

Bazı toprak kökenli funguslara karşı defne esansiyel yağı ve hidrosölünün antifungal etkilerinin belirlenmesi*

Muharrem TÜRKKAN¹, Ömer ÇALIŞKAN², İsmail ERPER^{3,4}, Ş. Metin KARA⁵, M. Akif AÇIKGÖZ⁵

¹Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 52200, Altınordu/Ordu

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bafra Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, 55400 Bafra/Samsun

³Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 55139 Atakum/Samsun

⁴Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 720044 Bişkek/Kırgızistan

⁵Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 52200, Altınordu/ Ordu

*Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje No: AR-1330)

Alınış tarihi: 30 Ekim 2018, Kabul tarihi: 2 Ocak 2019

Sorumlu yazar: Muharrem TÜRKKAN, e-posta: muharremturkkan@odu.edu.tr

Öz

Mevcut çalışmada, defne (*Laurus nobilis* L.) uçucu yağının ve hidrosölünün *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, *Rhizoctonia solani* AG-4, *Macrophomina phaseolina* ve *Sclerotium rolfsii*'ye karşı antifungal etkileri *in vitro* ve toprak test yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca uçucu yağın kimyasal bileşenleri GC-MS analizleri ile belirlenmiştir. Ana bileşeni 1,8-sineol (%57.03) olan defne uçucu yağında on altı bileşen tespit edilmiştir. Miselyal gelişme, spor çimlenmesi ve sklerot çimlenmesi dahil olmak üzere tüm *in vitro* çalışmalarda, uçucu yağın dört fungusun tamamına karşı engelleyici etkisi, uçucu yağ hidrosölününkinden çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 ve *S. rolfsii* için uçucu yağın EC₅₀, MIC ve MFC değerleri sırasıyla 9.84, >40 ve >40, 5.28, >40 ve >40, 3.55, 20 ve >40, ve 2.74, 20 ve 40 µl/petri olarak belirlenmiştir. Toprak testlerinde, uçucu yağ (40 µL/petri) *R. solani* AG-4 ve *S. rolfsii*'nin misel gelişimini tamamen engellemiş, ancak *F. oxysporum* f. sp. *cepae* ve *M. phaseolina*'nın misel gelişimini sırasıyla %63.61 ve %95.53'e kadar azaltmıştır. Bununla birlikte, uçucu yağın birinci grup funguslara karşı engelleyici etkisi ile *M. phaseolina*'nın arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Uçucu yağ hidrosölünün en yüksek konsantrasyonu (%40, w/v)'nda bile, *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4

ve *S. rolfsii*'nin misel gelişmelerini sırasıyla %2.91, 5.36, 26.80 ve 35.13'e kadar azaltmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, çeşitli toprak kökenli fungusların kontrolünde defne uçucu yağının kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Defne, uçucu yağ, toprak kökenli funguslar, alternatif kontrol

Determination of antifungal effects of laurel essential oil and hydrosol against some soilborne fungi

Abstract

In present study, the antifungal activities of the essential oil and hydrosol of laurel (*Laurus nobilis* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, *Rhizoctonia solani* AG-4, *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium rolfsii* were evaluated by using *in vitro* and soil test methods. The chemical composition of the essential oil were also determined by GC-MS analysis. Sixteen components were detected in the essential oil, the main component of which was 1,8-cineole (57.03%). In all *in vitro* studies, including mycelial growth, spore germination, and sclerotial germination, the inhibitory effect of the essential oil against all four fungi was found to be much higher than that of the essential oil hydrosol. In addition, the values of EC₅₀, MIC and MFC of the essential oil for *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 and *S. rolfsii* were 9.84, >40 and >40, 5.28, >40

and >40, 3.55, 20 and >40, and 2.74, 20 and 40 µl/petri, respectively. In soil tests, the essential oil (40 µL/petri) completely inhibited the mycelial growth of *R. solani* AG-4 and *S. rolfii*, but reduced the mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *cepae* and *M. phaseolina* by 63.61 and 95.53%, respectively. However, the difference between the inhibitory effect of the essential oil against the first group fungi, and that of *M. phaseolina* was not statistically significant. Even at the highest concentration (40%, w/v) of the essential oil hydrosol, it reduced the mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 and *S. rolfii* by 2.91, 5.36, 26.80 and 35.13%, respectively. The results of this study show that the essential oil of laurel could be used in the control of various soilborne fungi.

