



Nohut Yanıklık Hastalığı [*Ascochyta rabiei* (Pass) Labr.]'nin Farklı İzolatlarına Karşı *Mentha spicata* L. Uçucu Yağının Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi

Yusuf BAYAR*

Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Kırşehir, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 25.10.2017

Kabul Tarihi/Accepted: 25.06.2018

ORCID ID

orcid.org/0000-0001-8393-7218

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: yusufbayan@gmail.com

Özet: Bu çalışma, nohut yanıklık hastalığı (*Ascochyta rabiei*)'nin 5 farklı izolatlarına karşı *Mentha spicata* L. uçucu yağının antifungal aktivitesinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Antifungal etkinlik denemesi, 10 ml Potato-Dekstroz-Agar (PDA) besi yeri içeren 60 mm çapındaki petriyelerde gerçekleştirilmiştir. Petri kaplarının ortasına 5 mm çapında fungal diskler yerleştirilerek konulmuştur. Uçucu yağ, petri kaplarına yapıştırılan steril kurutma kağıtları üzerine mikro pipet yardımıyla 0 (kontrol), 1, 3, 5 ve 10 µl dozlarında eklenmiştir. Parafilm ile kapatılan petri kapları 25 °C'de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra ölçümler yapılmış ve miselyal gelişiminin engellenmesi yüzde olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, *M. spicata* uçucu yağının farklı dozları, fungusun miselyal gelişimini farklı oranlarda engellediği ve 10 µl'lik dozunun fungusun miselyal gelişimini tamamen (% 100) durdurduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, *M. spicata*'nın uçucu yağınının *in vitro* koşullarda güçlü bir antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nohut yanıklığı (*Ascochyta rabiei*), antifungal etki, uçucu yağ, *Mentha spicata* L.

Determination of Antifungal Activity of *Mentha spicata* L. Essential Oils Against Different Isolates of Chickpea Blight Disease [*Ascochyta rabiei* (Pass) Labr.]

Abstract: This study was conducted to determine the antifungal activity of *Mentha spicata* L. essential oils against 5 different isolates of Chickpea Blight (*Ascochyta rabiei*) under *in vitro* conditions. The antifungal activity assay was performed in 60 mm Petri dishes containing 10 ml Potato-Dextrose-Agar (PDA) media. 5 mm diameter fungal discs were placed in the middle of Petri dishes. The essential oils were added to the sterile drying papers stuck to the Petri dishes using micropipette at doses of 0 (control), 1, 3, 5 and 10 µl. Petri dishes sealed with parafilm were incubated for 14 days at 25 °C. Measurements were made after completion of the incubation period and percent inhibition of mycelial growth was determined. In conclusion, different doses of *M. spicata* essential oil inhibited fungus mycelial growth at different ratios, and 10 µL dose completely (100%) stopped mycelial growth of fungus. As a result of this study, it has been determined that *M. spicata* essential oils has a strong antifungal activity *in vitro* conditions.

Keywords: Antracnose (*Ascochyta rabiei*), antifungal effect, essential oil, *Mentha spicata* L.

1. Giriş

Nohut (*Cicer arietinum* L.), dünyada ve Türkiye’de önemli bir besin kaynağı olup, insan ve hayvan beslenmesinde önemli yeri olan bir baklagil bitkisidir. Dünyanın birçok bölgesinde yetişen nohutun gen merkezi Türkiye’nin de içinde bulunduğu Doğu Akdeniz olarak bildirilmektedir. Nohut, yüksek ve düşük sıcaklıkları tolere edebilen ve su kısıtlığı bulunan kıraç alanlarda yetişebilen bir bitkidir (Akçin, 1988; Malhotra ve Singh, 1991; Huisman ve Poel, 1994). Nohutun üretimini kısıtlayan birçok abiyotik ve biyotik stres faktörleri bulunmakta olup; bunlardan en önemlileri, nohut hastalıklarıdır. Dünyada, 25’ten fazla hastalık etmeninin nohut üretimini farklı düzeylerde etkilediği bildirilmektedir (Nene ve Reddy, 1987). Türkiye’de de nohut üretimini kısıtlayan en önemli faktör, fungal hastalık olan ve halk arasında “ülker, bulut çaldı, yanıklık ve antraknoz” olarak adlandırılan etmenin bilimsel ismi *Ascochyta rabiei* (Pass)’ın neden olduğu nohut yanıklık hastalığıdır (Nene ve Reddy, 1987).

