

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

http://dergipark.gov.tr/bitkorb

Original article

***In vitro* sensitivity of anthracnose disease agent, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., to some fungicides on lemon**

Limonda Antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.'in bazı fungusitlere karşı *in vitro* duyarlılığı

Aysun UYSAL^a, Şener KURT^{a*}

^a Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection and Centre for Implementation and Research of Plant Health Clinic - Antakya-Hatay, TURKEY

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.471055](https://doi.org/10.16955/bitkorb.471055)

Received : 16.10.2018

Accepted : 10.12.2018

Keywords:

lemon, Anthracnose, fungicides, *Colletotrichum*, sensitivity

* Corresponding author:

Şener KURT

✉ senerk31040@gmail.com

ABSTRACT

Anthracnose is one of the diseases that seriously threaten citrus production, especially lemons in the world and in our country. The aim of this study was to determine the sensitivity of an anthracnose disease agent, *Colletotrichum gloeosporioides*, on lemon, to some fungicides with different mechanisms of action from different chemical groups such as DMI, SDHI, QoI, amides, anilines and dithiocarbamates. For this purpose, tissue pieces of diseased plants collected from lemon orchards were incubated in PDA medium at 25 °C for 5 days. All isolates were identified as *Colletotrichum gloeosporioides* as a result of morphological and molecular diagnoses of fungal cultures. The virulence levels of all isolates were determined in pathogenicity tests and the highest virulence was found to have LC5 isolate. The susceptibility of *C. gloeosporioides* LC5 isolate to 10 different fungicides was demonstrated by *in vitro* mycelial growth and conidial germination trials. As a result, it was determined that fungicides fluopyram+tebuconazole, fluazinam, fluxapyroxad+ difenoconazole and dithianon+phosphorous acid showed the highest effect.

GİRİŞ

Turunçgiller, dünyada en fazla yetiştirilen ve tüketilen meyve grubu olup, 2014 yılı verilerine göre 8.9 milyon hektar alanda 138 milyon ton üretilmiştir. Ülkemiz, turunçgil üretiminde 4 milyon ton ile yedinci sırada yer almaktadır (FAO 2016). Turunçgillerin üretim aşamasında verim ve kaliteyi sınırlandıran sorunların başında fungal hastalıklar gelmektedir. Turunçgillerde antraknoz hastalığı, hem olgunlaşmakta olan hem de olgun bitki dokularında ve meyvelerde hasat öncesi ve hasat sonrası

enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Colletotrichum* türlerinin neden olduğu bu hastalık, bitkisel üretimde pazar değerini %10-80 arasında değişen oranlarda azaltan ve ekonomik olarak çok önemli olan hastalıklardan birisi olarak kabul edilmektedir (Bosland and Votana 2003, Hadden and Black 1989). *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.&Sacc.'i içine alan *Colletotrichum* cinsi, tüm üretim dönemlerinde dünyada ve ülkemizde limon üretimini ciddi düzeyde tehdit eden bir patojen grubu

olarak kaydedilmektedir (Ramos et al. 2016, Uysal ve ark. 2016). Turunçgillerde antraknoz hastalığı sürgünlerde geriye doğru kuruma, yapraklarda leke, erken dönem yaprak ve meyve dökümleri ve meyvelerde yanık lekeler şeklinde ortaya çıkmaktadır. *Colletotrichum* türlerinin farklı kültür bitkilerinde neden olduğu antraknoz hastalığının mücadelesinde; hava sirkülasyonunun sağlanması ve yaprak ıslaklık periyotlarının azaltılması, zararlı böceklerden korunma, şiddetli düzeyde hastalanan bitkilerin uzaklaştırılması ve bitkinin su ve sıcaklık stresine maruz bırakılmaması savaşımında önerilen yöntemlerdir. Bu hastalığa karşı kimyasal mücadele, en pratik ve en etkili yol olarak görülmektedir.

Ülkemizde ve son yıllarda Avrupa'da turunçgillerde antraknoza neden olan *Colletotrichum* türlerinin morfolojik ve moleküler olarak tanıları gerçekleştirilmiş ve en virüent türün *C. gloeosporioides* olduğu bildirilmiştir (Guarnaccia et al. 2017, Uysal ve ark. 2016). Ayrıca araştırmacılar, etmenin tüm yetiştirme sezonu boyunca ortaya çıkabileceğini ve limon bitkisinin tüm organlarını enfekte edebildiğini saptamışlardır. Aynı şekilde, bu çalışmanın yapıldığı Doğu Akdeniz Bölgesinde turunçgil yetiştirilen alanlarda da yılın her dönemi ve bitkinin her organında *C. gloeosporioides* etmenine rastlamak mümkündür. Bu hastalık etmeninin kontrolüne yönelik olarak dünyada farklı araştırmacılar tarafından fungusitlerin etkileri üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Ülkemizde de henüz bu hastalığa karşı ruhsatlı bir fungusitin olmaması, bu denemelerin yürütülmesini zorunlu kılmıştır.

