalık için oldukça etkili bir mücadele yöntemi olmaktadır. Ancak patojen ana gövdede kolonize olduysa ağacın sökülüp yakılması gerekmektedir. Ayrıca budama işlemlerinin simptomların görüldüğü hava sıcaklığının 28°C'nin üzerine çıktığı ilkbahar ve yaz aylarında rüzgarsız ve yağmursuz dönemde yapılması hastalığın bulaşmasını önlemek için gerekli bir tedbirdir.

Phoma tracheiphila infeksiyonlarının yayılmasını önlemek amacıyla yağışlı sezon boyunca 2-4 haftada bir yapılacak bakırlı preparat uygulaması etkili olabilmektedir. Fakat bu dönemde kimyasal uygulaması yapmak da üreticiler açısından sıkıntı yaratmaktadır.

Uçkurutan sorunun bahçe tesis edilirken en başından dayanıklı çeşit seçerek engellenebileceği bilinmektedir. Bununla birlikte, dayanıklı olan bu çeşitlerin aynı zamanda verim özellikleri açısından da değerlendirilmesi gerekmektedir. Günümüz tarım stratejilerinde, birim alandan alınan verimin yüksek

olduğu çeşitler ön plana çıkmaktadır. Bölgemizde uçkurutan sorununun üst seviyelere çıkmasında en önemli etken olan *Phoma tracheiphila*'ya son derece hassas Eureka çeşidi, yüksek verim ve kalite özelliklerine sahip bir limondur. Öte yandan Monachello ve Enterdonat çeşitlerinin *Phoma tracheiphila*'ya dayanıklı olduğu bilinmektedir. Bu çeşitlerin de veriminin düşük olması, çiçeklenme sayısının az oluşu ve meyve suyunun düşük asit içermesi, üreticiler açısından değerlendirildiğinde olumsuz bir izlenim yaratmaktadır (Nigro ve Salerno, 2011).

Uçkurutan hastalığı ile mücadelede yapılan dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında ise bugüne kadar başarı elde edilememiştir. Yunanistan'da "Ermioni" adı verilen hibrit bir çeşit üretilmiş; fakat meyve verimi düşük olduğu için yetiştiricilikte tercih edilmemiştir (Thanassouloupoulos, 1991). Ülkemizde, Tuzcu ve ark. (1992) tarafından yapılan çalışmalarda farklı yerli çeşitler melezlenerek elde edilen klonlarda ümitvar sonuçlar elde edilmiş; ancak pratiğe aktarılamamıştır. Benzer şekilde Baş ve Koç (2006) tarafından "Kütdiken limon 20b" olarak isimlendirilen klonun tarımda kullanımı sağlanamamıştır.

Günümüzde fitopatoloji alanında yapılan çalışmalarda, bitkilerde var olan dayanıklılık mekanizmasının harekete geçirilebileceği bilinmektedir. Bitkiler, virulent bir etmen ya da patojen olmayan bir mikroorganizma karşısında (SAR) ve çeşitli kimyasallara maruz kaldığında (ISR) geniş spektrumlu bir direnç geliştirmektedirler (Justyna ve Ewa, 2013). Bu konuda çok sayıda çalışma yapılmış ve *in vivo*'da bitkilere verilen çeşitli kimyasalların ve bitki köklerine kolonizasyonu sağlanan mikorizal fungusların, bitkilerde patojene karşı dayanıklılığı teşvik ettiği belirlenmiştir (Afek ve Sztejnberg, 1989; Fourie, 2004).

Bitkilerle simbiyotik olarak yaşayan mikorizal fungusların bitkinin besin elementleri ve su gereksinimini karşılayarak verim özellikleri üzerinde pozitif etkiler yarattığı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Bitki koruma noktasında baktığımızda ise bu fungusların bazı patojenlere karşı bitkiyi dayanıklı hale getirdiğini bildirilen çalışmalar mevcuttur. Bu mikroorganizmaların, kök bölgesinde bazı fenolik bileşikler ve fitoaleksinler teşvik ederek üretimlerini

artırdığı tespit edilmiştir (Davis ve Menge, 1980; Karajeh ve Al-Raddad, 1999; Declerck ve ark., 2002).

Bitki patojenlerine karşı direkt olarak etki sağlamayan, uygulandığı bitkilerde dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirerek dolaylı yoldan hastalık gelişimini azaltan veya durduran kimyasallar bulunmaktadır. Bu kimyasallar, dayanıklılık teşvik edici olarak isimlendirilmektedir. Bu kimyasallardan olan Salisilik asit (SA), patojenlere karşı bitki savunmasının önemli bir aracıdır ve bitkilerde dayanıklılığı teşvik edici olarak bulunan ilk kimyasaldır. SA'nın patojenik organizmaların yokluğunda dahi patojenlere karşı direnç sağladığı ve bitkilerde bazı PR proteinlerinin üretilmesini uyardıkları tespit edilmiştir (Popova ve ark., 1997). Protein özelliği göstermeyen bir aminoasit olan β -amino-N-butyric asit (BABA)'ın etkisinin antifungal aktivite ile değil, patojenin gelişmesini önleme yoluyla olduğu belirtilmiştir; fungus, bakteri, virüs, nematod ve böcekler de dahil olmak üzere birçok mikroorganizmaya karşı bitkilerde sistemik direnci teşvik ettiği bildirilmiştir (Justyna ve Ewa, 2013). Benzer şekilde Acibenzolar-S-Methyl (ASM) ve Fosetyl-Al kimyasalları ile yapılan birçok araştırmada da bitkilerde patojen infeksiyonlarına karşı yüksek oranda engelleyici etki yarattığı bildirilmiştir (Afek ve Sztejnberg, 1989; Agostini ve ark., 2003; Hassan ve Buchenauer, 2007; Erkilic ve ark., 2018).

Dayanıklılık teşvik edici kimyasallar ve mikorizal fungusların etkileşim içinde oldukları fenolik bileşikler, hemen hemen tüm bitki türlerinde bulunmakla birlikte, fitoaleksinler daha çok dikotiledon bitkilerde rapor edilmiştir. Günümüzde 350'den fazla olan fitoaleksinlerin çoğu fenol yapısında olmasına rağmen tamamen farklı özelliklere sahip grupları da içermektedirler (Kuc, 1995).

Turunçgillerde, fenolik yapıdaki kumarin, flavanoid (flavonlar, flavanonlar ve flavanoller) ve antosiyanin gruplarına ait çok sayıda fenolik madde ve fitoaleksinin varlığı tespit edilmiştir (Berhow ve ark., 1998). Flavonoidler, bitkide engelleyici ve fitoaleksin olarak görev yaparken, kumarinler bitki dokularında patojen infeksiyonu sonucu üretilen fitoaleksinleri içermektedir. Hesperidin,

naringin, diosmin, sinensetin, tangeretin, nobiletin, scoparone, scopoletin ve limonin bunlardan bazılarıdır.

Bu tez çalışmasında, ülkemiz turunçgil yetiştiriciliğinin önemli merkezlerinden olan bölgemizde uçkurutan sorununun ele alınması ve bazı dayanıklılık teşvik edici kimyasallarla mikorizaların bu hastalığın gelişimine ve limon bitkisindeki fenolik maddelere olan etkilerinin belirlenmesi, ayrıca patojen ve fenolikler arasındaki ilişkinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.





2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Phoma tracheiphila* İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Limon ağaçlarında Uçkurutan hastalığı etmeni *Phoma tracheiphila*, Yunanistan'da 1889 yılında ilk tespit edildiği zamandan bu yana araştırmacılar için güncelliğini korumaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan araştırmalar, patojene karşı dirençli anaç geliştirilmesi, kimyasal mücadele olanakları ve bitkide dayanıklılığın teşviki gibi noktalarda yoğunlaşmıştır.

Dinç ve ark. (1980), 1973-1979 yılları arasında yaptıkları çalışmada turunçgillerde Uçkurutan hastalığı (*Deuterophoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik.)'na karşı etkili bir mücadele yöntemi tespit etmişlerdir. Saptanan bu mücadele yöntemine göre budama işlemlerinin fungusun durgun bir dönemde olduğu Ağustos ayında yapılması ve ayrıca ağaçların Ekim, Aralık ve Mart ayları başlangıçlarında olmak üzere yeşil aksam ilaçlaması olarak 3 defa ilaçlanması önerilmiştir. İlaçlamalarda Benomyl terkipli ilaçların %0,06 dozunda kullanılması, ağaçlarda kabuklu bit bulunması durumunda Benomylli eriyik içerisine %1,5 dozunda beyaz yağ da karıştırılması ve Benomyl bulunmadığı zamanlarda hazır bakırlı preparatların % 0,4'lük dozda kullanılabileceği belirtilmiştir.

Erkiliç ve Çınar (1989), limon fillosferinden izole edilen antagonist fungusların *Phoma tracheiphila* üzerindeki etkilerini belirlemiştir. Bu alternatif uygulamalar, patojenin infeksiyonlarını engelleyememiş; fakat hastalığa yakalanma oranlarını azaltmıştır. Patojen inokulasyonundan 2 gün önce antagonist *Aspergillus sclerotiorum* ve *Cryptococcus* sp. spor süspansiyonları yapraklara uygulandığında hastalık şiddeti %50 ve %64,3; sürgünlerin hastalığa yakalanma oranı ise %55,6 ve 66,7 oranlarında azalmıştır. Antagonist uygulaması, patojen ile birlikte veya patojenden sonra yapıldığında ise başarılı sonuç elde edilememiştir.

Thanassouloupoulos (1991) Yunanistan'da bir bahçede bulunan, Uçkurutan'a (*Phoma tracheiphila*) dayanıklı bir limon ağacını değerlendirmiştir. Bu amaçla, Turunç ve Volkameriana anaçlarında, yapay ve doğal inokulasyon

şartlarında tomurcuk aşılama yapılmıştır. Orjinal ağaçta hastalık belirtileri görülmezken, tomurcuk progenilerinde yaklaşık 2500 bahçede yetişen ağaçların yalnızca 16'sında *Phoma tracheiphila* tarafından hastalık oluşturulmuştur. Yapay olarak aşılanmış 45 ağacın, sadece ikisi patojen tarafından infekte edilmiştir. Elektroforez kullanılarak yaprak proteinlerinin analizi ve gen / enzim 6Phosphogluconate dehidrogenaz (6-PGD) sisteminin genetik kontrolü, dirençli çeşitler olan Yunan çeşitleri Maglini, Adamopoulou, Karystini ve İtalyan Monachello ve Interdonato ile yapılmıştır. Protein analizi, dirençli seleksiyon ile Maglini çeşidi arasındaki yakın ilişkiyi göstermiş; fakat dirençli seleksiyon ve Maglini arasında bazı fenotipik farklılıklar da gözlenmiştir. Fenotipik farklılıklar, Uçkurutana karşı direnç, Maglini hariç diğer tüm çeşitlerdeki proteinlerdeki farklılıklar ve bunların 6-PGD'lik farklı elektroforetik desenleri, diğer çeşitlerle karşılaştırıldığında, "Ermioni" isminin verildiği yeni bir çeşit önerilmiştir.

Reforgiato Recupero ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada, erkek ebeveyn olarak *Poncirus trifoliata*, *C. aurantium* ve *C. volkameriana* ile dişi ebeveyn *Citrus latipens* ile elde edilen üç progende *Phoma tracheiphila*'ya direnç özelliğinin ayırma çalışmalarını incelemeyi amaçlamışlardır. Direnç tespiti, 10 yıl boyunca gözlenen doğal enfeksiyonlara dayandırılmıştır. Sonuçlar, duyarlılığa karşı baskın direnci belirleyen üç alternatif genin (A, B ve C) hipotezlenmesine izin vermiştir. Ek olarak, baskın koşullarda, baskın B alelinin hareketini geçersiz kılarak duyarlılığı belirleyebilen dördüncü bir genin varlığını bildirmişlerdir. Dirençli Citrus genotiplerinde, patojene karşı verilen reaksiyon, büyük miktarlarda mevcut olduğu bildirilen bir PR (patogeneze bağlı) protein olan chitinaz üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmada, direnç özelliğinin en az iki dominant gen tarafından kontrol edildiği hipotezi doğrulanmıştır. Bu hipotezin, diğer genetik mekanizmaların olasılığının göz ardı edilemeyeceği, diğer Citrus türlerine uygulanabilir olup olmadığını tespit etmek için daha fazla kanıt gerekli olduğu bildirilmiştir.

Tusa ve Del Bosco (2000) simetrik ve asimetrik protoplast füzyonuyla elde edilen limon melezlerinin, *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu uçkurutan enfeksiyonuna karşı reaksiyonunu test etmişlerdir. Genel olarak, somatik hibrit ve cybridler, kontrol olarak kullanılan dirençli "Monachello" limonuna ve duyarlı "Femminello" limonuna kıyasla, hastalık simptomlarında hafif farklılıklar olan orta derecede bir direnç göstermiştir. Asimetrik limon türlerinde oluşan düşük ölüm oranı nedeniyle, hastalığa karşı spesifik direnç mekanizmalarının bu genotiplerde aktive edilebileceğini bildirmişlerdir.

Ezra ve ark. (2007) *Phoma tracheiphila*'nın meyve de dahil olmak üzere bitki dokularından tanımlanması için patojen popülasyonundaki genetik değişkenliği dikkate alan PCR tabanlı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, İsrail'in farklı bölgelerindeki farklı turuncgil türlerinden alınan izolatların arasında önemli bir farklılık bulamamışlardır.

Gentile ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, *Trichoderma harzianum*'dan alınan chit42 geni, *Phoma tracheiphila*'ya dirençli transgenik bitki üretmek için "Femminello siracusano" limonuna *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla eklenmiştir. Üç polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile pozitif klonları elde edilmiştir. Southern blot, transgenin limon genomuna entegrasyonunu doğrulamış ve bir veya iki kopyanın yerleştirildiğini göstermiştir. Ters transkriptaz - PCR, Northern blot ve Western analizi yapılmış ve sonuçlar eklenen genin ekspresyonunu doğrulamıştır. Transgenik klonlar, hastalık direnci için *in vitro* ve *in vivo* test edilmiştir. Konidi çimlenmesi ve *Phoma tracheiphila*'nın gelişimi, transgenik yaprak proteinleri tarafından *in vitro*'da kuvvetli bir şekilde inhibe edilirken, kontrollerde hiçbir etki gözlenmemiştir. Genel olarak, sonuçlar, antifungal endochitinaz geni ile dönüşümün, turuncgillerde hastalık kontrolü için bir strateji teşkil edebileceğini göstermiştir.

Baş ve Koç (2006) tarafından yapılan çalışmada, *Phoma tracheiphila*'ya son derece hassas olan embriyogenik Kütdiken limon kallusu, *Phoma tracheiphila*'nın seyreltilmiş toksinine karşı *in vitro*'da denenmiştir. Toksin ile

desteklenmiş besi yerinde altı ardışık alt kültürden sonra yirmi dört kallus kütlesi elde edilmiş ve daha sonra seçilen kallus kümelerine, *Phoma tracheiphila*, *Penicillium italicum*, *P. digitatum*, *Geotrichum candidum* ile ikili kültür çalışması yapılmıştır. Bir kararlı dirençli kallus kütlesi seçilmiş ve Kütdiken limonu 20b olarak etiketlenmiştir. *Phoma tracheiphila*'nın gelişimi, duyarlı Kütdiken limonu ve orta derecede dirençli Zagara Bianca'ya kıyasla altkültür çalışmasında kuvvetli bir şekilde inhibe edilmiştir. Bu sonuçlara göre, fungus gelişimine engelleyici olarak herhangi bir PR proteini yerine, savunma reaksiyonunun alternatif bir nedeninin, fungus için toksik olan sekonder metabolitlerin olabileceği bildirilmiştir.

Ziadi ve arkadaşları (2012) Tunus'ta izole edilen dört *Phoma tracheiphila* izolatının, İtalyan limon anaçlarında infeksiyonları incelenmiştir. Yapay inokulasyondan 10, 20 ve 30 gün sonra hastalık belirtilerinin görünümünü gözlemleyerek, pozitif aşılama oranını sayarak ve yaprak ampirik skalasına göre ortalama hastalık yoğunluğunu belirleyerek üç değerlendirme yapılmıştır. Bütün bu parametreler, dört limon anacının Uçkurutan'a karşı duyarlılığına göre sınıflandırılmasına olanak vermenin yanı sıra, anaçların hastalığa karşı davranışları hakkında da bilgi vermiştir. Bu nedenle, yüksek hassas davranış sergileyen Volkameriana, duyarlı olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, Turunç, patojenin infeksiyonuna karşı orta düzeyde bir duyarlılık göstermiş ve toleranslı anaç olarak sınıflandırılmıştır. Flying Dragon ve Troyer Citrange ise *Phoma tracheiphila*'nın yaprak infeksiyonuna karşı büyük bir direnç göstermiş ve dayanıklı anaçlar olarak kabul edilmiştir.

Avcı (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, yeni kurulan turunçgil bahçelerinde sorun olan fungal patojenler belirlenmiş ve turunçgil çeşitlerinin duyarlılıkları araştırılmıştır. Bu amaç ile Çukurova bölgesine yakın zamanda girmiş ve yaygın tesis olanağı bulabilecek olan 24 adet turunçgil çeşidinin turunçgil bahçelerinde üretimi kısıtlayan *Alternaria alternata* f.sp. *citri*, *Phytophthora citrophthora* ve *Phoma tracheiphila* patojenleri açısından değerlendirilmesi yapılmıştır. Buna göre, *in vivo* testlerde *Phoma tracheiphila*'ya en duyarlı tür

limon olmuş, bunu altıntop izlemiştir. Mandarin ve portakal çeşitlerinde ise hastalık oluşumu az da olsa gözlenmiştir.

2.2. Mikorizal Funguslar İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Phoma tracheiphila ve mikorizal fungusların etkileşimi ile ilgili henüz bir çalışma yapılmamıştır. Bununla birlikte, turuncgil çeşitlerinin kökleriyle mikorizal birliktelik içinde yaşayan fungusların varlığı bilinmektedir ve bu konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır.

Davis ve Menge (1980), fosfor gübrelemesi yapılmış toprakta, *Phytophthora parasitica* ve mikorizal fungus *Glomus fasciculatum* ile infekte edilmiş olan portakal fidanlarının (*Citrus sinensis*), köklerinin sadece *Phytophthora parasitica* ile infektelenmiş köklerden daha ağır ve daha sağlıklı olduğunu belirtmişlerdir. *Glomus fasciculatum* ile enfekte olmuş turuncgillerde *Phytophthora parasitica* kök çürüklüğüne karşı toleransın, mikorizal köklerin mikorizal olmayan köklerden daha fazla fosfor ve muhtemelen diğer mineralleri alabilme kabiliyetinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Karajeh ve Al-Raddad (1999)'ın yaptıkları çalışmada, *Glomus mosseae* ve *Verticillium dahliae* ile inokule edilen zeytin fidanlarında sürgün ve köklerin yaş ve kuru ağırlıkları, yalnızca *Verticillium dahliae* ile inokule edilen ya da inokulasyon yapılmayan kontrole göre önemli miktarda artmıştır. Mikorizalı bitkilerde bitki ağırlığı, yaprak sayısı ve hastalık şiddetindeki azalma oranlarındaki artış, mikorizalı olmayanlara göre daha fazla olmuştur.

Declerck ve ark. (2002), dört arbusküler mikorhizal (AM) fungus (*Glomus* sp., *G. proliferum*, *G. intraradices* ve *G. versiforme*) ile *Cylindrocladium spathiphylli* ve muzun (*Musa acuminata*, AAA, cv. Grande Naine) büyüme ve fosfor beslenmesi üzerindeki etkilerini sera koşullarında incelemişlerdir. Genel olarak, *C. spathiphylli*'nin neden olduğu kök infeksiyonu, muz bitkilerinin büyümesini geriletmiş; ancak AM fungusları ile inokule edilen bitkilerde bu zararlı etki önemli ölçüde azalmıştır. AM fungusları ile aşılanan bitkilerde düşük hastalık

şiddeti, büyümenin uyarılması ve sürgün fosfor içeriği artışı gözlenmiştir. *C. spathiphylli*'nin neden olduğu kök zararı, AM funguslarının varlığında azalmış; fakat mikorizal bitkilerin *C. spathiphylli* ile inokule edilmesi, AM fungus kök kolonizasyonunun yoğunluğunu da azaltarak, iki organizma arasında net bir etkileşim olduğunu göstermiştir.

Watanarajanaporn ve ark. (2011), turuncgil köklerinden 13 farklı mikorizal tür elde etmiş ve bunları 3 farklı turuncgil türünde (Shogun: *Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun; Tangerine: *Citrus reticulata*; C-35 Citrange: *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) test etmişlerdir. Bu mikorizal funguslardan turuncgillerde en iyi kolonizasyon oranının *Glomus etunicatum* ve *Acaulospora tuberculata* mikorizal fungusları tarafından oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu mikorizal fungusların *Phytophthora nicotianae* ile ilişkisinin de araştırıldığı çalışmada, hem *P. nicotianae* hem de farklı mikorizal funguslar tarafından inokule edilen Shogun / C-35 citrange anaç kombinasyonları düşük seviyede kök çürüklüğü belirtileri göstermiştir. Bununla birlikte yalnızca *P. nicotianae* ile inokule edilen Shogun sürgünleri üzerinde şiddetli geriye doğru ölüm belirtileri görülürken, mikorizal funguslar ve *P. nicotianae* ile inokule edilen sürgünlerde geriye doğru ölüm belirtileri daha az olmuştur. İlk olarak sürgünlerde düşük oranlarda geriye doğru ölüm belirtileri görülmüş, sonrasında bunlar onarılarak sağlıklı ve genç sürgünler gelişmiştir. Her iki mikorizal fungusun da turuncgil bahçeleri için muazzam bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir.

2.3. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasallar İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Bitkilerde savunma mekanizmasını harekete geçirdiği bilinen pek çok kimyasal bulunmaktadır. Günümüz bitki koruma stratejilerinde yer alması amacıyla bu konu ile ilgi oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Turuncgillerde ve diğer bazı meyve ağaçlarında yapılan bazı çalışmalarda da bu kimyasalların etkileri ortaya konmuştur.

Çimen (1994), *Phoma tracheiphila*'nın doğal infeksiyonunun Ekim-Mayıs ayları arasında olduğunu, çoğunlukla Aralık–Mart döneminde ortaya çıktığını bildirmiştir. Bu çalışmada, Paclabutrazol'un çeşitli dozları topraktan ve yapraktan kütmeden fidanlarına uygulanmıştır. Bir yaşlı fidanlarda *Phoma tracheiphila*'nın yapay inokule edilerek topraktan Paclabutrazol uygulaması yapıldığında en iyi sonuç elde edilmiş, hastalık şiddeti %71,6 oranında engellenmiştir. Aynı uygulamanın doğal infeksiyonlarında oluşan hastalık şiddeti ise %52,6 olmuştur.

