



# Bazı bitki uçucu yağ ve karışımlarının mandarinde *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler 1832'nin neden olduğu kahverengi leke hastalığı üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi

## Determination of antifungal effects of some plant essential oils and their mixtures on brown spot disease caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler 1832 on mandarin

Mehmet ATAY<sup>1\*</sup>, Meltem AVAN<sup>2</sup>, Memet İNAN<sup>3</sup>

<sup>1-2</sup> Adıyaman Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 02450 Kahta-ADİYAMAN

<sup>3</sup> Adıyaman Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 02450 Kahta-ADİYAMAN

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5751-4764>; <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2939-8177>; <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8870-5029>

### To cite this article:

Atay, M., Avan M. & İnan, M. (2024). Bazı bitki uçucu yağ ve karışımlarının mandarinde *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler 1832'nin neden olduğu kahverengi leke hastalığı üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(4): 570-583

DOI: 10.29050/harranziraat.1556160

### \*Address for Correspondence:

Mehmet ATAY  
e-mail:  
matay@adiyaman.edu.tr

### Received Date:

25.09.2024

### Accepted Date:

19.11.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ÖZ

Dünya çapında önemli bir fitopatojen fungus türü olan *Alternaria alternata*, çok sayıda bitki türünde gerek yetiştiricilik sırasında gerekse hasat sonrası dönemde ciddi ürün kayıplarına neden olan bir fungustur. Farklı turuncgil türlerinin yaprak ve meyvelerinde kahverengi leke hastalığına neden olan bu patojen, mandarin (*Citrus reticulata*) meyveleri üzerinde siyah veya merkezi gri renkte çürüklükler meydana getirir. Bu çalışmada, iki kekik türü (*Thymbra spicata* L. ve *Origanum onites* L.) ve adaçayı (*Salvia officinalis* L.) uçucu yağlarının tekli ve ikili kombinasyonlar halindeki karışımlarının farklı dozları, buhar fazında ve *in vitro* şartlarda mandarin meyvesinden izole edilen patojen *A. alternata*'ya karşı antifungal etkileri araştırılmıştır. Yağların tekli olarak kullanımı durumunda fungal izolata karşı en düşük uygulama dozundaki (MIC) en yüksek antifungal etkiyi *T. spicata* (4.0 µl petri<sup>-1</sup>) uçucu yağı göstermiştir. Yağların karışımlar şeklinde kullanılmaları sonrası en yüksek engelleme ise *T. spicata* + *O. onites* ve *T. spicata* + *S. officinalis* (8.0 µl petri<sup>-1</sup>) uçucu yağ karışımlarında saptanmıştır. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan bitki uçucu yağları ve karışımları doza bağlı bir şekilde *A. alternata* izolatına karşı antifungal etkiler göstermişlerdir. Özellikle mandarin meyvelerinin depolanarak muhafaza edilebilen bir ürün olduğu göz önünde bulundurulduğunda, farklı bitkilerden elde edilmiş bu uçucu yağların, depolanmış ürünlerde fumigant olarak ümitvar olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Alternaria alternata*, *Salvia officinalis* L., Sinerjistik etki, *Origanum onites* L., *Thymbra spicata* L.

### ABSTRACT

*Alternaria alternata*, an important phytopathogenic fungus worldwide, is a fungus that causes serious crop losses in many plant species both during cultivation and post-harvest period. This pathogen, which causes brown spot disease on leaves and fruits of different citrus species, produces black or central gray rots on mandarin (*Citrus reticulata*) fruits. In this study, different doses of mixtures of two thyme species (*Thymbra spicata* L. and *Origanum onites* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.) essential oils in single and double combinations were investigated in volatile phase and *in vitro* conditions for their antifungal effects against *A. alternata*, isolated from mandarin fruits. In case of single use of oils, *T. spicata* (4.0 µl petri<sup>-1</sup>) essential oil showed the highest antifungal effect against fungal isolates at minimum inhibitory concentration (MIC). After using the oils as mixtures, the highest inhibition was determined in the essential oil mixtures of *T. vulgaris* + *O. onites* and *T. spicata* + *S. officinalis* (8.0 µl petri<sup>-1</sup>). As a result, the plant essential oils and their mixtures used in the study showed antifungal effects against *A. alternata* isolate in a dose-dependent manner. Especially considering that mandarin fruits are a

product that is stored and preserved, these essential oils obtained from different plants can be easily applied as fumigants in stored product.

**Key Words:** *Alternaria alternata*, *Salvia officinalis* L., Synergistic effect, *Origanum onites* L., *Thymbra spicata* L.

## Giriş

Portakal, limon, mandarin ve greyfurtun da içerisinde dâhil olduğu turunçgiller, dünya çapında ekonomik açıdan yetiştiriciliği yapılan önemli bitki gruplarından biridir (Scora, 1975). Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) taze tüketimde ve meyve işlemede kullanılmak üzere yetiştirilen, her mevsim yeşil yapraklara sahip olan ve dünyanın tropik/subtropik bölgelerde yetiştirilen önemli turunçgillerinden birisidir. Üretim bakımından günümüzde önemli bir konumda yer alan bu bitkiden 2022 yılında dünya çapında 3.3 milyon hektarlık alandan yaklaşık 44 milyon ton civarında meyve elde edilmiştir. Önemli bir turunçgil üreticisi ülke olan Türkiye’de ise aynı yıl yaklaşık 68 bin hektar alanda 1.9 milyon ton civarında mandarin üretimi gerçekleştirilmiştir (FAO, 2024).

Turunçgillerin meyveleri lezzetli olduğu için insanlar tarafından beğenilerek tüketilmektedir. Lezzetlerinin yanı sıra insan sağlığına faydalı doğal antioksidanlar açısından zengin olmaları (Zhang ve ark., 2014; Zou ve ark., 2016), meyve sularındaki yüksek sitrik asit, C vitamini, flavonoidler ve mineral içerikleri nedeniyle de bu meyvelerin günümüzde insan beslenmesinde önemli bir yer almasına olanak sağlamaktadır (Silalahi, 2002; He ve ark., 2012; Wang ve ark., 2017).

Fitopatogen funguslar; üretim alanlarında, seralarda ve hasat sonrası depolama aşamasında farklı bitkilerde çok sayıda önemli hastalığa neden olan patojenik etmenlerdir. Çok sayıda fungus türünün tehdidi altında olan kültür bitkilerinin önemli hastalık etmenlerinden biri de, çeşitli patojenik, saprofitik ve endofitik türlerle dünya çapına yayılmış *Alternaria* cinsine ait fitopatogen türleridir (Dang ve ark., 2015; Garganese ve ark., 2016). Nitekim cinse ait farklı türler, ekonomik açıdan önemli çok sayıda bitki türünde oldukça yıkıcı hastalıklara neden olabilmektedir (Felipini ve ark., 2023; Han ve ark., 2023). Geniş konukçu dizisine sahip olması, gerek hasat öncesi gerekse de hasat sonrası dönemde konukçu bitkilerin

çeşitli kısımlarında meydana getirdiği hastalıklar ve buna bağlı şekilde oluşan ciddi ürün kayıplarından ötürü özellikle bu cinse ait bir tür olan *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler 1832, fitopatolojik bakımdan oldukça önem taşımaktadır. Konukçu bitki türüne göre meydana getirdiği hastalıklar için farklı isimler kullanılmakla birlikte bu etmenin turunçgillerde oluşturduğu hastalıklar için ‘kahverengi leke’ ve ‘siyah çürüklük’ isimlendirmeleri kullanılmaktadır (Vega ve Dewdney, 2014; Garganese ve ark., 2018; Ghooshkhaneh ve ark., 2022; Güney ve ark., 2023). Önemli bir turunçgil hastalığı olan kahverengi leke hastalığı, tropik ve subtropik iklim koşullarına sahip farklı coğrafi özelliklerin gözlendiği çok sayıdaki bölge ve ülkede rapor edilmiştir (Vicent ve ark., 2000; Golmohammadi ve Rahimian, 2004; Elena, 2006; Bassimba ve ark., 2014; De-Miguel ve ark., 2019; Arlotta ve ark., 2020).

*A. alternata*’nın neden olduğu hastalıklar çoğunlukla kimyasal kullanımı ile kontrol altına alınabilmektedir (Garganese ve ark., 2019). Ancak kimyasalların kullanımı konusunda insanların bilinç kazanması, aşırı fungusit kullanımı sonucu fungusitlere dirençli patojenlerin ortaya çıkması ve insan/çevre sağlığı üzerinde meydana getirdikleri olumsuz etkilerinden ötürü günümüzde kimyasal fungusitlerin kullanımı konusunda endişeler hızla artmıştır (Morales ve ark. 2010; Zhou ve ark. 2018). Bu doğrultuda kimyasallara alternatif mücadele yöntemleri araştırılmakta olup çeşitli bitki türlerinden elde edilen uçucu yağların, hastalık yönetiminde kullanılabilecek önemli doğal ürünlerden biri olduğu bildirilmiştir (Villaverde ve ark. 2014; Raveau ve ark., 2020; Atay ve Soylu, 2023). Uçucu yağlar çok sayıda bitki türünde doğal olarak bulunurlar ve bitkilerin farklı kısımlarından elde edilebilirler. Çeşitli bitki uçucu yağlarının fitopatogenler dâhil olmak üzere farklı mikroorganizma türlerine karşı önemli bir kontrol etkisine sahip oldukları, biyokimyasal savunma yollarını aktive ettikleri ve bitkilerde direnç

mekanizmalarını artırabilme yeteneğine sahip oldukları tespit edilmiştir (González-Lamothe ve ark. 2009; Perina ve ark., 2019).