Key words: Laurel, essential oil, soilborne fungi, alternative control

Giriş

Toprak kökenli fungal patojenler, tarla ve bahçe bitkilerinde sıklıkla ölümle sonuçlanan ve önemli verim kayıplarına yol açan kök çürüklüğü hastalık kompleksinin gelişiminde büyük bir rol oynarlar (Siddiqui et al., 2002). *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina* ve *Sclerotium* cinsleri bitkilerde vasküler solgunluk, kök ve gövde çürüklükleri, çökerten ve yanıklıklara neden olan önemli toprak kökenli fungal patojenlerdir (Agrios, 2005).

Bu hastalıklar ile mücadelede sağlıklı üretim materyali kullanılması, topraktaki fazla suyun drene edilmesi, enfekteli bitki artıklarının alandan uzaklaştırılması, dengeli gübreleme ve sulama gibi kültürel önlemler, bitkisel materyallerin sıcak su ile muamele edilmesi ve toprak solarizasyonu gibi fiziksel önlemler, dayanıklı bitki çeşitlerinin yetiştirilmesi, topraktaki faydalı mikroorganizma (bakteri, fungus vd.)'ları harekete geçirmek için toprağın organik materyaller ile zenginleştirilmesi ve arbuskular mikorhizal uygulamaları gibi biyolojik önlemlerin yanı sıra tohumların fungusit (benomil, captan, carbendazim ve thiram vd.)'ler ile muamelesi ve toprak fumigasyonu (metil bromid, metam sodyum ve dazomet) gibi kimyasal savaşım yöntemleri tavsiye edilmektedir (Farih et al., 1981; Yuen et al., 1991; Duniway, 2002; Agrios, 2005; Alaniz et al., 2011). Ancak bu hastalık etmenleri ile mücadele, toprakta uzun yıllar canlılıklarını koruyabildikleri dayanıklı yapıları (klamidospor, sklerot vd.)'nın olması, direnç sorunları ve kullanılan fungusitlerin maliyetlerinin yüksekliği nedeniyle

oldukça zordur (Yangui et al., 2008). Ayrıca günümüzde bu etmenlere karşı mücadelede en etkili olan kimi fungusitler (benomil, carbendazim, metil bromid) hem dünyada hem de ülkemizde yasaklanmıştır (Fan et al., 2008; Anonymous, 2018). Bunlara alternatif olarak kullanılan fungusitlerin yetiştiriciliği yapılan ürünlerde ve toprakta kalıntılara neden olmakta, çevre ve insan sağlığını olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Bu yüzden, bitki hastalıkları ile mücadele de yeni stratejiler içerisinde bitkinin gelişme sezonu içerisinde kullanılabilen kimyasal içermeyen doğal bileşiklerle patojenlerin mücadelesinin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda çeşitli tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağlar bitki hastalıklarının kontrolünde doğal fungusit olarak değerlendirilmektedir (Isman, 2000; Paulitz and Belanger, 2001). Adaçayı, biberiye, defne, güvey otu, karanfil, kekik, kimyon, lavanta, limon otu, mercanköşk, nane, oğul otu, ökaliptus, rezene, sedef otu, tarçın, yavşan otu, yarpuz gibi bitkilerden elde edilen uçucu yağlar hasat öncesi ve hasat sonrası fungal hastalıkların kontrolünde kullanılmıştır (Zambonelli et al., 1996; Wilson et al., 1997; Ristic et al., 2000; Walter et al., 2001; Bouchra et al., 2003; Daferera et al., 2003; Bowers and Locke, 2004; Soylu et al., 2005a; Soylu et al., 2005b; Lee et al., 2007). Uçucu yağların biyolojik aktiviteleri uçucu yağların elde edildiği bitki genotipine ve bitkilerin yetiştiği ekolojik koşullara, test metodlarına ve mikroorganizmaya bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermektedir (Giese, 1994; Rota et al., 2004; Yeşil Çelikaş et al., 2007). Bitki uçucu yağları terpenoidlerin özellikle monoterpen ve sesquiterpenlerin değişken karışımlarından oluşur, ancak bunun yanı sıra bitki uçucu yağlarında diterpenler ve çeşitli düşük molekül ağırlıkta bileşikler (alifatik hidrokarbonlar, asitler, alkol, aldehitler, fenolik bileşikler, asiklik esterler veya laktonlar)'de bulunabilir. Antimikrobiyal etkileri de bu uçucu yağ fraksiyonlarından kaynaklanmaktadır (Rota et al., 2004).