Nohut yanıklık hastalığı, dünyada 35’ten fazla ülkede, önemli kalite ve verim kayıplarına neden olmaktadır. Hastalık gelişimi için uygun koşulların oluşması durumunda verim kaybı % 100’e ulaşmaktadır (Nene, 1982; Nene ve Reddy, 1987). Hastalığın kontrolünde farklı mücadele yöntemleri tavsiye edilmekle beraber öne çıkan yöntemlerden birisi fungusit kullanımıdır. Kullanılan kimyasal ilaçların gerek kalıntı gerekse çevreye olan zararlarından dolayı bilim insanları bitkisel kökenli ilaçların geliştirilmesi yönünde çalışmalar yürütmekte; aynı şekilde, bu bitkisel ilaçlar ve kimyasalların bitki hastalıklarına karşı etkinlikleri üzerine değerlendirmeler devam etmektedir (Delen ve Tosun, 1997).

Nane (*Mentha spicata* L.)’den elde edilen uçucu yağların ana bileşenleri; carvone, limonene, cis-carveol, 1,8 cineol ve cis-sabinene hydrate’dir. Temel bileşenin ise carvone olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Baser, 1993; Kokkini ve ark., 1995). Bitkisel kökenli bir ürün olan uçucu yağların daha önce yapılan birçok çalışmada bitki patojeni funguslara karşı antifungal aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmaların çoğunlukla toprak kökenli patojenlere karşı yapıldığı bildirilmiştir (Kordali ve ark., 2009; Al-Reza ve ark., 2010; Bayan ve Akşit, 2016). Uçucu yağların nohut yanıklığı hastalığına neden olduğu patojen izolatlarına karşı etkinliği üzerine yapılmış bir çalışmaya Türkiye’de rastlanılmamıştır.

Bu çalışma, *Mentha spicata* L. bitkisinin uçucu yağının nohut yanıklığı hastalığının 5 farklı izolatlarına karşı antifungal aktivitesini *in-vitro* koşullarda belirlemek için yürütülmüştür.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki materyali ve uçucu yağ elde edilmesi

Bitki materyali (*M. spicata*), Kırşehir ilinin farklı alanlarından (Yenice ve Gölhisar lokasyonlarından) 2016 yılında toprak üstü aksamı alınarak toplanmıştır. Toplanan bitki materyalleri oda sıcaklığında ve güneş ışığı almayan ortamda kurutulmuştur. Daha sonra Clevenger aparatı yardımıyla hidro-destilasyon yöntemi kullanılarak uçucu yağ elde edilmiştir (Telci ve ark., 2006). Uçucu yağlar, kullanılmaya kadar 4 °C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2.2. Fungus kültürlerinin geliştirilmesi

Fungus, Kırşehir’de nohut yetiştiriciliği yapılan farklı lokasyonlardan toplanan hastalıklı nohut bitkilerinden Potato-Dekstroz-Agar (PDA) besiyeri kullanılarak izole edilmiştir. Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Fitoklinik Laboratuvar’ında teşhisi yapılan nohut yanıklığı hastalık etmeni (*Ascochyta rabiei*) fungus, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık periyotta 22±1 °C sıcaklıkta, iki hafta süreyle inkübe edilmiştir. Geliştirilen bu ortam çalışmada kullanılmıştır.