Bu çalışmada, mandarin ve diğer turunçgil bitkilerinde hasat öncesi ve sonrası dönemde önemli bir patojen fungus türü olan *A. alternaria*'ya karşı, farklı bitki türlerinden elde edilmiş uçucu yağların tekli ve ikili karışımlarının *in vitro* koşullardaki antifungal etkileri araştırılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### *Denemelerde kullanılan fungal izolat, uçucu yağlar ve diğer malzemeler*

Çalışmanın fungal izolatını oluşturan *A. alternata*, Adıyaman ilinin merkez ilçesindeki yerel pazar ve marketlerde 2023 yılında yapılan survey çalışmaları sonrası elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan uçucu yağlar, Kâhta Meslek Yüksekokulu deneme ve uygulama alanında bulunan *T. spicata* (karabaş kekik), *O. onites* (İzmir kekiği) ve *S. officinalis* (tıbbi adaçayı) bitkilerinden elde edilmiştir.

Fungal etmenin izolasyonu, tanısı (Atay ve Soylu, 2023) ve uçucu yağların antifungal etkilerinin belirlendiği denemelerde kullanılan Patates Dekstroz Agar (PDA) besi yeri, hazır ticari olarak (Merck, Darmstad, Germany) satın alınmıştır. Çalışmanın diğer materyallerini ise Fitoklinik Laboratuvarı'nda bulunan alet-ekipmanlar, çeşitli laboratuvar malzemeleri ve bazı kimyasal ürünler oluşturmuştur.

### *Fungal izolatın izolasyonu ve patojenisitesinin belirlenmesi*

Denemede kullanılan fungal izolatın patojenisite durumunun belirlenmesi amacıyla sağlıklı ve olgunlaşmış taze mandarin meyveleri (Nova çeşidi) kullanılmış olup izolatın mandarin meyvelerinde patojen olup olmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla, önce misel deliciyle meyve yüzeyinde daire şeklinde yaralar açılmış ve ardından PDA besi ortamı üzerinde geliştirilmiş saf fungus kültüründen 6 mm çapındaki misel diskleri alınarak bu yara yerlerine yerleştirilmiş ve üzeri parafilm ile sarılmıştır. Bu şekilde fungus

inokulasyonu yapılan meyveler steril saklama kaplarına alınmış ve bu kaplar  $25 \pm 2$  °C'de iklim kabininde (12 h/12h fotoperiyotta) inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda meyvelerde oluşmuş hastalık belirtileri not edilmiş ve inokulasyon çevresinde meydana gelen hastalık gelişmelerinden yeniden izolasyon yapılarak re-izolatlar elde edilmiştir. PDA üzerinde gelişen re-izolatlara aşağıda izah edilen teşhis yöntemleri uygulanarak bunlar orijinal izolatla karşılaştırılmış ve bu şekilde izolatın mandarin meyvelerinde patojen olup olmadığı belirlenmiştir.

### *Fungal izolatın mandarin meyvelerinden izolasyonu ve moleküler tanısının yapılması*

Çalışmada kullanılan fungal izolat *A. alternata*, Adıyaman ilinin market ve yerel pazarlarından tesadüfen seçilmiş hastalık belirtisi gösteren mandarin meyvelerinden PDA besi yeri üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları sonrası elde edilmiştir. Bu amaçla seçilen meyvelerin hastalık belirtisi gösteren dokularından sırasıyla; yaklaşık 0.5x0.5 mm kesitler alınarak (hastalıklı ve sağlıklı kısımları içerecek şekilde) %2 sodyum hipoklorit çözeltisi ile yüzey sterilizasyonları yapılmış, bu kesitler içerisinde  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  streptomisin sülfat antibiyotik içeren PDA ortamına ekilmiş ve  $25 \pm 2$  °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında petrielerde gelişmiş olan fungus misellerden saflaştırmalar yapılarak saf izolatlar elde edilmiş ve bu izolatlar ileriki denemelerde kullanılmak üzere buzdolabında  $+4$  °C'de muhafaza edilmiştir.

İzolat, türe özgü PCR ve dizi analizi kullanılarak moleküler tanıya tabi tutulmuştur. DNA izolasyonu için misel elde etmek amacıyla kültürler PDA üzerinde  $25$  °C'de 12 gün boyunca geliştirilerek ve miseller CTAB yöntemi kullanılarak hasat edilmiştir. DNA ekstraksiyonu Lee ve Taylor (1990) tarafından tarif edildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve stok DNA hazırlanmıştır. Elde edilen fungal DNA'nın PCR amplifikasyonu White ve ark. (1990) ITS (ITS-AB28/ITS-TW81) primer seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 8µl LUNA (NEB) ana karışımı (reaksiyon tamponu, MgCl<sub>2</sub>, dNTP'ler, enzimler ve

su içeren) eklenerek toplam 10µl reaksiyon hacmi hazırlanmış, reaksiyon karışımına ileri ve geri primerlerin her birinden 0,5µl (10mMol) eklenmiş ve son olarak reaksiyonu tamamlamak için 1µl ekstrakte edilmiş DNA eklenmiştir. PCR termodöngü koşulları, 95 °C'de 1 dakika bekletme ve ardından 95 °C'de 10 saniye ve 57 °C'de 30 saniye olmak üzere 40 döngü şeklinde üretim otoritesinin tavsiyesine göre ayarlanmıştır. 1 × TBE agarozun %1,5'i hazırlanmış ve her bir numuneden 4µl her bir kuyucuğa yüklenmiş ve 1 saat boyunca 90 voltta çalıştırılmıştır. Fungal ITS (ITS: nükleer ribozomal dâhili transkripsiyonlu ara bölge) bölgesinin beklenen amplikon boyutu

gözlemlendikten sonra, elde edilen PCR ürünleri dizi analizi için hazırlanmıştır. PCR ürünleri PCR saflaştırma kiti (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) kullanılarak saflaştırılmış ve dizileme için Aquatayf Biyoteknoloji Laboratuvarlarına gönderilmiştir. Ham sekanslama verileri Geneious Genetic analyzer yazılımı (Biomatters Ltd, Yeni Zelanda) kullanılarak işlenmiştir. Veriler <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adresi üzerinden BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) analizi yapmak için kullanılmış ve BLASTn sonuçlarına göre türler belirlenmiştir. Her bir izolattan elde edilen diziler GenBank'a kaydedilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. PCR işlemi amacıyla kullanılan primerler ve bunların gen dizilimleri  
Table 1. Primers used for PCR process and their gene sequences

Bağlanma Bölgesi	Primer İsmi	DNA Uzunluğu	Gen Dizilimi (5'→3') Q- Bank
Internal	ITS-AB28	550-650bp	5'- ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'
Transcribed Spacers (ITS)	ITS-TW81		5'- GTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'

#### Uçucu yağların elde edilmesi

Uçucu yağ elde etmek amacıyla, *T. spicata*, *O. onites* ve *S. officinalis* bitkileri, tam çiçeklendiği dönemlerde hasat edilmiş, toplanan bitkiler oda sıcaklığında ve gölge ortamda kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra, yaprak sap ayrımı yapıp, 25 g kuru bitki örneğindeki (yaprak + çiçek) uçucu yağ oranları, Neo-clevenger cihazında su buharı distilasyonu yöntemine göre, 3 saat boyunca kaynatılmış, çıkan uçucu yağlar volumetrik olarak ölçülmüş ve sonuçlar yüzdeye (%) çevrilmiştir. Buna göre, *T. spicata* türünde % 3.32, *O. onites* türünde % 4.09, *S. officinalis* türünde % 1.83 oranında uçucu yağ olduğu tespit edilmiştir. 1.5 ml'lik vida kapaklı vial şişelere alınan uçucu yağlar, uygulama zamanına kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza altına alınmıştır (Wichtl, 1971; Avcı ve İnan, 2020).

#### Uçucu yağ ve karışımlarının antifungal etkilerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan uçucu yağ ve karışımlarının *A. alternata*'nın misel gelişimi üzerine olan antifungal etkileri, in vitro şartlarda ve içerisinde PDA besi ortamı bulunan 90 mm

çapındaki cam petri kaplarında araştırılmıştır. Uçucu yağlar; tek başlarına veya iki yağın eşit miktarda karıştırılması suretiyle karışımlar şeklinde, farklı uygulama dozlarında (2.0-64 µl petri<sup>-1</sup>) fungusa karşı uygulanmışlardır. Denemeler öncesinde kullanılan tüm cam petriler etüvde 160 °C'de 2 saat, besi ortamı ise otoklavda 121 °C'de 15 dk. süre ile steril edilmiştir (Türkmen, 2015; Kara ve ark., 2022).