Çili biberinde antraknoz hastalığının kimyasal mücadelesinde azoxystrobin, trifloxystrobin ve pyraclostrobin kullanılmaktadır (Alexander and Waldenmaier 2002, Lewis and Miller 2003). Güney Kore'de biber yetiştirilen alanlarda antraknoza karşı ise azoxystrobin, bakır hidroksit, difenoconazole, famoxadone+cymoxanil, fludioxonil+cyprodinil ve mancozeb gibi fungusitler etkin şekilde kullanılmaktadır (Harp et al. 2014). İsviçre'de kiraz ve vişnelerde antraknoz hastalığına karşı thiram, captan, carbendazim, mancozeb, dichlofluanid, etaconazole+captan, penconazole+captan ve bitertanol fungusitlerinin etkili olduğu bildirilmiştir (Kloutvorova and Egert 2004).

Çin'de antraknoz hastalıklarının kontrol etmek için azoxystrobin, picoxystrobin, difenoconazole, thiophanate-methyl, mancozeb ve pyraclostrobin fungusitleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Çin'de 2016 yılında çili biber antraknozuna karşı pyraclostrobin kullanılmaya başlanmıştır. *Colletotrichum acutatum*'un misel gelişimine ve konidi çimlenmesine karşı fungusitlerin etkisini araştırmışlar ve pyraclostrobin'in *C. acutatum*'u inhibe

ettiğini saptamışlardır. Ayrıca, saha denemelerinde pyraclostrobin'in çili antraknozunun oranını ve şiddetini azaltmada etkili olduğu ve doğrudan da pazarlanabilir verimini artırdığı da saptanmıştır. (Gao et al. 2017). Biberde antraknoza neden olan *C. acutatum*'un mücadelesi için alternatif fungusit olan fludioxonil'in iyi bir aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. *C. acutatum* izolatlarının fludioxonil'e duyarlılıklarını gösteren ortalama EC₅₀ değerlerinin, miselyal gelişim için 0.031 µg/ml, spor çimlenmesi için 0.035 µg/ml olduğu belirlenmiştir (Gao et al. 2018).

Colletotrichum türlerine karşı SDHI fungusitlerinden fluxapyroxad, fluopyram ve boscalid'in etkisiz olduğu bulunmuştur. Benzovindiflupyr fungusiti ise en yüksek inhibitör aktivite göstermiştir (Ishii et al. 2016). Brezilya'da muz antraknozu etmeni *Colletotrichum musae*'ye karşı thiophanate-methyl duyarlılığı incelendiğinde; miselyal gelişimde EC₅₀ değeri 0.003-48.73 µg/ml olarak saptanmıştır (Vieira et al. 2017). Bununla birlikte Sicilya'da portakal bahçelerinde antraknoza neden olan *C. gloeosporioides*'e karşı QoI fungusitlerinden azoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin kullanılmış ve bu fungusitlerin, bahçe koşullarında hasat öncesinde antraknoz enfeksiyonlarını ve şiddetini; %84-92 ve hasat sonrası dönemde yaklaşık olarak %81-92 oranında azalttığı bildirilmiştir (Piccirillo et al. 2018). Bilindiği gibi ülkemizde limonda antraknoz hastalığı etmeni *C. gloeosporioides*'e karşı ruhsatlı bir fungusit bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, 2016-2017 yıllarında, Doğu Akdeniz Bölgesinin Mersin, Adana, Hatay ve Osmaniye illerinde limonlarda görülen antraknoz hastalığı etmeni *C. gloeosporioides*'in, *in vitro* koşullarda DMI, SDHI, QoI, amid, aniline ve dithiocarbamate gibi farklı kimyasal gruplardan farklı etki mekanizmalarına sahip bazı fungusitlere karşı duyarlılığını belirlemektir.

MATERYAL VE METOT

Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması ve izolatların tanınması

Doğu Akdeniz Bölgesinde 2016-2017 yıllarında antraknoz belirtisi gösteren hastalıklı limon ağaçlarından enfekteli yaprak, sürgün ve meyve örnekleri toplanmıştır. Gözle görülebilir belirtiler gösteren bu bitki örnekleri alınarak plastik torbalara konulup laboratuvara getirilmiştir. Hastalıklı doku parçalarından Potato Dextrose Agar (PDA) besi yerine yapılan izolasyonlar sonrasında fungusun gelişmesi için petri 25 °C' de 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmışlardır. İzole edilen her bir fungal izolat, PDA besi ortamında koloni rengi, ters koloni

rengi, apsesoryum ve aservulus oluşumu ve konidilerin şekil ve boyutları gibi morfolojik parametreler yönünden tanılanmıştır (Ramos et al. 2016). Öte yandan tek spordan geliştirilmiş 5-7 günlük fungal PDA kültürlerinden QIAGEN DNeasy (250) Plant mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) kullanılarak DNA ekstraksiyonu ve PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir (Rhaïem and Taylor 2016). PCR ürünlerinin sekans sonuçlarının BLAST analizi yapılması ile tür tanısı moleküler olarak tamamlanmıştır.