Bu çalışmada defne (*Laurus nobilis* L.) yaprağından elde edilen uçucu yağ ve hidrosölünün *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, *Rhizoctonia solani* AG-4, *Macrophomina phaseolina* ve *Sclerotium rolfii*'nin misel gelişimi, spor ve sklerot çimlenmesi üzerine etkileri *in vitro*'da belirlenmiş ve uçucu yağ ve hidrosölünün misel gelişimi üzerine etkileri toprak testleri ile de değerlendirilmiştir. Ayrıca çalışmada defne uçucu yağ bileşimi gaz kromatografi/kütle spektrometresi (GC-MS) ile belirlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Fungal kültür

Çalışmada kullanılan toprak kökenli fungal [*F. oxysporum* f. sp. *cepae* (soğan), *R. solani* AG-4 (soğan), *M. phaseolina* (fasulye) ve *S. rolfsii* (fasulye)] izolatlar Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Laboratuvarı'ndaki fungal kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Bitkisel materyal

Çalışmada kullanılan defne (*Laurus nobilis* L.) yaprakları 2014 yılında Samsun ili Bafra ilçesinden toplanmıştır.

Defne uçucu yağlarının eldesi

Defne yaprakları (2 kg) gölgede 3-4 hafta kurutulup küçük parçalara ayrıldıktan sonra 500 mL'lik cam balonlara alınmış ve üzerine bir miktar su ilave edilip cam balonlar elektrikli ısıtıcıya yerleştirilmiştir. Cam balonun ağzına soğutucu bağlı Klevenger aparatı cihazın büret kısmında uçucu yağ miktarında değişim olmayıncaya kadar 4-5 saat süre ile ısıtılmıştır. Bu şekilde buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağlar 0.22 µm porluk membran filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir (Çakır, 1992). Çalışmada elde edilen defne yağ hidrosölü de membran filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir. Elde edilen uçucu yağlar denemelerde kullanılıncaya kadar +4°C' de içerisinde anhydrous sodium sulphate bulunan vida kapaklı koyu renkli cam şişelerde saklanmıştır.

Defne uçucu yağ bileşenlerinin gaz kromatografi/kütle spektrometresi (GC-MS) ile belirlenmesi

Defne uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS analizi Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'ndan hizmet alımıyla yapılmıştır. Bileşen analizleri, otomatik örnekleme sistemi bulunan 7890 A model GC system, 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler 1:10 oranında hekzan ile seyreltilerek bileşenlerin ayrımı için HP-5 (%5 Phenyl Methyl Siloxan) 1 µL olarak split (10:1) modunda enjekte edilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan helyumun iç basıncı 5 psi olarak ayarlanmıştır. Enjektör sıcaklığı 250°C, detektör sıcaklığı 250°C olacak şekilde planlanmıştır. Kolonun başlangıç sıcaklığı 60°C, son sıcaklığı 240°C olup, dakikada 4°C artacak şekilde programlanmıştır. GC/MS ayrımı için, 70 eV iyonizasyon enerjili, elektron iyonizasyon sistemi kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan helyumun akış oranı 1 mL/dk. ve kullanılan kolon ise

