



Geliş(Received) :19/03/2019
Kabul(Accepted) :17/07/2019

Araştırma Makalesi/Research Article
Doi:10.30708mantar.541886

Toprak Mikrofunguslarının Dikotan Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Fatih KALYONCU, Azize ÖZER
Sorumlu Yazar: fatih.kalyoncu@cbu.edu.tr

Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Muradiye, 45140, Manisa, TÜRKİYE
fatih.kalyoncu@cbu.edu.tr /Orcid No: 0000-0003-3912-9373
azize.ozer@hotmail.com /Orcid No: 0000-0002-4738-4991

Öz: Bu çalışmada, Manisa İlindeki tarım alanlarından izole edilen mikrofungusların sıklıkla kullanılan bir fungusit olan dikotana karşı duyarlılık / dirençlilik durumları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; katı besiyeri üzerinde dirençlilik yönünden tarama testleri yapılmış, dirençli izolatların sıvı ortamda gelişimlerinin hangi oranda engellendiği araştırılmıştır. Çalışma kapsamında izole edilen 183 mikrofungus izolatından 28 tanesinin dikotana direnç gösterdiği saptanmıştır. Dikotanın bu dirençli izolatların gelişimlerini engelleme oranının % 15 ile % 48 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Dikotan, Dirençlilik, Duyarlılık, Fungisit, Mikrofungus

Determination of Dikotan Sensitivity of Soil Microfungi

Abstract: In this study, determination of susceptibility / resistance conditions of microfungi isolated from different agricultural areas against dikotan which is a commonly used fungicide. For this purpose, screening tests were performed on solid medium in terms of resistance and rate of inhibition of the development of resistant isolates in liquid medium was investigated. It was determined that 28 of the 183 isolates of microfungi showed dikotan resistance. Dikotan has been found to inhibit the development of these resistant isolates from 15 % to 48 %.

Key words: Dikotan, Fungicides, Microfungus, Resistance, Sensitivity

Giriş

Funguslar ayrıştırıcı rolleri ile doğal çevrimin devamlılığını sağlayan ve yeryüzünün her parçasında geniş yayılım gösteren canlılardır. İnsanoğlunun var olduğu günden bu yana funguslar ile yakın ilişkisi bulunmaktadır. Bu ilişki gıda elde etmek için kullanımlarından, hastalıklarından korunmaya kadar geniş bir yelpazeye yayılmıştır. Araştırmacılar bir milyonun üzerinde fungus türü bulunduğunu düşünmektedirler ancak bu türlerin günümüze değin yalnızca yüz bin kadarı tanımlanabilmiştir (Singh, 2005).

Hızlı nüfus artışı tarımsal ürünlere gereksinimi artırırken, ekimi yapılan arazilerin oranı farklı amaçlar için kullanım sebebi ile hızla azalmaktadır (Ni vd., 2004; Karakoç ve Nakiboğlu, 2010). Tarım ürünlerinde verim kaybı oluşturan etmenlerden biri de büyüme ve gelişmeyi engelleyici, parazitik veya patojen yapıdaki çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardır. Bu etmenlerle mücadele için farklı yöntemler kullanılmakla birlikte en sık tercih edilen kimyasal mücadeledir (Delen vd., 2005).

Bilinçli ve kontrollü kimyasal kullanımı; yüksek ve hızlı etki kapasitesi, ekonomik olması, bitki gelişimini istenilen yönde etkileme ve tarla koşullarında ürünü toksin kontaminasyonundan koruma gibi avantajlara sahiptir (Rapsdale, 1994). FAO verilerine göre ülkemizde tarımsal ilaç kullanımı yaklaşık 1.63 kg/ha'dır ve Ege Bölgesi kullanım miktarı açısından % 25 ile Marmara Bölgesinin (% 28) ardından ikinci sırada yer almaktadır (Arslan ve Çiçekgil, 2018). Dikotan dithiyokarbonat grubundan bir fungusittir. Etken maddesi mancozebdir ve dirençlilik riski düşük olarak değerlendirilmektedir. Parçalanma ürünlerinin fungus hücresindeki proteinlerin sülfidril grupları ile birleşmesi sonucu enzimleri ve diğer hücresel fonksiyonları durdurarak etki göstermektedir. Yapısında bulunan çinko ve mangan bu elementler açısından fakir yerlerde yetişen bitkiler tarafından kullanılabilir (Delen, 2008).