Colletotrichum gloeosporioides izolatlarının patojenitesisi

Bu aşamada, ilk deneme meyvelerde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, %5'lik NaOCl'de 3 dk. süreyle dezenfekte edilen Interdonato çeşidi limon meyvelerinin ekvatorial bölgesinin 3 farklı noktasında 5x5 mm çapında açılan her bir yaraya, 1×10^6 konidi/ml konsantrasyona ayarlanmış spor süspansiyonundan 50 µl olacak şekilde pipet yardımıyla inokulasyon yapılmıştır. Kontrol meyvelerine ise steril saf su uygulanmıştır. İkinci deneme için, aynı şekilde dezenfekte edilen sürgün ve yapraklar, içerisinde steril kurutma kağıdı bulunan petri kaplarının içerisine yerleştirilmiş ve dokuların üzerlerine 7 günlük fungus kültürlerine ait diskler yerleştirilmiş ve inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyondan 15 gün sonra lezyon alanları ölçülerek hastalık oranları belirlenmiştir. Elde edilen izolatların limon bitkisinin sürgün, yaprak ve meyvelerinde gerçekleştirilen patojenite denemesi sonucu virülensliği en yüksek olan izolat belirlenmiştir.

Denemede kullanılan fungusitler

Denemede yer alan fungusitler, ticari formülasyonlar halinde kullanılmıştır. Bunlar; tebuconazole (Folicur WP 25, BAYER), fluopyram+tebuconazole (Luna Experience SC 400, BAYER), Fluazinam (Nando 500 SC, NUFARM), dithianon+phosphorus acid (Delan Pro SC, BASF), fluxapyroxad+difenoconazole (Activus, SC, BASF), mancozeb+dimethomorph (Acrobat Plus WG, BASF), kresoxim-methyl+boscalid (Collis SC, BASF), metiram+pyraclostrobin (Cabrio, WG, BASF), metrafenone (Vivando SC, BASF) ve kresoxim-methyl (Candit, WG, BASF) şeklinde 10 adet olarak belirlenmiştir.

Colletotrichum gloeosporioides izolatının seçilen fungusitlere karşı in vitro duyarlılık denemeleri

Miselyal gelişim denemesi

Çalışmada kullanılacak fungusitlerin bir seri konsantrasyonlarını içeren katı besi ortamlarında radyal gelişmeyi ölçerek miselyal gelişimin engellenme oranı saptanmıştır (Çizelge 1). Çalışmada kullanılan fungusitlerden tebuconazole 0.1-100

µgml⁻¹, fluopyram+tebuconazole 0.001-0.01 µgml⁻¹, fluazinam 0.001-0.01 µgml⁻¹, dithianon+phosphorus acid 0.001-0.01 µgml⁻¹, fluxapyroxad+difenoconazole 0.001-0.01 µgml⁻¹, mancozeb+dimethomorph 0.1-10 µgml⁻¹, kresoxim-methyl+boscalid 0.001-0.01 µgml⁻¹, metiram+pyraclostrobin 0.1-20 µgml⁻¹, metrafenone 0.001-0.01 µgml⁻¹, kresoxim-methyl 0.1-20 µgml⁻¹ konsantrasyonları kullanılmıştır. Her bir fungusitin belirli konsantrasyonları, 50 °C'ye soğutulmuş PDA ortamına karıştırılmış ve petrilere dökülmüştür. Kontrol olarak herhangi bir fungusit içermeyen PDA kullanılmıştır. *C. gloeosporioides*'in 5 gün süreyle PDA'da aktif olarak geliştirilmiş kolonilerinin kenarlarından kesilmiş 5 mm çapındaki miselyal diskleri, yaklaşık 10 ml PDA içeren Petri kaplarının orta kısmına miselyal kısım alta gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Kültürler, karanlıkta 20 °C'de 3-7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca ortalama koloni çapları ölçülerek günlük radyal gelişme hesaplanmıştır. Her bir izolat için yapılan deneme, her bir fungusit konsantrasyonu için 3 kez tekrarlanmıştır.

Konidiyal çimlenme denemesi

Seçilen fungusitlerin *C. gloeosporioides*'in konidi çimlenmesi üzerine etkisini belirlemek için, uygun hacimleri su agarı (WA) besi yerine eklenmiştir. Seçilen fungusitlerden tebuconazole 0.5-100 µgml⁻¹, fluopyram+tebuconazole 0.001-0.01 µgml⁻¹, fluazinam 0.001-0.01 µgml⁻¹, dithianon+phosphorus acid 0.001-0.01 µgml⁻¹, fluxapyroxad+difenoconazole 0.001-0.03 µgml⁻¹, mancozeb+dimethomorph 0.1-5 µgml⁻¹, kresoxim-methyl+boscalid 0.001-0.03 µgml⁻¹, metiram+pyraclostrobin 0.1-10 µgml⁻¹, metrafenone 0.01-5 µgml⁻¹, kresoxim-methyl 0.1-20 µgml⁻¹ konsantrasyonlarında kullanılmıştır (Çizelge 1). Steril saf su kullanılarak kaşık yardımıyla kazıma yöntemi ile spor süspansiyonu hazırlanmış ve 2 katlı tül bentten süzülmüştür. Spor süspansiyonu hemacytometer yardımıyla 1×10^6 konidi/ml'ye ayarlanmıştır. Her biri 10 ml WA içeren Petri kaplarına 10 µl konidi süspansiyonu damla halinde pipetle damlatılmıştır. Tüm denemeler, her bir konsantrasyon için 3 tekrar olacak şekilde yürütülmüştür. Ayrıca fungusit uygulanmamış 3 tekrarlı kontrol Petri kapları oluşturulmuştur. Daha sonra konidileri çimlenmeye bırakmak için Petri kapları, karanlıkta 20 °C'de 14-18 saat bekletilmiştir. Çimlenme oranı, bir konidinin en az 3 katı uzunluğa sahip ve normal görünümlü çim tüpleri içeren 100 konidi sayılarak belirlenmiştir.