Denemelerde, önce taze fungus kültürünün 6 mm çapındaki misel diskleri, içerisinde 20 ml PDA besi yeri dökülmüş petrilerin merkezine ve miselli taraf besi yeri ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra, bu petrilerin üst kapağının iç yüzeyinin merkezine bırakılan 1 cm çapındaki steril filtre kağıdına, mikro pipet ile uçucu yağ ve karışımlarının farklı uygulama konsantrasyonları emdirilmiştir. Uçucu yağ uygulaması yapıldıktan sonra yağların petriden uzaklaşmasını önlemek için özellikle bu aşama oldukça seri bir şekilde tamamlanmış ve yağlar filtre kâğıdına emdirildikten hemen sonra hızlı bir şekilde petri kapları parafilmle 3 kat sarılmıştır. Tüm işlemler sonrası petriler üst kapakları altta kalacak şekilde ters çevrilmiş ve 25±2 °C'de

inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amacıyla kullanılacak petrilere ise benzer şekilde fungus misel diskleri yerleştirilmiş ancak filtre kağıdına uçucu yağ yerine sadece steril saf su emdirilmiştir. Kontrol petrilindeki misel gelişimi petri yüzeyini tümüyle kapladığında deneme sonlandırılmış ve uçucu yağ uygulaması yapılan tüm petrilere meydana gelen misel gelişimlerinin çapları ölçülerek veriler değerlendirilmiştir. Her bir uçucu yağ ve uçucu yağ karışımı için farklı dozlardaki engelleme oranları ise aşağıda yer alan (%) Abbott formülüne göre belirlenmiştir (Abbott, 1925).

$$\text{Engelleme (\%)} = [(KMG-UMG)/KMG] \times 100$$

KMG = Kontrol petrilere yüzeyinde meydana gelen misel gelişim (mm)

UMG = Uygulama petrilere yüzeyinde meydana gelen misel gelişim (mm)

*Uçucu yağ ve karışımlarının fungisidal ve fungistatik etkilerinin belirlenmesi*

Uçucu yağ ve karışımlarının, %100 engelleme görülen dozlarında meydana getirdikleri antifungal etkinin fungisidal veya fungistatik özellikte olup olmadığını belirlemek amacıyla, denemeler sonuçlandıktan sonra uçucu yağ uygulanmış petrilere yerleştirilmiş misel diskleri alınarak bunlar herhangi bir uygulama yapılmamış yeni PDA besi ortamı içeren petrilere aktarılmış ve 25±2 °C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Misel diskleri yeniden aktarıldıkları petri ortamı üzerinde inkübasyon sonrası herhangi bir gelişime meydana getirememişse uçucu yağın oluşturduğu antifungal etki fungisidal (fungusu tamamen öldüren), ancak misel gelişimi tekrardan başlamış ise bu etki fungistatik (fungusu geçici olarak baskılayan) olarak değerlendirilmiştir.

*Uçucu yağ ve karışımlarının fungal izolatın hif ve konidi morfolojisinde meydana getirdikleri değişimlerin belirlenmesi*

Denemede kullanılan uçucu yağ ve karışımlarının fungal izolat *A. alternata*'nın konidi ve hiflerinin morfolojisinde meydana getirdikleri

değişimler ışık mikroskobu kullanılarak gözlenmiştir. Bu amaçla fungal izolatan alınan diskler PDA ortamına aktarılmış ve herhangi bir uçucu yağ veya karışımı uygulanmaksızın 3 gün süreyle 25±2 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası fungus koloni çapı yaklaşık 20-25 mm boya eriştikten bu petrilere her bir uçucu yağ ve karışımının MIC değerleri uygulanmış ve petrilere parafilmle sarıldıktan sonra 4 gün süreyle tekrardan inkübasyona bırakılmıştır. Denemede kontrol petrilere ise herhangi bir uçucu yağ uygulanmamıştır. İnkübasyon sonrasında fungusun miselyumundan preparatlar hazırlanarak bunlar ışık mikroskobu altına 400 büyütmede incelenmiş ve uçucu yağların hif ve konidilerde morfolojilerinde meydana getirdikleri değişimler, kontrol petrilindeki hif ve konidi gelişim durumlarına kıyaslanarak incelenmiştir.

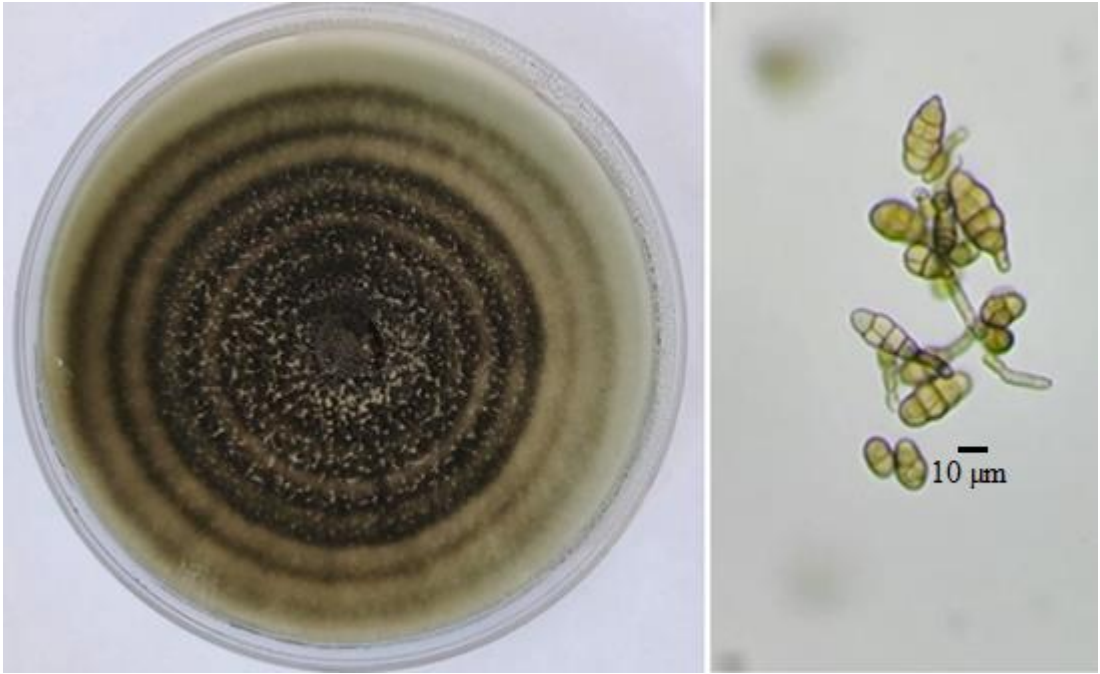
*Deneme deseni ve istatistik analizleri*

Çalışmadaki *in vitro* denemelerin tümü, her uçucu yağ ve uçucu yağ karışımı için uygulama dozu 3 tekrür olacak şekilde ayrı petrilere uygulanmıştır. Tesadüf Parselleri Deneme Planına göre deneme kurulmuş olup iki farklı zaman diliminde tekrarlanmıştır. Araştırmadan elde edilen sonuçlar Mstat-c istatistik programında tesadüf parselleri deneme desenine göre yorumlanmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar, en güvenilir farka (EGF) göre gruplandırılmıştır.

## **Araştırma Bulguları ve Tartışma**

*Fungal izolatın patojenisite testi ve tanılanması*

Denemelerde kullanılan fungal izolat, mandarin meyvelerinde çürümelere neden olan fungal etmenleri belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonrası elde edilmiştir. Bu amaçla yapılan izolasyonlar sonucunda, çok sayıda bitki türünde gerek hasat öncesi gerekse hasat sonrası fitopatogenik karakterli fungal etmen olan *A. alternata* M2-3 izolatı elde edilmiştir (Şekil 1).