Bu çalışmanın amacı; yoğun tarımsal üretim yapılan alanlarda bulunan mikrofungusların, araştırma alanında sıklıkla kullanıldığı yapılan saha incelemesi ile



anlaşılan ve literatürde dirençlilik riski düşük olarak değerlendirilen bir fungusit olan dikotana karşı duyarlılık / dirençlilik durumlarının saptanmasıdır. Elde edilecek verilerin dikotanın mikrofunguslar üzerindeki etki düzeyini güncel olarak ortaya çıkarması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmamızda kullanılan toprak numuneleri Manisa İli, Yunussemre İlçesi'nde bulunan ve farklı ürünlerin (mısır, tütün, zeytin, domates, üzüm) yetiştirdiği altı araziden kış ve yaz mevsimlerinde (Ocak ve Temmuz) kompozit toprak örnekleme yöntemi ile alınmıştır (Aderiyev vd., 2008). En kısa sürede laboratuvara getirilen örnekler hızla analiz edilmiştir. Yüzde nem değerleri hesaplanan örneklerin kimyasal analizleri (pH, tuzluluk, kireç, nitrat, fosfor, potasyum, sodyum, demir, bakır, çinko ve mangan) Manisa İl Tarım Müdürlüğü toprak laboratuvarında yaptırılmıştır. Toprak örneklerinin kimyasal analizleri istasyonlar arasında fungal yoğunluğu etkileyecek düzeyde farklılık olup olmadığının belirlenebilmesi amacı ile yapılmıştır.

Örneklerin mikrofungus yoğunlukları toprağı sulandırma yöntemi ile seyreltme sonucunda hesaplanmıştır. Önceden yüzde nem değeri hesaplanan numuneler 10 gr kuru ağırlık olarak tartılmış ve toplam hacim 100 ml olacak şekilde steril distile su ile seyreltilmiştir. Bu stok solüsyon 120 rpm hızında 10 dakika çalkalandıktan sonra 10^{-2} – 10^{-6} 'lık dilüsyonlar hazırlanmış ve tüm dilüsyonlar incelenmiştir (Waksman, 1922). Her bir istasyon için ayrı ayrı hazırlanan seyreltme tüplerinden steril Rosebengal Chloramphenicol Agar (RBCA) içeren petrilere 1'er ml aktarılmış ve 27°C'de 3-10 gün inkübasyona alınmıştır. Düzenli kontrol edilen Petri kaplarındaki mikrofungus kolonileri sayılarak numaralandırılmış ve Malt Ekstrakt Agar (MEA) içeren tüplere alınarak inkübasyon sonrası +4°C'de muhafaza edilmişlerdir (Kalyoncu ve Özer, 2017).

Takip eden aşamada mikrofungus izolatları 2 gr/L dozda dikotan içeren MEA besiyerine aşılanarak (27°C'de 3-10 gün) duyarlılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu doz dikotanın kullanım reçetesinde verilen en yüksek dozdur. Bu tarama testi sonucunda dikotan içeren ortamda gelişme gösteren izolatlar belirlenmiştir. Dikotana dirençli olduğu düşünülen bu izolatlar güncel literatür kullanılarak tanımlanmıştır (Domsch vd., 1980; Pitt, 2000; Klich, 2002; Samson vd., 2004). Bu izolatlar daha sonra aynı dozda dikotan içeren sıvı besiyerine (Malt Ekstrakt Broth) aktarılmışlardır. Aşılamada standardı sağlamak için katı ortamda gelişen kolonilerden çıkarılan 6 mm çapındaki misel kaplı tek disk kullanılmıştır. İnokulasyon sonrası erlenler çalkalamalı inkübatörde 27°C'de, 120 rpm

hızında 30 gün süre ile karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Aynı işlem dikotan içermeyen sıvı besiyeri ile de tekrarlanmıştır. Tüm denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmış, inkübasyon sonunda mikrofungus miselleri sıvıdan süzülerek ayrılmış ve kurutulup tartılmıştır (Kalyoncu ve Özer, 2017). Bu şekilde aynı izolatin dikotan içeren ve içermeyen sıvı ortamdaki biomass miktarı hesaplanarak aradaki fark ortaya çıkarılmış ve dikotanın fungusun gelişimi üzerindeki etki düzeyi belirlenmeye çalışılmıştır.