İstatistiksel analizler

Denemeler, tesadüf parselleri deneme deseninde kurulmuş ve elde edilen tüm veriler, varyans analizine tabi tutularak

Çizelge 1. *Colletotrichum gloeosporioides*'in miselyal gelişim ve konidial çimlenme denemelerinde kullanılan fungusitlerin farklı konsantrasyonları (μgml^{-1})

Fungisitler	Miselyal gelişim	Konidial çimlenme
Tebuconazole	0.1-100	0.5-100
Fluopyram+Tebuconazole	0.001-0.01	0.001-0.01
Fluazinam	0.001-0.01	0.001-0.01
Dithianon+Phosphorus acid	0.001-0.01	0.001-0.01
Fluxapyroxad+Difenoconazole	0.001-0.01	0.001-0.03
Mancozeb+Dimethomorph	0.1-10	0.1-5
Kresoxim-methyl+Boscalid	0.001-0.01	0.001-0.03
Metiram+Pyraclostrobin	0.1-20	0.1-10
Metrafenone	0.001-0.01	0.01-5
Kresoxim-methyl	0.1-20	0.1-20

ortalamalar, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ($P>0.05$) karşılaştırılmıştır. Her bir fungusitin farklı konsantrasyonlarındaki etki oranları, Abbott formülü ile hesaplanmıştır. Bununla birlikte *C. gloeosporioides* izolatının EC_{50} değeri, SPSS istatistik programı ile \log_{10} fungusit konsantrasyonuna karşı gelişimin engellenme oranı üzerinden regresyon analizi yapılarak hesaplanmıştır. Fungisit konsantrasyonları μg etken madde (e.m.) ml^{-1} olarak ifade edilmiştir.

SONUÇLAR

Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması ve izolatların tanılanması

Limon bahçelerinden toplanan hastalıklı bitki örneklerinin PDA besi yerinde izolasyonları sonucunda başlangıçta beyaz gri, sonra koyu gri ve turuncu koloniler gözlenmiştir. Bu fungal kolonilerin mikroskopik incelemeleri sonucu, konidilerin silindirik, şeffaf, bölmesiz ve $17.42 \times 4.87 \mu\text{m}$ boyutlarında olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte fungusun apresoryumlarının açık kahverengi, düzensiz,

pürüzsüz şekilli ve $6.9-12.8 \times 5.5-8.0 \mu\text{m}$ boyutlarında olduğu kaydedilmiştir. Bu türün, PDA besi yerinde 7 günde $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonucu 57.1 mm ve 60.0 mm koloni çapına ulaştığı tespit edilmiştir. Bu fungal gelişimin morfolojik ve kültürel özelliklerine dayanılarak fungus türü, *Colletotrichum gloeosporioides* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen bu türün morfolojik teşhisini doğrulamak için izolatların ITS (Internal transcribed spacer) ve GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gen bölgelerine göre PCR sonuçları sekanslanmış ve NCBI kütüphanesinde BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizi yapılarak izolatların *C. gloeosporioides* olduğu belirlenmiştir. Akdeniz Bölgesinde yer alan Mersin, Adana ve Hatay illerindeki üretim alanlarından limon antraknoz hastalığı etmeni olarak 32 izolat elde edilmiş olup, bunun 20 tanesi *C. gloeosporioides* olarak tanımlanmıştır. Moleküler teşhis için fungal kültürlerin tek spor izolatlarının genomik DNA izolasyonlarından sonra rDNA ITS bölgesi ve GAPDH için, sırasıyla ITS1/ITS4 ve GDF/GDR primerleriyle PCR çalışmaları yapılmıştır. Fungal DNA dizilerinin NCBI BLAST sonuçlarına

göre Genbank veritabanından 7 tane izolata ait erişim numaraları alınmıştır. İzolatların GAPDH için erişim numaraları, LC1 (MG951769), LC2 (MG966511), LC3 (MG951787), LC5 (MG951781), LC8 (MG951793), LC9 (MG951778) ve LC10 (MG951789) olarak kaydedilmiştir.

Elde edilen izolatların patojenite çalışmaları sonucunda limonda *C. gloeosporioides*'in en virulent izolatu, meyvede %55.5, sürgünde %74.0 ve yaprakta %96.2 oranındaki hastalık şiddeti ile LC5 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen tüm *C. gloeosporioides* izolatları, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde +4 °C'de muhafaza edilmektedir.