HP-5Ms (30m x 0.25mm x 0.25µm film) dir. Enjektör ve MS transfer sıcaklıkları sırasıyla 230°C ve 250°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Gaz kromatografisinde olduğu gibi, hekzan ile seyreltilen örnekten 1.0 µL split/splitless (10:1) olarak kolona verilmiştir (McLafferty, 1994; Adams, 1995).

Misel gelişimi üzerine defne uçucu yağ ve hidrosölünün buhar ve değme etkilerinin belirlenmesi

Defne uçucu yağının fungusların misel gelişimi üzerine buhar etkisini belirlemek için, 9 cm çapındaki steril petri kaplarına patates dekstroz agar [PDA; Difco Laboratories, Becton Dickinson (BD), Maryland, USA] besin ortamı dökülmüş ve ertesini gün petri kaplarının merkezine 4-7 günlük fungus kültürlerinin diskleri (5mm) PDA ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Uçucu yağ (40 µL/petri) petri kaplarının kapağının merkezine yerleştirilen steril filtre kağıdına (10 mm, Whatman No.1) damlatılıp petri kaplarının etrafı parafilm ile kapatıldıktan sonra ters çevrilerek 24±1°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petri kaplarına sadece steril saf su damlatılmıştır. Aynı koşullarda inkübe edilen kontrol grubu petrilerdeki fungusların gelişmeleri günlük olarak takip edilerek petriyi kaplamaya yakın olduğunda, kontrol ve uçucu yağ içeren petrilerdeki fungusların misel gelişmeleri dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür.

Defne yağ hidrosölünün fungusların misel gelişimi üzerine değme etkisini belirlemek için, hidrosöl steril edilmiş PDA besin ortamına (50°C) son konsantrasyonu %40 (v/v) olacak şekilde eklenmiş ve 9 cm çapındaki petri kaplarına dökülmüştür. Bu petriler, daha önceden PDA besin ortamında geliştirilmiş 4-7 günlük fungus kültürlerinden mantar delici ile alınan 5 mm çaplı miselyal disklerle inokule edilmiştir. Petriler parafilm ile kaplandıktan sonra 24±1°C'de inkübe edilmiştir. Aynı koşullarda inkübe edilen kontrol (steril saf su içeren PDA) grubu petrilerdeki fungusların gelişmeleri günlük olarak izlenerek petriyi kaplamaya yakın olduğunda, kontrol ve uçucu yağ hidrosöllü petrilerdeki fungusların misel gelişmeleri dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür.

Ölçümler sırasında fungusların en uzun ve kısa radyal gelişmeleri esas alınmış ve miselyal gelişmenin engellenmesi Abbot formülü, % Engelleme = [(kontrol petrilerindeki fungal gelişme- uçucu yağ eklenmiş veya steril filtre kağıdına damlatılmış petrilerdeki fungal gelişme) / kontrol petrilerindeki fungal gelişme]*100, kullanılarak

hesaplanmıştır. Denemede her uygulama 6 tekerrürlü olacak şekilde planlanmıştır.

