



## Tarım Alanlarından İzole Edilen Mikrofungusların Benomil Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Fatih Kalyoncu\*, Azize Özer

Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 45140 Muradiye/Manisa, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

#### Araştırma Makalesi

Geliş 12 Nisan 2017  
Kabul 31 Temmuz 2017

#### Anahtar Kelimeler:

Benomil  
Direncililik  
Duyarlılık  
Fungisit  
Mikrofungus

### ÖZET

Bu çalışmada, farklı tarımsal ürünlerin yetiştirildiği alanlardan izole edilen mikrofungusların tarımsal üretimde sık kullanılan bir fungusit olan benomile karşı duyarlılık/direncililik durumları ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla mikrofungus izolatları katı besiyeri ortamında benomile direnç yönünden taranmış, dirençli olduğu görülen izolatlar sıvı besiyerine alınarak gelişimlerinin hangi oranlarda engellendiği anlaşılmasına çalışılmıştır. Çalışma kapsamında izole edilen 183 mikrofungus izolatından 23 tanesinin benomile direnç gösterdiği saptanmıştır. Benomilin bu dirençli türlerin gelişimini engelleme oranının %19 ile %66 arasında olduğu tespit edilmiştir.

\* Sorumlu Yazar:

E-mail: fatihkalyoncu@hotmail.com

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 5(10): 1184-1188, 2017

### Determination of Benomyl Sensitivity of Microfungi Isolated from Agricultural Areas

### ARTICLE INFO

#### Research Article

Received 12 April 2017  
Accepted 31 July 2017

#### Keywords:

Benomyl  
Fungicides  
Microfungus  
Resistance  
Sensitivity

### ABSTRACT

In this study, determination of susceptibility / resistance conditions of microfungi isolated from the areas where different agricultural crops were cultivated against benomyl which is a commonly used fungicide in agricultural production. It was determined that 23 of the 183 isolates of microfungi showed benomyl resistance. Benomyl has been found to inhibit the development of these resistant strains from 19% to 66%.

\* Corresponding Author:

E-mail: fatihkalyoncu@hotmail.com

## Giriş

İnsanoğlunun dünya üzerinde var olduğu günden bu yana funguslar ile yakın ilişki içerisinde olduğu bilinen bir gerçektir. Funguslar doğanın her parçasında geniş bir yayılım alanına sahip canlılardır. Organik maddeler üzerindeki parçalayıcı etkileri, doğal çevrimin devamlılığındaki rolleri açısından oldukça önemlidir. Yaklaşık olarak bir buçuk milyon civarında fungus türünün bulunduğu inanılmaktadır ancak mikolojik araştırmaların başladığı günden bu yana geçen zaman içinde bu türlerin yalnızca yüz bin kadarı tanımlanabilmiştir (Singh, 2005).

Dünya nüfusunun hızla artmasıyla birlikte tarım ürünlerine duyulan ihtiyaç da artmakta, fakat tarım arazileri amaç dışı kullanımlarla sürekli olarak azalmaktadır (Ni ve ark., 2004; Karakoç ve Nakiboğlu, 2010). Tarım ürünlerinin verimli bir şekilde üretilmesi her geçen gün çok daha önemli bir hale gelmektedir. Verimliliği etkileyen temel faktörlerden biri, ürünlerin ortaya çıkması ve gelişmesini engelleyen çeşitli bitki, hayvan ya da mikroorganizmalardır. Bu zararlıların önlenmesi için farklı yöntemler kullanılmaktadır ve en çok kullanılan kimyasal yöntemdir (Delen ve ark., 2005). Her ne kadar kimyasal mücadele tarımsal mücadelenin içinde bir yöntem ise de tüm mücadele yöntemleri arasında en fazla kullanılanıdır. Çünkü bilinçli ve kontrollü uygulandığında kimyasal mücadelenin değişik avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar, diğer mücadele yöntemlerine oranla daha yüksek etkiye sahip olması, daha hızlı sonuç vermesi, ekonomikliği, ürünü toksin salgılayan organizmalardan tarla koşullarında koruyabilmesi ve bitki gelişimini istenilen yönde de etkileyebilmesidir (Ragsdale, 1994).