Bulgular

Bu çalışmada izole edilen 183 mikrofungus izolatu içinde en sık karşılaşılan üç genus sırasıyla *Aspergillus* (% 26), *Rhizopus* (% 21) ve *Penicillium* (% 15)'dur. Katı ortam denemelerinde dikotana dirençli olduğu belirlenen izolat sayısı ise 28'dir. Bu izolatların teşhisi ile belirlenen 8 genusa dâhil 18 mikrofungus türü Tablo 1'de verilmiştir.

Sıvı ortamda gerçekleşen ve dikotanın etki düzeyini belirlemeye yönelik denemelerin sonuçları da Tablo 2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre dikotan dirençli olduğu belirlenen izolatların gelişimini % 15 ile % 48 arasında engellemiştir. Gelişim *Penicillium expansum* Link'de % 48 oranında, *Aspergillus fumigatus* Fresen'de ise % 15 oranında inhibe edilmiştir.

Toprak numunelerinin kimyasal analiz sonuçları Tablo 3'de verilmiştir. Fungusların optimum gelişim için asidik ortamları tercih ettikleri bilinen bir durumdur (Başbülbül vd., 2011). Örnekleme yapılan araziler ise genel olarak alkali özelliktedir. Bu durumun fungal biyoçeşitlilik üzerinde olumsuz etkisi olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Tablo 3'de de görülebileceği üzere istasyonlarımız azot ve fosfor açısından genelde fakirdir. Bu sebeple yoğun gübreleme faaliyeti görülmektedir.

Tartışma

Dünya genelinde görülen hızlı nüfus artışı ve beslenme sorunları günümüzde büyüyen bir sorun teşkil etmektedir. Tarıma dayalı ekonomiye sahip ülkelerde bu durum sosyo-ekonomik gelişim üzerinde de etkili olmaktadır. Birim alandan daha yüksek verim elde etmek için tohum, toprak, sulama, gübreleme gibi konularda çalışmalar yapılmaktadır. Bunların yanı sıra ürünü zararlılardan korumak için de büyük çaba harcanmaktadır. Hastalık ve zararlıların tarımsal üretimde % 30'a varan kayıplara neden olması, mikroorganizmalar tarafından üretilen toksinlerin ürünün kalitesini olumsuz etkilemesi gibi nedenlerden dolayı yoğun kimyasal mücadele yapılmaktadır (Kalyoncu ve Özer, 2017).



Tablo 1. Dikotana direnç gösteren mikrofungus türleri

1	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.
2	<i>A. tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire
3	<i>Aspergillus flavus</i> Link
4	<i>A. fumigatus</i> Fresen.
5	<i>A. niger</i> Tiegh.
6	<i>A. parasiticus</i> Speare
7	<i>A. wentii</i> Wehmer
8	<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. & M.A. Curtis
9	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldt.
10	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx
11	<i>P. brevicompactum</i> Dierckx
12	<i>P. digitatum</i> (Pers.) Sacc.
13	<i>P. expansum</i> Link
14	<i>P. lanosum</i> Westling
15	<i>Rhizopus arrhizus</i> A. Fisch.
16	<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
17	<i>Talaromyces funiculosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert
18	<i>Trichoderma viride</i> Pers.

Tablo 2. Dirençli mikrofungusların misel kuru ağırlıkları (gr)

	Dikotan İçeren Ortam	Dikotansız Ortam	Gelişim Farkı %
<i>Alternaria alternata</i>	1.32	1.67	21
<i>A. tenuissima</i>	1.58	2.13	26
<i>Aspergillus flavus</i>	1.17	1.43	18
<i>A. fumigatus</i>	2.32	2.73	15
<i>A. niger</i>	1.03	1.32	22
<i>A. parasiticus</i>	1.13	1.69	33
<i>A. wentii</i>	1.34	1.78	25
<i>Cladosporium oxysporum</i>	2.14	2.68	20
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.29	3.23	29
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1.13	1.79	37
<i>P. brevicompactum</i>	2.15	3.16	32
<i>P. digitatum</i>	1.66	2.18	24
<i>P. expansum</i>	1.40	2.68	48
<i>P. lanosum</i>	1.70	2.75	38
<i>Rhizopus arrhizus</i>	1.91	2.82	32
<i>R. stolonifer</i>	1.09	1.67	35
<i>Talaromyces funiculosus</i>	1.13	1.62	30
<i>Trichoderma viride</i>	1.29	2.19	41