Misel gelişimi üzerine defne uçucu yağ ve hidrosölünün toksik etkilerinin belirlenmesi

Defne yağ (2.5, 5, 10, 20 ve 40 µL/petri) ve hidrosöl [%5, 10, 20 ve 40 (v/v)]'lerinin fungusların miselyal gelişmesini %50 oranında azaltan konsantrasyon (EC₅₀ = lethal concentration)'ları probit (IBM SPSS Statistic 20) analizi ile hesaplanmıştır. Fungus miselyal gelişmelerini tamamen engelleyen en küçük konsantrasyon (MIC = minimum inhibition concentration) değeri paralel denemelerle belirlenmiştir. Defne yağ ve hidrosölünün fungisidal veya fungistatik etkileri Thompson (1989) ve Tripathi et al. (2004)'nin metodları izlenerek belirlenmiştir. Buna göre gelişmeyen fungus diskleri petrilere alınarak, taze besin ortamı içeren petrilere tekrar aşılacaktır. Fungusların gelişmeleri 24±1°C'de 9 gün boyunca gözlenmiştir. Bu sürede zarfında fungal diskte geri dönüşümsüz olarak hiç bir gelişme gözlenmemişse, bu konsantrasyon fungusu tamamen engelleyen konsantrasyon (MFC = minimum fungicidal concentration) olarak belirlenmiştir. Ayrıca aktarılan fungusun tekrar gelişmeye başladığı ve petriyi tamamen kapladığı gün sayısı belirlenerek defne yağ ve hidrosöllerinin konsantrasyonlarının fungistatik etkileri de belirlenmiştir.

Spor çimlenmesi üzerine defne uçucu yağ ve hidrosölünün buhar ve değme etkilerinin belirlenmesi

Defne yağının *F. oxysporum* f. sp. *cepae* spor çimlenmesi üzerine buhar etkilerinin belirlenmesi için, 9 cm çapındaki steril petri kaplarına PDA besin ortamı dökülmüş ve ortam katılaştıktan sonra, daha önceden hazırlanmış 7 günlük fungus kültürlerine 10 mL steril saf su [%0.5 (v/v) Tween-20] eklenerek steril bir bistürü yardımıyla kültürün yüzeyi kazanmış ve elde edilen süspansiyon 3 katlı steril tülbentten geçirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan spor süspansiyonu (1x10⁴ spor/mL) PDA besin ortamına yayılarak, uçucu yağın farklı (2.5, 5, 10, 20 ve 40 µL/petri) konsantrasyonları petri kaplarının merkezine yerleştirilen steril filtre kağıdına damlatılıp, petri kaplarının etrafı parafilm ile kapatıldıktan sonra ters çevrilerek 24±1°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu petri kaplarına sadece steril saf su damlatılmış ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Spor çimlenmesi için değerlendirme 24 saat sonra yapılmıştır. Deneme üç tekerrürlü olarak yürütülmüş

ve her petride iki farklı alanda 100'er spor sayılmıştır.

Defne yağ hidrosölünün *F. oxysporum* f. sp. *cepae* spor çimlenmesi üzerine değme etkisinin belirlenmesi için yağ hidrosölünün son konsantrasyonları %5, 10, 20 ve 40 olacak şekilde steril edilip soğutulmuş PDA besin (50°C) ortamına eklenmiş ve 9 cm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüştür. Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan spor süspansiyonu yağ hidrosöllü PDA besin ortamına yayılarak, 24±1°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Uygulama yapılmamış petri kapları kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Değerlendirme yukarıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Sklerot çimlenmesi üzerine defne uçucu yağ ve hidrosölünün buhar ve değme etkilerinin belirlenmesi

Defne yağının sklerot çimlenmesi üzerine buhar etkisini belirlemek için *S. rolfsii*'nin saf kültürlerinden elde edilen (3-4 haftalık fungus kültürü) sklerotlar, PDA besin ortamı dökülmüş 9 cm çapındaki petri kaplarına 5'er adet olacak şekilde yerleştirilmiş ve petri kaplarının kapaklarının merkezine yapıştırılan steril filtre kağıtlarına uçucu yağların yukarıda belirtilen konsantrasyonları damlatılmıştır. Daha sonra petri kapları parafilm ile kapatılarak ve 24±1°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Deneme 5 tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. Değerlendirmelerde kontrol grubu (steril safsu) petri kaplarındaki sklerotların çimlenme durumları takip edilerek, uçucu yağ uygulaması yapılmış petrileredeki sklerotların çimlenme oranları buna göre % olarak belirlenmiştir.