Benomil benzimidazol grubundan bir fungusittir ve sistemik özelliğindedir. Uygulama sonrası bitkide ve toprakta hızla carbendazime metabolize olur (Delen, 2008). Carbendazim fungal tubuline yüksek afinite ile bağlanır ve hücre bölünmesini engeller. Bununla birlikte benomil bitkisel ve hayvansal tubuline afinite göstermez. Bu sebeple bitkiler ve hayvanlar üzerindeki toksisitesi düşüktür. Benomilin funguslarda tek etki yeri olması direnç gelişimini artırmaktadır. Dirençlilik tek gen ile düzenlendiği için sürekli benomil uygulamaları yüksek dirençli bireyleri ortaya çıkarmaktadır (Karaarslan, 2008).

Çalışmanın amacı; tarımsal üretimin yoğun olduğu alanlarda bulunan mikrofungusların sık kullanılan bir fungusit olan benomile karşı duyarlılık/dirençlilik durumlarının belirlenmesidir. Elde edilecek sonuçlar benomil etken maddesinin mikrofunguslar üzerindeki etki düzeyini güncel verilerle ortaya çıkaracaktır.

## Materyal ve Metot

Çalışma kapsamında kullanılan toprak örnekleri Manisa İli, Yunussemre İlçesi, Muradiye Mahallesi'nde bulunan farklı tarımsal ürünlerin yetiştirildiği altı araziden yaz ve kış örnekleme şeklinde alınmıştır. Örneklerin alınmasında kompozit toprak örnekleme yöntemi kullanılmıştır (Aderiye ve ark., 2008). Toprak örneklerinin alındığı dönemde 1. istasyonda mısır, 2.

istasyonda tütün, 3. istasyonda zeytin, 4. istasyonda domates, 5. ve 6. istasyonda ise üzüm yetiştirilmektedir. Toprak örnekleri en kısa sürede laboratuvara ulaştırılarak analizlere başlanmıştır. İlk olarak toprak örneklerinin yüzde nem değerleri hesaplanmış ve Manisa İl Tarım Müdürlüğü toprak analiz laboratuvarında kimyasal analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kimyasal analiz kapsamında toprak örneklerinde pH, tuzluluk, kireç, nitrat, fosfor, potasyum, sodyum, demir, bakır, çinko ve mangan değerleri belirlenmiştir.

Toprak örneklerinin mikrofungus yoğunluklarının belirlenmesi için örnekler toprağı sulandırma yöntemi ile seyreltilerek analize hazır hale getirilmiştir. Bu yöntemde göre, önceden yüzde nem miktarı belirlenen toprak numunesi kuru ağırlığı 10 gr gelecek şekilde tartılmış ve üzerine toplam hacim 100 ml olacak şekilde steril saf su ilave edilmiştir. Stok solüsyon homojenizasyonu sağlamak için iyice karıştırılmış ve daha sonra bu solüsyon kullanılarak  $10^{-2}$ - $10^{-6}$ lık dilüsyonlar hazırlanmıştır (Waksmann, 1922). Bu şekilde her bir istasyon için hazırlanan seyreltme tüplerinden Rosebengal Chloramphenicol Agar (RBCA) içeren Petri kaplarına 1'er ml aşılama yapılmıştır. 3–10 gün süre ile 27°C 'de inkübe edilen petri kapları her gün düzenli olarak kontrol edilmiştir. Petri kaplarında oluşan mikrofungus kolonileri sayılarak ve numara verilerek steril Malt Ekstrakt Agar (MEA) içeren tüplerin içerisine aşılanmış ve yine 3–10 gün süre ile 27°C 'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda stok kültürleri içeren tüpler +4°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Bir sonraki aşamada ise stok kültürler benomilin kullanım reçetesinde belirtilen en yüksek dozda benomil içeren MEA besiyerlerine aşılanarak mikrofungus izolatlarının fungusit duyarlılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. En yüksek doz benomil için 0,6 gr/L'dir. Bu tarama testi sonucunda benomil içeren ortamda gelişme gösteren mikrofungus izolatları belirlenmiştir. Benomil dirençliliği gösteren izolatlar ilgili literatür kullanılarak tanımlanmışlardır (Domsch ve ark., 1980; Pitt, 2000; Samson ve Pitt, 2000; Klich, 2002; Samson ve ark., 2004). Bu izolatlar daha sonraki aşamada yine 0,6 gr/L benomil içeren steril sıvı besiyerine (Malt Ekstrakt Broth-MEB) aşılanmışlardır. Aşılama işleminde standardizasyonu sağlamak için katı besiyerinde gelişen kolonilerden çıkarılan 6 mm çapındaki diskler kullanılmıştır. Aşılanan erlenler çalkalamalı inkübatöre alınarak 30 gün süre ile 27–30°C aralığında ve misel gelişimini teşvik etmek amacı ile karanlıkta inkübasyona bırakılmışlardır (Kalmış ve ark., 2008). Tüm denemeler üç tekrarlı olarak yapılmış ve inkübasyon süresi sonunda erlenlerde gelişim gösteren mikrofungus izolatlarına ait biomass süzülerek besiyerinden ayrılmış ve kurutulup tartılarak benomilli ortamda üretilen biomass miktarı hesaplanmıştır. Aynı mikrofungus izolatları benomil içermeyen MEB ortamına da aşılanmış ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde benomil içeren ve içermeyen besiyerlerinde üretilen biomass miktarları karşılaştırılarak benomilin mikrofungus gelişimi üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