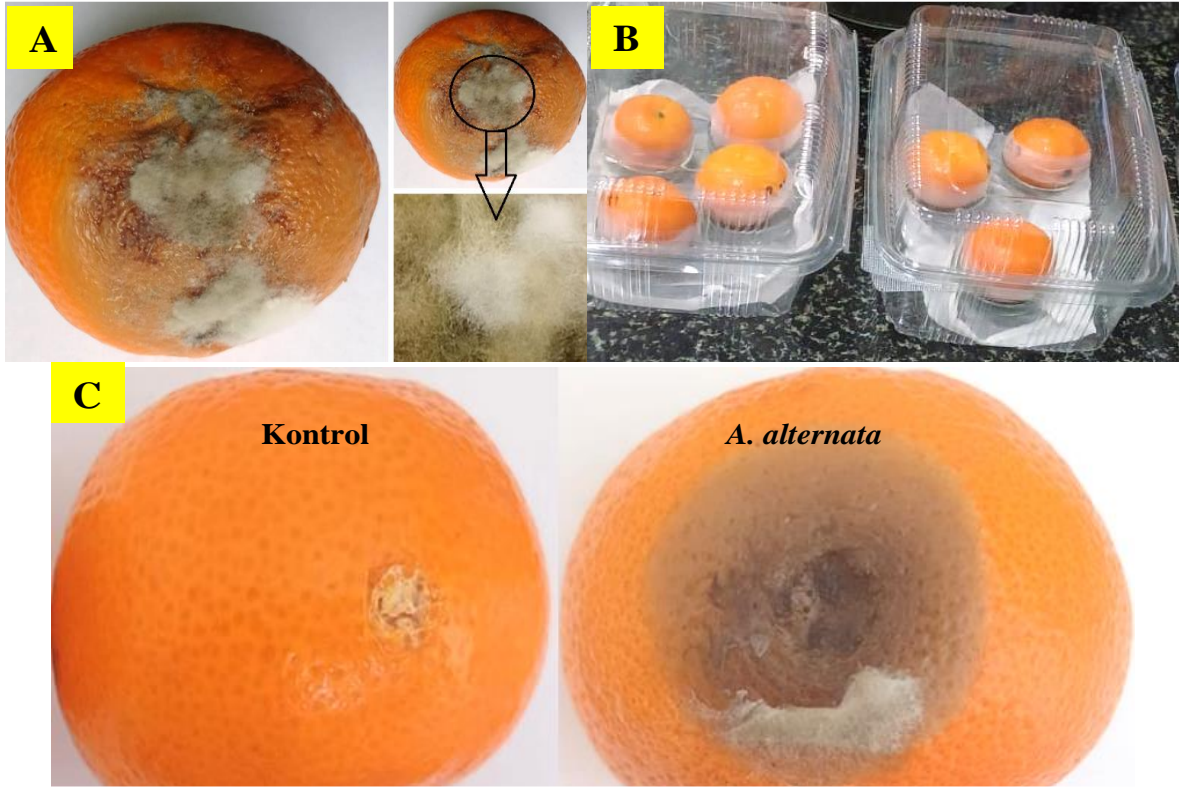
Şekil 1. Mandarin meyvelerinden yapılan izolasyonlar sonrası elde edilen *A. alternata* M2-3 izolatının PDA besi ortamı üzerindeki 10 günlük gelişimi (solda) ve bu izolata ait konidilerin ışık mikroskobu altındaki görünümü (sağda)

Figure 1. Growth of *A. alternata* M2-3 isolate obtained after isolation from mandarin fruits on PDA medium (left) and appearance of conidia of this isolate under light microscope (right)

Denemede kullanılan *A. alternata* M2-3 izolatının morfolojik olarak ön teşhis çalışması yapılmış, uçucu yağların antifungal etkileri araştırılmadan önce ise sağlık mandarin meyvelerinde patojenisite testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2B). Patojenisite testine tabi tutulan sağlıklı mandarin meyvelerinde oluşan belirtilerden yapılan yeniden izolasyonlardan gelişen re-izolatlara, orijinal izolat için yapılmış olan benzer teşhis yöntemleri uygulanmış ve sonuç olarak elde edilen re-izolatların orijinal izolatla aynı türe ait olduğu, böylece bu izolatın mandarin meyvelerinde patojen olduğu saptanmıştır.

Patojenisite çalışması sonucu fungal izolatın test edilen mandarin meyvelerinin yüzeyinde, doğal yollarla enfekte olmuş meyvelerde gerçekleşen semptomlara benzer belirtileri oluşturduğu gözlenmiştir. Nitekim yapay olarak enfekte edilen 'Nova' çeşidi mandarin meyvelerinin inokulasyon bölgesi ve çevresinde meydana gelen çürümelerin rengi ve yapısı (merkezi koyu, çevresi nispeten açık kahverengi çürüklükler), doğal yollarla enfekte olmuş meyvelerde oluşan doku çürüklükleriyle benzer renk ve yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 2 A,C).





Şekil 2. (A) Doğal şekilde *A. alternata* ile enfekte olmuş bir mandarin meyvesinin desikatöre alındıktan sonra yüzeyinde gelişen fungus miselyumları. (B) 'Nova' çeşidi sağlıklı mandarin meyvelerinde yapılan patojenite çalışmaları (C) ve patojenite testi sonucu kontrol meyvesine kıyasla *A. alternata* M2-3 izolatu inokule edilmiş bir mandarin meyvesi  
 Figure 2. (A) Fungal mycelium growing on the surface of a mandarin fruit naturally infected with *A. alternata* after being placed in a desiccator. (B) Pathogenicity tests on healthy mandarin fruits of the 'Nova' variety (C) and pathogenicity test results on a mandarin fruit inoculated with *A. alternata* M2-3 isolate compared to control fruit

Fungal izolatin makroskobik ve mikroskobik olarak ön teşhisinin yanı sıra (Şekil 1) kesin olarak tür tayini, moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Universal primerlerden olan ITS primer çiftleri (ITS-AB28/ITS-TW81) ile yapılan moleküler, devamındaki sekans ve BLAST analizi sonrası mandarin meyvelerinde patojen olduğu tespit edilen izolatomuzun, %100 oranda "OW983122" erişim numaralı *A. alternata* izolatu ile eşleştiği belirlenmiştir. Bununla birlikte fungal izolatomuza ait sekans ve diğer bilgiler GenBank'a yüklenerek izolat için erişim numarası alınmıştır (GenBank erişim no: PQ142807).

*Bitki uçucu yağ ve karışımlarının Alternaria alternata M2-3 izolatının misel gelişimi üzerine olan in vitro antifungal etkileri*

Mandarinde patojen olan *A. alternata* M2-3 izolatına karşı çalışmadaki uçucu yağların tekli kullanımı sonrası engelleme durumlarına bakıldığında en etkili uçucu yağın *T. spicata* olduğu saptanmıştır (Çizelge 2, Çizelge 3). Bu

uçucu yağ 4.0 µl petri<sup>-1</sup> dozda misel gelişimini tümüyle engellerken (Şekil 3A) *O. onites* 32.0 µl petri<sup>-1</sup> ve *S. officinalis* 64.0 µl petri<sup>-1</sup> konsantrasyonda misel gelişimini tümüyle engelleyebilmişlerdir.

*A. alternata* M2-3 izolatına karşı çalışmadaki uçucu yağların karışım şeklinde kullanımları sonrası engelleme durumlarına bakıldığında en etkili uçucu yağ karışımlarının *T. spicata* + *S. officinalis* ve *T. spicata* + *O. onites* olduğu saptanmıştır (Çizelge 2, Çizelge 3). Bu uçucu yağ karışımları 8 µl petri<sup>-1</sup> dozda misel gelişimini tümüyle engellerken (Şekil 3D,F), *O. onites* + *S. officinalis* uçucu yağ karışımı ise 16 µl petri<sup>-1</sup> dozunda misel gelişimini tümüyle engellemiştir (Şekil 3E).

Yapılan istatistik analizi sonrasında patojene karşı uygulanan farklı uçucu yağ/karışım dozları arasındaki farkın önemli olduğu saptanmış olup (Çizelge 3), bu dozların M2-3 izolatının misel gelişimini % engellenmesi üzerine olan antifungal etkilerine ise Çizelge 2'de yer verilmiştir.

Çizelge 2. Farklı uçucu yağların *A. alternata*'nın misel gelişimini engelleme (%) düzeyleriTable 2. Levels of inhibition (%) of different essential oil on mycelial growth of *A. alternata*

Doz ( $\mu\text{l}$ petri <sup>-1</sup> )	Uçucu yağ ve karışımlarının fungus misel gelişimini yüzde (%) engelleme düzeyleri					
	<i>T. spicata</i>	<i>O. onites</i>	<i>S. officinalis</i>	<i>T. spicata</i> + <i>O. onites</i>	<i>T. spicata</i> + <i>S. officinalis</i>	<i>O. onites</i> + <i>S. officinalis</i>
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	74.0	0.0	31.4	70.3	18.1	51.4
2	78.5	0.0	37.0	84.0	24.8	69.6
4	<b>100.0</b>	4.0	51.4	83.3	37.0	75.9
8	100.0	24.4	53.7	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	77.0
16	100.0	37.0	57.03	100.0	100.0	100.0
32	100.0	100.0	78.14	100.0	100.0	100.0
64	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Çizelge 3. Farklı uçucu yağ ve karışımlarının uygulanması sonrası *A. alternata*'nın petriyelerde oluşturduğu koloni çapları (mm)Table 3. Colony diameters (mm) formed by *A. alternata* in petri dishes after application of different essential oils and their mixtures

Doz ( $\mu\text{l}$ petri <sup>-1</sup> )	Uçucu yağ ve karışımlarının fungus misel gelişimi (mm) üzerine olan etkileri					
	<i>T. spicata</i>	<i>O. onites</i>	<i>S. officinalis</i>	<i>T. spicata</i> + <i>O. onites</i>	<i>T. spicata</i> + <i>S. officinalis</i>	<i>O. onites</i> + <i>S. officinalis</i>
0	90 a	90 a	90 a	90 a	90 a	90 a
1	23.33 j	90 a	61.67 e	26.67 ı	73.67 c	43.67 g
2	19.33 k	90 a	56.67 f	14.33 l	67.67 d	27.33 ı
4	<b>0 m</b>	86.33 b	43.67 g	15.00 l	56.67 f	21.67 jk
8	0 m	68.00 d	41.67 g	<b>0 m</b>	<b>0 m</b>	20.67 jk
16	0 m	56.67 f	38.67 h	0 m	0 m	0 m
32	0 m	0 m	19.67 k	0 m	0 m	0 m
64	0 m	0 m	0 m	0 m	0 m	0 m