Colletotrichum izolatının seçilen fungusitlere karşı in vitro duyarlılık denemeleri

Miselyal gelişim

Farklı fungusitlerin *C. gloeosporioides*'in LC5 izolatının miselyal gelişimi engellemesi üzerine etkileri incelendiğinde, en düşük konsantrasyonlarda (0.01 µgml⁻¹) en yüksek etkiyi gösteren fungusitler, sırasıyla fluopyram+tebuconazole, fluazinam, fluxapyroxad+difenoconazole ve dithianon+phosphorus acid %100-81.7 aralığında etkili bulunmuştur (Çizelge 2). Seçilen fungusitlerin konsantrasyonları yükseltildiğinde (10-100 µgml⁻¹), tebuconazole, pyraclostrobin+metiram, kresoxim methyl ve dimethomorph+mancozeb %100-45.8 aralığında etki gösterebilmiştir.

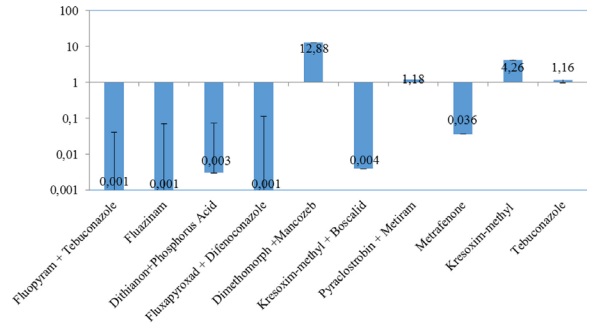
C. gloeosporioides'in LC5 izolatının misel gelişimlerinin fungusitlere duyarlılığı EC₅₀ değerleri üzerinden incelendiğinde (Şekil 1), en etkili fungusitlerin fluopyram+tebuconazole, fluxapyroxad+difenoconazole ve fluazinam'ın 0.001 µgml⁻¹ EC₅₀ değerleri ile en etkili fungusitler olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık 1 µgml⁻¹ EC₅₀ değerinin üzerinde etkili konsantrasyona sahip fungusitler, dimethomorph+mancozeb, pyraclostrobin+metiram ve kresoxim methyl olarak bulunmuştur.

Konidyal çimlenme

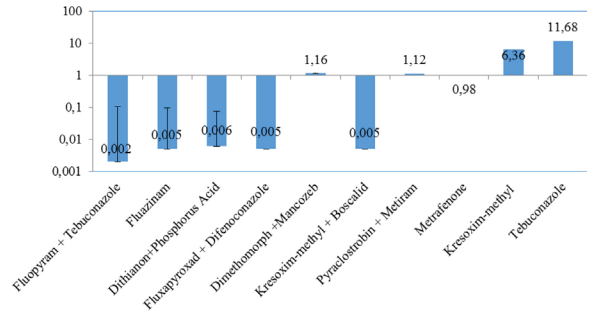
Kullanılan fungusitlerin *C. gloeosporioides*'in LC5 izolatının konidyal çimlenmesini engellemesi üzerine etkisi ve duyarlılığı incelendiğinde (Çizelge 2); 1 µgml⁻¹ konsantrasyonun altında fungusun konidi çimlenmesinin fluopyram+tebuconazole, fluazinam, dithianon+phosphorus acid, fluxapyroxad+difenoconazole ve kresoxim methyl+boscalid tarafından %90'a yakın değerlerde engellendiği saptanmıştır. Diğer söz konusu fungusitlerin ise benzer etkiyi gösterebilmesi için 1-10 µgml⁻¹ konsantrasyon aralığında kullanılması gerektiği belirlenmiştir (Çizelge 3).

C. gloeosporioides'in LC5 izolatının konidyal çimlenmesi üzerine kullanılan fungusitlerin etkili konsantrasyonları göz önüne alındığında (Şekil 2), EC₅₀ değerlerinin 0.002-11.68 aralığında olduğu kaydedilmiştir. Elde edilen bulgulara göre en yüksek EC₅₀ değerlerine fluopyram+tebuconazole, fluazinam, dithianon+phosphorus acid, fluxapyroxad+difenoconazole ve kresoxim methyl+boscalid fungusitlerinin sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak limonda antraknoz hastalığı etmeni *C. gloeosporioides*'e karşı fungusun hem miselyal gelişim hem de konidi çimlenmesi parametreleri esas alındığında en yüksek etkiyi, fluopyram+tebuconazole, fluazinam, fluxapyroxad+difenoconazole ve dithianon+ phosphorus acid fungusitlerinin gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 1. *Colletotrichum gloeosporioides*'in LC5 izolatının miselyal gelişiminin fungusitlere karşı duyarlılığı (EC₅₀ değerleri)



Şekil 2. *Colletotrichum gloeosporioides*'in LC5 izolatının konidyal çimlenmesinin fungusitlere karşı duyarlılığı (EC₅₀ değerleri)