## Bulgular ve Tartışma

Çalışma kapsamında toplam 183 mikrofungus izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlar içinde en sık karşılaşılan ilk üç cins sırasıyla *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Penicillium* 'dur. *Aspergillus* cinsinin tüm izolatlar içindeki oranı %26 'dır. *Rhizopus* cinsinin oranı %21, *Penicillium* cinsinin oranı ise %15 'tir. Petri kabı denemelerinde bu izolatların 23 tanesinin benomile direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu 23 izolatin tanımlanması sonucu 9 cins'e ait 16 mikrofungus türü belirlenmiştir. Belirlenen mikrofunguslar Çizelge 1'de verilmiştir.

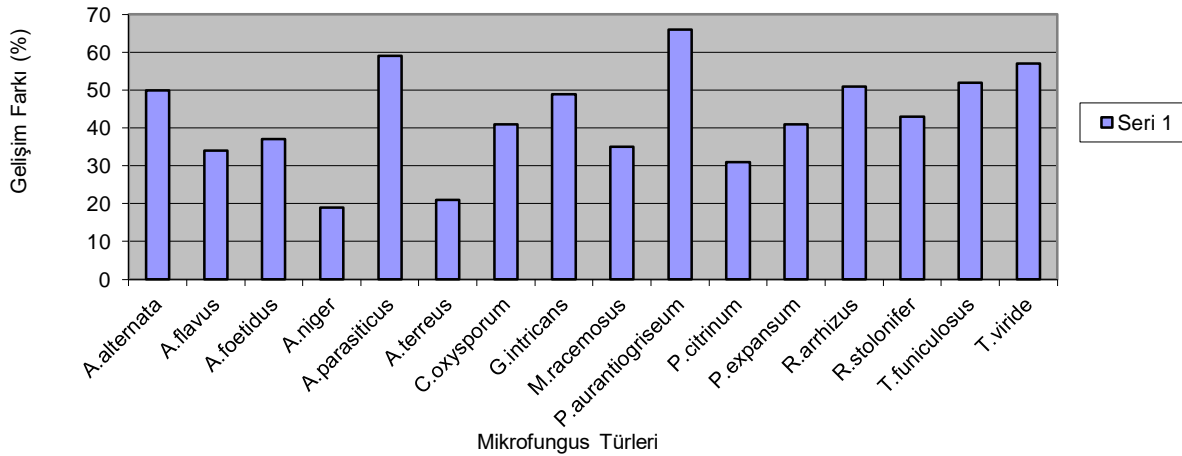
Çalışmanın Ocak ayı örneklemeğinde 6 istasyon içinde en yüksek mikrofungus konsantrasyonu 4. istasyonda, en düşük 2. istasyonda belirlenmiştir. Temmuz ayı örneklemeğinde ise en yüksek mikrofungus konsantrasyonu 5. istasyonda, en düşük ise 4. istasyonda saptanmıştır. Düşük veya yüksek olmasının sebebi, başta sıcaklık farkı olmak üzere ekimi yapılan ürünler ve kullanılan farklı kimyasal mücadele ajanları ile yağış ve gübreleme miktarları olabilir.

Sıvı besiyerlerinde gerçekleştirilen ve benomilin mikrofungusların gelişimini ne oranda etkilediğini belirlemeye yönelik deneyin sonuçları ise Şekil 1 ve Çizelge 2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre benomil direnç gösteren mikrofungusların gelişimi üzerinde %19 ile %66 arasında etkili bulunmuştur. Gelişim *Penicillium aurantiogriseum*'da %66, *Aspergillus niger*'de %19 oranında engellenmiştir.