Defne yağ hidrosölünün sklerot çimlenmesi üzerine değme etkisinin belirlenmesi için, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan petri kaplarına *S. rolfsii*'nin 5'er adet sklerotu eşit aralıklarla yerleştirilmiştir. Değerlendirme yukarıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Toprak testleri ile defne uçucu yağ ve hidrosölünün funguslar üzerine buhar ve değme etkilerinin belirlenmesi

Defne yağ ve hidrosölünün etkilerini değerlendirmek amacıyla toprak testlerinde Arslan et al. (2009) tarafından tanımlanan metod biraz değiştirilerek kullanılmıştır. Mısır unu-kum ortamında, kumun mısır ununa oranı 1'e 8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Mısır unu kum karışımı ortamın 9 g'ı 7 cm çapındaki cam petrilere konduktan sonra petri kapları etüvde 130°C'de 5 saat steril edilmiştir. Daha önce PDA

besin ortamında geliştirilen 4-7 günlük fungus (*F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 ve *S. rolfsii*) kültürlerinden alınan 5 mm çaplı misel diskleri, mısır unu-kum ortamının merkezine 0.25 cm derinliğine yerleştirilmiştir. Fungal diskler petrinin ortasına yerleştirildikten sonra ortamda fungal gelişmeyi sağlamak için birkaç mL steril saf su ilave edilmiştir. Uçucu yağın farklı konsantrasyon (5, 10, 20 ve 40 µL/petri)'ları petri kapaklarına yerleştirilen steril filtre kağıtlarına damlatılmış ve petri kapları parafilm ile kapatılıp 24±1°C'de 5-10 gün karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu petri kaplarına ise steril saf su eklenmiştir. Inkübasyon sonrasında petri kapakları üzerine 1 cm² ve 1 mm²'lik karelere bölünmüş asetat kağıdı yerleştirilerek fungusların miselyal gelişme alanı ölçülmüştür. Engelleme yüzdesi, uçucu yağın farklı konsantrasyonları eklenmiş petrilerdeki miselyal gelişme ve kontrol grubu kontrol grubu petrilerdeki miselyal gelişme alanı % engelleme olarak belirlenmiştir. Denemede her uygulama 6 tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür.

Defne yağ hidrosölünün etkisini belirlemek için, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan besin ortamının merkezine fungal diskler yerleştirildikten sonra yağ hidrosölünün farklı konsantrasyon (%10, 20 ve 40, v/v)'larının 10'ar mL si petri ortamına steril cam pipet ile eklenmiş ve petri kapları parafilm ile kapatılıp 24±1°C'de 5-10 gün karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu petri kaplarına ise sadece steril saf su ilave edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda fungal gelişme yukarıda belirtildiği şekilde değerlendirilmiştir.

İstatistik analiz

Fungusların misel, spor ve sklerot çimlenmeleri ile toprak testi sonucu elde edilen veriler ayrı ayrı olacak şekilde IBM SPSS Statistic programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Tukey-HSD testi (P<0.05) ile belirlenmiştir.

Bulgular

Mevcut çalışmada, GC/MS analizleri ile defne uçucu yağında 16 etken madde belirlenmiştir (Çizelge 1). Bunlardan 1,8-cineole %57.03'lük oran ile defne uçucu yağ bileşeninde en yüksek oranda olup, bunu terpinyl acetate (%13.35) izlemiştir.