Resende ve ark. (2002) tarafından bir benzotiadiazol bileşiği olan Acibenzolar S-Methyl (ASM), kakao bitkisinde *Crinipellis pernicioso* (cadı süpürgesi) ve *Verticillium dahliae* (vasküler solgunluk)'ya karşı değerlendirilmiştir. ASM, inokulasyondan 30 gün önce uygulandığında kakao fidanları üzerinde cadı süpürgesi hastalığının görülme sıklığını *catongo* çeşidi kakao fidanları üzerinde %84,5'e varan oranda azaltmıştır. ASM ayrıca *Verticillium* solgunluğunun *Cocoa* cv. *theobahia*'da % 55,4'e düşmesine neden olmuştur. Her iki uygulamada da, dozun hastalık üzerindeki etkileri açıkça gözlenmemiştir. Bir başka deneyde, ASM'nin kakao fidanları üzerindeki etkisi, *Crinipellis pernicioso* inokulasyonundan 15 gün önce püskürtülen bakır oksit ve tebuconazole ile karşılaştırılmıştır. ASM, patojen inokule edilen kontrole kıyasla hastalık miktarını % 60,1 oranında azaltmıştır. ASM'nin etkisi tebuconazole'den daha üstün bulunmuştur. Bir direnç artırıcı olarak ASM'nin etki mekanizmasını anlamak için, toplam fenolik, polifenol oksidazlar ve peroksidaz seviyelerindeki değişiklikler, ilaçlamadan 3, 15 ve 30 gün sonra *Catongo* çeşidi fidanları üzerinde değerlendirilmiştir. *Theobahia* fidanlarının enzim aktiviteleri ise ilaçlamadan 30 gün sonra değerlendirilmiştir. *Catongo* çeşidinde, toplam fenolik içerikte ve polifenol oksidaz aktivitesinde, püskürtme sonrasında önemli bir fark bulunmamıştır. cv. *Theobahia*'da, peroksidaz ve polifenol oksidaz aktivitelerinde önemli artışlar tespit edilmiş ve ASM'ye karşı savunma yanıtlarının konukçu genotipine bağlı olduğu bildirilmiştir.

Agostini ve ark. (2003), bitkide dayanıklılık teşvik edici kimyasalları, *Elsinoe fawcettii* için Kaba limon çeşidinde, *Diaporthe citri* için Dancy tangerine çeşidinde, *Alternaria alternata* pv. *citri* için ise Duncan greyfurtta denemişlerdir. Bitkilere uygulanan Oxycom, Nutriphite, Messenger, Goemar H11, Serenade, ReZist, Prophyt, Aliette (Fosetyl-Al), Actigard (ASM) ve Keyplex kimyasallarının hepsinin hastalık şiddetini azalttığı; fakat standart fungusitler, Benlate 50WP (benomyl), Abound 2.08F (azoxystrobin), Headline 2.09F (pyraclostrobin) kadar etkili olmadığı görülmüştür. Bu kimyasallardan en etkilisinin ReZist ve Actigard (ASM) olduğu, bunları Aliette (Fosetyl-Al) ve Nutriphite'in takip ettiği belirtilmiştir. Konukçudaki dayanıklılığı teşvik eden ürünlerin turuncgillerde entegre mücadelede standart fungusitlerle birlikte kullanılabileceği bildirilmiştir.

Graham ve Leite (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, Swingle citrumelo çeşidi turuncgil bitkilerinin yapraklarına *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* bakterileri inokule edilemeden 7 gün öncesinde ASM ve Messenger kimyasalları yeşil aksama püskürtülmüştür. Bu uygulamaların hastalık lezyonlarını azalttığı görülmüştür. Brezilya'da bulunan portakal bahçelerinde bu kimyasalların tek başına ve bakır oksiklorid (COC) ve bakır hidroksit (CuOH) ile birlikte kullanıldığında hastalık zararını azalttığı bildirilmiş; fakat bu uygulamaların bakırın tek başına uygulamasına göre önemli bir etkisi olmadığı ifade edilmiştir.

Cao ve Jiang (2006) yaptıkları çalışmada Yali armut çeşidinde (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) meyve gelişme döneminde üç kez ASM uygulaması yapılmış ve hasattan sonra *Penicillium expansum* veya *Alternaria alternata* ile aşılanmış olgun armutlarda hastalık indeksinin %27,9 ve %42,7 ve lezyon çapının ise %29,1 ve %23,4 daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. ASM'nin tarlada uygulanmasının meyvelerin hasat sonrası hastalıklarının kontrol altına alınmasında büyük umut vadettiğini bildirmişlerdir.

Elma ağaçlarında *Erwinia amylovora*'nın neden olduğu Ateş Yanıklığı Hastalığına karşı bazı dayanıklılık teşvik edicilerin etkinlikleri belirlendiği bir

çalışmada, DL-3-β-amino-N-bütirik asit (BABA; 1,0 mg/ml) ve Acibenzolar-S-methyl (ASM; 0,1 mg/ml), inokulasyondan önce farklı günlerde ya tek başına ya da kombinasyon olarak yapraklara uygulanmıştır. Ateş yanıklığı hastalığının kontrolünde ASM, BABA'dan biraz daha etkili bulunmuştur. BABA ve ASM ile kombine edilmiş uygulamalar, uzun bir periyod boyunca, hastalığı büyük ölçüde azaltmış ve diğer uygulamalardan daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Direnç teşvik edici etkiler, kimyasal uygulaması ve patojen inokulasyonu arasındaki süre arttığında giderek azalmıştır (Hassan ve Buchenauer, 2007).

Graham ve Myers (2013), Turunçgil yeşillenme hastalığı vektörüne karşı kullanılan neonicotinoid grubu sistemik insektisitlerin toprak uygulamasının ağaçlarda *Xanthomonas citri* subsp. *citri*' nin neden olduğu turunçgil kanserine karşı da dayanıklılık oluşturduğunu bildirmişlerdir. Neonicotinoid grubu imidacloprid ve thiamethoxam insektisitleri ile ticari dayanıklılık teşvik edici ASM'nin turunçgil kanserine karşı etkileri Vernia portakal ve Ray Ruby greyluft çeşitlerinde araştırılmıştır. Tüm uygulamalar, kontrole göre hastalık şiddetini önemli miktarda azaltmıştır. Üretim dönemi boyunca ASM'nin toprak uygulaması ile imidacloprid ve thiamethoxam uygulamaları, greyluft ve portakal fidanlarında hastalık baskısı üzerinde çok etkili olmuştur. ASM'nin yeşil aksam püskürtme uygulaması ise toprak uygulamasından daha az etkili bulunmuştur.

Li ve ark. (2016), β-amino N- Butyric acid (BABA), 2,1,3-benzothiadiazole (BTH) ve 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) dayanıklılık teşvik edici kimyasallarının tek ya da kombinasyon halinde uygulanmasının turunçgil yeşillenme (*Liberibacter* sp.) hastalığını baskılamada etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu uygulamaların kontrole oranla hastalık şiddetini %15- 30 oranlarında azalttığını ve meyve verimi ve kalitesini de artırdıkları gösterilmiştir. Buna göre, dayanıklılık teşvik edici kimyasalların turunçgil yeşillenme hastalığı kontrolünde kullanılmasının uygun olacağını önermişlerdir.

Erkılıç ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, *Verticillium dahliae*'ya karşı dayanıklılığı teşvik etmek amacıyla Salisilik asit (SA), DL-β-amino-n-butyric asit

(BABA) ve Acibenzolar S-Methyl (ASM) ve Fosetyl-Al kimyasallarını kullanmışlardır. Fosetyl-Al, *Verticillium dahliae*'nin miseliyal gelişmesini 1000ppm konsantrasyonda tamamen engellemiştir. Diğer kimyasalların misel gelişimine etkisi ya olmamış veya çok az olmuştur. *Verticillium dahliae*'nin hastalık oluşturmaya kimyasalların toprak uygulamaları daha etkili olmuştur. ASM, *Verticillium dahliae*'nin hastalık şiddetini %80 oranında engellemiştir. Fosetyl-Al ve SA'nın *Verticillium dahliae*'nin kontrolünde ümitvar bulgular gösterdiği bildirilmiştir.

2.4. Fenolik Bileşikler İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Mikorizal fungus-fenolik bileşik etkileşimini konu alan çalışmalar genellikle tek yıllık bitkilerde yürütülmüştür. Kısa süreli çalışmalarda çok yıllık odunsu bitkilerde mikorizal fungusların kolonizasyonunun kısıtlı olabileceği düşüncesi bu noktada bir yanılgı oluşturabilmektedir. Öyle ki orman alanlarında mikorizal funguslar ve orman ağaçları binlerce yıldır birlikte yaşamaktadırlar. Mikorizal kolonizasyonun kültür bitkilerinde de üreticiler ve çevre açısından faydaları gözardı edilmemelidir. Dayanıklılık teşvik edici kimyasalların fenolikler üzerindeki etkisi ise daha çok çalışılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda, bitkilerin dayanıklılık mekanizmasının etkin çalışan bir sistem olduğu ve aktive edildiği durumlarda ümitvar sonuçlar elde edilebileceği görülmektedir.

Duglas Göknarı (*Pseudotsuga menziesii*) fidanlarının primer köklerini *Fusarium oxysporum* kök çürüklüğünden koruyabilen ektomikorizal fungus *Laccaria laccata*, primer köklerin kortikal hücrelerinde fenolik maddelerin birikmesine neden olmuştur. Patojenin infeksiyonu, *Laccaria laccata* veya metabolitlerinden etkilenen fidanlarda, kontrollerden daha az miktarda bulunmuştur. Hif yoğunluğunun ise fenolik maddelerin konsantrasyonuyla ters orantılı olduğu görülmüştür. *Laccaria laccata*'nın *in vitro*'da *Fusarium oxysporum*' un gelişimini engellediği gösterilmiş olsa da antibiyosisin önemli olmadığını, primer kökte *Laccaria laccata* tarafından teşvik edilen fenoliklerin,

bitki kök korumasının temeli olabileceği öne sürülmüştür (Sylvia ve Sinclair, 1983).

Afek ve Szejnberg (1988), *Phytophthora citrophthora*'ya dirençli ve duyarlı olan turunçgil türlerinin scoparone üretimleri patojen inokulasyonundan 1-8 gün sonra karşılaştırmışlardır. Dirençli türlerde, Scoparone konsantrasyonları daha yüksek bulunmuş ve inokulasyondan sonraki 24 saat içinde daha hızlı artmıştır. İnokulasyondan 4 gün sonra turunçgil kabuğunda *P. citrophthora*'nın neden olduğu lezyon uzunluğu, duyarlılarda 11 mm, ayrıca dirençli türlerde ise 2.5-5.0 mm olarak ölçülmüştür. Scoparone, *in vitro* koşullarda *P. citrophthora*'nın miseliyal gelişimini *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Verticillium dahliae*, *Colletotrichum gleosporoides*, *Hendersonula toruloidea* ve *Diplodia natalensis* funguslarının çimlenmesini inhibe etmiştir.

Turunçgillerde *Phytophthora citrophthora*'ya karşı dayanıklılığı teşvik ettiği düşünülen bir fitoaleksin olan scoparonun, fosetyl- Al ve fosforik asit ile etkileşimi incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, *Phytophthora citrophthora*'ya dayanıklı olan Macrophylla ve Turunç anaçları ile duyarlı olan kaba limon ve niva çeşitleri kullanılmıştır. Niva hariç tüm çeşitlerde infekteli dokuya uygulanan fosetyl- Al ve fosforik asit, scoparone düzeyini 2-4 katına kadar yükseltmiş ve bu fidanlarda lezyon alanı, hızlı bir şekilde azalmıştır. Sağlıklı bitkilere yapılan kimyasal uygulanmasının scoparone üretimini artırmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca regresyon analizi yapıldığında, miseliyal gelişimin azalmasının kimyasalların konsantrasyonunun artmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Afek ve Szejnberg, 1989).

Berhow ve ark. (1998) tarafından fenolik bileşiklerin, özellikle flavanonların ve flavon-flavonol bileşiklerinin incelenmesi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılarak, 5 cins, 35 tür ve 114 çeşit temsil eden Rutaceae'de gerçekleştirilmiştir. Turunçgil yaprağı, flavedo, albedo ve meyve suyunda meydana gelen ortalama pik veya fenolik bileşik sayısı sırasıyla 21, 17, 15 ve 9,3 olarak bulunmuştur. Turunçgi türleri ve çeşitleri için yaprak, flavedo, albedo ve meyve

suyu dokularında dört farklı fenolik bileşik sınıfı (flavon / ols, flavanonlar, kumarinler / sinnamik asit türevleri ve psoralenler) belirlenmiştir. 11 flavanon glikozid, 3 flavon glikozid ve 1 flavonol glikozidin oranları ve konsantrasyonları belirlenmiş ve kategorilere ayrılmıştır. Taksonların çoğu, ağırlıklı olarak neohesperidosil veya rutinosil olarak adlandırılmıştır. Baskın neohesperidosil flavanonları naringin, neoeriocitrin ve neohesperidin; baskın rutinosil flavanonları ise hesperidin, eriocitrin ve narirutin olarak belirlenmiştir. Esas olarak neohesperidosil flavanonları içeren çeşitler, neohesperidosil flavonları da içermiştir. Benzer şekilde, rutinosil flavanonları içeren türler ve çeşitler, rutinosil flavonları içermiştir.

Evensen ve ark. (2000), *Ceratocystis polonica* inokulasyonu yapılan Norveç ladini (*Picea abies*) ağaçlarında, sadece yara açılan ağaçlara göre daha fazla kateşin, taksifolin ve *trans*-resveratrol konsantrasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Hem patojen inokulasyonu yapıp hem de yaralanan ağaçlardaki fenolik bileşik oranı kontrole oranla daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca Norveç ladin kabuğunun fenolik ekstraktının *Heterobasidion annosum* ve *Ceratocystis polonica* ve *Ophiostoma penicillatum*'un miseliyal gelişmesi üzerindeki etkisi *in vitro*' da incelenmiştir. Bu çalışmada *Heterobasidion annosum* olumsuz yönde etkilenmemiş, *O. penicillatum*'un gelişimi ise *C. polonica*'dan daha fazla inhibe edilmiştir.

El-Modafar ve El-Boustani (2001), dayanıklı hurma ağacı köklerinin duyarlı çeşitlere göre *Fusarium oxysorum* f. sp. *albedinis*'in hücre duvarı parçalayıcı enzimlerinin aktivitelerine daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Hurma ağacı kökleri p- hydroxybenzoic acid, p- coumaric acid, ferulic acid ve sinapic acid olarak tanımlanan 4 tane hücre duvarı fenoliği içermektedir. Dayanıklı çeşitlerde duyarlı çeşitlere göre coumaric acid ve ferulic acid 2 kat fazla; hydroxybenzoic asit ve sinapic asit ise 8,4 ve 4,5 kat fazla ölçülmüştür. Ayrıca dayanıklı çeşitlerin köklerinde bulunan lignin miktarının da duyarlı çeşitlere göre 1,8 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Dirençli çeşitlerde biriken hücre duvarına

bağlı fenollerin *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*'in miseliyal büyümesini ve bu fungusun hücre duvarı parçalayıcı enzim üretimini büyük ölçüde azalttığı bildirilmiştir.

Fourie (2004) yaptığı çalışmada, *Phytophthora nicotianae*'nin neden olduğu infeksiyona karşı reaksiyonda toplam çözünür fenoliklerin birikimini, patojene toleranslı ve duyarlı olan farklı turuncgil anaçlarında araştırmıştır. Buna göre, fenolik konsantrasyonlar, inokulasyondan 21 gün sonra toleranslı Swingle, Macrophylla, Troyer ve Turunç anaç köklerinde daha yüksek bulunmuştur. Hassas Kaba limon ve Volkameriana limon anaçlarında ise küçük artışlar meydana gelmiştir. Orta toleranslı anaçlar, Carrizo ve C35'ten, Carrizo orta düzeyde bir fenolik üretirken, C35 ise düşük bir seviyede fenolik içermiştir. Toplam fenolik konsantrasyonların, *P. nicotianae*'ya toleranslık ile pozitif ilişki gösterdiği ve fenoliklerin anaç direncinde rol oynadığını bildirmiştir. *P. nicotianae* inokulasyonu üzerine, toleranslı anaçlar toplam fenolikleri bazal çizginin yaklaşık 2.2 katına kadar biriktirirken, toplam fenolikler duyarlı anaçlarda bazal değerlerin sadece 1.6 katını biriktirmiştir. Ayrıca fosetyl-Al uygulaması, patojen uygulanan anaçlarda, patojen uygulanmamış anaçlara göre fenoliklerin 2,2 kat artmasını uyarmıştır. Bu artış, fenolik bileşiklerin bu fungusitin etki tarzında bir rol oynadığını göstermektedir.

Limonlarda yaygın olarak görülen fenolik bileşiklerden hesperidin ve limonin ile *Phoma tracheiphila* arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, dayanıklı ve orta dayanıklı çeşitlerde (Tatlı limon, Mayer ve Enterdonato) hesperidin ve limoninin ya her ikisinin ya da bir tanesinin duyarlı çeşitlere (Eureka, Yediveren, Kütdiken) oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. *In vitro* çalışmalarda ise hesperidin ve limoninin farklı konsantrasyonlarının (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 ppm) *P. tracheiphila* gelişimi üzerine engelleyicilik yüzdeleri araştırılmış ve her iki fenolik bileşiğin de konsantrasyonları arttıkça hastalık etmeni fungus gelişimini engellediği belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 100

ppm'de limoninin engelleyiciliğinin (%85,29), hesperidinin engelleyiciliğinden (%58,68) daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Baydar, 2010).

Graham ve Myers (2011) tarafından imidacloprid, thiamethoxam ve acibenzolar-S-methyl toprak uygulamaları çeşitli oranlarda ve uygulama sıklıklarında 3 ve 4 yaşlı Ray Ruby çeşidi greyfurt ağaçlarında *Xanthomonas citri* subsp *citri*'nin neden olduğu turunçgil kanserinin kontrolü için 2 yıl boyunca değerlendirilmiştir. İlk yılda, tüm uygulamalar ilkbahar-yaz-sonbahar büyüme dönemlerinde hastalık miktarını önemli ölçüde azaltmıştır. Bakır hidroksit ve streptomisin spreyleri, kontrole kıyasla mevsim boyunca hastalık oranını azaltmada etkiliyken, topraktan uygulanan dayanıklılık teşvik ediciler, uygulama oranına, sıklığına ve zamanlamasına bağlı olarak hastalığı azaltmıştır. İkinci yılda, tüm uygulamalar, ilkbahar-yaz-sonbahar büyüme dönemlerinde turunçgil kanserinin görülme sıklığını önemli ölçüde azaltmış, ancak dayanıklılık teşvik ediciler ile ilkbahar-yaz dönemlerinde tüm uygulamalar kontrole kıyasla etkili olmamıştır. Bu nedenle, uygulamanın oranına, sıklığına ve zamanlamasına bağlı olarak, toprak uygulamalı dayanıklılık teşvik ediciler, epidemik koşullar altında genç greyfurt ağaçlarının hastalık oranını azaltmıştır.

Salisilik asit (SA) birçok bitkide patojenlere direnç sağlamada kilit rol oynamaktadır. SA'nın hurma (*Phoenix dactylifera* L.) 'da *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA)' e olan direnç olası katılımını araştırmak için, fenolik bileşiklerin seviyeleri incelenmiştir. SA uygulamasından sonra, *F. oxysporum* aşılansız hurma fidanlarının köklerinde çözünür fenoliklerin içeriği, hastalık belirtileri gösteren tedavi edilmemiş bitkilere oranla Bousthami noir çeşidinde yaklaşık 4 kat ve Jihel çeşidinde ise 6 kat daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca SA uygulaması hücre duvarı fenoliklerinin içeriğini de arttırmıştır. Ek olarak, SA uygulanan hurma köklerine FOA inokulasyonu yapıldığında, bitkide çok sayıda aşırı duyarlılık reaksiyonuna benzer nekrotik lezyonlar oluşmuştur. Buna karşılık, SA ile işlem görmemiş bitkiler normal olarak fungus inokulasyonuna tepki olarak yayılma nekrozu göstermiştir (Dihazi ve ark., 2003).

Sanzani ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, kuercetin, scopoletin ve scoparone fenolik bileşiklerini, *Penicillium digitatum*'a karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda test etmişlerdir. Her ne kadar *in vitro* koşullarda *P. digitatum* üzerinde küçük (%13) bir etki kaydedilmiş olsa da, *in vivo* deneme sonuçları ümit verici bulunmuştur. Fenolik uygulaması yapılmış portakallarda, semptomlar inokulasyondan 6 gün sonra, kontrole kıyasla 2 günlük bir gecikmeyle ortaya çıkmıştır. Ayrıca, inokulasyondan 8 gün sonra, quercetin, scopoletin ve scoparone, kontrol grubuna kıyasla hastalık oranını ve şiddetini sırasıyla % 69- % 40 ve % 85- % 70 oranında azaltmıştır. inokulasyondan 14 gün sonra ise en aktif molekülün scoparone olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, bu bileşiklerin sentetik fungusitlere ilginç bir alternatif teşkil edebileceği önerisi yapılmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, bitkilerde patojenlere karşı savunma mekanizmalarını etkilediği bilinen *Glomus caledonium*, *Glomus clarium*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices* ve *Glomus mosseae* mikorizal fungusları ve Salisilik asit (SA), DL- β - amino-n-butirik asit (BABA), Acibenzolar-S-methyl (ASM) ve Fosetyl-Al kimyasalları kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan *Phoma tracheiphila* izolatları, Mersin ve Adana illerinde bulunan limon bahçelerindeki hastalık semptomu gösteren ağaçlardan alınan örneklerden izole edilmiştir.

Farklı limon çeşitlerinin *Phoma tracheiphila*'ya duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla Kütdiken, Yediveren, Enterdonat ve Mayer limon çeşitleri kullanılmıştır. Dayanıklılık teşvik edici ve mikorizaların *Phoma tracheiphila*'ya karşı limondaki fitoaleksinleri teşvikinin belirlenmesinde ve patojenite çalışmalarında ise Kütdiken çeşidi tercih edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinden *Phoma tracheiphila*'nın İzolasyonu

Mersin ve Adana illerinde bulunan limon bahçelerinde yapılan survey çalışmaları sonucunda şiddetli hastalık semptomu gösteren ağaçlardan alınan örnekler, laboratuara getirilmiştir. Bu örneklerin tipik turuncu-kırmızı renklenme gösteren bölgelerinden 2-5 mm büyüklüğünde parçalar kesilerek %1'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra steril distile sudan geçirilmiş ve steril kurutma kağıdında kurutulup PDA ortamına yerleştirilmiştir. Bu petriler, 24 °C'de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu 15 farklı *Phoma tracheiphila* izolatu saflaştırılarak çalışmada kullanılmak üzere eğik besi yeri (+4 °C) ve kağıt kültür (-18 °C) ortamlarında saklanmıştır.