Çizelge 2. Fungisitlerin farklı konsantrasyonlarda *Colletotricum gloeosporioides*'in miselyal gelişimi üzerine etkileri

Fluopyram+Tebuconazole						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
80.0±0.0f*	25.3±0.33e	21.0±1.0d	17.3±0.33c	11.6±0.88b	0.0±0.0a	
% Etki	68.3	73.8	78.3	85.4	100.0	
Fluazinam						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
80.0±0.0f	32.6±1.45e	27.6±1.45d	24.3±0.33e	15.3±0.33b	4.6±0.33a	
% Etki	59.2	65.4	69.6	80.8	94.2	
Dithianon+Phosphorus Acid						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
80±0.0f	61.0±1.0e	43.6±0.67d	30.6±0.67c	20.0±0.0b	14.6±0.33a	
% Etki	23.8	45.4	61.7	75.0	81.7	
Metrafenone						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
80.0±0.0e	76.3±0.88d	71.6±1.67c	64.3±0.67b	61.0±0.57a	60.0±0.0a	
% Etki	4.6	10.4	19.6	23.8	25.0	
Fluxapyroxad+Difenoconazole						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
80.0±0.0f	36.3±0.88e	25.6±0.67d	20.3±0.33c	17.0±0.57b	12.3±0.33a	
% Etki	54.6	67.9	74.6	78.8	84.6	
Kresoxim-methyl+Boscalid						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
80.0±0.0d	46.0±0.57c	41.0±0.57b	40.0±0.0b	35.3±0.33a	34.3±0.67a	
% Etki	42.5	48.8	50.0	55.8	57.1	
Dimethomorph+Mancozeb						
Kontrol	0.1	0.5	1	3	5	10
80.0±0.0g	74.3±0.67f	70.0±0.0e	63.3±0.88d	53.6±0.67c	48.3±0.88b	43.3±1.67a
% Etki	7.1	12.5	20.8	32.9	39.6	45.8
Pyraclostrobin+Metiram						
Kontrol	0.1	0.5	1	5	10	20
80.0±0.0g	52.6±0.33f	50.0±0.0e	43.6±0.67d	32.6±0.33c	25.3±0.33b	16.0±0.57a
% Etki	34.2	37.5	45.4	59.2	68.3	80.0
Kresoxim-methyl						
Kontrol	0.1	0.5	1	5	10	20
80.0±0.0e	49.3±0.67d	49.3±0.67d	43.6±0.67c	40.0±0.0b	38.6±0.67b	33.3±0.88a
% Etki	38.3	38.3	45.4	50.0	51.7	58.3
Tebuconazole						
Kontrol	0,1	0,5	1	10	50	100
80.0±0.0g	58.3±1.7f	41.6±1.7e	35.3±1.4d	21.6±0.8c	4.3±0.7b	0.0±0.0a
% Etki	27,1	47,9	55,8	72,9	94,6	100,0

Çizelge 3. Fungisitlerin farklı konsantrasyonlarda *Colletotrichum gloeosporioides*'in konidiyal çimlenmesi üzerine etkileri

Fluopyram+Tebuconazole						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
100±0.0f*	81.6±0.8e	71.3±0.8d	51.0±0.57c	41.3±0.3b	10.3±0.3a	
% Etki	18.3	28.7	49.0	58.7	89.7	
Fluazinam						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
100±0.0f	72.0±0.57e	62.3±0.3d	48.3±0.8c	30.0±0.57b	13.6±0.8a	
% Etki	28.0	37.7	51.7	70.0	86.3	
Dithianon+Phosphorus Acid						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	
100±0.0f	71.0±1.0e	60.3±0.3d	48.3±0.8c	28.3±0.8b	10.3±0.3a	
% Etki	29.0	39.7	51.7	71.7	89.7	
Dimethomorph+Mancozeb						
Kontrol	0.1	0.5	1	3	5	
100±0.0f	77.6±1.45e	58.3±0.8d	43.0±1.0c	28.3±0.8b	11.0±0.57a	
% Etki	22.3	41.7	57.0	71.7	89.0	
Metrafenone						
Kontrol	0.01	0.1	0.5	1	5	
100±0.0f	60.3±0.3e	49.6±0.3d	44.6±0.3c	40.3±0.3b	35.3±0.3a	
% Etki	39.7	50.3	55.3	59.7	64.7	
Tebuconazole						
Kontrol	0,5	1	10	50	100	
100±0.0f	85.0±2.8e	7.2.6±1.5d	57.6±1.5c	37.6±1.2b	10.0±0.0a	
% Etki	15,0	27,3	42,3	62,3	90,0	
Fluxapyroxad+Difenoconazole						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	0.03
100±0.0g	85.6±0.7f	59.3±0.7e	45.6±0.7d	31.3±0.8c	24.6±0.3b	0.0±0.0a
% Etki	14.3	40.7	54.3	68.7	75.3	100.0
Kresoxim-methyl+Boscalid						
Kontrol	0.001	0.003	0.005	0.007	0.01	0.03
100±0.0g	90.3±0.3f	84.3±0.67e	61.0±1.0d	46.6±0.8c	30.3±0.3b	15.3±0.3a
% Etki	9.7	15.7	39.0	53.3	69.7	84.7
Pyraclostrobin+Metiram						
Kontrol	0.1	0.5	1	3	5	10
100±0.0g	70.6±0.6f	61.6±0.8e	50.3±0.3d	34.6±0.3c	15.6±0.3b	0.0±0.0a
% Etki	29.3	38.3	49.7	65.3	84.3	100.0
Kresoxim-methyl						
Kontrol	0.1	0.5	1	5	10	20
100±0.0g	91.6±0.8f	83.3±0.8e	61.0±1.0d	50.3±0.3c	44.6±0.3b	30.3±0.3a
% Etki	8.3	16.7	39.0	49.7	55.3	69.7