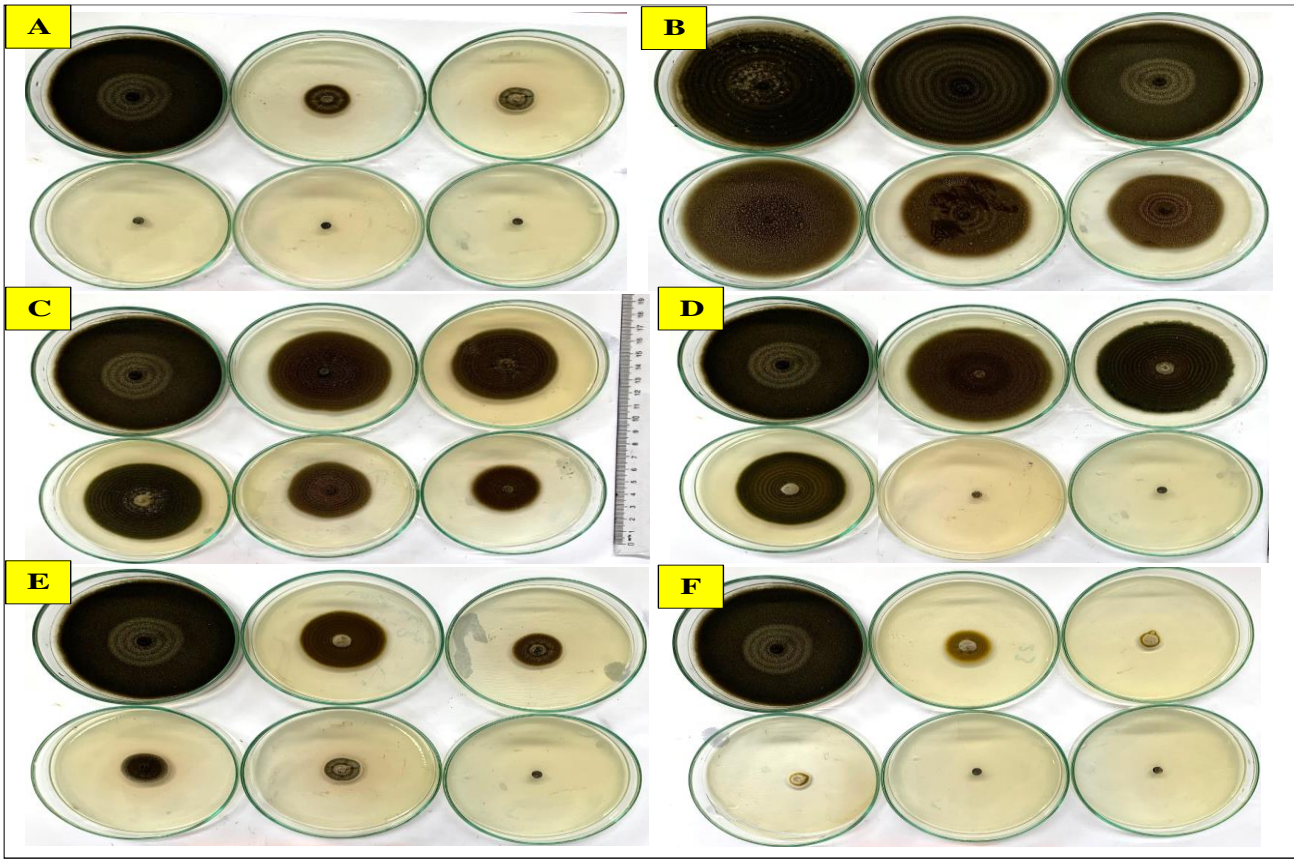
EGF (LSD) 2.673 (En Güvenilir Fark)

Tüm uçucu yağ ve karışımlarda geçerli olmak üzere, genel olarak bir uçucu yağ uygulamasına ait MIC değeri altındaki farklı uygulama dozları arasında farkların olduğu, MIC değeri ve üzerindeki uygulama dozları arasında ise herhangi bir farkın olmadığı istatistiksel olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). Bu doğrultuda özellikle MIC değeri üzerindeki uygulama dozlarına gereksinim olmayacağı söylenebilir.

Bunların yanı sıra *O. onites*'in 0, 1 ve 2  $\mu\text{l}$  petri<sup>-1</sup>, *S. officinalis*'in 4 ve 8  $\mu\text{l}$  petri<sup>-1</sup>, *T. spicata* + *O.*

*onites*'in 4 ve 8  $\mu\text{l}$  petri<sup>-1</sup> ve *O. onites* + *S. officinalis*'in 4 ve 8  $\mu\text{l}$  petri<sup>-1</sup> uygulama dozları arasında istatistiksel açıdan herhangi bir fark olmadığı görülmüştür. Bunlarla birlikte bazı farklı uçucu yağ uygulamaları arasında da istatistiksel farkın olmadığı belirlenmiştir. Nitekim *O. onites*'in 8 ile *T. spicata* + *S. officinalis*'in 2  $\mu\text{l}$  petri<sup>-1</sup> dozları ve *O. onites*'in 16, *S. officinalis*'in 2 ve *T. spicata* + *S. officinalis*'in 4  $\mu\text{l}$  petri<sup>-1</sup> dozları arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı saptanmıştır.





Şekil 3. Farklı bitki uçucu yağ ve karışımlarının farklı konsantrasyonlarda ( $0-16 \mu\text{l petri}^{-1}$ ) fungal etmen *Alternaria alternata* M2-3 izolatının misel gelişimini *in vitro* koşullarda engelleme potansiyellerinin belirlenmesi. Farklı konsantrasyonlarda (A) *T. spicata*, (B) *O. onites*, (C) *S. officinalis*, (D) *T. spicata*+*S. officinalis*, (E) *O. onites*+*S. officinalis* ve (F) *T. spicata*+*O. onites* uçucu yağları uygulanmış petriyelerde oluşan misel gelişimleri

Figure 3. Determination of the potential of different plant essential oils and their mixtures at different concentrations ( $0-16 \mu\text{l petri}^{-1}$ ) to inhibit the mycelial growth of the fungal agent *Alternaria alternata* M2-3 isolate under *in vitro* conditions. Mycelial growth in petri dishes treated with different concentrations of (A) *T. spicata*, (B) *O. onites*, (C) *S. officinalis*, (D) *T. spicata*+*S. officinalis*, (E) *O. onites*+*S. officinalis* ve (F) *T. spicata*+*O. onites* essential oils.

Çalışmada kullanılan *T. spicata*, *O. onites* ve *S. officinalis* bitki uçucu yağlarının tamamının tekli olarak kullanımları sonrası *A. alternata*'ya karşı uygulama dozuna bağlı şekilde değişen oranlarda antifungal etkiler sergiledikleri tespit edilmiştir. Uçucu yağların çalışmadaki fungal etmene karşı gösterdikleri antifungal etkinin içerdikleri bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim uçucu yağların sahip oldukları fenolik bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerden sorumlu oldukları daha önce yapılan bir çok çalışmalarda bildirilmiştir (Kotan ve ark., 2005; Tripathi ve ark., 2008; Kotan ve ark., 2010). Bu çalışmada en yüksek antifungal etki sergileyen *T. spicata*'nın içeriğinde yer alan başlıca ana bileşenler karvakrol,  $\gamma$ -terpinen, p-simen,  $\beta$ -karyofilen ve timol olarak tespit edilmiş olup (Kizil ve ark., 2015; Gedikoğlu ve ark., 2019), denemelerde saptanan antifungal etkilerin bu ana bileşenlerin bir ya da

birkaçından meydana geldiği düşünülmektedir.