3.2.2. *Phoma tracheiphila* İzolatlarının Klasik ve Moleküler Tanısı**3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu**

DNA ekstraksiyonunda, Ahrens ve Seemüller (1992)'in kullandığı CTAB yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Kültüre alınmış olan *Phoma tracheiphila* izolatlarının petrilerinde fungus gelişmiş olan alandan 0,5 cm² çapında miselyum alınarak 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine konulmuştur. Örnekler üzerine 0,5 ml CTAB buffer (2% w/v cetyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 0.2%2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-Base, 2% polyvinylpyrrolidone, pH 8.0) ilave edilmiş ve ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Tüplerdeki 600 µl ekstrakt su banyosunda 65°C'de 30 dakika bekletilmiş daha sonra örnekler üzerine 600 µl chloroform-isoamyl alkol (24:1) eklenerek 1 dakika vortex yapılmıştır. Vortexlenen tüpler, 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst fazdan pipet yardımı ile 500 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bunun üzerine tekrar 500 µl chloroform-isoamyl alkol (24:1) ilave edilip 1 dakika vortex yapılmış, yine 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra üst fazdan pipet yardımı ile 350 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Daha sonra örnekler üzerine 2/3 soğuk isopropanol eklenerek vortex yapılmış ve -20°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Örnekler -20°C'den alınarak 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmış ve üst faz atılmıştır. DNA çökeltisi tekrar soğuk % 70'lik ethanol ile yıkanmış ve örnekler oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Daha sonra pellet, 70 µl saf su ile çözülerek PCR da kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR Çalışmasında Kullanılan Primer Bilgileri

Primer Adı	Sekans (5'- 3')	Hedef	Referans	DNA Büyüklüğü
ITS1	5'-TCCGTA GGTGA A CCTGCCG-3'	ITS	White et al., 1990	~500 bp
ITS4	5'-TCCTCCGCTTA TTGA TA TGC-3'	ITS	White, 1990	~500 bp
P.trachITSF	5'-CA GGGGA TGGCGCCA GCC-3'	ITS	Ezra et al., 2007	~500 bp
P.trachITSR	5'-CCGTCCTGCA CA A GGGCA GTGG-3'	ITS	Ezra et al., 2007	~500 bp
Pt- FOR	5'-GGA TGGCGCCA GCCTTC-3'	ITS	Balmas et al., 2005	378 bp
Pt- REV2	5'-GCA CA A GGGCA GTGGA CA AA-3'	ITS	Balmas et al., 2005	378 bp
β -tubulin DLH91	5'-CA GCTCGA GCGCA TGA A CGTCTA-3'	β -tubulin	Hailstones et al., 2003	1070bp
β -tubulin DLH92	5'-TGTA CCA A TGCA A GAA A GCCTT-3'	β -tubulin	Hailstones et al., 2003	1070 bp

3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Çalışmaları

PCR çalışmalarında daha önceki araştırmacıların kullandığı primer çiftleri kullanılmış olup, yöntemleri modifiye edilerek çalışmalar yürütülmüştür (Ezra ve ark., 2007). PCR çalışmaları, 50 µl final hacminde yürütülmüştür. Daha önceden elde edilmiş DNA ekstraksiyonundan 3 µl alınarak, 5 µl Dream Taq Green buffer (10X), 1 µl dNTP (ATP, GTP, CTP, TTP; 10mM), 1µl primer Reverse (10pmol) 1 µl primer Forward (10pmol), 0,25 µl Dream Taq DNA polimeraz enzimi (5u/µl) ve 38,75µl ddH₂O ile karıştırılmış ve 50 µl lik son hacimde PCR tüpüne konulmuştur. PCR tüpleri daha önceden primerlerin Tm değerlerine ve beklenen PCR ürününün molekül ağırlığına göre programlanmış olan thermocycler cihazına yerleştirilmiştir. Örneklere uygulanan thermocycler cihazı programı aşağıdaki gibidir:

95 santigrat derecede 3 dakika 1 döngü

bağlı

95 santigrat derecede 45 saniye

Tm-3 santigrat derecede 45 saniye 35 döngü

72 santigrat derecede 45 saniye

bağlı

72 santigrat derecede 10 dakika 1 döngü

Sonraki aşamada, PCR ürünlerinin varlığının kontrolü 1X TAE de hazırlanan agaroz jelde yapılmıştır. Ayrıca PCR çalışmaları sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizilemeleri de yaptırılmıştır.

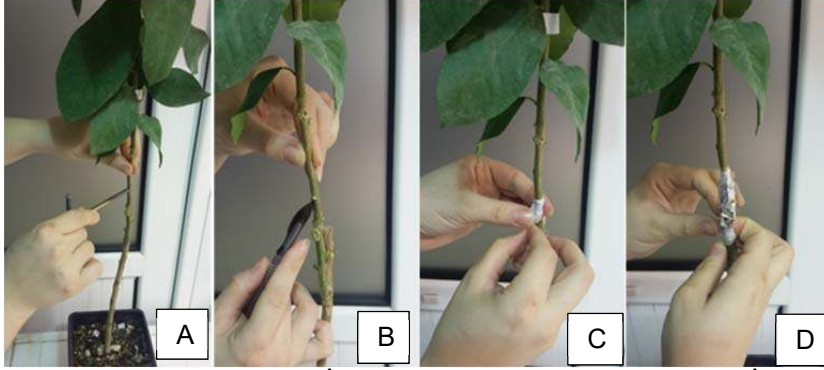
PCR ürünlerinin analizlerinin yapılması amacıyla bu ürünler Asgen firmasına gönderilmiştir. Firmanın gerçekleştirmiş olduğu dizi analizi işleminin sonuçları MEGA7 programı kullanılarak örnekler arasındaki akrabalık düzeyinin ortaya konulması amacıyla filogenetik ağaçları oluşturulmuştur. Filogenetik analiz çalışmaları kapsamında izolatların ülkemiz dışında İsrail, ABD, Tunus, İtalya ve Çin'den seçilen izolatlar ile ilişkileri de ortaya konmuştur.

3.2.3. Patojenite Testleri

İzolasyon sonucu elde edilen ve tanısı yapılan izolatların patojenite testini yapmak ve en şiddetli izolatu belirlemek amacıyla Kütdiken limon çeşidinde patojenite çalışmaları yapılmıştır (Şekil 3.1). Patojenite çalışmasında, limon fidanlarının aşı noktasının üstünden 6 mm çaplı mantar delici yardımıyla yara açılıp buraya yine aynı cork borer ile kesilip alınan *Phoma tracheiphila* kültürü yerleştirilmiş, daha sonra bu bölge ıslak pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılmıştır. İnokulasyon işlemi yapılan bu fidanlar iklim odasında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ortalama 20 °C’ de bekletilmiştir. Uygulamadan 6 hafta sonra bitkilerde ilk belirtiler görülmeye başlanmış, 8 hafta sonra ise 0-5 skalasına göre değerlendirilmesi yapılmıştır (Solel ve Spiegel-Roy, 1978). 0-5 skalası aşağıdaki gibidir:

- 0: Enfeksiyon yok
- 1: Yapraklarda lokal sararma
- 2: Yaprakların tamamen sararması ve/veya dökülmesi
- 3: Bir veya birkaç sürgünde uçtan 10-15 cm’lik kuruma
- 4: Tepeden aşı noktasına kadar ilerleyen kuruma
- 5: Bitkinin tamamen kuruması ve ölümü

Değerlendirme sonucu elde edilen skala değerleri üzerinden, Tawsend-Heuberger formülüne göre hastalık şiddeti hesaplanmıştır. Değerlendirme sonucunda en yüksek hastalık şiddeti gösteren izolat belirlenmiş ve çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *Phoma tracheiphila* İzolatlarının Limon Fidanlarına İnokulasyonu İşlemi (Cork Borer ile Limon Fidanlarında Yara Açılması (A), Miseliyal Diskin Yerleştirilmesi (B), Bölgenin Islak Pamuk ile Sarılması (C), İnokulasyon Alanının Alüminyum Folyo ile Kapatılması (D))

3.2.4. Limon Çeşitlerinin *Phoma tracheiphila*'ya Duyarlılığının Belirlenmesi

Patojenite çalışması sonucunda virülensliği en yüksek olarak belirlenen *Phoma tracheiphila* izolatı ile Kütdiken, Enterdonat, Yediveren ve Mayer limon çeşitlerinde duyarlılık çalışması yürütülmüştür.

Çalışmada, limon fidanlarının *Phoma tracheiphila* ile bulaştırılması ve değerlendirilmesi işlemleri 3.2.3 başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, deneme 5 tekrarı olarak kurulmuştur.

3.2.5. Laboratuvar Çalışmaları

Bitkilerde dayanıklılık teşvik edici özelliği bilinen Acibenzolar S-Methyl (ASM), DL-β-amino-n-butyric asit (BABA), Fosetyl- Al ve Salisilik asit (SA) kimyasallarının PDA besi ortamında *Phoma tracheiphila*'nın miseliyal gelişimine olan etkilerini belirlemek amacıyla bu kimyasalların 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 ppm konsantrasyonları denenmiştir. Bu amaçla, cam deney tüplerinde 10 ml PDA besi ortamı hazırlanıp, 121°C'de, 1 atm basınçta 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra steril edilen besi ortamları 60°C'de çalışan su banyosu içerisine konularak sıcaklığın sabit kalması sağlanmıştır. Diğer yandan, steril distile su içeren şişelerde ASM, BABA, Fosetyl-

Al ve SA'nın stok solüsyonları hazırlanıp her bir deney tüpü için gereken solüsyon miktarı mikropipetör ile 10ml'lik ortamlara enjekte edilmiştir. Daha sonra, bu tüplerdeki ortamlar vortexte karıştırılarak 9 cm çaplı petrilere dökülüp, ortamların katılaşp soğumasının ardından *Phoma tracheiphila* kültüründen 6 mm çaplı miseliyal diskler alınarak, her bir petriye 1 adet ekilmiştir. Petriler 1 hafta süreyle 24°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra gelişen kolonilerin çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Elde edilen rakamlar üzerinden varyans analizi yapılmış ve uygulamalar arasındaki istatistiksel farklar LSD çoklu karşılaştırma testiyle ortaya konulmuştur.

3.2.6. Sera Denemeleri İçin Yapılan Ön Hazırlıklar

3.2.6.1. Mikorizal Fungus İnokulumunun Üretilmesi

Sera denemelerinde kullanılmak üzere Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü'nden temin edilen *Glomus caledonium*, *Glomus clarium*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices* ve *Glomus mosseae* mikorizal funguslarının üretimi yapılmıştır (Şekil 3.2). Bu amaçla saksılara önce 1:1 oranında karıştırılan toprak ve torf koyulmuş, tohum ekilmeden 2-3 cm derinliğe mikorizal fungus türünün misel+toprak+kök+sporlarından oluşan inokulumu bırakılarak mısır tohumu ekilip üstü toprakla kapatılmıştır (Menge ve Timmer, 1982). Yaklaşık olarak 1m uzunluğa ulaşan mısır bitkileri susuz bırakılarak kurutulmuştur. Bu bitkiler kök boğazından kesilerek uzaklaştırılmış ve saksı içeriği boşaltılarak kökler küçük parçalar halinde kesilmiştir. Daha sonra kökler ve yetiştirme ortamı karıştırılarak, çalışmada kullanılmak amacıyla +4 °C'de soğuk hava deposunda saklanmıştır.



Şekil 3.2. Mısır Bitkisinde Mikorizal Fungus İnokulumunun Üretilmesi

3.2.6.2. Mikorizal Fungus Türlerinin İnokulumundaki Spor Yoğunluklarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılmak üzere üretimi yapılan mikorizal inokulumdaki spor yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla ıslak eleme yöntemi kullanılmıştır (Gerdeman ve Nicholson, 1963). *Glomus caledonium*, *Glomus clarium*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices* ve *Glomus mosseae* inokulumundan 10'ar gr toprak örneği tartılarak ayrı ayrı beher glass içerisine konulmuş ve üzerine 100 ml saf su ilave edilmiştir. Çözelti yarım saat süreyle bir magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldıktan sonra farklı gözenek boyutlu eleklerden (750, 250, 100 ve 53 μm 'lık elekler altta en küçük elek olacak şekilde yerleştirilir) geçirilerek çözelti berraklaşmaya kadar çeşme suyuyla toprak materyali yıkanmıştır. Ardından santrifüj ve %50'lik şekerli çözeltiden geçirilen toprak materyali, saf su yardımı ile petri kaplarına aktarılmış ve binoküler mikroskop altında spor sayımı yapılmıştır.

3.2.6.3. Limon Fidanlarının Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan limon fidanları, ÇÜ Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi seralarında ve üretici bahçesinde yetiştirilmiştir (Şekil 3.4). Bu amaçla olgun turunç meyvelerinin tohumları çıkartılarak yıkanıp kurutulmuş ekime hazır hale getirilmiştir. Viyollerin yarısına kadar 2:1 oranında karıştırılmış torf ve ürgüp taşı karışımı koyulup üstüne 5 adet tohum eklenerek toprakla kapatılmıştır. Çimlenip çıkış yapan bitkilerin boyu yaklaşık 10-15 cm'ye ulaştığında her saksıda 1 adet bitki olacak şekilde şaşırtma işlemi yapılmıştır. Şaşırtma işlemi sırasında bitki köklerine 50 g mikoriza inokulumu eklenmiştir. Ayrıca dayanıklılık teşvik edici kimyasalların etkilerini belirlemek amacıyla mikoriza inokulumu içermeyen turunç fidanları da yetiştirilmiştir. Gerekli bakım işlemleri yapılan turunç çöğürleri 6 ay sonunda Kütdiken çeşidi ile aşılanmış ve 1 yıl süreyle bakım işlemleri yapılarak, fidanlar patojen inokulasyonuna hazır hale getirilmiştir.



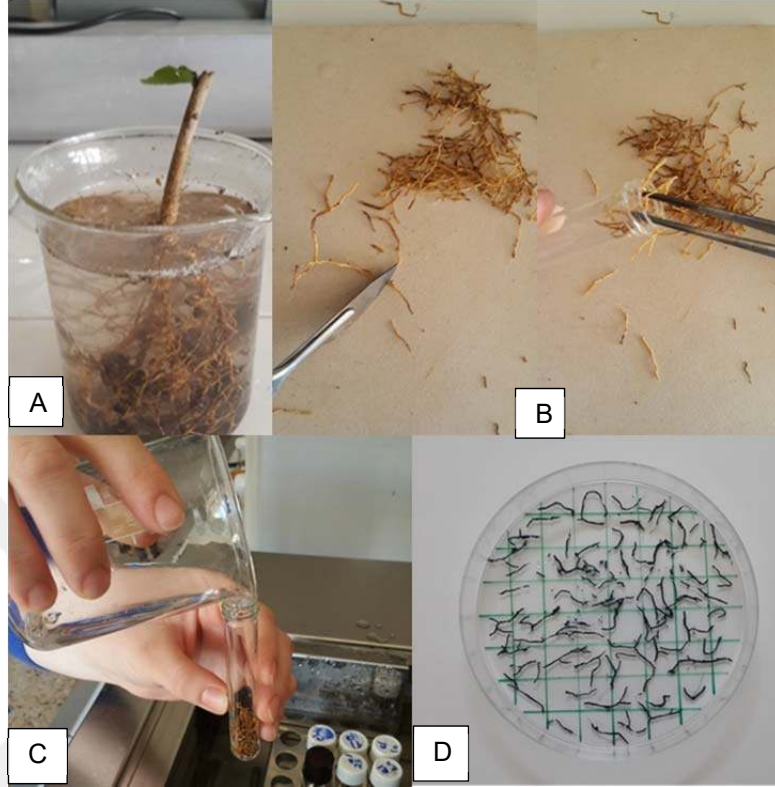
Şekil 3.3. Mikoriza İnokulasyonu Yapılan Turunç Çöğürlerinin Yetiştirilmesi

3.2.7. Sera Denemeleri**3.2.7.1. Turunç Çöğürlerinde Mikorizal Fungusların Kolonizasyonunun Belirlenmesi**

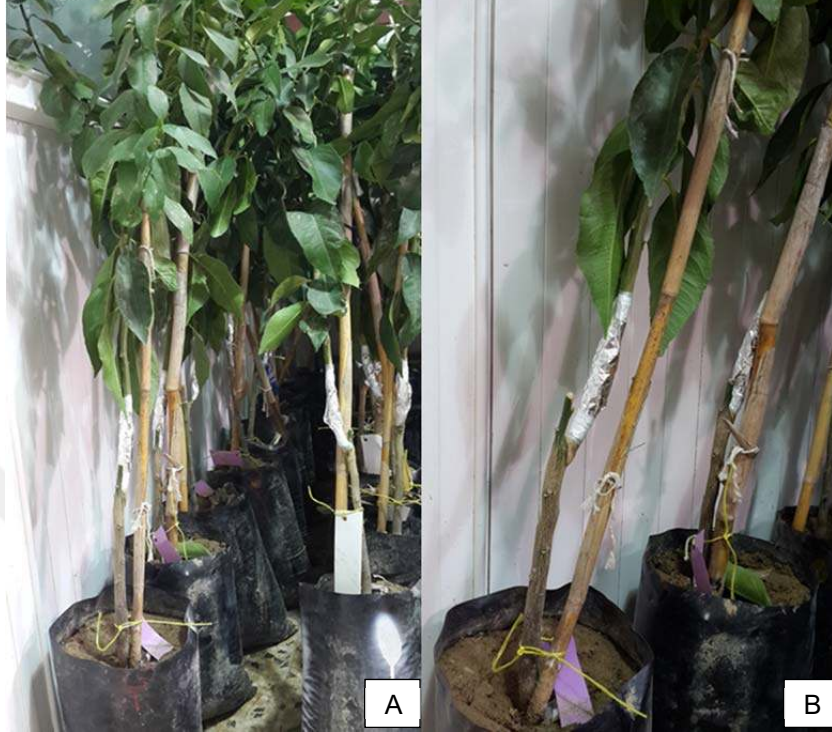
Mikorizal inokulasyon yapılmış turunç bitkilerinde kök kolonizasyonu oranını belirlemek amacıyla öncelikle Ç.Ü. Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezinde yetiştirilen mikorizalı turunç çöğürleri saksılardan sökülerek laboratuara getirilmiş, bu fidanların kökleri temizlenip yıkanmıştır (Şekil 3.5). Her bir uygulamaya ait bitkilerin kılcal kökleri kesilerek ayrı ayrı test tüpleri içerisine yerleştirilmiştir. Tüp içerisindeki kökler tamamen kapanacak şekilde %10'luk KOH çözeltisi eklenmiş ve 65°C sıcaklıkta 1 saat süreyle etüvde tutulmuştur. Daha sonra KOH boşaltılarak kökler saf su ile yıkanıp, tüplere 2N HCL ilave edilmiştir. Aynı sıcaklıkta kökler temizleninceye kadar (yaklaşık 10 dakika) bekletilmiş ve daha sonra HCL uzaklaştırılarak %0,1'lik Trypan Blue eklenip tekrar 65°C sıcaklıkta 10-15 dakika süreyle etüvde tutulmuştur. Son aşamada Trypan Blue dökülerek laktik asit ilave edilmiş ve aynı sıcaklık ve sürede etüvde bekletilmiştir (Koske ve Gemma, 1989). Etüvden çıkarılan örneklerin köklerindeki mikorizal kolonizasyon binoküler mikroskop altında incelenip kolonizasyon oranı (%) doğru orantı ile belirlenmiştir.

3.2.7.2 Mikorizal Fungusların *Phoma tracheiphila*'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Mikorizal fungus türlerinin inokulasyonu yapılarak üretilmiş olan kütdiken limon fidanlarına patojen inokulasyonu 3.2.3 bölümünde olduğu gibi yapılmıştır. Daha sonra bu fidanlar, iklim odasında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ortalama 20 °C' de 2 ay bekletilmiştir (Şekil 3.6). Bu süre sonunda, bitkilerdeki belirtiler 0-5 skalasına göre değerlendirilmiştir. Elde edilen skala değerleri üzerinden hastalık indeks değerleri hesaplanarak varyans analizi ve LSD (0.05) çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır.



Şekil 3.4. Turunç Çöğürleri Köklerinde Mikorizal Fungus Kolonizasyonunun Belirlenmesi (Turunç Köklerinin Temizlenmesi (A), Köklerin Parçalara Ayrılması (B), Tüplere %10'luk KOH Çözeltisi Eklenmesi (C), Binoküler İncelemesi İçin Hazırlanan Kökler (D))



Şekil 3.5. *Phoma tracheiphila* İnokulasyonu Yapılmış Limon Fidanları (A), Mikorizalı Limon Fidanları (B)

3.2.7.3. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların *Phoma tracheiphila*'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, *Phoma tracheiphila* izolatının limon fidanlarına inokulasyonu 3.2.3 bölümünde anlatıldığı gibi yapılmış ve ASM, BABA, Fosetyl-Al ve SA kimyasallarının 1000 ppm dozu yeşil aksam püskürtmesi şeklinde uygulanmıştır (Şekil 3.7). İnokulasyondan 1 ay sonra tekrar kimyasalların 1000 ppm dozu yeşil aksam püskürtme şeklinde fidanlara uygulanmıştır. Bu fidanlar, hastalık belirtilerinin gözlenmesi için 2 ay klima odasında bekletilmiştir. Bitkide hastalık belirtilerinin görülmesinin ardından belirtiler 0-5 skalasına göre değerlendirilmiştir. Elde edilen skala değerleri üzerinden indeks

değerleri hesaplanarak varyans analizi yapılmış ve LSD çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.



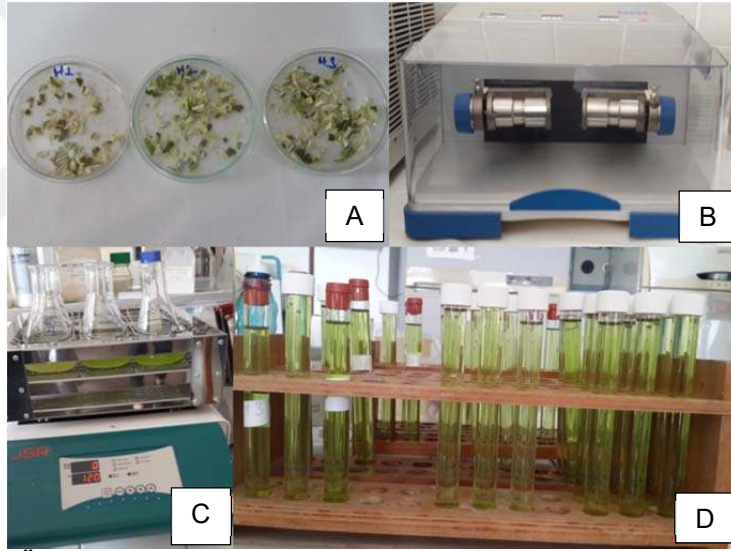
Şekil 3.6. *Phoma tracheiphila* İnokulasyonu Yapılmış Limon Fidanları (A) ve Dayanıklılık Teşvik Edicilerin Uygulanması (B)

3.2.8. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasallar ve Mikorizal Fungusların Fenolik Bileşikler Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Hesperidin ve Limonin bileşiklerinin ekstraksiyonları Chinapongtitiwat ve ark. (2013)'nın kullandıkları yöntemle yapılmış, her bir ekstraksiyon 3'er tekrürlü olarak yapılmıştır. Analizlerde C18 kolon (25 x 4.6 mm x 5µ) ve taşıyıcı faz olarak %5 lik formik asit ile asitlendirilmiş su (A) ve %40 (A) / %60 asetronitril karışımından oluşan (B) fazları kullanılmıştır.