* Duncan çoklu karşılaştırma testine göre aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $P \leq 0.05$ 'e göre önemsizdir

TARTIŞMA VE KANI

Ülkemizdelimonyetiştiriciliği yapılan bölgelerde antraknoz hastalığına neden olan *C. gloeosporioides* etmenine sıklıkla rastlanmaktadır. Son yıllarda Avrupa'da turuncgillerde antraknoza neden olan *Colletotrichum* türlerinin morfolojik ve moleküler olarak tanıları gerçekleştirilmiş ve en virulent türün *C. gloeosporioides* olduğu bildirilmiştir (Guarnaccia et al. 2017). Ayrıca araştırmacılar, etmenin tüm yetiştirme sezonu boyunca ortaya çıkabileceğini ve limon bitkisinin tüm organlarını enfekte edebildiğini saptamışlardır. Aynı şekilde, ülkemizde çalışmamızın yapıldığı Doğu Akdeniz Bölgesinde turuncgil yetiştirilen alanlarda da yılın her dönemi ve bitkinin her organında *C. gloeosporioides* etmenine rastlamak mümkündür. Bu hastalık etmeninin kontrolüne yönelik olarak dünyada farklı araştırmacılar tarafından fungusitlerin etkileri üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Ülkemizde de henüz bu hastalığa karşı ruhsatlı bir fungusitin olmaması, bu denemelerin yürütülmesini zorunlu kılmıştır.

Farklı etki mekanizması ve kimyasal gruptan fungusitleri seçerek yürütülen bu çalışma, dünyanın değişik yerlerinde antraknoz hastalıklarına karşı yapılan çalışmalarda kullanılan fungusitlerle benzerlik göstermektedir. Portakalda antraknoza neden olan *C. gloeosporioides*'e karşı Sicilya'da yapılan çalışmada, QoI fungusitleri olarak azoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin kullanılmış ve elde edilen etkinlik düzeylerine ilişkin bulgular, çalışmamızda karışım ilaç olarak kullanılan pyraclostrobin fungusiti ile elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir. Ayrıca söz konusu çalışmada *in vivo* koşullarda denemeler yürütülmüş ve sonuçlar *in vitro* denemesinin bulgularını destekler nitelikte bulunmuştur (Piccirillo et al. 2018).

C. acutatum'un neden olduğu Chili antraknozuna karşı azoxystrobin, picoxystrobin, difenoconazole, thiophanate-methyl, mancozeb ve pyraclostrobin gibi strobilurin (QoIs), DMI, dithiocarbamate gibi farklı gruplardan tekli fungusitler denemeye alınmıştır. *In vitro* denemelerde pyraclostrobin ve azoxystrobin hem miselyal gelişimin hem de spor çimlenmesinin, mancozeb ise sadece spor çimlenmesinin ve difenoconazole ile thiophanate-methyl ise sadece miselyal gelişimin engellenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Gao et al. 2017). Mevcut çalışmada tekli fungusitlerin yanı sıra karışım fungusitler, *C. gloeosporioides*'e karşı kullanılmış ve elde edilen sonuçlara göre çalışmalarımızda karışım fungusitlerin daha etkili olduğu gözlenmiştir. Pyraclostrobin etken maddesinin metiram ile karışımı, yüksek konsantrasyonlarda hem misel gelişimi hem de spor çimlenmesi aşamalarında etkili sonuçlar ortaya koymuştur. Mancozeb'in dimethomorph

ile karışımının ise *C. gloeosporioides*'e karşı spor çimlenmesinde daha etkili olduğu saptanmıştır.

C. gloeosporioides, *C. acutatum*, *C. cereale* ve *C. orbiculare* türlerine ait izolatların, fluxapyroxad, fluopyram ve boscalid'e karşı dirençli olduğu saptanmasına karşılık (Ishii et al. 2016), çalışmamızda kullanılan fluxapyroxad, fluopyram ve boscalid etken maddelerinin fluxapyroxad+difenoconazole, fluopyram+tebuconazole ve kresoxim-methyl+boscalid karışımlarına karşı *C. gloeosporioides*'in duyarlı olduğu saptanmıştır.