Tablo 3. Toprak örneklerinin kimyasal analiz sonuçları

İstasyon	Mevsim	pH	Tuz*	Kireç**	N ⁺⁺	P ⁺⁺	K ⁺⁺	Na ⁺⁺	Fe ⁺⁺	Cu ⁺⁺	Zn ⁺⁺	Mn ⁺⁺
1	Yaz	7.5	640	7.02	3.8	11.6	276	60	1.4	2.1	0.46	3.3
	Kış	7.1	706	4.29	3.2	1.5	237	24	2.2	1.9	0.72	4.2
2	Yaz	6.7	410	0.78	3.0	10.5	145	25	1.0	0.7	0.48	31.8
	Kış	6.4	386	0.78	3.6	1.2	224	22	1.1	0.8	0.55	11.5
3	Yaz	7.4	732	28.08	5.9	7.8	253	8	1.6	1.4	0.43	4.6
	Kış	6.7	1076	22.62	5.0	1.2	498	16	1.5	1.8	0.97	19.2
4	Yaz	7.1	450	0.78	5.9	38.8	376	25	5.9	1.7	3.54	16.8
	Kış	6.9	510	0.78	3.9	5.1	775	25	6.0	1.3	3.20	12.9
5	Yaz	7.6	595	24.57	5.9	12.2	330	10	1.7	14.2	0.70	6.6
	Kış	7.3	642	20.67	4.7	0.8	384	12	0.7	3.6	1.02	7.7
6	Yaz	7.6	465	5.46	3.2	5.2	154	12	1.8	6.9	0.53	4.5
	Kış	7.5	443	5.46	3.2	0.7	279	22	1.8	5.4	1.40	5.7

* $\mu\text{S} / \text{cm}$; ** %; ++ ppm

Kimyasal mücadelede istenmeyen durumlardan birisi de kullanılan fungisitlere karşı direnç oluşumudur. Kimyasal etmenle karşılaşan fungusun ürettiği sporlarda seleksiyon baskısı sonucu mutasyon görülme olasılığı artmaktadır. Bu şekilde, birkaç nesil sonunda dirençli birey sayısı popülasyonda baskın hale gelebilmektedir. Direnç oluşumu yalnızca fungisit kullanılabilişliğini azaltmaz aynı zamanda yetersiz mücadele sonucu ekonomik kayıplara ve beslenme problemlerine de yol açar (Yeşil ve Boyraz, 2010). Çalışmamızda izole edilebilen 183 mikrofungus izolatının 28'inde dikotana karşı dirençlilik görülmüştür. Bu veriler oransal olarak çalışma yapılan alanlarda % 15,30 oranında dirençliliği göstermektedir. Bu oran günümüz için düşük olarak görülse bile, dirençlilik beklenmeyen bir fungisit olan dikotanın kullanım imkânının gelecekte azalabileceği değerlendirilmiştir. Tarımsal üretimde fungisit kullanımı gelecekte de önemli bir yer tutacağı için fungisit

dayanıklılık yönetimi stratejilerinin geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Topraktaki mikrofungus sayısını etkileyen en önemli ekolojik faktörlerden birisi de toprak pH'sıdır. Çalışmamızda toprak örneklerinin alındıkları yerlere göre pH farklılıkları görülmektedir. İstasyonlarımız Ocak ayında Temmuz ayına göre asitleşmiştir. Bazı araştırmalarda da kış mevsimine geçişte toprak örneklerinin pH değerlerinin düştüğü belirtilmiştir (Başbülül vd., 2011). Ayrıca toprak örneklerimizin kireç oranları da farklılık göstermektedir. 3. istasyonumuz her iki örnekleme döneminde en yüksek, 2. istasyonumuz ise en düşük kireçlilik oranına sahiptir. İkinci istasyonumuz aynı zamanda mikrofungus yoğunluğunun ve izolat sayısının en düşük olduğu istasyonumuzdur.

Alınabilir fosfor miktarı açısından değerlendirildiğinde yaz döneminde tüm istasyonlar yeterli düzeyde iken kış döneminde istasyonlarda



fakirleşme görülmektedir. Sıcaklığın azalmasının yanı sıra alınabilir fosfor miktarındaki düşüş de kış örneklemede mikrofungus yoğunluğunun düşük çıkmasının nedenlerinden biri olabilir. Elbette ki toprak mikrofunguslarının sayısı ve biyoçeşitliliği üzerinde tek bir faktörün etkili olduğunu söylemek mümkün değildir (Kara, 2005). Örneğin yaz aylarında artan ortam sıcaklığına karşın toprak neminin azalması fungal yoğunluğu sınırlamaktadır. Dolayısı ile fungal yayılımda tüm ekolojik koşulların etkisi olduğu ancak habitat ve iklime bağlı olarak bazı koşulların etkisi artarken bazılarının azaldığı görülmektedir.