Scoparone analizinde ise Ortuña ve ark (1997) tarafından önerilen yöntem esas alınmış ancak, ekstraksiyon aşaması tarafımızdan modifiye edilerek

uygulanmıştır. Dayanıklılık teşvik edici ve mikorizal fungusların *Phoma tracheiphila* üzerine etkilerinin belirlendiği çalışmada kullanılan bitkilerin gövdeleri kesilerek laboratuvara getirilmiştir. Her bir uygulamanın tüm tekerrürlerinden 10 g tartılmış ve toz haline getirilmiş ve üzerine 100 ml etanol eklenip, çalkalayıcıda 250 rpm’de 45 dakika süreyle çalkalanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Karışım daha sonra 2500 g’de 15 dk süreyle santrifüj edilmiş ve üst kısımdaki renkli olan faz alınarak elde edilen karışım vakum altında 35°C’de kurutulmuştur. Evaporasyon sonrasında elde edilen ekstrakt metanol ile çözündürülmüş ve 0.45 µm’lik tek kullanımlık teflon filtreden geçirilerek HPLC cihazına enjekte edilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.7. Örneklerin Parçalanması (A), Toz Haline Getirilmesi (B), Solüsyonun Çalkalayıcıda Karıştırılması (C) ve Santrifüj İşleminin Sonra HPLC Okumasına Hazır Hale Getirilmesi (D)

LC-MS/MS analizleri, negatif iyonizasyon modu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LC-MS’de kapiler sıcaklık 400 °C, kapiler voltaj -3V, nebulizatör gaz akışı 1.75 L/dak., çözünme gaz akışı 1L/dak. ve sprej voltaj 5 kV’tur. Fenolik bileşiklerin tanımlanması LC-DAD-MS/MS cihazında elde edilen

alıkonma zamanları, max/min dalga boyları, ana ve fragment iyonlar, kütle spektrumları, standart olarak kullanılan bileşiklerin alıkonma zamanları ve spektrumları ve konu ile ilgili yapılmış literatür verilerinden yararlanılarak yapılmıştır. Bileşiklerin miktarsal tayinleri için her bir standart maddeden üç farklı konsatrasyonda çözelti hazırlanmış ve HPLC'ye enjekte edilerek her bir bileşik için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bu bileşiklerin hazırlanmasında limon bitkisi gövdesinde bulunabilecek konsantrasyonları içerecek şekilde standart hazırlanmıştır. Bu bileşikler için 0.995'in üzerinde regresyon katsayıları (r^2) elde edilmiştir. Tespit sınırları (LOD) ve kantitatif (LOQ), sırasıyla 3 ve 10 sinyal-gürültü oranlarında (Sinyal/gürültü) hesaplanmıştır. Metodun performansını belirlemek için, doğrusallık, tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ), tekrarlanabilirlik, geri kazanım ve doğruluk parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS koşul ve parametreleri aşağıda verilmiştir:

Kolon: Phenomenex Luna marka C18 (4.6 mm×250 mm, 5 µm iç çapında)

Enjeksiyon miktarı: 20 µL

Taşıyıcı fazlar:

A=Su/formik asit (99:1, % / %),

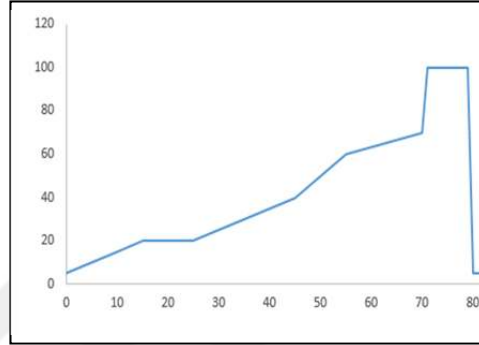
B= Asetonitril/ A fazı/Formik asit (60/39/1, % / %/ %)

Akış hızı: 0.6 ml/dak

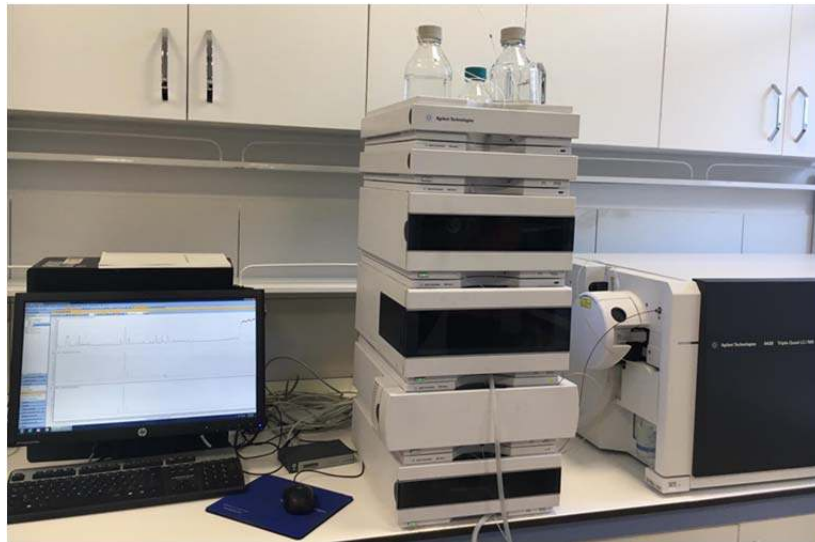
Dalga boyu: 280 nm

Dedektör tipi: Diyot array dedektör

Süre (Dakika)	% A	% B
0	98	2
15	85	15
20	70	30
30	70	30
50	60	40
60	40	60
75	35	75
76	0	100
84	0	100
85	98	2
87	98	2



Şekil 3.8. Fenolik Bileşiklerin HPLC Analizlerinde Kullanılan Elüsyon Sistemi (Taşıyıcı fazların zamana bağlı değişimi (1); B fazının süreye bağlı değişimi (2))



Şekil 3.9. Çalışmaların Yürütüldüğü HPLC-ESI-DAD-MS/MS Cihazı



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinden *Phoma tracheiphila*'nın İzolasyonu ve Patojenitesi

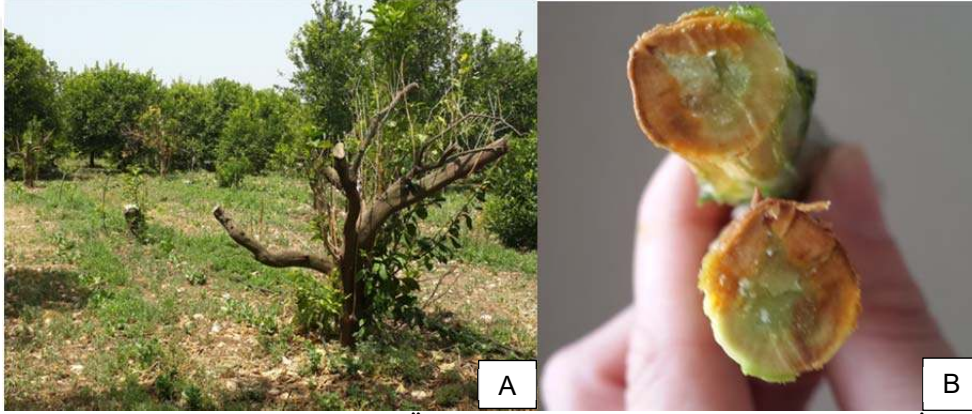
Mersin ve Adana illerinde yapılan survey çalışmalarında *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu Uçkurutan hastalığının limon bahçelerinin önemli bir sorunu olduğu görülmüştür. Özellikle Kütdiken ve Eureka limon çeşitleriyle oluşturulan bahçelerde uçkurutan sorununun ciddi boyutlarda ağaç kayıplarına neden olduğu; hatta bu nedenle bahçelerdeki tüm ağaçların sökülerek çeşit değişikliğine gidildiği gözlemlenmiştir.

Mersin ilinde Kütdiken çeşidinin daha fazla tercih ediliyor olması ve bakım işlemleri noktasında yapılan eksiklikler nedeniyle Adana iline göre Uçkurutan sorununun görece daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Survey çalışmalarında, limon bahçelerinde tipik geriye doğru ölüm, odun dokusunda oluşan turuncu-kırmızı renklenme semptomlarını taşıyan ağaçlar gözlemlenmiş ve bu ağaçlardan alınan bitki örneklerinde izolasyon çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.1). Bu çalışmalar sonucunda, *in vitro*'da makroskopik ve mikroskopik olarak tanımlanan 15 farklı *Phoma tracheiphila* izolatı elde edilmiş ve alındıkları bölgeleri temsil edecek şekilde isimlendirmeleri yapılmıştır (Çizelge 4.1). Çizelgeden de görüleceği gibi, izolatların 12 tanesi yoğun hastalık baskısı altında olan Mersin bölgesinden, 3 tanesi ise hastalığın daha az görüldüğü Adana bölgesinden elde edilmiştir.

Elde edilen izolatların, virülensliklerinin ve bitkide oluşturdukları hastalık şiddetlerinin değerlendirilmesi amacıyla patojenite çalışmaları yürütülmüştür. Bu izolatlar, Kütdiken limon fidanlarında %6,7 ve 86,7 arasında değişen oranlarda hastalık şiddeti yaratmışlardır (Çizelge 4.2; Şekil 4.2). Alata 3 (% 6,7) ve Sakızlı (% 6,7) izolatları diğer izolatların yoğun hastalık semptomu gösterdiği süre içerisinde, bitkide çok az miktarda semptom oluşturmuştur. Bunun yanında Seymenli, Çeşmeli 2 ve Dedepınarı 2 izolatları ise bitkide yüksek oranda hastalık

görüntüsü oluşturmuş, hatta bazı tekerrürlerde ölüme neden olmuştur. Bu izolatların oluşturdukları hastalık şiddetleri sırasıyla % 86,7, % 73,3 ve % 66,7 olarak ölçülmüştür. Bunların dışında kalan, Alata 1 (% 13,3); Alata 2 (%46,7); Tömük (%40,0); Tece 1 (%46,7); Koyunlu (%26,7); Çeşmeli 1 (% 53,3); Kargıpınar (%33,3); Tece 2 (%53,3); Yeşilyurt (% 33,3); Dedepınarı 1 (%46,7) izolatları da fidanlarda ortalama değerlerde hastalık şiddeti yaratmışlardır. Bitkilerde uçkurutan hastalığı simptomsu oluşturmayan izolat bulunmamıştır



Şekil 4.1. Uçkurutan Nedeniyle Ölen Bir Limon Ağacı (A) ve Patojenin İletim Demetlerinde Neden Olduğu Renklenme (B)

Patojenite çalışması süresince izolatların nicel ve nitel olarak gözlemleri yapılmıştır. Seymenli izolatının, limon fidanlarında diğer izolatlardan çok daha önce simptomsu görülmeye başlanmıştır. Bu simptomsu hızlı bir şekilde ilerleyerek tüm fidanı sarmış ve bazı tekerrürlerin tamamen kuruyarak ölmesine neden olmuştur. *Phoma tracheiphila*'nın trakeomikoz bir patojen olması nedeniyle, izolatların iletim demetlerinde ilerlemesini hızlandıran bazı yapısal farklılıkları olabilmektedir. Söz konusu izolatın da iletim demetlerinde daha fazla fialokonidi üretmesi ya da toksin üretiminin diğer izolatlara göre fazla olması ihtimalleri bulunmaktadır. Bunun bilgileri ışığında, bitkide oldukça tahripkar olan bu izolat, tez çalışmasının diğer aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

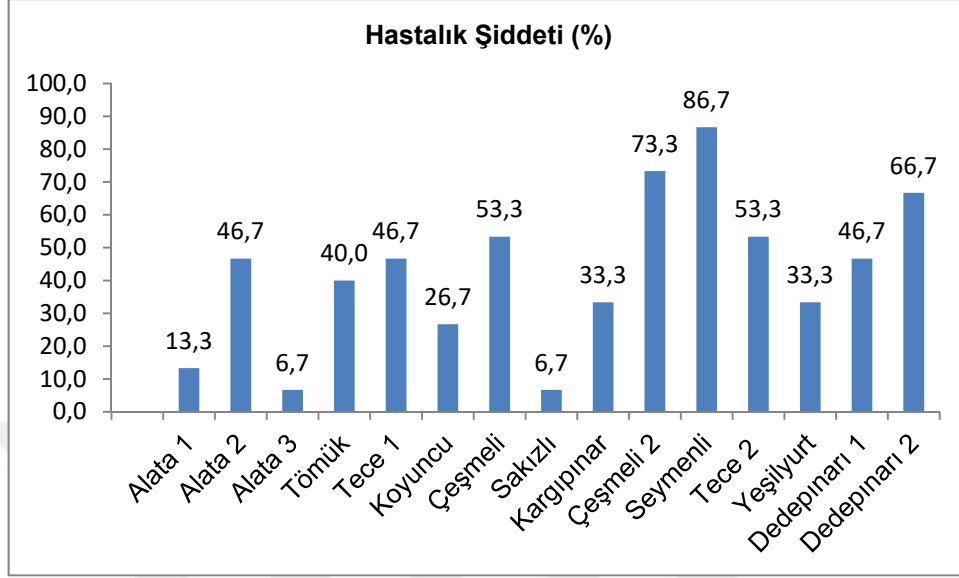
Selda KOZAK ÖZDEMİR

Çizelge 4.1. Hastalıklı Bitki Örneklerinden Elde Edilen *Phoma tracheiphila* İzolatları

İzolat No	İzolat Adı	İl	İzolat No	İzolat Adı	İl
1	Alata 1	Mersin	9	Kargıpınar	Mersin
2	Alata 2	Mersin	10	Çeşmeli 2	Mersin
3	Alata 3	Mersin	11	Seymenli	Mersin
4	Tömük	Mersin	12	Tece 2	Mersin
5	Tece 1	Mersin	13	Yeşilyurt	Mersin
6	Koyunlu	Mersin	14	Dedepınarı 1	Adana
7	Çeşmeli 1	Mersin	15	Dedepınarı 2	Adana
8	Sakızlı	Adana			

Çizelge 4.2. *Phoma tracheiphila* İzolatlarının Bitkide Oluşturduğu Hastalık Şiddeti Değerleri (%)

İzolat Adı	% Hastalık Şiddeti	İzolat Adı	% Hastalık Şiddeti
Alata 1	13,3	Kargıpınar	33,3
Alata 2	46,7	Çeşmeli 2	73,3
Alata 3	6,7	Seymenli	86,7
Tömük	40,0	Tece 2	53,3
Tece 1	46,7	Yeşilyurt	33,3
Koyunlu	26,7	Dedepınarı 1	46,7
Çeşmeli 1	53,3	Dedepınarı 2	66,7
Sakızlı	6,7		



Şekil 4.2. *Phoma tracheiphila* İzolatlarının Bitkide Oluşturduğu Hastalık Şiddeti Değerleri (%)

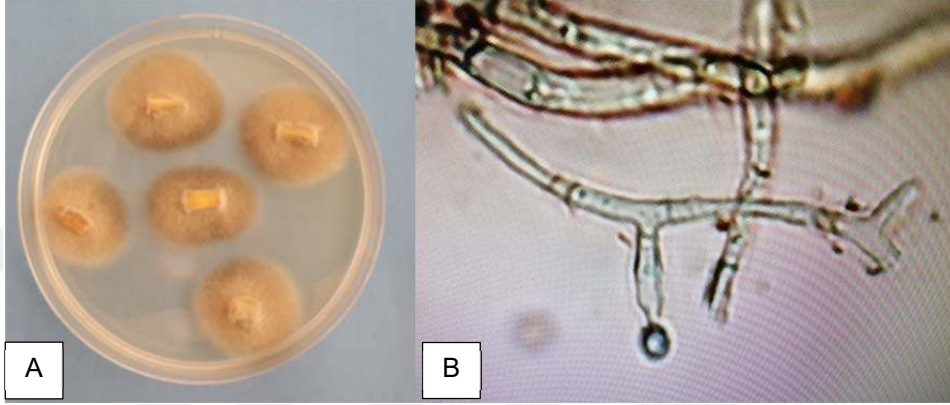
4.2. *Phoma tracheiphila* İzolatlarının Klasik ve Moleküler Tanısı

Makroskobik olarak gözlemi yapılan ve *Phoma tracheiphila* olduğu düşünülen hastalıklı bitki örneklerinin tanılanmasında uygulanan bazı yöntemler bulunmaktadır. Bunlar, fungusun besi yerinde gelişimi sağlandığında oluşturduğu yapıların teşhis edilmesi, besi yerinden alınan örneklerin moleküler olarak analizlerinin yapılması veya hastalıklı örneklerin direkt olarak moleküler analizinin yapılması şeklindedir.

Klasik tanıda, *Phoma tracheiphila*'nın petride yavaş ve sıkı bir miseliyal gelişme göstermesi; koloni renginin başlangıçta kirli beyaz, sonrasında açık kahverengi-yeşil veya turuncumsu tonlarda görünmesi; sert ve koyu renkli piknidyum oluşturmaları; pikniosporların tek hücreli, elipsoid ve hyalin oluşu; kısa fialidler ucunda tek tek hyalin elipsoid tek hücreli fialokonidiler üretmesi özellikleri incelenmektedir (Anonymous, 2015).

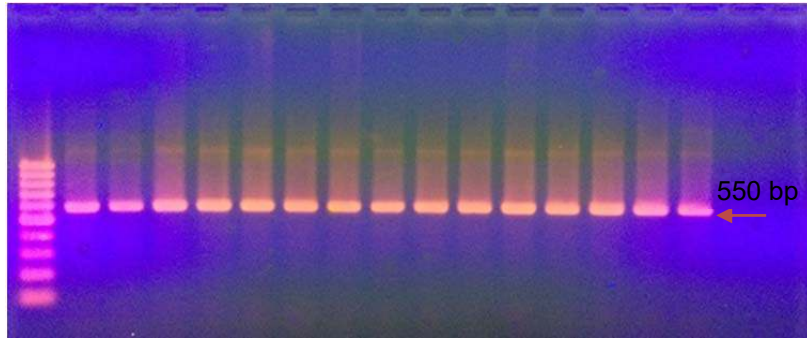
Bu çalışmada, elde edilen izolatların saf kültür olarak PDA besi yerinde üretimi sağlanmış, fungusun gelişiminin 10. gününde belirtilen prosedürler

gözönünde bulundurularak mikroskop incelemeleri yapılmıştır. Petride oluşturduğu görüntü ve mikroskopik olarak yapılan incelemeler sonucunda tüm izolatların *Phoma tracheiphila* olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).

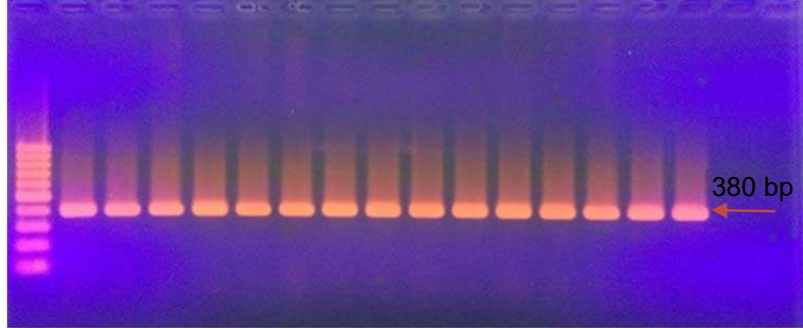


Şekil 4.3. *Phoma tracheiphila*'nın Klasik Tanısında Değerlendirilen Koloni Görüntüsü (A) ve Fialokonidi Yapısı (B)

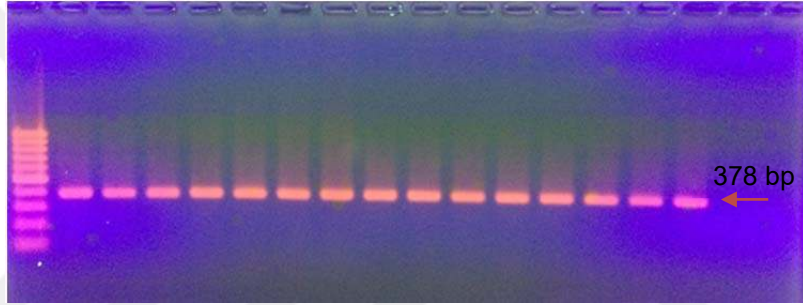
Klasik olarak yapılan tanı çalışmalarına ek olarak, *Phoma tracheiphila* izolatları ile PCR çalışmaları yürütülmüş ve çalışma sonucunda *Phoma tracheiphila*'ya spesifik tüm primer çiftlerinden beklenen PCR ürün bantları görüntülenmiştir (Şekil 4.4- 4.7). Böylece klasik mikolojik yöntemlere göre *Phoma tracheiphila* olarak belirlenen izolatların tanısı, PCR çalışmasıyla da desteklenmiştir.



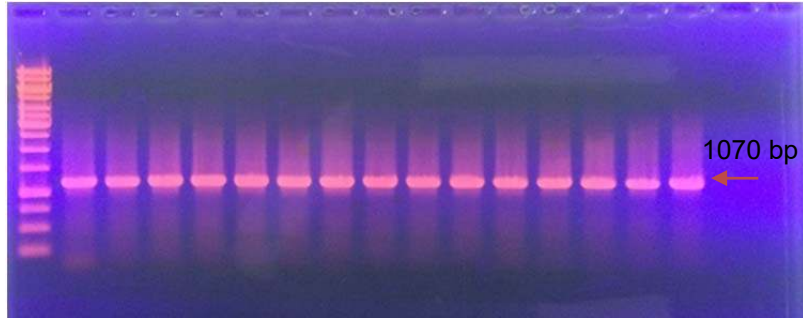
Şekil 4.4. ITS1-ITS4 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonucunda Elde Edilen 550 bp lik DNA Bantları (M: 100bp DNA marker)



Şekil 4.5. P.trach ITS - P.trach ITSF Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonucunda Elde Edilen 389 bp lik DNA Bantları (M: 100bp DNA marker)



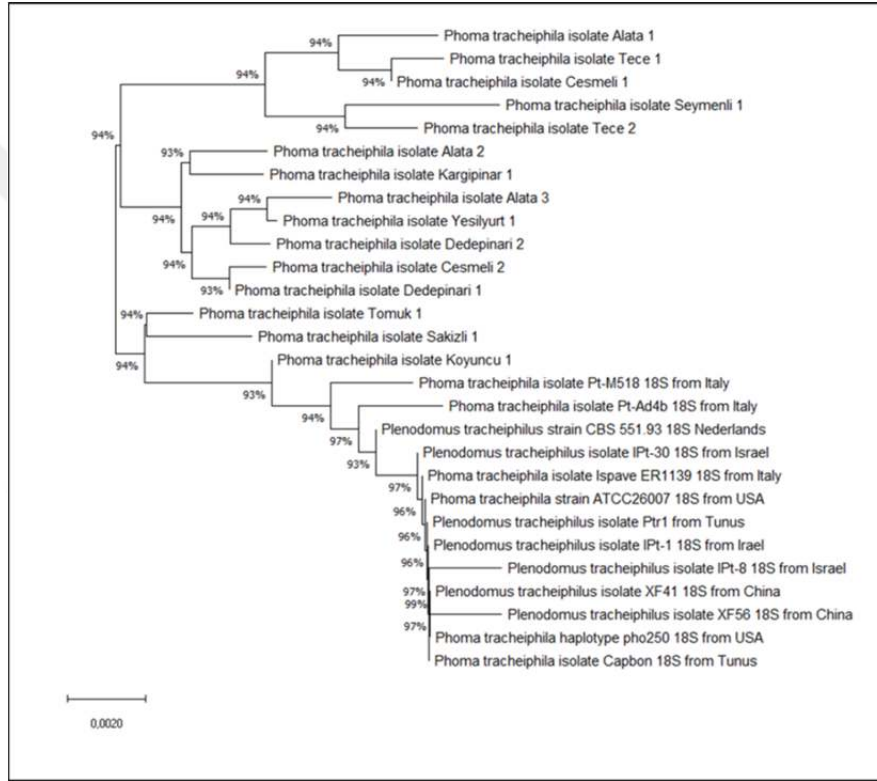
Şekil 4.6. Pt-FOR, Pt-REV2 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonucunda Elde Edilen 378 bp lik DNA Bantları (M:100bp DNA marker)



Şekil 4.7. β .tubulin primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonucunda Elde Edilen 1070 bp lik DNA Bantları (M: 1 kb DNA marker)

Filogenetik ağacı incelediğimizde, genel olarak ağacın iki kısma ayrıldığı ve bir kolda diğer ülkelerin izolatlarının, diğer kolda da bu çalışmada elde edilen

izolatların yer aldığı görülmektedir (Şekil 4.8). Sakızlı, Tömük ve Koyuncu izolatlarının kısmen dünya izolatlarına daha yakın olduğu ve diğer elde edilen izolatların da birbiriyle yakın akraba oldukları görülmüştür. Bu çalışma kapsamlı bir soy analizi olarak analiz edilmemiş, daha çok tanı ve izolatların akrabalıkları üzerine yapılmış bir değerlendirme olarak görülmüştür.