Benzer şekilde uçucu yağların 1:1 oranında hazırlanan ikili karışım kombinasyonlarının (*T. spicata* + *S. officinalis*, *O. onites* + *S. officinalis* ve *T. spicata* + *O. onites*) tümü de fungusun misel gelişimi üzerinde antifungal etkiler meydana getirmişlerdir. Özellikle karışım olarak uygulanan dozlar tekli kullanımlara oranla daha etkili olup bunlar sinerjistik şekilde antifungal etkiler meydana getirmişlerdir. Bitki uçucu yağları ya da bunlardan elde edilen ana bileşenlerin tekli olarak kullanılmaları sonucu hedef patojen üzerindeki etkilerinin daha düşük olabileceği, karışım şeklinde kullanılmaları suretiyle ise bu etkinin daha fazla olabileceği bildirilmiştir. Karışım olarak uygulanan bileşiklerde söz konusu bu etkinin, farklı bileşenlerin sinerjistik etkiler oluşturmasından ileri geldiği belirtilmektedir. Yapılan literatür taramalarında uçucu yağların

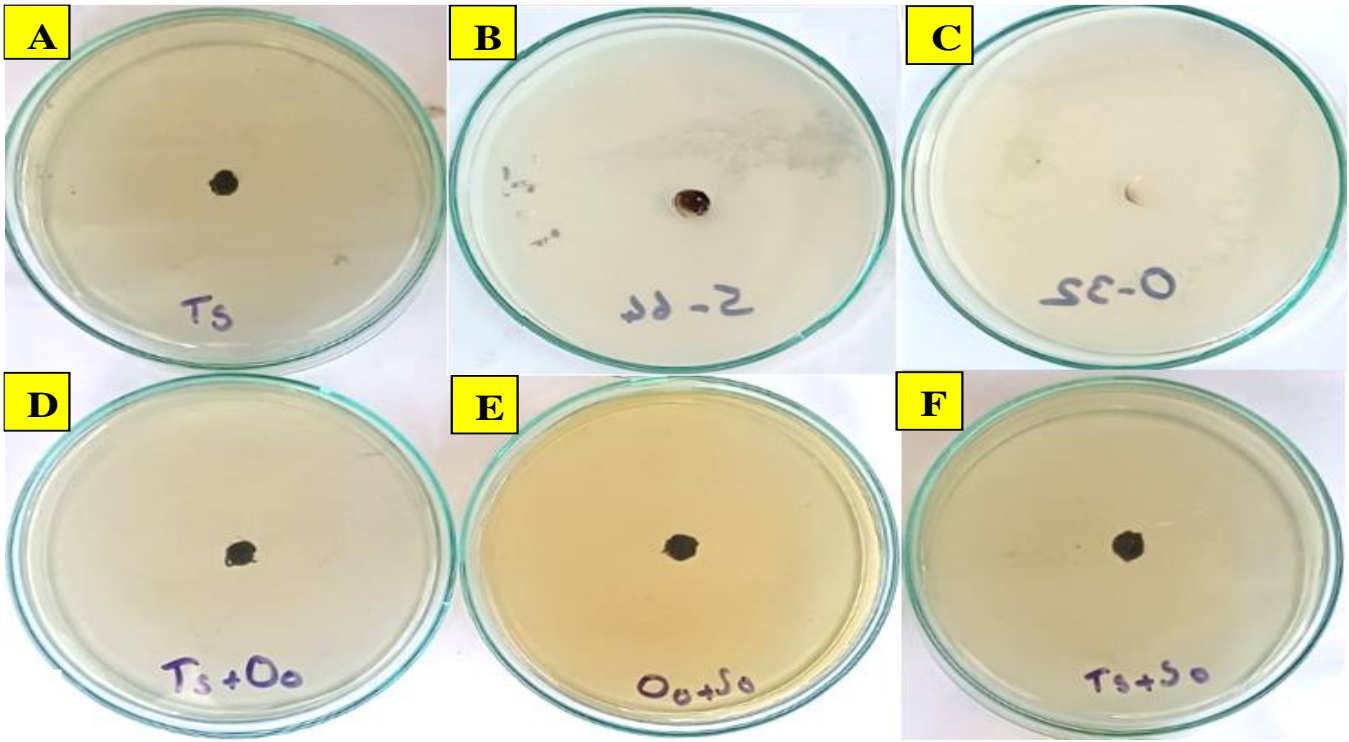
karışım olarak kullanılmaları sonrası meydana gelen etkinin belirlenmesine yönelik kısıtlı sayıda çalışma bildirilmiştir (Türkmen, 2015; Grati Affes ve ark., 2022). Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada Kara ve ark. (2022) rezene ve defne bitkilerinden elde edilmiş uçucu yağların karışım halinde kullanılmaları sonucu limoni servi ağaçlarında patojen olan *Pestalotiopsis funerea*'ya karşı sinerjistik şekilde antifungal etkilerin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada kullanılan uçucu yağlar da karışımlar şekliyle kullanıldıklarında sinerjistik etkiler gözlenmiş olup bu yönüyle çalışmaların bir birini destekler nitelikte olduğu söylenebilir.

Bitki uçucu yağların çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi, son dönemde araştırmacılar tarafından ilgi gören konular arasındadır. Yapılmış çalışmalara bakıldığında uçucu yağların genel olarak insan sağlığı üzerine etkilerinin araştırılmış olduğu görülmüş olup bitki patolojisi alanındaki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar nispeten azdır. Yapılan literatür taramalarında, farklı bitkilerden elde edilmiş *A. alternata* izolatlarına karşı bitkilerden elde edilmiş bitki uçucu yağlarının antifungal etkileri az sayıdaki çalışmada araştırılmıştır. Söz konusu çalışmalarda *A. alternata* izolatlarına karşı farklı bitki türlerinden elde edilmiş bazı uçucu yağ ve ekstraktlarının antifungal etkiler gösterdikleri bildirilmiş olup (Xu ve ark., 2014; Atay ve Soylu, 2023) doğrudan mandarin meyvelerinden izole edilen *A. alternata* izolatına karşı bitki uçucu yağları ve karışımlarının antifungal etkileri ilk defa bu çalışma ile ortaya koyulmuştur. Mandarin dışında farklı turuncgil meyvelerinde çürümelere neden olan *A. alternata* izolatlarına karşı ise bitki uçucu yağlarının antifungal etkilerinin araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışmaya rastlanılmamış olup bunların birinde Soylu ve Köse (2015), *O. onites* ve *T. spicata* uçucu yağlarının sırasıyla 20.0 ve 80.0 µg ml<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında turuncgillerde patojen olan *A. alternata*'nın miselyal büyümesini tümüyle inhibe ederek güçlü antifungal aktivite

gösterdiğini bildirilmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan kekik türlerinin de M2-3 izolatına karşı söz konusu çalışmadan farklı dozlarda da olsa antifungal etkiler sergilediği göz önünde bulundurulduğunda sonuçların bir birini destekler nitelikte olduğu görülmektedir. Turuncgiller dışında biber meyvelerinden izole edilen *A. alternata* izolatına karşı bazı bitki uçucu yağlarının antifungal etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise Atay ve Soylu (2023), farklı kekik türlerinden *T. spicata*, *O. syriacum* ve *T. vulgaris* uçucu yağlarının 2.0-4.0 µl petri<sup>-1</sup> dozlarında, fungal etmene karşı yüksek düzeyde antifungal etkiler sergilediklerini bildirmişlerdir. Bu denemede kullanılan kekik türlerinin de çok düşük dozlarda dahi fungal izolata karşı antifungal etkiler sergilemesiyle iki çalışmanın sonuçlarının birbirlerini destekler nitelikte oldukları söylenebilir.

#### *Uçucu yağ ve karışımlarının alternaria alternata M2-3 izolatına olan fungisidal ve fungistatik etkileri*

Denemede kullanılan uçucu yağların tekli ve karışımlarının MIC değerindeki *A. alternata*'ya olan fungisidal/fungistatik etkilerine bakıldığında %100 engeleme gösteren tüm konsantrasyonlarda (*T. spicata*=4µl petri<sup>-1</sup>, *O. onites*=32 µl petri<sup>-1</sup>, *S. officinalis*=64 µl petri<sup>-1</sup>, *T. spicata* + *O. onites*=8µl petri<sup>-1</sup>, *T. spicata* + *S. officinalis*=8µl petri<sup>-1</sup> ve *O. Onites* + *S. officinalis*=16µl petri<sup>-1</sup>) antifungal etkinin fungisidal özellikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Mandarin dışında kurutulmuş biber meyvelerinden izole edilmiş *A. alternata* izolatına karşı yapılmış bir çalışmada da bu çalışmadaki bulgulara paralel sonuçlar bildirilmiş olup (Atay ve Soylu, 2023) söz konusu çalışmadaki farklı kekik türlerine (*Thymus vulgaris*, *Thymbra spicata* ve *Origanum syriacum*) ait uçucu yağların MIC değerlerindeki antifungal etkilerinin fungisidal özellikte olduğu bildirilmiştir.



Şekil 4. %100 engellemenin görüldüğü MIC değerlerinde uçucu yağların, *Alternaria alternata* M2-3 izolatına olan fungisidal/fungistatik etkilerinin belirlenmesi çalışması. MIC değerlerinde; A) *T. spicata* (4  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>), B) *S. officinalis* (64  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>) C) *O. onites*, (32  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>), D) *T. spicata*+*O. onites*, (8  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>), E) *O. onites*+*S. officinalis* (16 $\mu$ l petri<sup>-1</sup>) F) *T. spicata*+*S. officinalis* (8 $\mu$ l petri<sup>-1</sup>) uçucu yağlarının sergilemiş oldukları fungisidal etki