Toprak örneklerinin kimyasal analiz sonuçları da Çizelge 3'de verilmiştir. Fungusların gelişebilmek için daha çok asit ortamları tercih ettikleri bilinmektedir (Başbülül ve ark., 2011). Çalışma alanı toprakları ise genel olarak alkali özelliktedir. Bu durumun fungus sayısı ve çeşitliğinin düşük olmasında etkisi olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada incelenen topraklar alınabilir Fosfor (ppm) yönünden değerlendirildiğinde ise Temmuz örneklemeğinde tüm toprak örneklerinin yeterli olduğu görülmektedir. Ocak örneklemeğinde ise 4. istasyon hariç diğer istasyonlar alınabilir Fosfor açısından fakirleşmiştir.

Çizelge 1 Benomile direnç gösteren mikrofungus türleri

No	Tür adı
1	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.
2	<i>Aspergillus flavus</i> Link
3	<i>Aspergillus foetidus</i> Thom & Raper
4	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.
5	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare
6	<i>Aspergillus terreus</i> Thom
7	<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. & M.A. Curtis
8	<i>Gibberella intricans</i> Wollenw.
9	<i>Mucor racemosus</i> Fresen.
10	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx
11	<i>Penicillium citrinum</i> Thom
12	<i>Penicillium expansum</i> Link
13	<i>Rhizopus arrhizus</i> A. Fisch.
14	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
15	<i>Talaromyces funiculosus</i> (Thom) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert
16	<i>Trichoderma viride</i> Pers.



Şekil 1 Mikrofungusların benomil içeren ve içermeyen ortamlardaki gelişim farkları (%)

Çizelge 2 Dirençli mikrofungusların misel kuru ağırlıkları (gr)

Tür Adı	Benomil İçeren Ortam	Benomilsiz Ortam	Gelişim Farkı %
<i>Alternaria alternata</i>	0,84	1,67	50
<i>Aspergillus flavus</i>	0,95	1,43	34
<i>Aspergillus foetidus</i>	1,10	1,73	37
<i>Aspergillus niger</i>	1,08	1,32	19
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,70	1,69	59
<i>Aspergillus terreus</i>	1,09	1,38	21
<i>Cladosporium oxysporum</i>	1,58	2,68	41
<i>Gibberella intricans</i>	1,40	2,73	49
<i>Mucor racemosus</i>	1,48	2,25	35
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0,62	1,79	66
<i>Penicillium citrinum</i>	1,49	2,14	31
<i>Penicillium expansum</i>	1,58	2,68	41
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,66	1,34	51
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,96	1,67	43
<i>Talaromyces funiculosus</i>	0,78	1,62	52
<i>Trichoderma viride</i>	0,94	2,19	57

Çizelge 3 Toprak örneklerinin kimyasal analiz sonuçları

İstasyon	Mevsim	pH	Tuz*	Kireç**	N <sup>++</sup>	P <sup>++</sup>	K <sup>++</sup>	Na <sup>++</sup>	Fe <sup>++</sup>	Cu <sup>++</sup>	Zn <sup>++</sup>	Mn <sup>++</sup>
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

\* µS / cm; \*\* %; ++ ppm, N-Azot, P-Fosfor, K-Potasyum, Na-Sodyum, Fe-Demir, Cu-Bakır, Zn-Çinko, Mn-Mangan

Günümüzde hızlı nüfus artışı ve bu nüfusun beslenmesi, dünyanın karşılaştığı en önemli problemlerden birisidir. Özellikle ekonomisi tarıma dayalı gelişen ülkelerin çoğunda gıda ihtiyacının karşılanmasında yerli üretim ana faktördür ve ülkenin sosyal ve ekonomik gelişmesinde de çok önemli bir rol oynar. Birim alandan alınan ürün miktarını artırmak için verimi yüksek çeşit kullanma, uygun toprak işleme, iyi sulama ve gübreleme yanında kültür bitkilerini zararlı organizmalardan korumak için bilinçli bir tarımsal mücadeleye gerek vardır. Hastalık, zararlı ve yabancı otlar, kültür bitkilerinde %25-30'a varan bir ürün kaybına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra tarımsal ürünlerdeki mikrofungusların oluşturdukları toksik sekonder metabolitlerin insan ve hayvan sağlığını tehdit etmesi nedeniyle gıda ve tarımsal ürünlerdeki mikrofunguslar ekonomik zararlarının yanı sıra büyük sağlık riskleri oluşturmaktadırlar. Tüm bu riskleri önlemek veya en aza indirmek amacı ile kültürel önlemler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik mücadele teknikleri uygulanmaktadır. Ancak, bunlar içerisinde sonucun hemen alınabilmesi ve uygulamasının kolay olması nedeniyle kimyasal mücadele diğerlerine göre daha yoğun olarak kullanılmaktadır (Akyıl, 2006).