Şekil 4.8. *Phoma tracheiphila* İzolatlarına Ait Filogenetik Ağaç

4.3. Limon Çeşitlerinin *Phoma tracheiphila*'ya Duyarlılığının Belirlenmesi

Bu çalışmada, *Phoma tracheiphila*'nın Enterdonat, Kütdiken, Mayer ve Yediveren limon çeşitlerinde oluşturduğu hastalık şiddeti değerleri belirlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.3 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, Kütdiken, *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu Uç kurutan hastalığına en duyarlı çeşit olarak tespit edilmiştir. *Phoma tracheiphila*, bu çeşitte %88 oranında hastalık

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Selda KOZAK ÖZDEMİR

oluşturmuştur. Öte yandan Yediveren ve Enterdonat çeşitlerinde de az miktarda hastalık belirtileri gözlenmiştir. Fungusun bu çeşitlerde yarattığı hastalık şiddeti sırasıyla %24 ve %12 olarak değerlendirilmiştir.

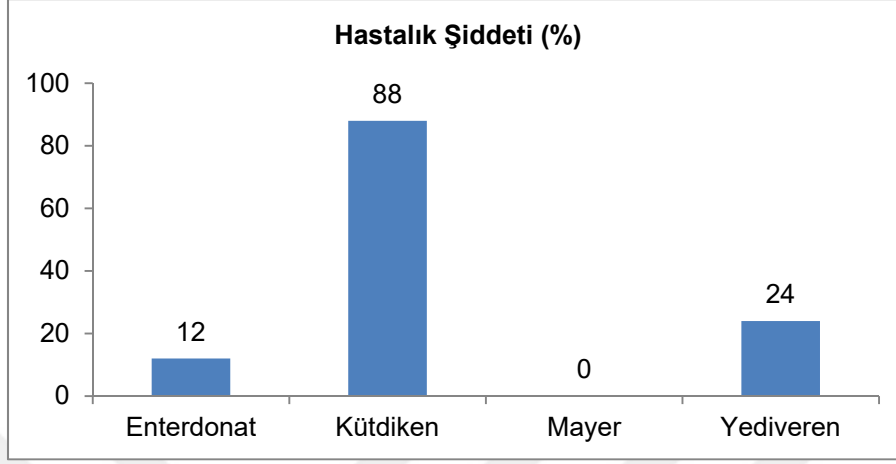
Fungusun inokule edildiği Mayer çeşidi limon fidanlarında ise hastalık gelişimi görülmemiştir. Bu bağlamda, Mayer çeşidinin *Phoma tracheiphila* enfeksiyonlarına karşı dayanıklı olduğunu söylemek mümkündür; fakat doğada hastalık şiddetinin yoğun olduğu zamanlarda bu çeşitte de belirtiler gözlemlenmektedir.

Çizelge 4.3. Limon Çeşitlerinin *Phoma tracheiphila*'ya Duyarlılıkları

İzolat Adı	% Hastalık Şiddeti
Enterdonat	12
Kütdiken	88
Mayer	0
Yediveren	24

Farklı limon çeşitlerinde *Phoma tracheiphila*'ya karşı farklı dayanıklılık/duyarlılık seviyeleri rapor edilmiştir.

Limon yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Akdeniz havzası ülkelerinde kullanılan Feminello grubu limonlar *Phoma tracheiphila*'ya karşı oldukça yüksek duyarlılık göstermektedir (Nigro ve ark., 2011). Bu çalışmada duyarlı olarak bulunan Kütdiken çeşidinin de bu gruptan farklılaşmış bir varyete olduğu bilinmektedir. Öte yandan bu çalışmada toleran olarak tespit edilen enterdonat çeşidi de patojene karşı dayanıklı veya toleran olarak kabul edilmektedir. Akdeniz havzası limon üretiminde enterdonat ile birlikte Monachello çeşitleri dayanıklı çeşitler olarak bilinmekle beraber bazı çeşit özelliklerindeki olumsuzluklar nedeniyle üretimde kullanımları kısıtlıdır (Salerno ve Cutuli, 1976; Cutuli, 1979).



Şekil 4.9. Limon Çeşitlerinin *Phoma tracheiphila*'ya Duyarlılıkları

4.4. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların *in vitro*' da *Phoma tracheiphila* Üzerine Etkileri

4.4.1 Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların *Phoma tracheiphila*'nın Miseliyal Gelişmesi Üzerine Etkileri

Bitkilerde önemli zararlara neden olan patojenlere karşı kullanılması düşünülen kimyasalların öncelikli olarak *in vitro* koşullarda denenmesi gerekmektedir. Bu çalışmaların laboratuvar ortamında yapılması, küçük alanlarda fazla tekrerr sayılarının kullanılması, daha hızlı sonuçlar alınması, daha ekonomik olması ve doğada olası bir zararlanmanın önüne geçilmesi açısından önem arz etmektedir. Söz konusu olan dayanıklılığı teşvik eden kimyasallar olduğunda ise kimyasalların sadece patojenle karşı karşıya gelmesi durumu yeterli olmamaktadır. Bitkinin içinde bulunduğu ortam, bitkinin iç dinamikleri, bitki-patojen arasındaki etkileşim bir bütün olarak bu kimyasalların etki mekanizmasında etkin olarak rol oynamaktadır. Bununla birlikte, bu kimyasalların *in vivo* çalışmalarının yanında negatif kontrol olarak dahi olsa *in vitro* çalışmaların yapılması önemli bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, bitkilerde dayanıklılık teşvik edici özelliği olduğu bilinen Acibenzolar S-Methyl (ASM), DL-β-amino-n-butyric asit (BABA),

Fosetyl- Al ve Salisilik asit (SA) kimyasallarının PDA besi ortamında *Phoma tracheiphila*'nın miseliyal gelişimine olan etkileri belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

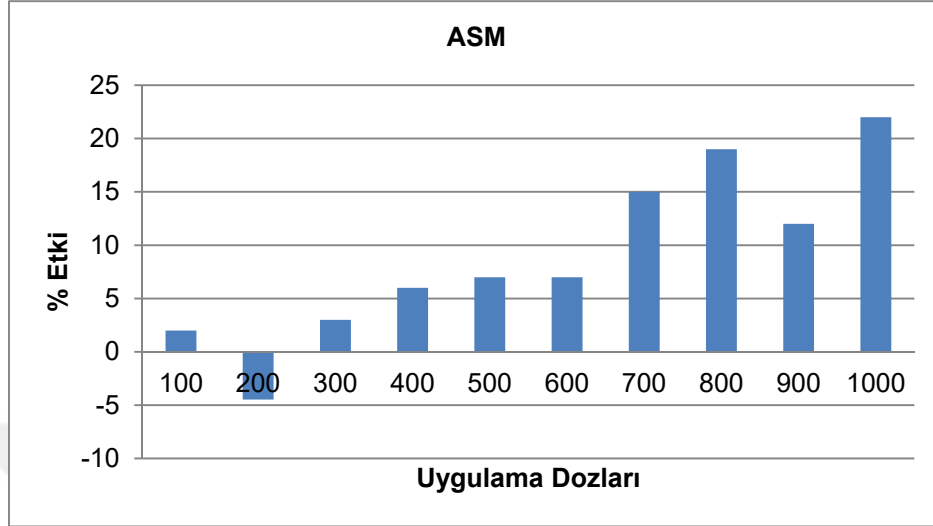
Çizelge 4.4. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Farklı Konsantrasyonlarının *Phoma tracheiphila*'nın Miseliyal Gelişimine Etkisi

Konsantrasyon (ppm)	ASM		BABA	
	Miseliyal Gelişme (mm)	% Etki	Miseliyal Gelişme (mm)	% Etki
0	40,3 d*		36,4 b	
100	39,5 d	2,0	43,5 d	-19,5
200	42,1 e	-4,5	41,7 cd	-14,6
300	39,0 d	3,2	40,4 bcd	-11,0
400	37,8 cd	6,2	42,6 d	-17,0
500	37,5 c	6,9	48,6 e	-33,5
600	37,6 c	6,7	36,6 b	-0,5
700	34,2 b	15,1	40,7 cd	-11,8
800	32,7 a	18,9	37,7 bc	-3,6
900	35,4 b	12,2	30,0 a	17,6
1000	31,6 a	21,6	29,0 a	20,3

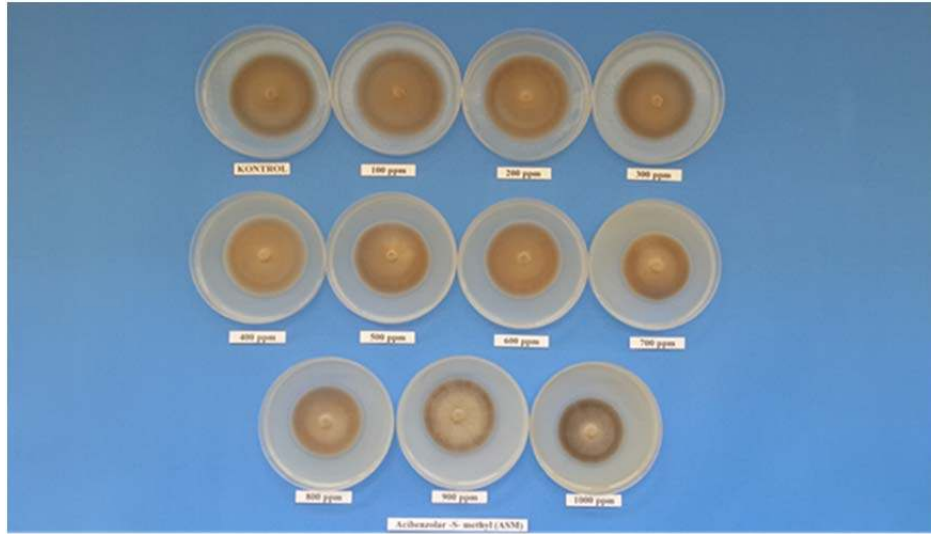
Konsantrasyon (ppm)	Fosetyl- Al		SA	
	Miseliyal Gelişme (mm)	% Etki	Miseliyal Gelişme (mm)	% Etki
0	47,1 e		34,7 bc	
100	14,0 d	70,3	29,6 b	14,7
200	16,0 d	66,0	32,6 bc	6,1
300	7,2 bc	84,7	33,7 bc	2,9
400	8,2 c	82,6	41,3 c	-19,0
500	2,2 ab	95,3	27,0 b	22,2
600	0,0 a	100,0	26,5 b	23,6
700	0,0 a	100,0	16,7 a	51,9
800	0,0 a	100,0	26,8 b	22,8
900	0,0 a	100,0	29,0 b	16,4
1000	0,0 a	100,0	26,2 b	24,5

* Her uygulama kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilere göre, ASM uygulaması *Phoma tracheiphila*'nın miseliyal gelişimini %2 ve %21,6 arasında değişen oranlarda azaltıcı etkide bulunmuştur (Şekil 4.10-4.11). Farklı konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak fark olduğu görülmüş olup, azaltıcı etki genellikle artan dozlarla birlikte artmıştır.



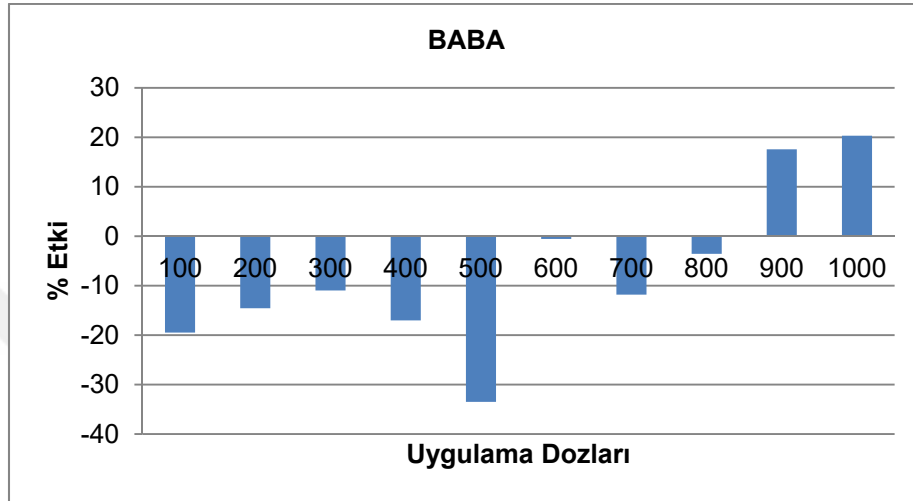
Şekil 4.10. ASM'nin Farklı Dozlarının *Phoma tracheiphila*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi



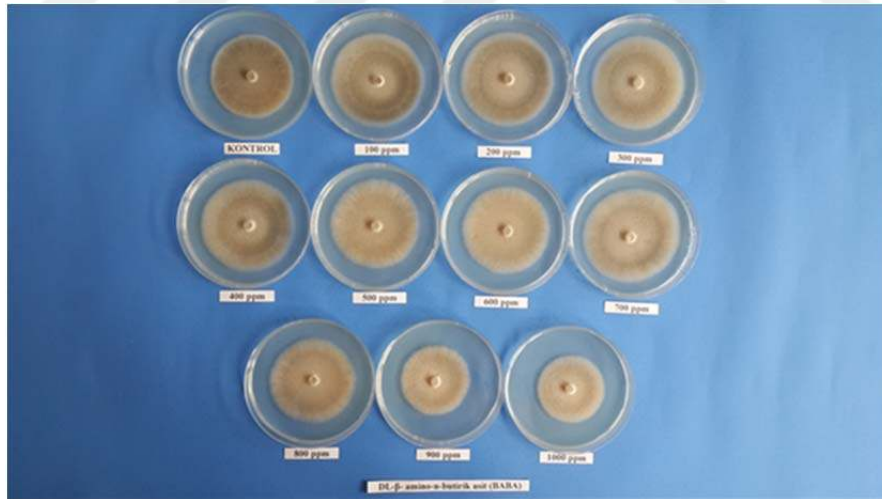
Şekil 4.11. ASM'nin *Phoma tracheiphila*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi

BABA uygulamasında, tüm dozlar kontrol uygulamasından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur, fakat 100 ile 800 ppm arasındaki dozların *Phoma tracheiphila* üzerindeki etkisi artırıcı yönde olmuştur (Şekil 4.12-4.13). 900 ve

1000 ppm dozları ise sırasıyla % 17,6 ve %20,3 oranlarında patojenin gelişimini engellemiştir.



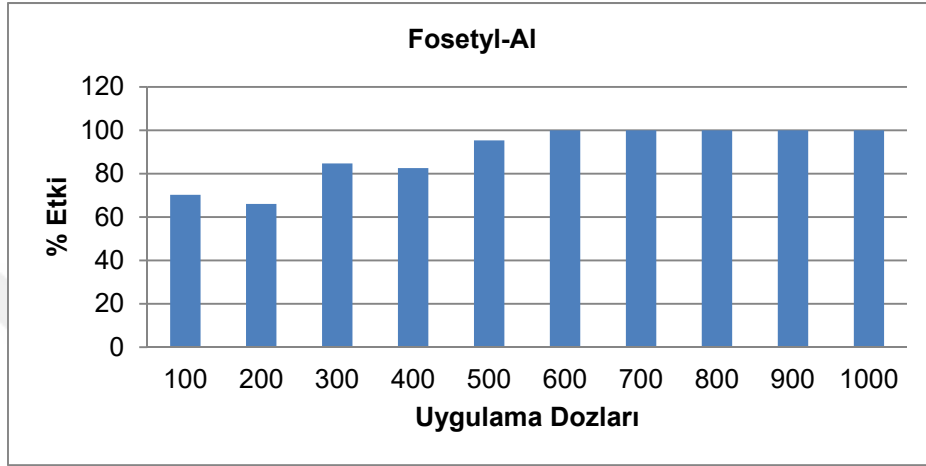
Şekil 4.12. BABA'nın Farklı Dozlarının *Phoma tracheiphila*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi



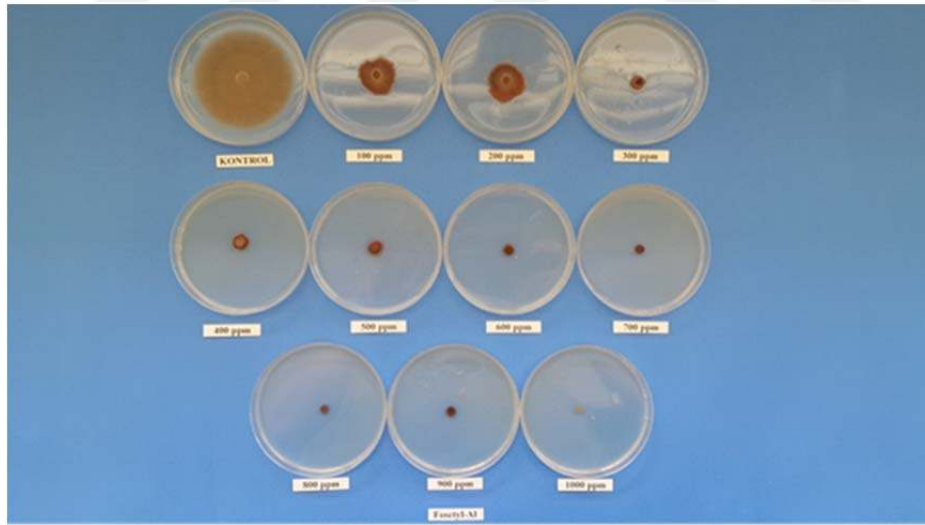
Şekil 4.13. BABA'nın *Phoma tracheiphila*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi

Fosetyl- Al, çalışmada kullanılan dayanıklılık teşvik ediciler arasında en etkili kimyasal olarak bulunmuştur. Patojen üzerindeki azaltıcı etkisi 100 ppm

konsantrasyonda bile %70,3 olmuştur (Şekil 4.14-4.15). Bu kimyasal, 600 ppm’ den sonra patojenin gelişimini tamamen durdurmuştur.



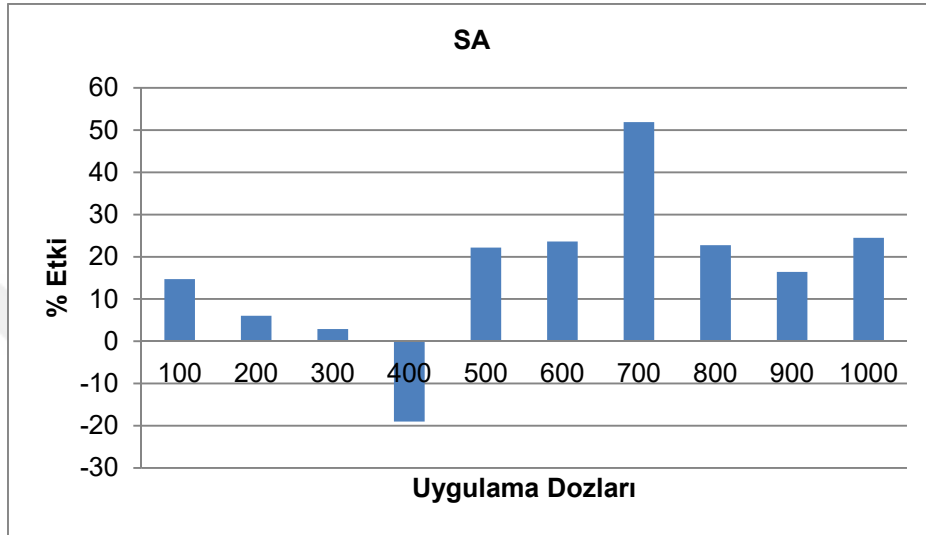
Şekil 4.14. Fosetyl-Al’nin Farklı Dozlarının *Phoma tracheiphila*’nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi



Şekil 4.15. Fosetyl-Al’nin *Phoma tracheiphila*’nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi

Çalışmada kullanılan diğer bir dayanıklılık teşvik edici olan SA, farklı konsantrasyonlarda istatistiksel olarak farklı etkiler göstermiştir (Şekil 4.16-4.17).

Bu etki %6,1 ile %51,9 arasında değişen oranlarda ölçülmüştür. Uygulama dozunun artması ile engelleyici etki arasında herhangi bir bağ bulunamamıştır.