Toprak mikrofungusları üzerine yapılan çalışmalarda *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarının oranının yüksek olmasının bir nedeni de toprağı sulandırma yönteminin tercih edilmesidir. Çok sayıda spor oluşturabilen bu genoslara ait türlerin bu yöntem ile topraktan izole edilme oranları oldukça artmaktadır

(Asan, 1997). Çalışmamızda da toprağı sulandırma yöntemi kullanıldığı için bu iki genus üyelerine daha yüksek oranda rastlanılmıştır.

Sonuç olarak; fungusitlerin de diğer kimyasal ajanlar gibi çevre ve canlılar üzerinde olumsuz etkileri bulunmasına karşın insektisit ve herbisitlere oranla daha az kullanıldıkları için bu etkinin oranı nispeten düşük kalmaktadır. Ancak funguslar çok sayıda spor ürettikleri için ve oluşan seleksiyon baskısından dolayı fungusit dayanıklılığı oluşma olasılığı diğer pestisitlere göre daha yüksek olmaktadır. Çalışmamız sonuçlarının fungusit dayanıklılığı araştırmaları için faydalı olacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu araştırma Manisa Celal Bayar Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'nce 2010-099 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Aderiye, B.I., Laleye, S.A., Ijalana, O.R. (2008). Soil mycoflora of some commercial ventures in south west Nigeria. *Int. J. Soil Sci.*, (3) 42 – 47.
- Arslan, S., Çiçekgil, Z. (2018). Türkiye'de tarım ilacı kullanım durumu ve kullanım öngörüsü. *Tarım Ekon. Araş. Dergisi.*, (4) 1-12.
- Asan, A. (1997). Trakya bölgesi mısır tarlaları mikrofungus florası – 1. *Turkish J. Biol.*, (21) 89-101.
- Başbülbül, G., Bıyık, H., Kalyoncu, F., Kalmış, E., Oryaşın, E. (2011). Aydın, İzmir ve Manisa illerinde endüstriyel atıksular ile kirlenmiş toprakların mikrofungus florasının belirlenmesi. *Ekoloji.*, (20): 66-73.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. (2005). Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi*, Ankara.
- Delen, N. (2008). *Fungisitler*. Nobel Yayın Dağıtım, ISBN: 978-605-395-158-2. Ankara.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. (1980). Compendium of soil fungi. Academic Press, Volume: 1-2. ASIN: B003D835HQ.
- Kalyoncu, F., Özer, A. (2017). Tarım alanlarından izole edilen mikrofungusların benomil duyarlılıklarının belirlenmesi. *Türk Tarım-Gıda Bilim Teknol. Dergisi.*, 5 (10) 1184-1188.
- Kara, Ö. (2005). Kuzey Trakya dağlık yetişme ortamı bölgesindeki meşe, kayın ve karaçam ormanlarındaki toprak mikrofungusları. *Anadolu Üniv. Bilim Teknol. Dergisi.*, (6) 167 – 174.
- Karakoç, Ö., Nakiboğlu, N. (2010). Ditiyokarbamat pestisitleri ve tayin yöntemleri. *J. Balıkesir Uni. Inst. Sci. Technol.*, (12) 112-135.
- Klich, M.A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*, First Edition, CBS Publication, ISBN 90-70351-46-3. Utrecht.
- Ni, Y., Qiu, P., Kokot, S. (2004). Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides by differential pulse stripping voltammetry and chemometrics. *Anal. Chimica Acta.*, (516) 7–17.
- Pitt, J.I. (2000). *A laboratory guide to common Penicillium species*. Food Science, ISBN: 978-0643048379. Australia.
- Ragsdale, N.N. (1994). Fungicides. *Encyc. Agric. Sci.*, (2) 445-453.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. (2004). *Introduction to food and airborne fungi*. CBS Publication, ISBN: 978-9070351427. Holland.
- Singh, J. (2005). Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor Built Environ.*, (14) 229-234.
- Waksman, S.A. (1922). A method for counting the number of fungi in the soil nature. *J. Bacteriol.*, (7) 339 – 341.
- Yeşil, S., Boyraz, N. (2010). Bitki patojeni funguslarda fungusid dayanıklılığı. *Selçuk Tarım Gıda Bil. Dergisi.*, 24 (3) 101-108.