Yapılan bu çalışma ile, turuncgil bahçelerinde turuncgil türlerini etkileyen antraknoz hastalığı etmeninin *C. gloeosporioides* olduğu ortaya konmuş ve bu patojene karşı 10 farklı fungusitin *in vitro* da duyarlılıkları belirlenmiştir. Sonuç olarak *C. gloeosporioides*'in neden olduğu antraknoz hastalığına karşı en yüksek etkiyi gösteren fluopyram+tebuconazole, fluazinam, fluxapyroxad+difenoconazole ve dithianon+fosforoz asit fungusitlerinin turuncgil üretim alanlarında kullanım potansiyelinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

ÖZET

Antraknoz, dünyada ve ülkemizde limon başta olmak üzere turuncgil üretimini ciddi düzeyde tehdit eden hastalıklardan birisidir. Bu çalışmanın amacı, limonda Antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in DMI, SDHI, QoIs, amid, aniline ve dithiocarbamate gibi farklı kimyasal gruplardan farklı etki mekanizmalarına sahip bazı fungusitlere karşı duyarlılığını belirlemektir. Bu amaçla, limon bahçelerinden toplanan hastalıklı bitkilerin doku parçaları, PDA besi yerinde 25 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Fungal kültürlerin morfolojik ve moleküler teşhisleri sonucunda tüm izolatların, *Colletotrichum gloeosporioides* olduğu belirlenmiştir. Patojenisite denemelerinde tüm izolatların virülenslik düzeyleri belirlenmiş ve en yüksek virülensliğe LC5 izolatının sahip olduğu tespit edilmiştir. *C. gloeosporioides* LC5 izolatının 10 farklı fungusite karşı duyarlılıkları, *in vitro*'da miselyal gelişim ve konidyal çimlenme denemeleri ile ortaya konmuştur. Sonuç olarak en yüksek etkiyi, fluopyram+tebuconazole, fluazinam, fluxapyroxad+difenoconazole ve dithianon+fosforoz asit fungusitlerinin gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: limon, Antraknoz, fungusit, *Colletotrichum*, duyarlılık

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

Alexander S.A., Waldenmaier C.M., 2002. Management of anthracnose in bell pepper. Fungicide and Nematicide Tests. Vol. 58. New Fungicide and Nematicide Data Committee of the American Phytopathological Society. p. 49.

Bosland P.W., Votana E.J., 2003. Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. CAB International, England, 233 p.

FAO 2016. Statistics of Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016 <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (01.10.2018)

Gao Y.Y., He L.F., Li B.X., Mu W., Lin J., Liu F., 2017. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to six fungicides and reduction in incidence and severity of chili anthracnose using pyraclostrobin. Australasian Plant Pathology, 46, 521–528.

Gao Y., He L., Mu W., Li B., Lin J., Liu F., 2018. Assessment of the baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum acutatum* to fludioxonil. European Journal of Plant Pathology, 150, 639–651.

Guarnaccia V., Groenewald J.Z., Polizzi G., Crous P.W., 2017. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. Persoonia, 39, 32–50.

Hadden J.F., Black L.L., 1989. Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. Proceeding of the International Symposium on Integrated Management Practices: Tomato and pepper production in the tropics. Asian Vegetable Research and Development Centre. Taiwan, p.189-199.

Harp T., Kuhn P., Roberts P.D., Pernezny K.L., 2014. Management and cross-infectivity potential of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose on bell pepper in Florida. Phytoparasitica, 42, 31–39.

Ishii H., Zhen F., Hu M., Lib X., Schnabel G., 2016. Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletotrichum* species. Pest Management Science, 72, 1844–1853.

Kloutvorova J., Egert P., 2004. New possibilities for protecting stone fruits with the fungicide Horizon 250 EW. Online Courier.

Lewis I.M.L., Miller S.A., 2003. Evaluation of fungicides and a biocontrol agents for the control of anthracnose on green pepper fruit, 2003. Nematicide Test Report. Vol. 58. New Fungicide and Nematicide Data Committee of the American Phytopathological Society, p. 62.

Piccirillo G., Carrieria R., Polizzib G., Azzaroc A., Lahoza E., Fernández-Ortuñod D., Vitaleb A., 2018. *In vitro* and

in vivo activity of QoI fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing fruit anthracnose in *Citrus sinensis*. Scientia Horticulturae, 236, 90–95.

Ramos A.P., Talhinhas P., Sreenivasaprasad S., Oliveira H., 2016. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C. karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. Phytoparasitica, 44, 549–561.

Rhaiem A., Taylor P.W.J., 2016. *Colletotrichum gloeosporioides* associated with anthracnose symptoms on citrus, a new report for Tunisia. European Journal of Plant Pathology, 146, 219–224.

Uysal A., Kurt Ş., Akgül D.S., 2016. Akdeniz Bölgesi limon bahçelerinde antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*'in patojenik ve moleküler karakterizasyonu. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi, 5-8 Eylül, Konya, 597 s.

Vieira W.A.S., Lima W.G., Nascimento E.S., Michereff S.J., Reis A., Doyle V.P., Camara M.P.S., 2017. Thiophanate methyl resistance and fitness components of *Colletotrichum musae* isolates from Banana in Brazil. Plant Disease, 101,1659-1665.