Şekil 4.16. SA'nın Farklı Dozlarının *Phoma tracheiphila*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi



Şekil 4.17. SA'nın *Phoma tracheiphila*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi

Dayanıklılık teşvik edici kimyasalların patojenler üzerinde direkt olarak etkisinin bulunmadığı; bitkideki bazı dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirerek hastalık oluşumunu engellediği bilinmektedir. Bu kimyasallarla yapılan *in vitro* çalışmalarda genellikle ASM, BABA ve SA'nın etkisiz kaldığı, Fosetyl-Al'nin ise diğer kimyasallara göre fark yarattığı bildirilmiştir (Şahbaz ve Akgül, 2016; Erkılıç ve ark., 2018; Aysan ve ark., 2019)

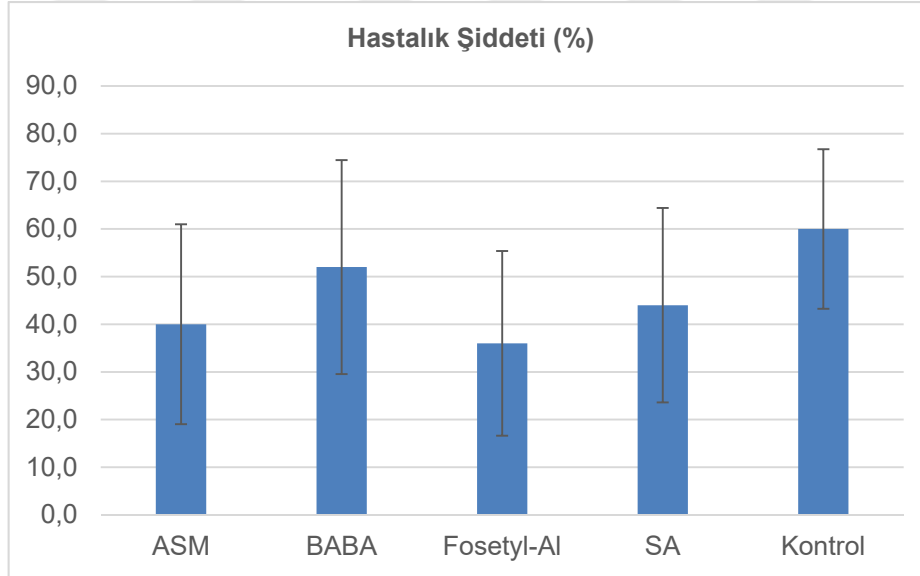
Bitki aktivatörlerinin *Rhizoctonia solani*'nin miseloyal gelişimine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada, Salisilik Asit ve Fosetyl-Al 700 ppm'in üzerindeki konsantrasyonlarda patojen gelişimini baskılarken diğer bitki aktivatörleri (Acibenzolar S-Methyl, Messenger, ISR 2000 ve Crop Set) patojene herhangi bir etkide bulunmamıştır (Aysan ve ark., 2019). Erkılıç ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde *in vitro*'da Fosetyl-Al'nin 1000 ppm dozu, *Verticillium dahliae*'nin miseloyal gelişimini tamamen engellemiştir. ASM, SA ve BABA kimyasallarının ise miseloyal gelişime etkisi ya olmamış ya da çok az olmuştur. Şahbaz ve Akgül (2016) ise dayanıklılığı teşvik edici ürünlerin (Fosetyl-Al, ASM, ISR-2000 ve salisilik asit), *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* ve *Verticillium dahliae*'nin miseloyal büyümesi üzerine hiçbir etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

4.4.2. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Limon Fidanlarında *Phoma tracheiphila*'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkileri

Limon fidanlarında *Phoma tracheiphila*'nın hastalık oluşturmaya etkilerini değerlendirmek amacıyla ASM, BABA, Fosetyl-Al ve SA kimyasallarının kullanıldığı denemeler yapılmıştır. Buna göre, dayanıklılık teşvik edici uygulanmış bitkilerde hastalık şiddeti kontrole oranla daha az oranda olmuştur. Kontrol bitkilerde %60 hastalık şiddeti elde edilirken, Fosetyl-Al uygulamasında bu oran %36 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5; Şekil 4.18). ASM, SA ve BABA uygulamalarında ise hastalık şiddeti sırasıyla % 40, 4 ve 52 oranında olmuştur.

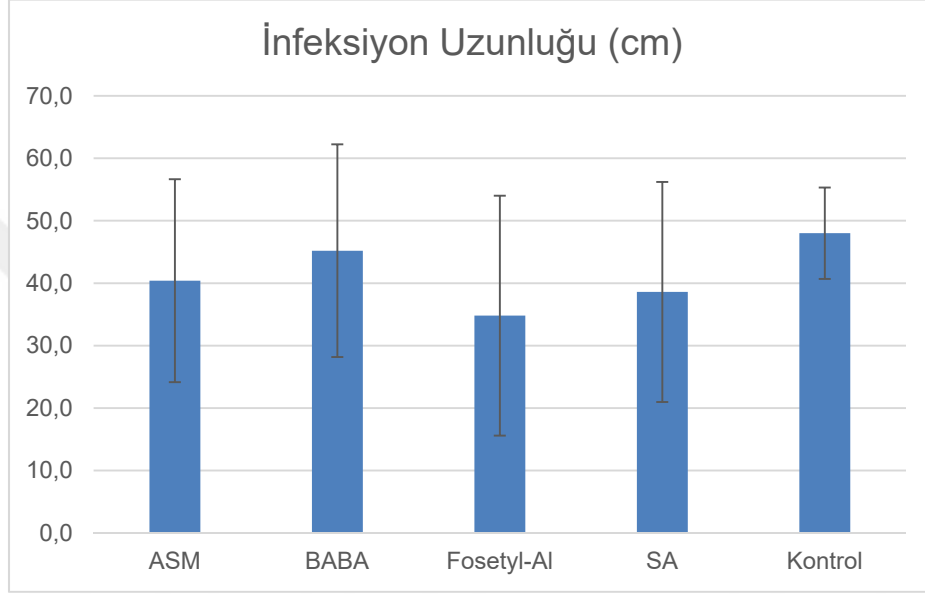
Çizelge 4.5. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların *Phoma tracheiphila*'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkisi

Uygulamalar	Hastalık Şiddeti		İnfeksiyon	
	(%)	Etki (%)	Uzunluğu (cm)	Etki (%)
ASM	40 a	33,3	40,4	15,8
BABA	52 a	13,3	45,2	5,8
Fosetyl-Al	36 a	40,0	34,8	27,5
SA	44 a	26,7	38,6	19,6
Kontrol	60 a		48,0	

Şekil 4.18. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların *Phoma tracheiphila* Üzerine Etkisi

Çalışma sonucunda yapılan istatistik analize göre, tekerrürler arasında varyansın yüksekliği nedeniyle, dayanıklılık teşvik edici kimyasal uygulamaları arasında fark bulunamamıştır. Bununla birlikte, Fosetyl-Al'nin hastalık şiddetini azaltıcı etkisi % 40 düzeyinde bulunmuştur. Benzer olarak ASM'nin de hastalık şiddetini %33,3 oranında azaltıcı etkide bulunduğu görülmüştür. Ayrıca patojenin

iletim demetlerinde oluşturduğu infeksiyonun ilerlemesi ölçüldüğünde de Fosetyl-Al uygulanan bitkilerde infeksiyon oluşumunun daha az olduğu ve infeksiyon uzunluğuna %27,5 oranında etki ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasal Uygulaması Yapılan Bitkilerde *Phoma tracheiphila* İnfeksiyonunun Gelişimi

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, meyve ağaçlarında çeşitli patojenlere karşı farklı dayanıklılık teşvik edici kimyasallar uygulanmıştır. Genel olarak bu çalışmaların sonuçları pozitif olarak sunulmuş, bu kimyasalların patojenler üzerinde azaltıcı etkileri bildirilmiştir. β -amino N- Butyric acid (BABA), 2,1,3-benzothiadiazole (BTH) ve 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) dayanıklılık teşvik edici kimyasallarının tek ya da kombinasyon halinde uygulanmasının turuncgil yeşillenme (Citrus Greening) hastalığını baskılamada etkili olduğu bildirilmiştir. Bu uygulamaların kontrole oranla hastalık şiddetini %15- 30 oranlarında azalttığını, dayanıklılık teşvik edici kimyasalların turuncgil yeşillenme hastalığı kontrolünde kullanılmasının uygun olacağı önerilmiştir (Li ve ark., 2016). Benzer

olarak, turunçgillerde önemli zararlar yaratan patojenler *Elsinoe fawcettii*, *Diaporthe citri* ve *Alternaria alternata* pv. *citri* için bitkilere uygulanan çeşitli dayanıklılık teşvik edici kimyasallar içinde ASM ve Fosetyl-Al'nin en etkili olduğu belirtilmiş ve konukçudaki dayanıklılığı teşvik eden ürünlerin turunçgillerde entegre mücadelede standart fungusitlerle birlikte kullanılabileceği bildirilmiştir (Agostini ve ark., 2003). Yapılan başka bir çalışmada, *Verticillium dahliae*'ya karşı Salisilik asit (SA), DL-β-amino-n-butyric asit (BABA) ve Acibenzolar S-Methyl (ASM) ve Fosetyl-Al kimyasallarının toprak uygulamalarının daha etkili olduğu bulunmuş ve ASM, *Verticillium dahliae*'nın hastalık şiddetini %80 oranında engellemiş, Fosetyl-Al ve SA'nın *Verticillium dahliae*'nin kontrolünde ümitvar bulgular gösterdiği bildirilmiştir (Erkiliç ve ark., 2018).

4.5. Mikorizal Fungusların *Phoma tracheiphila* Üzerine Etkileri

4.5.1. Mikorizal Fungus Üretimi ve Turunç Çöğürlerindeki Kolonizasyonu

Mikorizal fungusların patojen ve fenoliklerle olan ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla, öncelikle mikorizal fungusların stok kültürlerinden üretimleri yapılmıştır. Daha sonra bu mikorizal inokulumlardaki spor yoğunlukları ve köklerde oluşturdıkları kolonizasyon oranları belirlenmiştir.

Mikorizal fungus inokulumlarındaki sporların elde edildiği izolasyonlar sonucunda 10 g toprakta bulunan spor miktarları tür bazında belirlenmiştir. İnokulumunda en yüksek miktarda spor bulunduran mikorizal fungus *Glomus caledonium* (254spor/10 g toprak) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Bunu takip eden miktar 212 spor/10 g toprak olarak *Glomus mosseae* inokulumunda ölçülmüştür. *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum* ve *Glomus clarium* türlerinde ise sırasıyla, 198, 187 ve 165 spor/10 g toprak olarak sayım yapılmıştır. *Glomus intraradices* inokulumunda ise spor miktarı bir hayli az olarak gözlenmiş ve 149 spor/10 g toprak sayılmıştır.

Mikorizal kolonizasyonun sağlandığı turunç çöğürü köklerinde izolasyonlar yapılmıştır. Buna göre köklerdeki mikorizal kolonizasyon tüm

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Selda KOZAK ÖZDEMİR

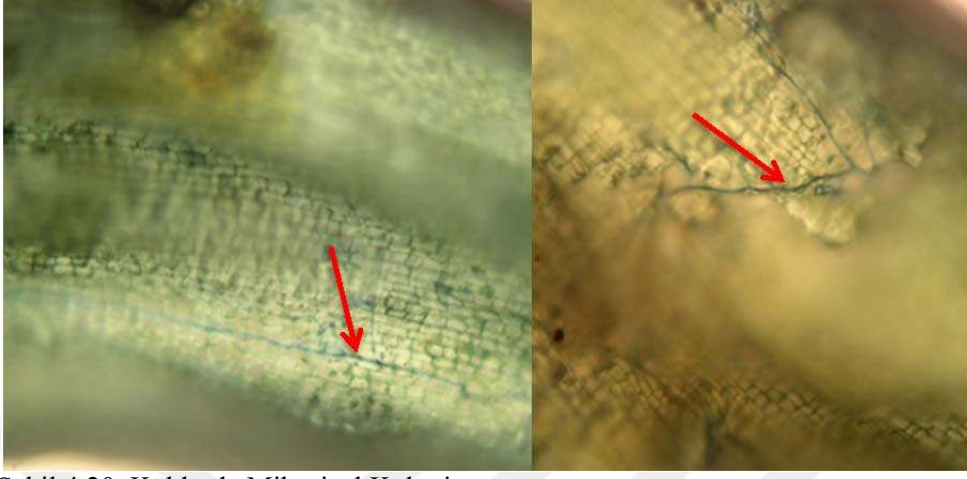
funguslarda %40'ın üzerinde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.7; Şekil 4.20). Köklerde en fazla bulunan mikorizal fungus, *Glomus caledonium* (%66) olurken, en az kolonizasyon oluşturan ise *Glomus mosseae* (% 42) olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında *Glomus fasciculatum* ve *Glomus clarium* da köklerde %57 oranında bulunmuştur. Bunları *Glomus intraradices* ve *Glomus etunicatum* mikorizal fungusları takip etmiş, sırasıyla %52 ve %46 oranlarında kökte kolonize olmuşlardır.

Çizelge 4.6. Mikorizal Fungus Stok Kültüründe Bulunan Spor Miktarı (10 g toprak)

Mikorizal Fungus	Spor Sayısı (10 g toprak)
<i>G. calodonium</i>	254
<i>G. clarium</i>	165
<i>G. etunicatum</i>	198
<i>G. fasciculatum</i>	187
<i>G. intraradices</i>	149
<i>G. mosseae</i>	212

Çizelge 4.7. Mikorizal Fungus Türlerinin Turunç Çöğürlerinin Köklerinde Oluşturduğu Kolonizasyon Oranları (%)

Mikorizal Fungus	Kolonizasyon Oranı (%)
<i>G. caledonium</i>	66
<i>G. clarium</i>	57
<i>G. etunicatum</i>	46
<i>G. fasciculatum</i>	57
<i>G. intraradices</i>	52
<i>G. mosseae</i>	42



Şekil 4.20. Köklerde Mikorizal Kolonizasyon

Bitkilerin mikorizal funguslara olan gereksinimleri, kök yapısına, yaşadığı çevreye, morfolojik yapısına ve çeşit özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda turunçgillerin mikorizal funguslara ihtiyaç duyduğu, turunç anacının mikorizal funguslarla yüksek etkileşim içinde olduğu bildirilmiştir (Ortaş ve ark., 2002b). Watanarajanaporn ve ark. (2011), turunçgil köklerinden 13 farklı mikorizal tür elde etmiş ve bunları 3 farklı turunçgil türünde (Shogun: *Citrus reticulata* Blanco cv. Shogun; Tangerine: *Citrus reticulata*; C-35 Citrange: *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) test etmişlerdir. Bu mikorizal funguslardan turunçgillerde en iyi kolonizasyon oranının *Glomus etunicatum* ve *Acaulospora tuberculata* mikorizal fungusları tarafından oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ortaş ve ark. (2002a) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, turunçgil fidanlarında beş farklı mikoriza türü test edilmiş ve en iyi kolonizasyonun *Glomus clarium* tarafından gerçekleştirildiği ve bunu *Glomus mossea*, *Glomus caledonium* ve *Glomus etunicatum*'un izlediği bildirilmiştir.

4.5.2. Mikorizal Fungusların *Phoma tracheiphila*'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkileri

Mikorizal fungusların bitki besleme açısından bitkilere sağladığı katkıların yanında toprak kökenli patojenlerle olan ilişkisi çok uzun zamandır bilinmekte ve incelenmektedir. Havai kökenli funguslarla olan etkileşimleri ise kabul edilmekle birlikte bu konuda çok az çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar da genellikle tek yıllık bitkileri konu almış, çok yıllık bitkilerdeki etkileri konusunda yetersiz çalışma mevcuttur. Bu açıdan turuncgillerde *Phoma tracheiphila* üzerine yapılan bu çalışma önem kazanabilmektedir.

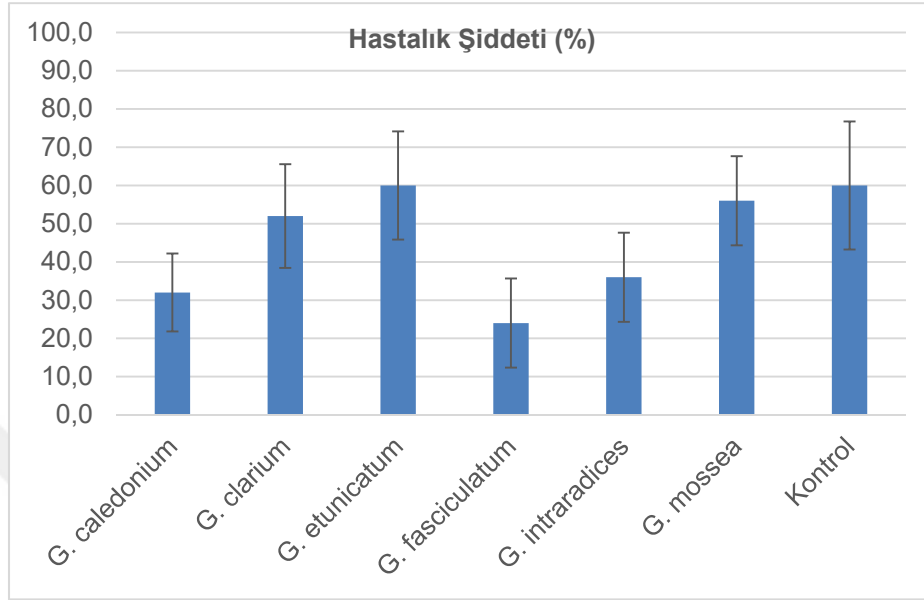
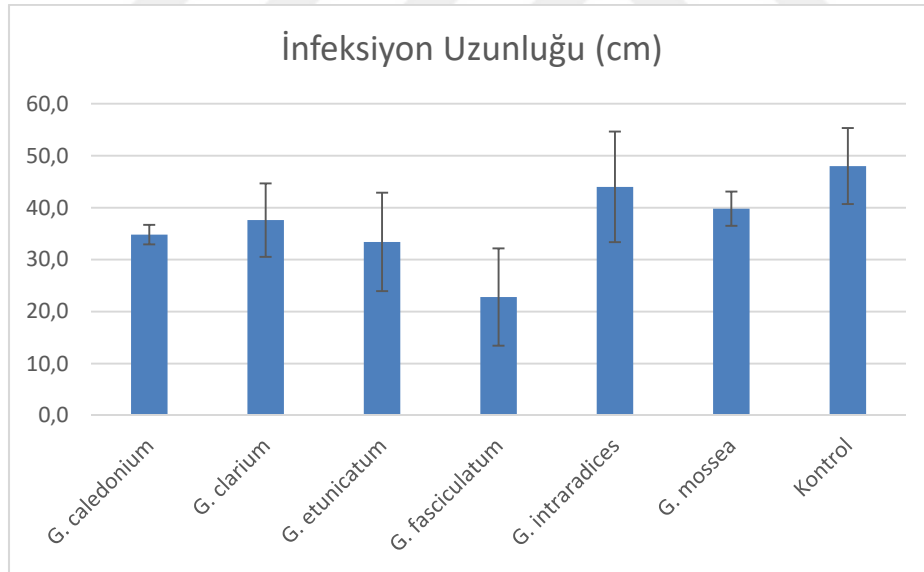
Bu çalışmada, bitkilerle mikorizal birliktelik kuran *Glomus* cinsine ait *G. caledonium*, *G. clarium*, *G. etunicatum*, *G. fasciculatum*, *G. intraradices* ve *G. mosseae* funguslarının *Phoma tracheiphila* üzerine etkileri Çizelge 4.8 ve Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Buna göre, patojen üzerinde en fazla etkiyi, *Glomus fasciculatum* oluşturmuş ve bu mikorizanın uygulandığı bitkilerde hastalık şiddeti % 24 olarak belirlenmiştir. Bunu *Glomus caledonium* (%32,0) ve *Glomus intraradices* (36,0) takip etmiştir. *Glomus clarium*, *Glomus mosseae* ve *Glomus etunicatum* uygulamalarında ise sırasıyla %52, %56 ve %60 hastalık şiddeti değerleri saptanmıştır.

Çizelge 4.8. Mikorizal Fungusların *Phoma tracheiphila*'nın Hastalık Oluşturması Üzerine Etkisi

Uygulamalar	Hastalık Şiddeti (%)	Etki %	İnfeksiyon	
			Uzunluğu (cm)	Etki %
<i>G. caledonium</i>	32 a	46,7	34,8	27,5
<i>G. clarium</i>	52 a	13,3	37,6	21,7
<i>G. etunicatum</i>	60 a	0,0	33,4	30,4
<i>G. fasciculatum</i>	24 a	60,0	22,8	52,5
<i>G. intraradices</i>	36 a	40,0	44,0	8,3
<i>G. mossea</i>	56 a	6,7	39,8	17,1
Kontrol	60 a		48,0	

Çalışmada kullanılan mikorizal fungus uygulamaları arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır; fakat mikorizalar, genel olarak sadece patojen uygulanmış kontrole göre hastalığı azaltıcı yönde etki göstermiş. Bu etki, *Glomus fasciculatum*'da %60 olarak ölçülmüştür. Ek olarak bu fungusun uygulandığı bitkilerde infeksiyon uzunluğunun kontrole göre oldukça düşük olduğu, iletim demetinde ilerleme miktarına %52,5 oranında etki ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.22).

Bu çalışmayla benzer olarak yapılan bir araştırmada, fosfor gübrelemesi yapılmış toprakta, *Phytophthora parasitica* ve mikorizal fungus *Glomus fasciculatum* ile infekte edilmiş olan portakal fidanlarının (*Citrus sinensis*) kontrole oranla daha sağlıklı olduğu belirtilmiştir (Davis ve Menge, 1980). Diğer bir çalışmada ise *Glomus etunicatum* ve *Acaulospora tuberculata* mikorizal funguslarının kolonizasyonun sağlandığı Shogun / C-35 citrange anaç kombinasyonlarında düşük seviyede *Phytophthora nicotianae* kök çürüklüğü belirtilen semptomları görülmüştür. Bu mikorizal fungusların turuncgil bahçeleri için muazzam bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Watanarajanaporn ve ark., 2011). *Verticillium dahliae* ve *Glomus mosseae* ile inokule edilen zeytin fidanlarında sadece patojen inokulasyonu yapılan kontrol bitkilere oranla daha düşük hastalık şiddeti ölçülmüştür (Karajeh ve Al-Raddad,1999). Benzer şekilde muz bitkisinde *Cylindrocladium spathiphylli*'nin neden olduğu kök zararı *Glomus preliiferum*, *Glomus intraradices* ve *Glomus versiforme* mikorizal funguslarının varlığında azalmıştır (Derlerck ve ark., 2002).

Şekil 4.21. Mikorizal Fungusların *Phoma tracheiphila* Üzerine EtkisiŞekil 4.22. Mikorizal Fungus Uygulaması Yapılan Bitkilerde *Phoma tracheiphila* İnfeksiyonunun Gelişimi

4.6. Limon Fidanlarında Fenolik Bileşiklerin Değişimlerinin Belirlenmesi**4.6.1. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Fenolik Bileşikler Üzerine Etkileri**

Dayanıklılık teşvik edici kimyasalların bitkilerde savunma mekanizmasında görev yapan fenolik bileşiklerin miktarı üzerine etkileri patojen varlığında ve patojen yokluğunda ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

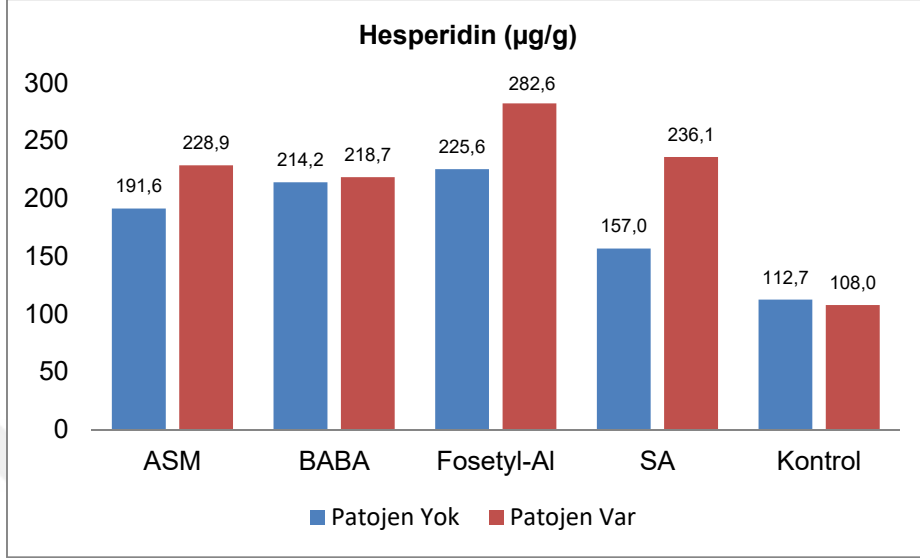
Dayanıklılık teşvik edici kimyasal uygulamaları yapılan tüm bitkilerde, hesperidin miktarı kontrolden yüksek ölçülmüş ve uygulamalar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur. Patojen yokluğunda kontrole göre hesperidin miktarını en fazla artıran Fosetyl-Al (225,56 µg/g) ve BABA (214,2 µg/g) olmuştur. ASM ve SA uygulamalarında ise hesperidin miktarı sırasıyla 191,55 µg/g ve 156,98 µg/g ölçülmüştür.