2.3. Uçucu yağın *in-vitro* koşullarda antifungal etkisinin belirlenmesi

Antifungal etkinin belirlenmesi için, 60 mm çaplı petri kaplarına yaklaşık 10 ml PDA besi yeri eklenmiştir. Kâğıt yapıştırılan petri kaplarının orta kısmına hastalık izolatlarının 5 mm çapındaki miselyum diskleri aktarılmıştır. *M. spicata* uçucu yağ; mikro pipet yardımıyla 0, 1, 3, 5 ve 10 µL petri⁻¹ konsantrasyonlarında petrinin üst kapağına yapıştırılan kâğıt üzerine eklenmiştir. Petri kapakları parafilmle kapatılarak 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık periyotta 25±2 °C sıcaklıkta, 14 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda fungal miselyum (koloni) gelişimi kumpas aleti yardımıyla ölçülmüştür. Uygulamalar, 4 tekerrürlü ve denemeler iki kez tekrarlanmıştır. Uygulama yapılmış petrilerdeki miselyal gelişimi, kontrol petrideki miselyum gelişimi ile kıyaslanarak uçucu yağın farklı dozlarının engelleme oranları Eşitlik 1 yardımıyla % olarak hesaplanmıştır (Pandey ve ark., 1982).

$$MGI=100 \times (K - U) / K \quad (1)$$

Eşitlikte MGI, % miselyum gelişimi engelleme oranını; K, kontroldeki radyal miselyum gelişimini; U, uygulamalardaki radyal miselyum gelişimini ifade etmektedir.

Denemelerde muameleler arasındaki farklılıkların önem dereceleri varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiş, DUNCAN testi kullanılarak ortalamalar karşılaştırılmıştır.

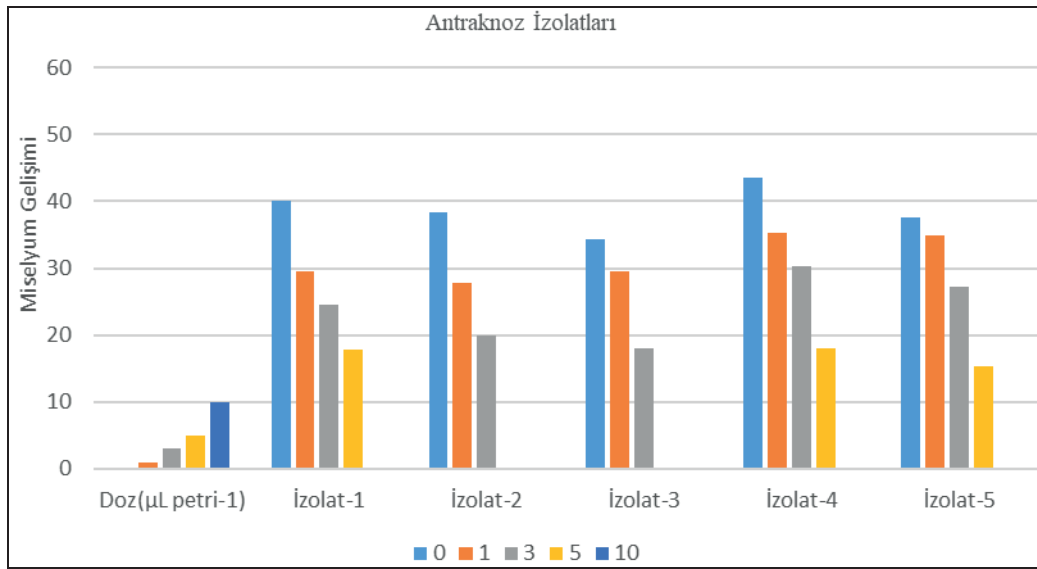
İstatistiki analizler, SPSS paket programı (Ver.15.0, SPSS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Steel ve Torrie, 1980).