Hastalıklarla kimyasal mücadelede en önemli problemlerden biri, bitki patojeni fungus popülasyonlarında fungusitlere karşı dayanıklılık

oluşumudur. Funguslar, yüksek oranda yeniden üreme gücüne sahip olduklarından fungusitlere karşı dayanıklılık geliştirmeye çok yatkındırlar. Fungisit dayanıklılığı, bitki hastalıklarıyla kimyasal mücadelenin başarısızlığının sebeplerinden birisidir. Funguslar çok sayıda spor oluştururlar, çok sayıda birey ilaçla muamele edilir, seleksiyon baskısıyla karşılaşır ve fungusit hassasiyetinin azalmasına sebep olacak mutasyonların oluşma olasılıkları oldukça yükselir. Seleksiyon baskısı altında, birkaç nesil sonra dayanıklı birey miktarı popülasyonda baskın hale gelebilecek şekilde hızla artabilir. Dayanıklılık sadece fungusitin kullanılabilirliğini tehdit etmez, aynı zamanda yetersiz hastalık kontrolü sonucu oluşan ürün kaybı neticesinde ekonomik kayıplara da sebep olur. (Yeşil ve Boyraz, 2010). Hastalıklarla mücadelede fungusit kullanımının gelecekte de önemli rol oynamaya devam edecek olmasından dolayı fungusitlerin etkilerini yitirmemeleri için dayanıklılık yönetimi stratejilerinin geliştirilmesi gerekli olacağı düşünülmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2010-099 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Aderiye BI, Laleye SA, Ijalana OR. 2008. Soil mycoflora of some commercial ventures in south west Nigeria. *International Journal of Soil Science.*, 3: 42 – 47.
- Akyıl D. 2006. Farklı tipteki fungusitlerin muhtemel mutajeniteleri üzerine bir çalışma. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Afyon.
- Başbülül 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, DOI: 10.5053/ekoloji.2011.809.
- Delen N, Durmuşoğlu E, Güncan A, Güngör N, Turgu C, Burçak A. 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara.
- Delen N. 2008. Fungusitler. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara. ISBN: 978-605-395-158-2.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press, Volume: 1-2. ASIN: B003D835HQ.
- Kalmış E, Azbar N, Kalyoncu F. 2008. Evaluation of two wild types of *Pleurotus ostreatus* (MCC07 and MCC20) isolated from nature for their ability to decolorize Benazol Black ZN textile dye in comparison to some commercial types of white rot fungi: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor* and *Pleurotus citrinopileatus*. *Can. J. Microbiol.*, 54: 366-370.
- Karaarslan Ç. 2008. Bazı yeni 2-(2,4 Dihalojenüstübenilino) benzimidazole türevlerinin sentez, yapı aydınlatması ve *Candida* türü mantarlara karşı antifungal ve stafilokoklara karşı antibakteriyel etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Karakoç Ö, Nakiboğlu N. 2010. Ditiyokarbamat pestisitleri ve tayin yöntemleri. *Journal of Balıkesir University Institute of Science and Technology.*, 12: 112-135.
- Klich MA. 2002. Identification of common *Aspergillus* species., First Edition, CBS Publication, Utrecht, ISBN 90-70351-46-3.
- Ni Y, Qiu P, Kokot S. 2004. Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides by differential pulse stripping voltammetry and chemometrics. *Analytica Chimica Acta.*, 516: 7–17.
- Pitt JI. 2000. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Food Science Australia. ISBN: 978-0643048379.
- Ragsdale NN. 1994. Fungicides. *Encyclopedia of Agricultural Science.*, 2: 445-453.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. 2004. Introduction to food and airborne fungi, CBS Publication, Holland. ISBN: 978-9070351427.
- Samson RA, Pitt JI. 2000. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification., Harwood Academic Publishers, Amsteldijk, ISBN 90-5823-159-3.
- Singh J. 2005. Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor and Built Environment.*, 14: 229-234.
- Waksmann SA. 1922. A method for counting the number of fungi in the soil. *Nature, Journal of Bacteriology.*, 7: 339 – 341.
- Yeşil S, Boyraz N. 2010. Bitki patojeni funguslarda fungusid dayanıklılığı. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi.*, 24 (3): 101-108.