Patojen varlığında yine Fosetyl-Al (282,58 µg/g) hesperidin üzerinde en etkili kimyasal olmuştur (Çizelge 4.9; Şekil 4.23). ASM ve SA uygulamalarında da 228,93 µg/g ve 236,13 µg/g hesperidin miktarları ölçülmüştür. BABA uygulamasında (218,7 µg/g) diğer kimyasallara göre düşük hesperidin miktarı olmasına rağmen kontrole oranla yüksek bir fark yaratmıştır.

Çizelge 4.9. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Hesperidin Miktarı Üzerine Etkisi

Kimyasallar	Patojen Yok	Değişim Oranı (%)	Patojen Var	Değişim Oranı (%)
ASM	191,6 b*	70,0	228,9 b	112,1
BABA	214,2 a	90,1	218,7 c	102,6
Fosetyl-Al	225,6 a	100,1	282,6 a	161,7
SA	157,0 c	39,3	236,1 b	118,7
Kontrol	112,7 d		108,0 d	

* Her uygulama kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.23. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Hesperidin Miktarı Üzerine Etkisi

Bir diğer fenolik bileşik olan limonin üzerinde kontrole oranla kimyasal uygulamalarının artışa neden olduğu; fakat bu değişim oranının çok yüksek miktarlar olmadığı görülmüştür. Patojenin olmadığı durumda en yüksek artırıcı etkiyi Fosetyl- Al (21,39 µg/g) yaratmıştır (Çizelge 4.10; Şekil 4.24). Bunu SA ve BABA uygulamaları 18,3 µg/g ve 17,2 µg/g değerleri ile izlemiştir.

Patojen varlığında ise ASM (25,76 µg/g) uygulaması limonin miktarı üzerinde en etkili kimyasal olmuştur. Ayrıca SA (24,3 µg/g) uygulamasının da bitkilerde limonin miktarında artışa neden olduğu görülmüştür. BABA uygulamasında ise limonin miktarında kontrole göre azalma görülmüştür.

Dayanıklılık teşvik edici kimyasalların patojen uygulanmadığı durumda scoparone miktarı üzerinde bir etkisi olmamıştır (Çizelge 4.11; Şekil 4.25). Tüm uygulamalarda kontrole göre düşük miktarlar ölçülmüştür.

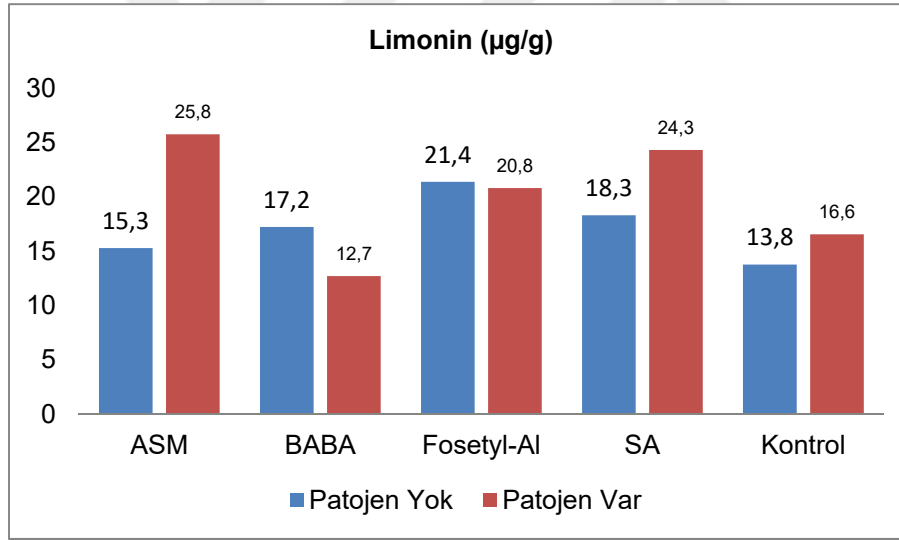
Patojen varlığında ise ASM (3,22 µg/g) uygulaması tüm uygulamalara ve kontrole göre ciddi oranda yüksek etki göstermiştir. SA ve BABA uygulamaları da

scoparone üzerinde bir miktar etki yaratmıştır. Fosetyl-Al uygulaması ise yüksek bir etki göstermemiş, istatistiki olarak kontrolle aynı grupta değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.10. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Limonin Miktarı Üzerine Etkisi

Kimyasallar	Patojen Yok	Değişim Oranı (%)	Patojen Var	Değişim Oranı (%)
ASM	15,3 c*	11,1	25,8 a	55,6
BABA	17,2 b	25,2	12,7 d	-23,2
Fosetyl-Al	21,4 a	55,3	20,8 c	25,8
SA	18,3 b	33,0	24,3 b	46,9
Kontrol	13,8 c		16,6 d	

* Her uygulama kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.24. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Limonin Miktarı Üzerine Etkisi

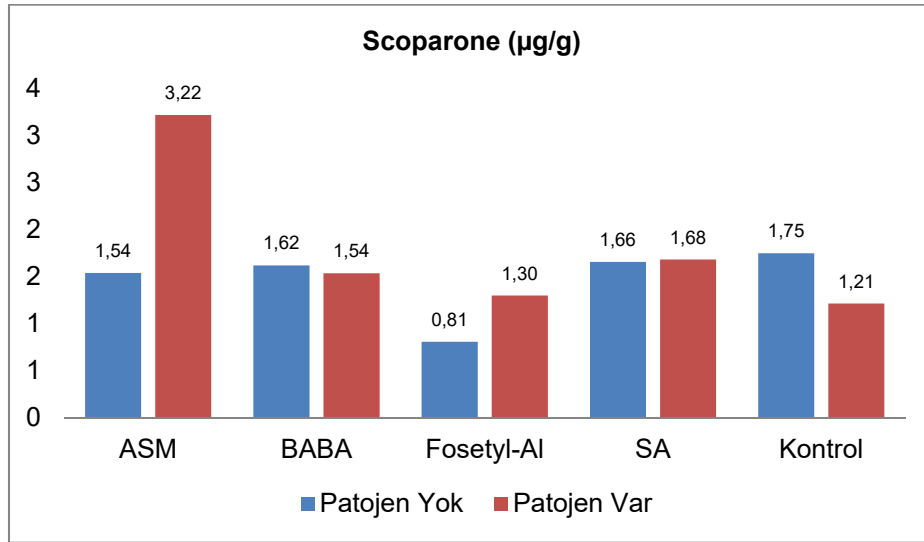
Turunçgillerde yapılan bir çalışmada, Fosetyl-Al uygulamasının, *Phytophthora nicotianae* uygulanan toleranslı Swingle, Macrophylla, Troyer ve Turunç, hassas Kaba limon ve Volkameriana, orta toleranslı Carrizo ve C35 anaçlarında, patojen uygulanmamış kontrole göre toplam fenoliklerin 2,2 kat

artışını uyardığı bildirilmiştir (Fourie, 2004). Turunçgillerde scoparonun Fosetyl-Al ile etkileşiminin incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, *Phytophthora citrophthora*'ya dayanıklı olan Macrophylla ve Turunç ile duyarlı olan kaba limon anacında infekteli dokuya uygulanan Fosetyl-Al, scoparone düzeyini 2-4 katına kadar yükseltmiş ve bu fidanlarda lezyon alanı, hızlı bir şekilde azalmıştır (Afek ve Szejnberg, 1989).

Çizelge 4.11. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Scoparone Miktarı Üzerine Etkisi

Kimyasallar	Patojen Yok	Değişim Oranı (%)	Patojen Var	Değişim Oranı (%)
ASM	1,54 b*	-12,0	3,22 a	165,1
BABA	1,62 ab	-7,4	1,54 b	26,5
Fosetyl-Al	0,81 c	-53,8	1,30 c	7,0
SA	1,66 ab	-5,3	1,68 ab	38,6
Kontrol	1,75 a		1,21 c	

* Her uygulama kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.25. Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Scoparone Miktarı Üzerine Etkisi

Graham ve Myers (2011) tarafından imidacloprid, thiamethoxam ve acibenzolar-S-methyl kimyasallarının toprak uygulamaları çeşitli oranlarda ve uygulama sıklıklarında 3 ve 4 yaşlı Ray Ruby çeşidi greyfurt ağaçlarında *Xanthomonas citri* subsp *citri*'nin neden olduğu turunçgil kanserinin kontrolü için değerlendirilmiş ve uygulamanın oranına, sıklığına ve zamanlamasına bağlı olarak, topraktan uygulanan dayanıklılık teşvik edicilerin, epidemik koşullar altında genç greyfurt ağaçlarının hastalık oranını azalttığı bildirilmiştir.

Salisilik asit (SA) birçok bitkide patojenlere direnç sağlamada kilit rol oynamaktadır. Dihazi ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, SA'nın hurma (*Phoenix dactylifera* L.) 'da *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (FOA)'e olan dirence olası katılımını araştırmak için, fenolik bileşiklerin seviyeleri incelenmiştir. SA uygulamasından sonra, *F. oxysporum* aşılınmış hurma fidanlarının köklerinde çözünür fenoliklerin içeriği, hastalık belirtileri gösteren tedavi edilmemiş bitkilere oranla Bousthami noir çeşidinde yaklaşık 4 kat ve Jihel çeşidinde ise 6 kat daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca SA uygulaması hücre duvarı fenoliklerinin içeriğini de arttırmıştır.

4.6.2. Mikorizal Fungusların Fenolik Bileşikler Üzerine Etkileri

Mikorizal fungusların bitkide bulunan hesperidin, limonin ve scoparone fenolik bileşiklerinin miktarına etkisini belirlemek amacıyla, mikorizal fungus uygulamaları patojen yokluğunda ve patojen varlığında olmak üzere iki farklı çalışmayla değerlendirilmiştir.

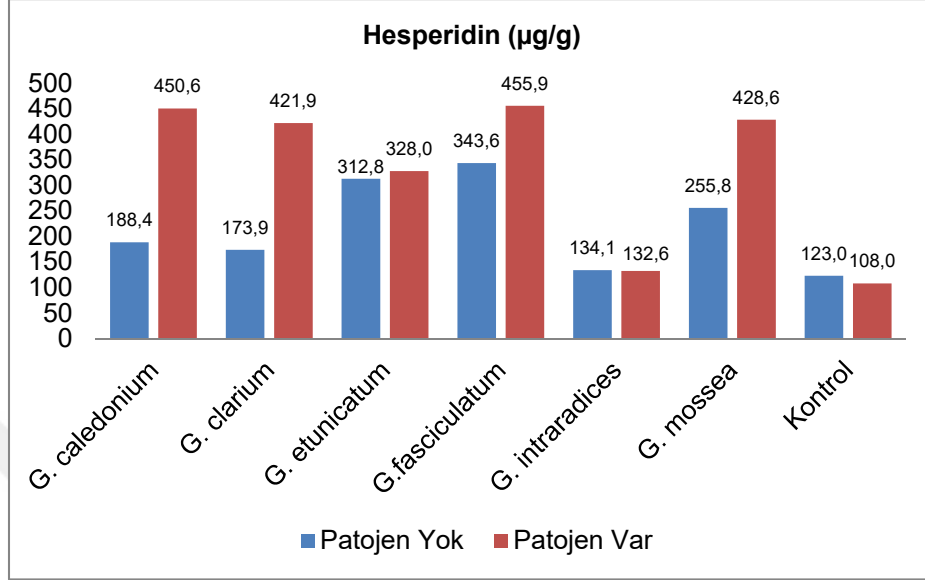
Patojen yokluğunda, *Glomus fasciculatum* (343,6 µg/g) hesperidin miktarına en fazla etkiyi göstermiştir (Çizelge 4.12; Şekil 4.26). Bunu *Glomus etunicatum* (312,8 µg/g) ve *Glomus mosseae* (255,8 µg/g) takip etmiştir. Hesperidin miktarında kontrole göre en az değişim yaratan mikorizal fungus *Glomus intraradices* (134,1 µg/g), *Glomus clarium* (173,9 µg/g) ve sonrasında *Glomus caledonium* (18,4 µg/g) olmuştur.

Patojen varlığında, kontrol uygulamasında bile değişiklik olmamışken *Glomus fasciculatum* (455,9 µg/g) ve *Glomus caledonium* (450,61 µg/g) uygulanan bitkilerde en yüksek hesperidin miktarına ulaşılmıştır. *Glomus mossea* (428,62 µg/g) ve *Glomus clarium* (421,91 µg/g) uygulamaları da küçük farklılıklarla hesperidin miktarı üzerine yüksek etkiye bulunmuştur. *Glomus intraradices* ise yine hesperidin miktarında % 22,8 oranında değişiklik yaratmış ve en az etkili mikoriza olmuştur.

Çizelge 4.12. Mikorizal Fungusların Hesperidin Miktarı Üzerine Etkisi

Mikoriza	Patojen Yok	Değişim Oranı (%)	Patojen Var	Değişim Oranı (%)
<i>G. caledonium</i>	188,4 d*	53,1	450,6 a	317,4
<i>G. clarium</i>	173,9 d	41,4	421,9 b	290,8
<i>G. etunicatum</i>	312,8 b	154,3	328,0 c	203,8
<i>G. fasciculatum</i>	343,6 a	179,3	455,9 a	322,2
<i>G. intraradices</i>	134,1 e	9,0	132,6 d	22,8
<i>G. mossea</i>	255,8 c	108,0	428,6 b	297,0
Kontrol	123,0 e		108,0 e	

* Her uygulama kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.26. Mikorizal Fungusların Hesperidin Miktarı Üzerine Etkisi

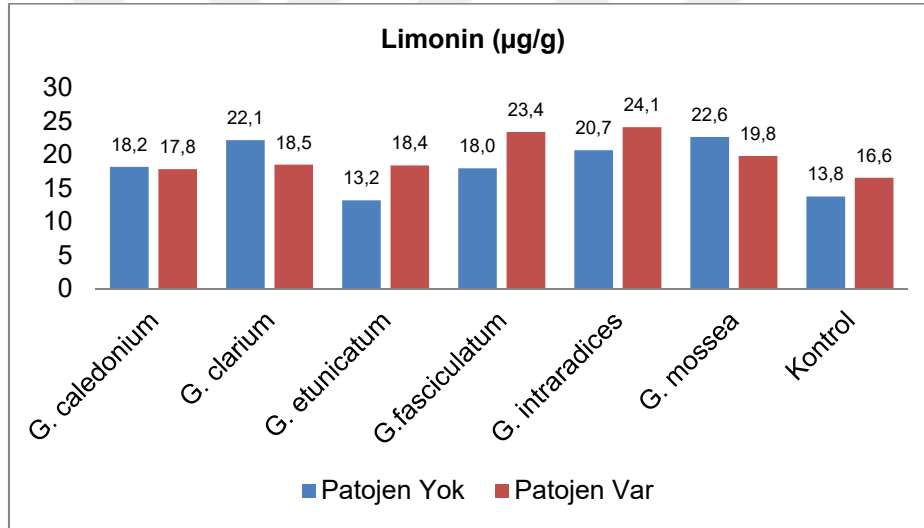
Patojen yokluğunda *Glomus mossea* (22,64 µg/g) ve *Glomus clarium* (22,15 µg/g) uygulamaları limonin miktarını kontrole oranla en fazla artıran mikorizal funguslar olmuştur (Çizelge 4.13; Şekil 4.27). *Glomus intraradices* (20,7 µg/g) uygulaması da bunları takip etmiştir. *Glomus etunicatum* (13,2 µg/g) uygulaması yapılan bitkilerde ise kontrole oranla hesperidin miktarında bir miktar azalma olduğu görülmüştür.

Patojen varlığında *Glomus fasciculatum* (23,37 µg/g) yine ön plana çıkmış ve oldukça yüksek seviyede limonin oluşumu sağlamıştır. *Glomus intraradices* (24,10 µg/g) uygulamasında da benzer etki görülmüştür. *Glomus caledonium* uygulamasında, limonin miktarı 17,8 µg/g olarak ölçülmüş ve kontrole yakın bir değer oluşturmuştur.

Çizelge 4.13. Mikorizal Fungusların Limonin Miktarı Üzerine Etkisi

Mikoriza	Patojen Yok	Değişim Oranı (%)	Patojen Var	Değişim Oranı (%)
<i>G. caledonium</i>	18,2 c*	31,9	17,8 bc	7,7
<i>G. clarium</i>	22,1 a	60,8	18,5 bc	11,8
<i>G. etunicatum</i>	13,2 d	-4,2	18,4 bc	11,1
<i>G.fasciculatum</i>	18,0 c	30,3	23,4 a	41,2
<i>G. intraradices</i>	20,7 b	50,0	24,1 a	45,6
<i>G. mossea</i>	22,6 a	64,4	19,8 b	19,6
Kontrol	13,8 d		16,6 c	

* Her uygulama kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.27. Mikorizal Fungusların Limonin Miktarı Üzerine Etkisi

Patojen yokluğunda *Glomus fasciculatum* (6,63 µg/g) uygulamasında yüksek seviyede scoparone ölçülürken; diğer uygulamalarda bu fenolik bileşik düşük seviyelerde bulunmuştur (Çizelge 4.14; Şekil 4.28). Öyle ki *G. intraradices*, *G. caledonium* ve *Glomus clarium* uygulamalarının yapıldığı bitkilerde scoparone miktarları kontrolden bile çok düşük olarak bulunmuştur. Bu değerler, 0,97 µg/g,

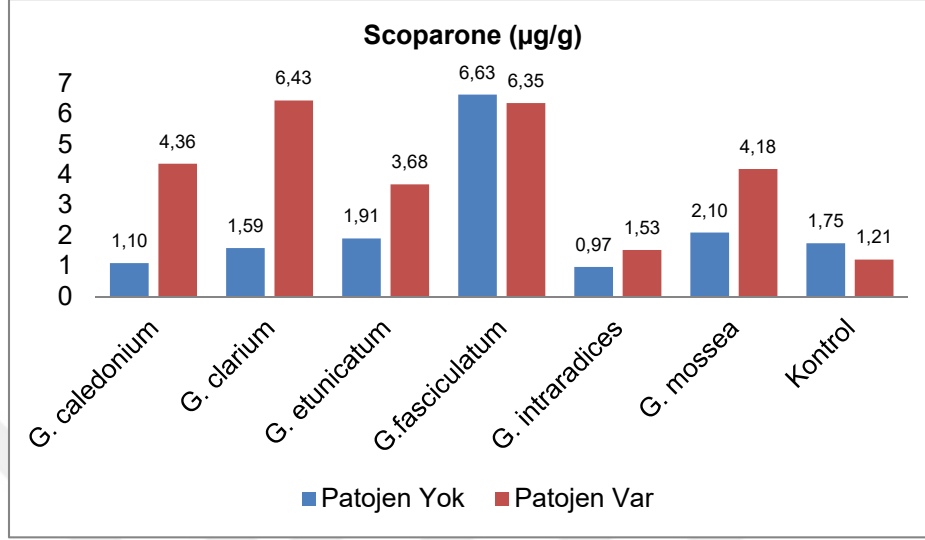
1,10 µg/g ve 1,59 µg/g olarak sıralanırken kontrol uygulamasında scoparone miktarı 1,75 µg/g olarak ölçülmüştür.

Patojen-mikorizal fungus interaksiyonunda, *Glomus clarium* ve *Glomus fasciculatum* en etkili mikorizalar olmuş ve bu uygulamalarda scoparone miktarları sırasıyla 6,43 µg/g ve 6,35 µg/g ölçülmüştür. Genel olarak tüm uygulamalarda scoparone miktarında artış sağlandığı gözlemlenmiştir. Farklı olarak *Glomus intraradices* (1,53 µg/g), diğer uygulamalara oranla çok düşük bir etki yaratmış ve kontrol ile aynı istatistik grubunda yer almıştır.

Çizelge 4.14. Mikorizal Fungusların Scoparone Miktarı Üzerine Etkisi

Mikoriza	Patojen	Değişim Oranı	Patojen	Değişim Oranı
	Yok	(%)	Var	(%)
<i>G. caledonium</i>	1,10 e*	-37,1	4,36 b	259,0
<i>G. clarium</i>	1,59 d	-9,1	6,43 a	429,5
<i>G. etunicatum</i>	1,91 bc	9,1	3,68 c	202,9
<i>G.fasciculatum</i>	6,63 a	279,2	6,35 a	422,5
<i>G. intraradices</i>	0,97 e	-44,3	1,53 d	25,7
<i>G. mossea</i>	2,10 b	20,2	4,18 b	244,4
Kontrol	1,75 cd		1,21 d	

* Her uygulama kendi içerisinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.28. Mikorizal Fungusların Scoparone Miktarı Üzerine Etkisi

Turunçgillerde ya da kültürü yapılan meyve ağaçlarında mikorizal fungus-fenolik bileşik-patojen etkileşimini konu alan çalışma bulunmamakla birlikte bu konuda referans alabileceğimiz bir çalışma orman alanlarında bulunan bir ektomikorizal fungus ile yürütülmüştür. Douglas Göknarı (*Pseudotsuga menziesii*) fidanlarında ektomikorizal fungus *Laccaria laccata*'nın primer kök hücrelerinde fenolik maddelerin birikmesine neden olduğu ve *Fusarium oxysporum* kök çürüklüğünü azalttığı bulunmuştur. *Laccaria laccata*'nın *in vitro*'da *Fusarium oxysporum*'un gelişimini engellediği gösterilmiş olsa da antibiyosisin önemli olmadığı, primer kökte *Laccaria laccata* tarafından teşvik edilen fenoliklerin, bitki kök korumasının temeli olabileceği öne sürülmüştür (Sylvia ve Sinclair, 1983).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışma ile, bazı limon çeşitlerinin *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu Uçkurutan hastalığına karşı duyarlılık dereceleri ortaya konmuş, bazı dayanıklılık teşvik edici ve mikorizal fungusların bu hastalık ile mücadelede azaltıcı etkileri belirlenmiştir. Ayrıca bu kimyasal ve mikorizaların bitkide bulunan bazı fenolik bileşikler üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir.

Mersin ve Adana illerinde yapılan survey çalışmalarında, *Phoma tracheiphila*'nın neden olduğu Uçkurutan hastalığının limon bahçelerinde önemli bir sorun olduğu tespit edilmiştir. İl bazında incelendiğinde ise, bu hastalık Mersin ilindeki bahçelerde daha çok gözlemlenmiştir. Survey çalışmaları sonucunda, bu iki ilin farklı noktalarından 15 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar, Alata 1, Alata 2, Alata 3, Tömük, Tece 1, Koyunlu, Çeşmeli 1, Sakızlı, Kargıpınar, Çeşmeli 2, Seymenli, Tece 2, Yeşilyurt, Dedepınarı 1, Dedepınarı 2 olarak isimlendirilmiştir.