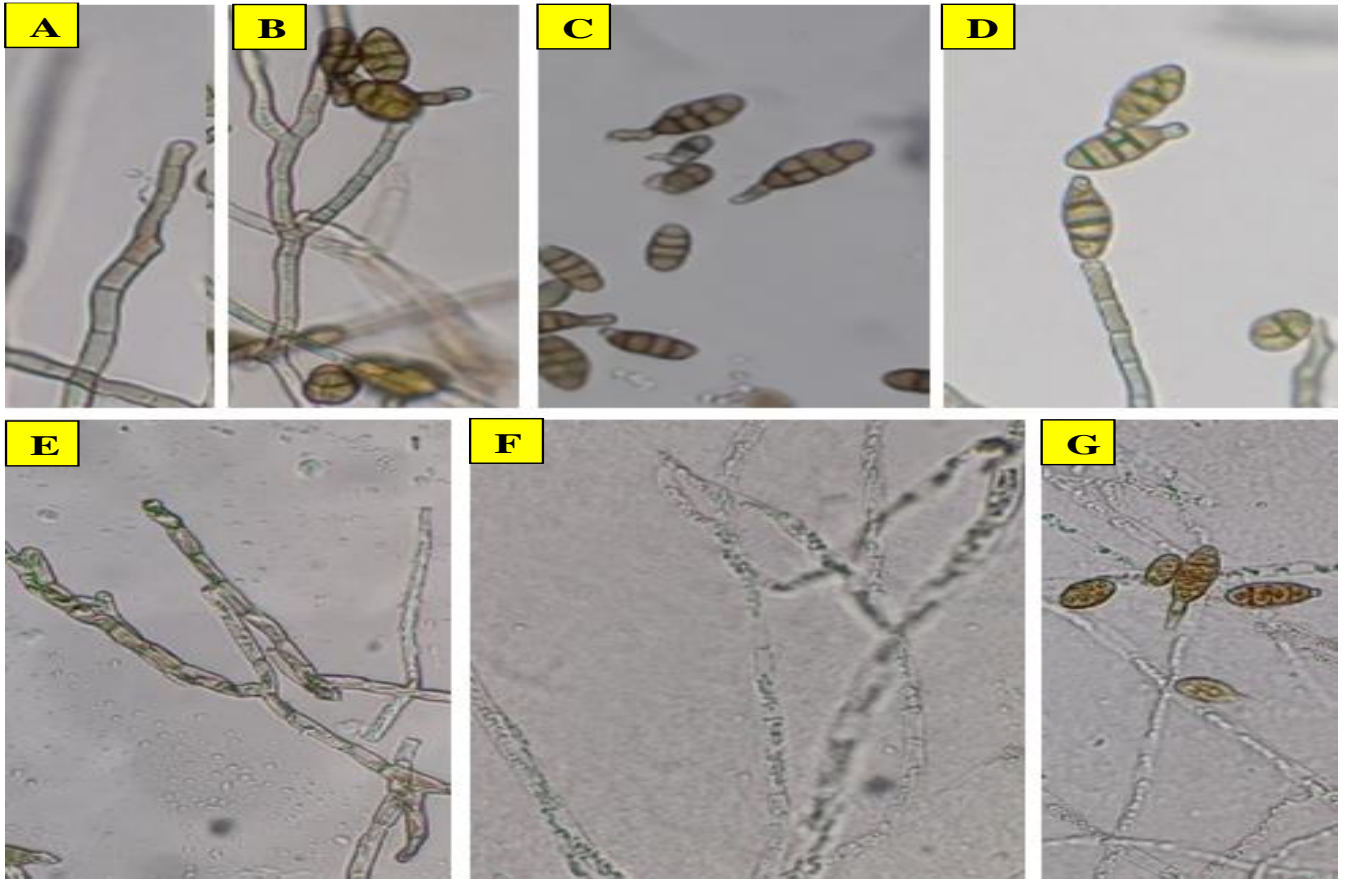
Figure 4. A study to determine the fungicidal/fungistatic effects of essential oils on *Alternaria alternata* M2-3 isolate at MIC values where 100% inhibition was observed. Fungicidal effects of essential oils on MIC values of; A) *T. spicata* (4  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>), B) *S. officinalis* (64  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>) C) *O. onites*, (32  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>), D) *T. spicata*+*O. onites*, (8  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>), E) *O. onites*+*S. officinalis* (16  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>) F) *T. spicata*+*S. officinalis* (8  $\mu$ l petri<sup>-1</sup>)

#### Uçucu yağ ve karışımlarının *Alternaria alternata* M2-3 izolatının hif ve konidi morfolojisinde meydana getirdiği değişimler

Denemelerde kullanılan uçucu yağ ve karışımlarının MIC değerlerindeki dozları 3 günlük misel gelişimi gerçekleşen petrilere tekrardan uygulandıklarında, fungal izolatın hif ve konidi morfolojisinde çeşitli deformasyonların meydana geldiği, ışık mikroskobu altında yapılan incelemeler sonrası gözlenmiştir (Şekil 5C-E). Özellikle uç kısımlarda çapın daralması, çeperlerin bozulması ve parçalanması suretiyle yapısal bütünlüğün kaybedilmesi, hiflerde görülen başlıca morfolojik değişimler olarak kaydedilmiştir. Bunun yanı sıra uçucu yağ uygulamaları konidilerin morfolojisinde de değişiklikler meydana getirmiş olup uçucu yağ uygulanmış petrilere konidilerin, uçucu yağ uygulanmamış petrilere göre bariz şekilde deforme olduğu ve şekillerinin bozulduğu gözlenmiştir. Özellikle *T. spicata* uçucu yağının meydana getirdiği deformasyonların, diğer yağların meydana getirdiğinden daha fazla olduğu da gözlenmiştir. Uçucu yağların antimikrobiyal

özelliklerinin belirlenmesine yönelik yapılmış bazı çalışmalarda ise patojen üzerinde meydana gelen bu tür yapısal bozulmalara, yağın içeriğinde yer alan ana bileşenlerin, mikroorganizmanın hücre duvarı sentezini düzenleyen enzimatik reaksiyonların olumsuz etkilenmesinden kaynaklı olabileceği bildirilmiştir (Soylu ve ark., 2006; Lucas ve ark., 2012; Kachur ve Suntres, 2020). Uçucu yağ ve karışımlarının antifungal etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Kara ve ark. (2022), *Foeniculum vulgare* ve *Laurus nobilis* uçucu yağ ve karışımlarının fungal etmen *Pestalotiopsis funerea*'nın hif ve konidileri üzerinde deformasyonlar meydana getirdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan uçucu yağlar da söz konusu çalışmayı destekler nitelikte fungusun hifleri ve konidilerinde ciddi deformasyonlar meydana getirmiştir. Nitekim Şekil 5'te de görüleceği üzere uçucu yağ uygulanmış petrilere konidilerin, uçucu yağ uygulanmamış petrilere kıyasla bariz şekilde deforme oldukları görülmüştür.





Şekil 5. A-D) Herhangi bir uçucu yağ ile muamele edilmemiş *A. alternata* M2-3 izolatının PDA besi ortamında geliştirilen kültüründen yapılan preparatlar sonrası patojenin sağlıklı hif ve konidilerinin görünümü. MIC değerinde uygulanan *T. spicata* uçucu yağının fungal izolatın E,F) hif ve G) konidi morfolojisi üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin ışık mikroskobu altında görünümü-

Figure 5. A-D) Appearance of healthy hyphae and conidia of the *A. alternata* M2-3 after preparations made from the culture of pathogen isolate grown in PDA medium without any essential oil treatment. Appearance of the changes caused by *T. spicata* essential oil applied at MIC value on the E,F) hyphae and G) conidia morphology of the fungal isolate under light microscope-

## Sonuçlar

Sonuç olarak, farklı bitki türlerinden elde edilmiş olan bitkisel kökenli uçucu yağlar, mandarin meyvelerinde hasat öncesi ve sonrası dönemde önemli bir patojen olan *A. alternata* izolatına karşı, doza bağlı şekilde *in vitro* şartlarda antifungal etkiler göstermişlerdir. Tek başına kullanımları sonucunda *T. spicata* uçucu yağı en etkili yağ olarak belirlenirken *S. officinalis* en düşük antifungal etkiyi göstermiştir. Bunların yanı sıra özellikle uçucu yağların karışım halindeki kullanımlarında sinerjistik antifungal etkiler saptanmış olup tekli kullanılmalarına kıyasla çalışmadaki uçucu yağ karışımlarının daha düşük dozlarda bile daha fazla antifungal etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu uçucu yağlar bitki patojenleriyle mücadelede tekli veya özellikle karışım şeklinde, fungusitlere alternatif doğa dostu yaklaşımlar olarak özellikle depo koşullarında fumigant olarak kolay şekilde uygulanabilirler.

**Çıkar Çatışması:** Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**Yazar Katkısı:** Fungal etmenin izole edilmesi ve uçucu yağların antifungal etkilerin belirlenmesi denemeleri Mehmet ATAY ve Meltem AVAN tarafından yürütülmüştür. Bitki uçucu yağlarının elde edilmesi ise Memet İNAN tarafından gerçekleştirilmiştir. Makalenin yazımı her üç yazarın katkısı ile gerçekleştirilmiş olup, makalenin son hali yazarlar tarafından okunarak onaylanmıştır.