3. Bulgular ve Tartışma

Ascochyta rabiei'nin neden olduğu nohutta yanıklık hastalığının mücadelesi nohut yetiştiriciliği yapılan bütün alanlarda verim açısından önemlidir. Hastalığın mücadelesinde doğada daha çabuk parçalanan ve kalıntı problemi oluşturmayan doğal pestisitlerin kullanılması üzerine yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir. Bu çalışmalardan bitki ekstraktları ve

uçucu yağlar ile yapılanların sayısı hızla artmaktadır (Shaaya ve ark., 1991; Delen ve Tosun, 1997; Urzúa ve ark., 2010).

Yapılan bu çalışma sonucunda, *M. spicata* uçucu yağının *Ascochyta rabiei* izolatlarının miselyal gelişimi üzerine etkisi Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1'de uçucu yağ izolatların miselyum gelişimini doza bağlı olarak değişen oranlarda engellediği görülmektedir. Uçucu yağın 5 µl petri⁻¹'de izolat-1 ve izolat-2'nin miselyum gelişimini tamamen engellediği, diğer izolatların miselyal gelişimini ise değişen oranlarda engellediği görülmüştür (Şekil 1).



Şekil 1. *M. spicata* uçucu yağının nohut yanıklık izolatlarının miselyum gelişimi üzerine etkisi

M. spicata uçucu yağının, *Ascochyta rabiei* karşı engelleme oranı Tablo 1'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda uygulama dozlarına ait engelleme yüzdelерinin istatistiki olarak önemli ($p \leq 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Tablo 1'de görüldüğü üzere, *M. spicata* uçucu yağının, nohut yanıklığının farklı izolatlarına karşı etkisinin oldukça yüksek olduğu

belirlenmiştir. Uçucu yağın 1 µL petri⁻¹ dozunda kullanılması, fungus izolatlarının miselyal gelişimi üzerine etkili olduğu, ancak bu etkinin sınırlı kaldığı görülmüştür. Aynı şekilde 3 µL petri⁻¹ dozunun miselyum gelişimlerini değişen oranlarda etkilediğini, ancak hiçbir izolatın gelişimini kontrolle kıyaslandığında yüzde yüz oranında engellemediği belirlenmiştir.

Tablo 1. *M. spicata* uçucu yağının nohut yanıklığına karşı antifungal etkisi*

Doz (µL petri ⁻¹)	<i>Ascochyta rabiei</i> izolatları				
	1 I(%)	2 I(%)	3 I(%)	4 I(%)	5 I(%)
Kontrol (0)	0±0.0 e	0±0.0 d	0±0.0 d	0.00±0.0 d	0±0.0 d
1	26.14±6.75 d	27.52±8.69 c	13.96±3.99 c	18.86±2.60 c	7.23±3.25 d
3	38.81±2.22 c	48.18±2.30 b	47.46±3.76 b	30.57±8.97 c	27.43±5.31 c
5	55.44±1.36 b	100±0.0 a	100±0.0 a	58.72±5.71 b	59.1±5.2 b
10	100±0.0 a	100±0.0 a	100±0.0 a	100.00±0.0 a	100±0.0 a

*: Aynı sütunda farklı ortalamalara sahip sütunların anlamlılık derecesinde $p < 0.05$ düzeyinde farklıdır, I(%)= Engelleme yüzdesi

Çalışma sonucunda, 5 µL petri⁻¹ dozunun; izolat-1, izolat-4 ve izolat-5'in dozları, sırasıyla miselyal gelişimlerini % 55.44, % 58.72 ve % 59.1 oranında engellemiş olduğu belirlenirken, izolat-2 ve izolat-3'ün miselyal gelişimini ise % 100 oranında engellediği belirlenmiştir. Uçucu yağın 5 µL petri⁻¹ dozunun izolat-1, izolat-4 ve izolat-5'e karşı etkili olduğu; izolat-2 ve izolat-3 üzerine ise etkinliğinin % 100 düzeyinde olmadığı saptanmıştır (Şekil 2).