In vitro denemelerde, 40 µL/petri konsantrasyonda, defne yağının buhar etkisi *F. oxysporum* f. sp. *cepae* ve *M. phaseolina*'nın miselyal gelişmelerini sırasıyla

%87.38 ve %96.06 azaltırken, *R. solani* AG-4 ve *S. rolfsii*'nin miselyal gelişmesini tamamen engellemiş ve bu fark istatistik olarak da önemli bulunmuştur (P<0.05). Yağ hidrosölü (%40, v/v)'nün funguslar üzerindeki temas etkilerinin daha sınırlı bir etkiye sahip olduğu ve miselyal gelişmelerini %6.13-56.74 oranında azalttığını göstermiştir.

Defne yağı en yüksek toksisiteyi *S. rolfsii*'ye karşı göstermiştir, bunu sırasıyla *R. solani* AG-4, *M. phaseolina* ve *F. oxysporum* f. sp. *cepae* izlemiştir (Çizelge 2). İlk iki fungus için MIC değerleri 20 µL/petri iken, *M. phaseolina* ve *F. oxysporum* f. sp. *cepae* için > 40 µL/petri olarak belirlenmiştir. Ancak bu fungusların miselyal gelişmesini durduran bu konsantrasyonun bir üst konsantrasyon (40 µL/petri)'u *S. rolfsii* için fungisidalken, *R. solani* AG-4 için ise fungisitativ etkisi olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Diğer iki fungus için MFC değeri > 40 µL/petri olarak tespit edilmiştir. Yağ hidrosölü fungusların miselyal gelişmelerini nispeten çok zayıf bir şekilde etkilediğinden, *S. rolfsii*'nin EC₅₀ değeri (%32.69) hariç tüm funguslar için EC₅₀, MIC ve MFC değerleri %40'tan büyük bulunmuştur.

Çizelge 1. Defne uçucu yağının bileşenleri

No	Bileşenler	Ahıkama zamanı	% Miktar
1	alpha-Pinene	12.812	3.65
2	β-Thujene	14.056	5.44
3	β-Pinene	14.260	3.18
4	1,8-Cineole	16.078	57.03
5	γ-Terpinene	16.918	0.92
6	Linalyl acetate	18.214	0.59
7	Isopulegol	20.837	0.60
8	4-Terpineol	21.238	4.20
9	α-Terpineol	21.657	2.81
10	Isobornyl formate	24.915	0.64
11	Pseudolimonen	25.886	0.66
12	Terpinyl acetate	26.935	13.35
13	Eugenol	27.230	1.64
14	Methyleugenol	28.547	3.55
15	Spathulenol	34.393	0.50
16	Bicyclo[4.3.0]nonane, 7-methylene-2,4,4-trimethyl-2-vinyl-	34.632	1.24

Çizelge 2. Defne uçucu yağının *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 ve *Sclerotium rolfsii*'nin miselyal gelişmesi üzerine toksisitesi

Fungus	Konsantrasyon (µL/petri)		
	EC ₅₀ ^a	MIC ^b	MFC ^c
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	9.84	> 40	> 40
<i>M. phaseolina</i>	5.28	> 40	> 40
<i>R. solani</i> AG-4	3.55	20	> 40
<i>S. rolfsii</i>	2.74	20	40

^aMiselyal gelişimi 50% oranında azaltan konsantrasyon.

^bMinimum engelleyici konsantrasyon.

^cMinimum fungisidal konsantrasyon.

Çizelge 3. Defne uçucu yağının *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 ve *Sclerotium rolfsii*'nin miselyal gelişmesi üzerine fungisidal ve fungistatik etkileri

Fungus	Konsantrasyon (µL/petri)				
	2.5 gün	5 gün	10 gün	20 gün	40 gün
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	ND*	ND	ND	ND	ND
<i>M. phaseolina</i>	ND	ND	ND	ND	ND
<i>R. solani</i> AG-4	ND	ND	ND	2	3
<i>S. rolfsii</i>	ND	ND	ND	2	MFC

*ND = belirlenemedi

Defne yağının buhar etkisinin *F. oxysporum* f. sp. *cepae*'nin spor çimlenmesini 20 ve 40 µL/petri konsantrasyonlarında sırasıyla %14.25 ve 30.75 oranında azalttığını, ancak diğer üç konsantrasyon (2.5, 5 ve 10 µL/petri)'un kontrolden farksız olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Yağın 2.5 ve 5 µL/petri konsantrasyonları *S. rolfsii*'nin sklerot çimlenmesini sırasıyla %12.50 ve 42.50 oranında azaltırken, 10 µL/petri ve üstü konsantrasyonlar sklerot çimlenmesini tamamen engellemiştir (P<0.05).