## Kaynaklar

- Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- Arlotta, C., Ciacciulli, A., Strano, M.C., Cafaro, V., Salonia, F., Caruso, P., Licciardello C, Russo G, Smith, M.W., & Cuenca, J. (2020.) Disease resistant citrus breeding

- using newly developed high resolution melting and CAPS protocols for *Alternaria* brown spot marker assisted selection. *Agronomy*, 10(9), 1368. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091368>.
- Atay, M., & Soyulu, S. (2023). Kurutmalık biber meyvelerinde iç çürüklüğüne neden olan bazı fungal etmenlere karşı bitki uçucu yağlarının *in vitro* antifungal etkileri. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 26(1), 76-89. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.1085859>.
- Avcı, A.B., & İnan, M. (2020). Comparing of Cultivated Annual and Perennial *Calendula officinalis* L. Species. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(3), 579-585.
- Bassimba, D., Mira, J.L., & Vicent, A. (2014). Inoculum sources, infection periods, and effects of environmental factors on *Alternaria* brown spot of mandarin in Mediterranean climate conditions. *Plant Disease*, 98(3), 409-417. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0956-RE>
- Dang, H.X., Pryor, B., Peever, T., & Lawrence, C.B. (2015). The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. *BMC Genomics* 16(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1430-7>
- De-Miguel, M.D., Caballero, P., & Fernández-Zamudio, M.A. (2019). Varietal change dominates adoption of technology in Spanish citrus production. *Agronomy*, 9(10), 631. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100631>
- Elena, K. (2006). *Alternaria* brown spot of *Minneola* in Greece; evaluation of citrus species susceptibility. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 259–262. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9005-8>
- FAO, (2024). Food and Agriculture Organization of the United Nations Official Website. Citrus fruit production data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (Erişim Tarihi: 24.08.2024)
- Felipini, R.B., Brito, R.A.S., Azevedo, F.A., Massola, & Júnior, N.S. (2023). *Alternaria alternata* f. sp. citri tangerine pathotype induces reactive oxygen species accumulation in susceptible citrus leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 126, 102040. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102040>
- Garganese, F., Schena, L., Siciliano, I., Prigigallo, M.I., Spadaro, D., De Grassi, A., Ippolito, A., & Sanzani, S.M. (2016). Characterization of citrus-associated *Alternaria* species in Mediterranean areas. *PLoS One* 11(9), e0163255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163255>
- Garganese, F., Ippolito, A., Di Rienzo, V., Lotti, C., Montemurro, C., & Sanzani, S.M. (2018). A new high resolution melting assay for genotyping *Alternaria* species causing citrus brown spot. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), 4578–4583. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8986>
- Garganese, F., Sanzani, S.M., Di Rella, D., Schena, L., & Ippolito, A. (2019). Pre-and postharvest application of alternative means to control *Alternaria* Brown spot of citrus. *Crop Protection*, 121, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.03.014>.
- Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food science & nutrition*, 7(5), 1704-1714.
- Ghooshkhaneh, N.G., Golzarian, M. R., & Mamarabadi, M. (2022). Withdrawn: Spectral pattern study of citrus black rot caused by *Alternaria alternata* and selecting optimal wavelengths for decay detection. *Food Science & Nutrition*, 10(6), 1694. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2739>
- Golmohammadi, M., & Rahimian, H., (2004). First report of brown spot caused by *Alternaria alternata* on tangrine in Iran. In *Proceedings of 16th Iranian plant protection congress*, (Vol. 28, p. 461). <https://doi.org/10.22059/ijpps.2017.233507.1006787>
- González-Lamothe, R., Mitchell, G., Gattuso, M., Diarra, M.S., Malouin, F., & Bouarab, K. (2009). Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3400-3419. <https://doi.org/10.3390/ijms10083400>
- Grati, Affes., T., Chenenaoui, S., Zemni, H., Hammami, M., Bachkouel, S., Aidi Wannas, W. & Lasram, S. (2022). Biological control of Citrus brown spot pathogen, “*Alternaria alternata*” by different essential oils. *International Journal of Environmental Health Research*, 33(8), 823-836. <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2055748>
- Güney, İ. G., Tekin, F., Günen, T. U., Özer, G., & Derviş, S. (2023). *Alternaria alternata* causing inner black rot of lemon (*Citrus limon*) fruits in Turkey: Genetic diversity and characterisation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 125, 101998. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.101998>
- Han, J., Fan, Y., Sun, T., An, J., Ding, Y., Zhang, W., Liu, F., & Wang, C. (2023). Sodium nitroprusside (SNP) treatment increases the postharvest resistance of apple fruit to *Alternaria alternata* by enhancing antioxidant enzyme activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 129, 102199. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102199>
- He, J.Z., Shao, P., Liu, J. H., & Ru, Q.M. (2012). Supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel and their antioxidant activity. *International journal of molecular sciences*, 13(10), 13065-13078. <https://doi.org/10.3390%2Fijms131013065>
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The Antibacterial Properties of Phenolic Isomers, Carvacrol and Thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 3042-3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Kara, M., Türkmen, M., & Soyulu, S. (2022). Rezene ve defne uçucu yağ karışımlarının kimyasal bileşenlerinin ve *Pestalotiopsis funerea*'ya karşı antifungal etkinliklerinin belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25 (1), 113-126. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.904966>
- Kizil, S., Toncer, O., Diraz, E., & Karaman, S. (2015). Variation

- of agronom-ical characteristics and essential oil components of Zahter (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*) populations in semi-arid climatic conditions. *Turkish Journal of Field Crops*, 20(2), 242–251.
- Kotan, R., Sahin, F., Ala, A. (2005). Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruits trees in eastern Anatolia region of Turkey. *J. Plant Dis. Prot.*, 113, 8–13.
- Kotan, R., Cakir, A., Dadasoglu, F., Aydin, T., Cakmakci, R., Ozer, H., ... & Dikbas, N. (2010). Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(1), 145-160.
- Lee, S.B., Taylor, J.W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*, pp 282–287.
- Lucas, G.C., Alves, E., Pereira, R.B., Perina, F.J. & de Souza, R.M. (2012). Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 351-359. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000300006>
- Morales, H., Marín, S., Ramos, A.J. & Sanchis, V. (2010). Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: a review. *Food Control*, 21(7), 953-962. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.016>
- Perina, F.J., de Andrade, C.C.L., Moreira, S.I., Nery, E.M., Ogoshi, C., & Alves, E. (2019). Cinnamomun zeylanicum oil and trans-cinnamaldehyde against *Alternaria* brown spot in tangerine: direct effects and induced resistance. *Phytoparasitica*, 47, 575-589. <https://doi.org/10.1007/s12600-019-00754-x>
- Raveau, R., Fontaine, J., & Lounès-Hadj, S.A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: a review. *Foods*, 9(3):365. <https://doi.org/10.3390/foods9030365>
- Scora, R.W. (1975). On the history and origin of Citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, (Nov.-Dec. 1975), 369-375.
- Silalahi, J. (2002). Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 11(1), 79-84. <https://doi.org/10.1046/j.1440-6047.2002.00271.x>
- Soylu, E.M., & Kose, F. (2015). Antifungal activities of essential oils against citrus black rot disease agent *Alternaria alternata*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(4), 894-903. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895158>
- Soylu, E.M., Soyly, S, & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161, 119-128. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0206-z>
- Tripathi, P., Dubey, N.K. & Shukla, A.K. (2008). Use of Some Essential Oils as Post-Harvest Botanical Fungicides in the management of Grey Mould of Grapes Caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 39–46. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9435-2>
- Türkmen, M. (2015). Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Uçucu Yağ Karışımlarının Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi*, 55 sayfa.
- Vega, B., & Dewdney, M.M. (2014). QoI-resistance stability in relation to pathogenic and saprophytic fitness components of *Alternaria alternata* from citrus. *Plant Disease*, 98(10), 1371-1378. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-14-0078-RE>
- Vicent, A., Armengol, J., Sales, R., García-Jiménez, J., & Alfaro-Lassala, F. (2000). First report of *Alternaria* brown spot of citrus in Spain. *Plant Disease*, 84(9), 1044-1044. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1044B>
- Villaverde, J.J., Sevilla, Morán. B., Sandín España, P., López-Goti, C., & Alonso Prados, J.L. (2014). Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Management Science*, 70(1), 2-5. <https://doi.org/10.1002/ps.3663>
- Wang, Y., Qian, J., Cao, J., Wang, D., Liu, C., Yang, R., & Sun, C. (2017). Antioxidant capacity, anticancer ability and flavonoids composition of 35 citrus (*Citrus reticulata* Blanco) varieties. *Molecules*, 22(7), 1114. <https://doi.org/10.3390/molecules22071114>
- White, T.J., Bruns, T, Lee, S.J.W.T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc A Guide To Methods Appl* 18(1):315–3.
- Wichtl, (1971). *Die pharmakogostich-Chemisehe Analys Band*, 12, Frankfurt/M.
- Xu, S.X., Yan, F.J., Ni, Z.D., Chen, Q.R., Zhang, H. & Zheng, X.D. (2014). In vitro and in vivo control of *Alternaria alternata* in cherry tomato by essential oil from *Laurus nobilis* of Chinese Origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 1403-1408. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6428>
- Zhang, Y.M., Sun, Y., Xi, W.P., Shen, Y., Qiao, L.P., Zhong, L.Z., Ye, X.Q., & Zhou, Z.Q. (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, 145, 674-680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.012>
- Zou, Z, Xi, W.P., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z.Q. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885–896. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>
- Zhou, T., Wang, X., Ye, B., Shi, L., Bai, X., & Lai, T. (2018). Effects of essential oil decanal on growth and transcriptome of the postharvest fungal pathogen *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 145, 203-212. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.07.015>