Aynı dozun değişik izolatlar üzerine etkisinin farklı olması arasında uçucu yağa karşı hassasiyetin de farklı düzeylerde olduğunu göstermektedir. Denemede kullanılan antraknoz izolatlarının uçucu yağa karşı farklı etkiler göstermesinin genetik farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu farklılıkların ortaya konması için genetik olarak ve bitki üzerinde uçucu yağın izolatlar üzerine olan etkilerinin de araştırılması gerekmektedir.

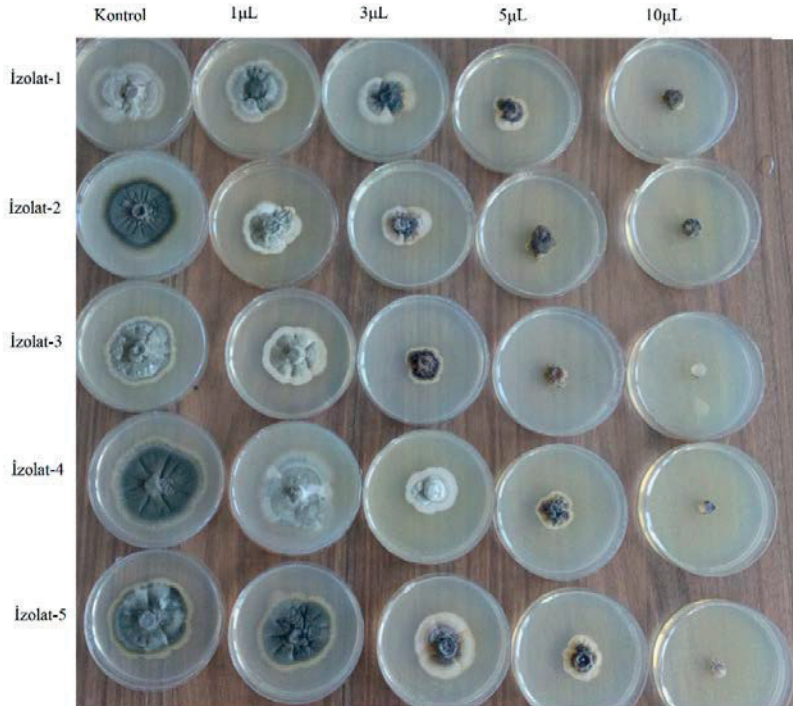
M. spicata uçucu yağının 10 µL petri⁻¹ dozunda patojenin tüm izolatlarının miselyal gelişimini % 100 oranında engellediği belirlenmiştir (Tablo 1).

In-vitro koşullarda yürütülen benzer bir çalışmada karanfil yağı, tarçın yağı ve beş uçucu yağ bileşeninin (sitrat, eugenol, geraniol, limonen ve linalool) *Ascochyta rabiei*'nin gelişiminin engellenmesi amacıyla yürütülen bir çalışmada, linalool'un hastalığı % 100 oranında engellediğini

diğer bileşiklerin (sitrat, eugenol, geraniol ve limonen) ise patojenin gelişimini engellemede yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Kishore ve ark., 2007). Konu ile ilgili diğer bir çalışmada ise, *Azadirachta indica* A. Juss., *Datura metel* L. ve *Allium sativum* L. bitkilerinden elde edilen % 5, % 10 ve % 15'lik ekstraktların sırasıyla; % 43.5, % 31.4 ve % 26.7 oranında patojeni engellediği bildirilmiştir (Usman Ghazanfar ve ark., 2011). Yine *Syzygium cumini* bitkisinin yaprak, meyve, kök-kabuk ve gövde kabuğundan elde edilen su, etanol ve n-hekzan ekstraktlarının *Ascochyta rabiei* patojenine karşı antifungal etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Jabeen ve Javaid, 2010). Bu durumda; daha önce yapılan bazı çalışmaların sonuçları ile, bu çalışmanın sonuçlarının önemli oranda benzerlik gösterdiği söylenebilir.