Klasik ve moleküler tanıları yapılarak *Phoma tracheiphila* oldukları kanıtlanan izolatlar, bitkide %6,7 ve 86,7 arasında değişen oranlarda hastalık şiddeti yaratmışlardır. Seymenli, Çeşmeli 2 ve Dedepınarı 2 izolatları, bitkide yüksek oranda hastalık görüntüsü oluşturmuş, hatta bazı tekerrürlerde ölüme neden olmuştur. Bu izolatların oluşturdukları hastalık şiddetleri sırasıyla %86,7, %73,3 ve %66,7 olarak ölçülmüştür.

Uçkurutan hastalığı, farklı limon çeşitlerinde farklı seviyelerde hastalık yapma özelliğine sahiptir. Bu çalışmada, Kütdiken limon çeşidinde % 88 oranında hastalık şiddeti değeri hesaplanmış ve bu çeşit *Phoma tracheiphila*'ya karşı duyarlı olarak bulunmuştur; % 12 hastalık şiddeti ölçülen Enterdonat ve hiç symptom görülmeyen Mayer çeşitleri ise dayanıklı çeşit olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan dayanıklılık teşvik ediciler arasında *in vitro* koşullarda en etkili kimyasal Fosetyl- Al olmuştur. Doz miktarı arttıkça patojeni

baskılama şiddetini arttırmış ve 600 ppm dozdan sonra patojenin gelişimini engellemiştir.

Dayanıklılık teşvik edici kimyasallar, *in vivo* koşullarda patojenin gelişimini azaltıcı yönde etki göstermiş, Tüm uygulamalarda kontrolden düşük hastalık şiddeti değerleri belirlenmiştir. Fosetyl-Al, patojen üzerinde %40 etki göstermiş ve en etkili kimyasal olarak bulunmuştur. Ayrıca, iletim demetlerinde hastalığın ilerlemesi ölçüldüğünde de yine Fosetyl-Al uygulaması yapılan bitkilerde daha az miktarda enfeksiyon oluşumu gözlemlenmiştir.

Çalışmada kullanılmak üzere üretilen mikorizal inokulumlardaki spor yoğunlukları ve köklerde oluşturdıkları kolonizasyon oranları değerlendirilmiştir. Buna göre, en yüksek miktarda spor bulunduran mikorizal fungus *Glomus caledonium* (254spor/10 g toprak) olarak belirlenmiştir. Kökleri en fazla enfekte eden mikorizal fungus ise %66 oranıyla yine *Glomus caledonium* olmuştur.

Mikorizal funguslar, *in vivo* koşullarda bitkilere uygulandığında, genel olarak sadece patojen uygulanmış kontrole göre hastalığı azaltıcı yönde etki göstermişlerdir. *Glomus fasciculatum* hastalığa %60 etki ederek, en etkili mikorizal fungus olmuştur. Ek olarak bu fungusun uygulandığı bitkilerde enfeksiyon uzunluğunun kontrole göre oldukça düşük olduğu, iletim demetinde ilerleme miktarına %52,5 oranında etki ettiği belirlenmiştir.

Dayanıklılık teşvik edici kimyasallar ve mikorizal fungusların bitkilerde savunma mekanizmasında görev yapan fenolik bileşiklerin miktarı üzerine etkileri patojen varlığında ve patojen yokluğunda ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Hesperidin miktarını her iki durumda da kontrole göre en fazla artıran kimyasal Fosetyl-Al olmuştur. Bu kimyasalın uygulandığı fidanlarda hesperidin miktarı patojen varlığında 225,56 µg/g; patojen yokluğunda 282,58 µg/g olarak ölçülmüştür.

Dayanıklılık teşvik edici kimyasal uygulamaları, limonin üzerinde kontrole oranla artışa neden olmuş; ancak bu artış çok yüksek miktarda ölçülmemiştir. Patojenin olmadığı durumda en yüksek artırıcı etkiyi Fosetyl-Al (21,39 µg/g)

yaratmıştır. Patojen varlığında ise ASM (25,76 µg/g) uygulaması limonin miktarı üzerinde en etkili kimyasal olmuştur.

Patojen yokluğunda, kimyasal uygulamalarının scoparone miktarı üzerinde bir etkisi olmamıştır. Patojen varlığında ise ASM, tüm uygulamalara ve kontrole göre ciddi oranda yüksek etki göstermiştir. Bu kimyasalın uygulandığı bitkilerde scoparone miktarı 3,22 µg/g olarak ölçülmüştür. Ayrıca Fosetyl-Al uygulaması, bu fenolün miktarında bir artışa neden olmamış ve istatistiki olarak kontrolle aynı grupta değerlendirilmiştir.

Fenolik bileşikler üzerinde mikorizal fungusların etkilerine bakıldığında, hesperidin miktarına en fazla etkiyi *Glomus fasciculatum* göstermiştir. Bu fungusun uygulandığı bitkilerde hesperidin miktarı patojen yokluğunda 343,6 µg/g; patojen varlığında ise 455,9 µg/g olarak ölçülmüştür.

Limonin miktarı üzerinde patojen olmadığı koşulda *Glomus mossea* (22,64 µg/g) ve *Glomus clarium* (22,15 µg/g) uygulamaları kontrole oranla en fazla etki eden mikorizal funguslar olmuştur. Patojen varlığında ise *Glomus fasciculatum* yine ön plana çıkmış ve bitkilerde 23,37 µg/g limonin seviyesi ölçülmüştür.

Patojen yokluğunda *Glomus fasciculatum* (6,63 µg/g) uygulamasında yüksek seviyede scoparone ölçülmüştür. Patojen-mikorizal fungus interaksiyonunda ise *Glomus clarium* ve *Glomus fasciculatum* en etkili mikorizalar olmuş ve bu uygulamalarda scoparone miktarları sırasıyla 6,43 µg/g ve 6,35 µg/g olarak belirlenmiştir.

Bitkide patojenlere karşı dayanıklılıkla ilişkilendirilen fenoliklerle yapılan çalışmaya genel bir bakış getirecek olursak, Fosetyl- Al, hesperidin miktarı üzerinde etkili olmuş; fakat bu etki tüm fenolilere bakıldığında tutarlı bulunmamıştır. Öte yandan ASM+patojen kombinasyonu, hesperidin, limonin ve scoparone fenolikleri üzerinde yüksek etki yaratmıştır. *Glomus fasciculatum*, patojen varlığında, incelemesi yapılan tüm fenolikler üzerinde en yüksek etkiyi gösteren mikorizal fungus olmuştur.

5.2. Öneriler

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, bu çalışmanın pratiğe aktarılması ve daha sonra yapılacak olan çalışmalara da ışık tutması açısından bazı öneriler sunmak mümkün olmuştur.

Uçkurutan hastalığı ile mücadelede, öncelikli olan konunun dayanıklı çeşit ıslahı olduğu düşünülmektedir. Bölgemizde yoğun olarak tercih edilen bir çeşit olan Kütdiken'in verim ve kalite özelliklerine sahip ve *Phoma tracheiphila*'ya karşı dayanıklı olan yeni çeşitlerin geliştirilmesi, bu patojenle mücadelede en önemli adım olacaktır.

Phoma tracheiphila surveyi yapıldığı sırada, bakım işlemlerinin daha az yapıldığı Mersin ilindeki bahçelerde, Adana iline göre daha fazla hastalık sorunu olduğu gözlemlenmiştir. Bu noktadan bakıldığında, hastalıkla mücadelede, bakım-budama işlemlerine özen gösterilmesi önerilmektedir. Bu nedenle bitki dokularının daha sıkı gelişmesini sağlayacak olan potasyumlu gübrelemeye önem verilmeli, bitkide yara açılmasına neden olacak dolu, don, şiddetli rüzgar gibi mevsimsel olayların ve budamanın ardından bakırlı preparatlarla koruyucu ilaçlama yapılmalıdır. Ayrıca İnokulum kaynağı olan piknidyumlu veya hastalık simptomsu gösteren dallar, 28°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda rüzgarsız ve yağmursuz dönemde infeksiyon noktasınının 15- 20 cm altından kesilerek imha edilmelidir.

Dayanıklılık teşvik edici kimyasal ve mikorizal fungusların *Phoma tracheiphila* üzerindeki etkileri konusunda önemli sonuçlar elde edilmiş; ancak farklı uygulamalar arasında istatistiksel olarak farklılık bulunamamıştır. Bu nedenle, trakeomikoz patojenlerle yapılan çalışmalarda, tekerrür sayısının daha fazla olması gerektiği düşünülmektedir.

Limon ağacı köklerinde kolonize olan mikorizal funguslar, patojenlere karşı bitkinin dayanıklılığını aktive etmesinde etkili bulunmuştur. Bu funguslar, üretim yapılan fidanlıklarda, tohum ekimi ve şaşırtma işlemleri sırasında üretim ortamına eklenmeli ve kökte kolonize olmaları sağlanmalıdır. Bu işlem sırasında *Glomus* cinsine ait mikorizal funguslar tercih edilmelidir. Ayrıca bunların

arasından özellikle *Glomus fasciculatum*'un seçilmesi de Uçkurutan hastalığına karşı mücadelede yüksek başarı getirecektir.

Bu çalışmada kullanılan dayanıklılık teşvik edicilerden Fosetyl-Al, patojen üzerinde; ASM ise fenolik bileşik miktarlarının artışı üzerinde önemli etkiler yaratmıştır ve bunların gelecekte Uçkurutan mücadelesinde kullanılmalarının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu kimyasalların değerlendirilmesi ve sonrasında entegre mücadele kapsamına alınabilmesi için daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır. Bu tez çalışması, sonrasında yapılacak olan bu araştırmalar için önemli bir ilk adım olacaktır.



KAYNAKLAR

- Afek, U. and Sztejnberg, A., 1988. Accumulation of Scoparone, a Phytoalexin Associated with Resistance of Citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* 78: 1678 -1682.
- Afek, U. and Sztejnberg, A., 1989. Effects of Fosetyl-Al and Phosphorous Acid on Scoparone, a Phytoalexin Associated with Resistance of Citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology*, Vol. 79, No:7.
- Agostini, J.P., Bushong, P. M. and Timmer, L. W., 2003. Greenhouse Evaluation of Products That Induce Host Resistance for Control of Scab, Melanose and *Alternaria* Brown Spot of Citrus. *Plant Disease*, 87: 69-74.
- Ahrens, U. and Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of Plant Pathogenic Mycoplasma-like Organisms by Polymerase Chain Reaction Amplifying a Sequence of 16S rRNA Gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- Akteke, Ş.A., 1979. Limonlarda Uçkurutan (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanciaveli et Ghikasevili) Hastalığının Sörveyi ve Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar. G.T.H.B., TAGEM, Yayın No. 17. Bahçe Kültürleri Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü, Erdemli-İçel, 95 s.
- Anonymous, 2007. Diagnostic. OEPP/EPPO Bulletin, 37: 521–527.
- Anonymous, 2015. PM 7/048 (3) *Plenodomus tracheiphilus* (formerly *Phoma tracheiphila*). OEPP/EPPO Bulletin, 45 (2):183–192.
- Aysan, M, Kozak Özdemir, S. ve Erkılıç, A., 2019. Çilekte *Rhizoctonia* Kök Çürüklüğü (*Rhizoctonia solani*)’ne Karşı Bazı Bitki Aktivatörlerinin Etkileri. JOTAF/ Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, 16(2): 173-180.
- Avcı, S. E., 2018. Yeni Kurulan Turunçgil Bahçelerinde Fungal Patojenlerin Belirlenmesi ve Çeşit Duyarlılıklarının Saptanması. ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Yüksel Lisans Tezi, 70 s.

- Baş, B. and Koç, N. K., 2006. *In vitro* Selection of Kütdiken Lemon 20b to Candidate for Resistance to *Phoma tracheiphila*. Plant Pathology Journal, 5(1): 35-40.
- Baydar, K., 2010. Bazı Limon Çeşitlerinin Uçkurutan Hastalığı (*Phoma tracheiphileia*)'na Karşı Dayanıklılık Mekanizmasının Fenolik Bileşikler Bazında Belirlenmesi. ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Yüksel Lisans Tezi, 60 s.
- Berhow, M., Tisserat, B., Kanes, K. and Vandercook, C., 1998. Survey of Phenolic Compounds Produced in Citrus. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Technical Bulletin No:1856, 158 pp.
- Cao, J. and Jiang, W., 2006. Induction of Resistance in Yali Pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) Fruit Against Postharvest Diseases by Acibenzolar-S-Methyl Sprays on Trees During Fruit Growth. Scientia Horticulturae, 110: 181-186.
- Cutuli, G., 1979. Un Prevegole Clone di Limone "Femminello" con Prominenti Caratteristiche di Resistenza al "Mal Secco". Inf. Tore Agr., 35:7269-7271.
- Chinapongtitiwat, V., Jongaroontaprangsee, S., Chiewchan, N. and Devahastin, S., 2013. Important Flavonoids and Limonin in Selected Thai Citrus Residues. Journal of Functional Foods, 5(2013), 1151-1158.
- Çimen, İ., 1994. İçel İlinde Uçkurutan Hastalık Epidemiyolojisinde İnokulum Kaynağı, İnfeksiyon Zamanı ve Gelişme Engelleyicilerinin Önemi Üzerinde Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora tezi, 139 s.
- Davis, R. M. and Menge, J.A., 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* and Soil Phosphorus on *Phytophthora* Root Rot of Citrus. Phytopathology, 70: 447-452.
- Declerck, S., Risede, J.M., Ruffikiri, G. and Delvaux, B., 2002. Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Severity of Root Rot of Bananas caused by *Cylindrocladium spathiphylli*. Plant Pathology, 51:109-115.

- Dihazi, A., Jaiti, F., Zouine, J., El Hassni, M. and El Hadrami, I., 2003. Effect of Salicylic Acid on Phenolic Compounds Related to Date Palm Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 42: 9–16.
- Dinç, N., Turan, K. ve Salih, H., 1980. Akdeniz Bölgesi Limonlarında Görülen Uçkurutan Hastalığı (*Deuterophoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik.)'nın Savaş Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni* Cilt: 21, No. 2.
- El- Modafar, C. and El- Boustani E., 2001. Cell Wall-Bound Phenolic Acid and Lignin Contents in Date Palm as Related to Its Resistance *Fusarium oxysporum*. *Biologia Plantarum*, 44: 125- 130.
- Erkiliç, A. ve Çınar, A., 1989. Limon Ağaçlarındaki Saprofit Mikofloranın Belirlenmesi ve Bunların Uçkurutan Hastalık Etmeni *Phoma tracheiphila*'ya Antagonistik Etkileri. *Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, cilt: 13, No:3b.
- Erkiliç, A., Kozak Özdemir, S. ve Akgül, D.S., 2018. Zeytinde *Verticillium dahliae*'ya Karşı Bazı Dayanıklılık Teşvik Edici Kimyasalların Etkilerinin Belirlenmesi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(1):69-76.
- Evensen, P. C., Solheim, H., Hoiland, K. and Stenersen J., 2000. Induced Resistance of Norway Spruce, Variation of Phenolic Compounds and Their Effects on Fungal Pathogens. *Forest Pathology*, 30: 97–108.
- Ezra, D., Kroitor, T. and Sadowsky, A., 2007. Molecular characterization of *Phoma tracheiphila*, causal agent of Mal secco disease of citrus, in Israel. *European Journal Plant Pathology*, 118:183–191.
- FAO, 2012. www.fao.org
- Fourie, A., 2004. Biochemical Mechanisms for Tolerance of Citrus Rootstocks Against *Phytophthora nicotianae*. University of Pretoria, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, MSc Thesis, 116 s.

- Gentile, A., Deng, Z., La Malfa, S., Distefano, G., Domina, F., Vitale, A., Polizzi, G., Lorito, M. and Tribulato, E., 2007. Enhanced Resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in Transgenic Lemon Plants Expressing a *Trichoderma harzianum* Chitinase Gene. *Plant Breeding*, 126:146-151.
- Gerdemann, J. W. and Nicholson, T. H., 1963. Spores of Mycorrhizal Endogone Extracted from Soil by Wetsieving and Decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- Graham, J. H. and Leite, R.P., Jr, 2004. Lack of Control of Citrus Canker by Induced Systemic Resistance Compounds. *Plant Disease*, 88: 745-750.
- Graham, J. H., and Myers, M. E. 2011. Soil Application of SAR Inducers Imidacloprid, Thiamethoxam, and Acibenzolar-S-Methyl for Citrus Canker Control in Young Grapefruit Trees. *Plant Disease*, 95:725-728.
- Graham, J. H. and Myers, M. E., 2013. Integration of Soil Applied Neonicotinoid Insecticides and Acibenzolar- S- Methyl for Systemic Acquired Resistance (SAR) Control of Citrus Canker on Young Citrus Trees. *Crop Protection* 54: 239-243.
- Hassan, M.A.E. and Buchenauer, H., 2007. Induction of Resistance to Fire Blight in Apple by Acibenzolar-S-Methyl and DL-3-Aminobutyric Acid. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114 (4): 151–158.
- Justyna, P.G. and Ewa, K., 2013. Induction of Resistance Against Pathogens by β -aminobutyric acid. *Acta Physiol Plant*, 35:1735–1748.
- Karajeh, M. and Al-Raddad, A., 1999. Effect of VA Mycorrhizal Fungus (*Glomus mosseae* Gerd & Trappe) on *Verticillium dahliae* Kleb. of Olive. *Dirasat Agric Sci* 26: 338 – 341.
- Kuc, J., 1995. Phytoalexins, Stress Metabolism and Disease Resistance in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33: 275-97.
- Koske, R.E. and Gemma, J. N., 1989. A Modified Procedure for Staining Root to Detect VAM. *Mycological Research*, 92: 486-505.
- Kuc, J., 1995. Phytoalexins, Stress Metabolism And Disease Resistance in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33: 275-297.

- Li, J., Trivedi, P. and Wong, N., 2016. Field Evaluation of Plant Defense Inducers for The Control of Citrus Huanglongbing. *Phytopathology*, 106: 37-46.
- Menge, J. A. and Timmer, L. W., 1982. Procedure for Inoculation of Plants with Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza in Laboratory, Greenhouse and Field . In: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research* ed. N. C. SCHENCK, 244 p.
- Migheli, Q., Pane, A., Ezra, D., Cacciola, S.O., Balmas, V. and San Lio, G. M., 2009. Mal Secco Disease Caused by *Phoma tracheiphila*: a Potential Threat to Lemon Production Worldwide. *Plant Disease*, vol 93, No:9.
- Nigro, F., Ippolito, A. and Salerno, M.G., 2011. Mal Secco Disease Of Citrus: A Journey Through A Century Of Research. *Journal of Plant Pathology*, 93(3): 523-560.
- Ortas, I., Ortakci, D. and Kaya, Z., 2002 a. Various Mycorrhizal Fungi Propagated on Different Hosts Have Different Effect on Citrus Growth and Nutrient Uptake. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33(1-2): 259-272.
- Ortas, I., Ortakci, D., Kaya, Z., Cinar, A. and Onelge, N., 2002b. Mycorrhizal Dependency of Sour Orange in Relation to Phosphorus and Zinc Nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 25(6): 1263-1279.
- Ortuno, A., Botia, J. M., Fuster, M.D., Porras, I., Garcia-Lidon, A. and Del Rio, J. A., 1997. Effect of Scoparone (6,7-Dimethoxycoumarin) Biosynthesis on the Resistance of Tangelo Nova, Citrus paradisi and Citrus aurantium Fruits against *Phytophthora parasitica*. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2740-2743.
- Popova, L., Pancheva, T. ve Uzunova, A., 1997. Salicylic Acid: Properties, Biosynthesis and Physiological Role. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 23(1-2): 85-93.

- Reforgiato Recupero, G., Gentile, A., Russo, M. P. and Domina, F., 1997. Genetic analysis of resistance to *Phoma tracheiphila* in three Citrus and Poncirus progenies. Plant Breeding, 116: 198-200.
- Resende, M. L. V., Nojosa, G. B. A., Cavalcanti, L. S., Aguilar, M. A. G., Silva, L. H. C. P., Perez, J. O., Andrade, G. C. G., Carvalho, G. A. and Castro, R. M., 2002. Induction of Resistance in Cocoa Against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by Acibenzolar S-Methyl (ASM). Plant Pathology, 51: 621–628.
- Sanzani, S. M., Schena, L. and Ippolito, A., 2014. Effectiveness of Phenolic Compounds against Citrus Green Mould. Molecules, 19: 12500-12508.
- Salerno, M. and Cutuli, G., 1976. “Mal secco” Disease of Citrus: Research Trends in Italy. Poljoprivredna Znanstvena Smotra 39: 281-286.
- Solel, Z. and Spiegel-Roy, P., 1978. Methodology of Selection of Lemon Clones for Tolerance to Mal Secco. Phytoparasitica, 6(3), 129-134.
- Sylvia, D. M. and Sinclair, W. A., 1983. Phenolic Compounds and Resistance to Fungal Pathogens Induced in Primary Roots of Douglas- Fir Seedlings by The Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria Laccata*. Phytopathology, 73: 390-397.
- Şahbaz, S. and Akgül, D. S., 2016. Fungal Wilt Pathogens and Their Management in Cotton Growing Areas in Reyhanlı County (Hatay). The Journal of Turkish Phytopathology, 45(1), 31-43.
- Thanassouloupoulos, C.C., 1991. Ermioni a New Lemon Cultivar Resistant to Mal Secco Disease (*Phoma tracheiphila*). Phytopathology, 131: 234-242.
- Tusa, N. and Del Bosco, S. F., 2000. Response of Cybrids and a Somatic Hybrid of Lemon to *Phoma tracheiphila* Infections. HortScience 35(1):125–127.
- Tuzcu, Ö., Kaplankıran, M., Yeşiloğlu, T. ve Erkılıç, A., 1992. Türkiye’de Uçkurutan (*Phoma tracheiphila*) Hastalığına Dayanıklı Limon Çeşidi Islahı Çalışmalarından Elde Edilen Ön Sonuçlar. Derim, 9(3): 99-107.
- TÜİK, 2018. www.tuik.gov.tr

- Watanarojanaporn, N., Boonkerd, N., Wongkaew, S., Prommanop, P. and Teaumroong, N., 2011. Selection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Citrus Growth Promotion and *Phytophthora* suppression. *Scientia Horticulturae*, 128: 423-433.
- Ziadi, S., Chebil, S., Ligorio, A., Ippolito, A. and Mliki, A., 2012. Behaviour of Italian Lemon Rootstocks towards Mal Secco Leaf Infection with Tunisian Fungus *Phoma tracheiphila* in Controlled Environment. *Journal of Plant Pathology&Microbiology*, 3(7): 1-4.



ÖZGEÇMİŞ

26.09.1989 tarihinde Bergama/İzmir'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği programında lisans eğitime başladı. 2011 yılında Bitki Koruma alt programından mezun oldu. Aynı yıl ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime başladı. 2013 yılında bu eğitimi tamamlayarak Doktora öğrenimine devam etti. 2011- 2019 yılları arasında Bitki Koruma Bölümü'nde Araştırma görevlisi olarak çalıştı. Evli ve bir çocuk sahibidir.