4. Sonuçlar

Kimyasal pestisitlerin çevre ve insan sağlığına olan olumsuz etkileri nedeniyle alternatif yöntemler aranmış ve tüm dünyada hastalıkların mücadelesinde doğal pestisitlerin kullanılması çalışmalarına hız verilmiştir. Özellikle bitkisel kökenli pestisit çalışmalarında bitki uçucu yağları ve ekstraktları üzerine son zamanlarda yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Bu çalışma sonucunda, *M. spicata*'dan elde edilen uçucu yağın, nohut yanıklığı hastalığına neden olan *Ascochyta rabiei*'nin farklı izolatlarına karşı, güçlü bir antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 2. *M. spicata* uçucu yağının *Ascochyta rabiei* üzerine etkisi

Kaynaklar

- Akçin, A., 1988. Yemelik Tane Baklagiller. Selçuk Üniversitesi Yayınları: 43, Ziraat Fakültesi Yayınları: 8, Konya.
- Al-Reza, S.M., Rahman, A., Ahmed, Y., Kang, S.C., 2010. Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(2): 86-92.
- Baser, K., 1993. Essential oils of Anatolian Labiatae: A profile. *Acta Horticulturae*, 333: 217-238.
- Bayan, Y., Akşit, H., 2016. Antifungal activity of essential oils and plant extracts from *Sideritis germanicopolitana* BORNM. growing in Turkey. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(2): 333-337.
- Delen, N., Tosun, N., 1997. Türkiye’de pestisit kullanımının toksikolojik değerlendirilmesi. *II. Toksikoloji Kongresi*, 3-6 Nisan, Antalya, s. 90-95.
- Gowen, S.R., 1986. Investigation into variability in *Ascochyta rabiei* and resistance to the disease in chickpea. Report of Project R3712 funded by Overseas Development Administration and Done in Collaboration with the International Centre for Agriculture Research in Dry Areas, University of Reading, UK.
- Huisman, J., Poel, V.D., 1994. Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. In: F.J. Muehlbauer and W.J. Kaiser (Eds.), *Expanding the production and use of cool season food legumes*, pp. 53-76.
- Jabeen, K., Javaid, A., 2010. Antifungal activity of *Syzygium cumini* against *Ascochyta rabiei*-the cause of chickpea blight. *Natural Product Research*, 24(12): 1158-1167.
- Kishore, G.K., Pande, S., Harish, S., 2007. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. *Plant Disease*, 91(4): 375-379.
- Kokkini, S., Karousou, R., Lanaras, T., 1995. Essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(4): 425-430.
- Kordali, S., Cakır, A., Akcin, T.A., Mete, E., Akcin, A., Aydın, T., Kılıc, H., 2009. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Industrial Crops and Products*, 29(2-3): 562-570.
- Malhotra, R.S., Singh, K.B., 1991. Gene action for cold tolerance in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(5): 598-601.
- Nene, Y.L., 1982. A review of Ascochyta blight of chickpea, *Tropical Pest Management*, 28(1): 61-70.
- Nene, Y.L., Reddy, M.V., 1987. Chickpea diseases and their control. In: The Chickpea (M.C. Saxena and K.B. Singh (Eds.), *The Chickpea*, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, p. 99-125.
- Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D., Dixit, S.N., 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptissua andolens*. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 89(6): 344-349.
- Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., Juandn, B., Zisman, U., Pissarev, V., 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. *Journal of Chemical Ecology*, 17(9): 499-504.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. New York, USA, McGraw Hill Book Co., Inc.
- Telci, İ., Bayram, E., Yılmaz, G., Avcı, B., 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(6): 489-497.
- Urzúa, A., Santander, R., Echeandria, J., Cabezas N., Palacios, S.M., Rossi, Y., 2010. Insecticide properties of the essential oils from *Haplopappus foliosus* and *Bahia ambrosoides* against the house fly *Musca domestica* L. *Journal Chilean Chemical Society*, 55(3): 392-395.
- Usman Ghazanfar, M.U., Wakil, W., Sahi, S.T., 2010. Induction of resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against *Ascochyta rabiei* by applying chemicals and plant extracts. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(1): 52-62.