Yağ hidrosölünün %5, 10, 20 ve 40 konsantrasyonları *F. oxysporum* f. sp. *cepae*'nin spor çimlenmesini hiç etkilemezken, *S. rolfsii*'nin sklerot çimlenmesi çalışmada kullanılan en yüksek iki konsantrasyonda sırasıyla %2.5 ve 7.5 oranında azaltmış ve bu istatistiksel olarak kontrolden farklı bulunmuştur (P<0.05).

Toprak testi sonuçlarına göre defne yağının çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyon (40 µL/petri)' da hem *R. solani* AG-4 hem de *S. rolfsii*'yi tamamen engellediği, ancak 10 µL/petri konsantrasyonda *S. rolfsii*'nin miselyal gelişimi %93.46 oranında engellemesine karşın, bu oranın istatistiksel olarak yüksek konsantrasyonlarından farksız olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4) (P<0.05). Yine benzer olarak *M. phaseolina*'nın miselyal gelişimi 40 µL/petri konsantrasyonda %95.53 oranında engellenmiş olmasına karşın, bu oran istatistiksel olarak yukarıdaki engellemelerden farksızdır (P<0.05). Halbuki *F. oxysporum cepae*'nın miselyal gelişimini en yüksek konsantrasyonda bile %63.61 oranında engelleyebilmiştir.

Defne yağ hidrosölünün ise çalışmada kullanılan fungusların hiç birini tamamen engelleyemediği, ancak etkilerinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 4. Toprak testinde defne uçucu yağının *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* AG-4 ve *Sclerotium rolfsii*'nin miselyal gelişmesi üzerine etkileri

Fungus	Konsantrasyon (µL/petri)	Engelleme (%)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	5	19.21 h ^a
	10	34.22 g
	20	44.58 f
	40	63.61 d
<i>M. phaseolina</i>	5	26.92 gh
	10	48.46 ef
	20	72.68 c
	40	95.53 a
<i>R. solani</i> AG-4	5	43.60 f
	10	63.10 d
	20	86.15 b
	40	100.00 a
<i>S. rolfsii</i>	5	54.66 e
	10	93.46 ab
	20	100.00 a
	40	100.00 a

^aAynı harfle gösterilen değerler arasında Tukey-HSD P<0.05'e göre bir fark yoktur.

Çizelge 5. Toprak testinde defne yağ hidrosölünün *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotium rolfsii*'nin miselyal gelişmesi üzerine etkileri

Fungus	Konsantrasyon (% w/v)	Engelleme (%)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	10	-0.85 d ^a
	20	0.49 d
	40	2.91 d
<i>M. phaseolina</i>	10	0.73 d
	20	2.39 d
	40	5.36 cd
<i>R. solani</i> AG-4	10	1.84 d
	20	11.18 c
	40	26.80 b
<i>S. rolfsii</i>	10	10.51 c
	20	20.44 b
	40	35.13 a

^aAynı harfle gösterilen değerler arasında Tukey-HSD P<0.05 e göre bir fark yoktur.

Sonuçlar ve Tartışma

Aromatik ve tıbbi bitkilerden elde edilen uçucu yağların, antibakteriyel, antifungal ve antioksidant özellikler gibi çeşitli biyolojik aktiviteye sahip oldukları çok eski çağlardan beri bilinmektedir (Baratta et al., 1998; Cosentino et al., 1999). Uçucu yağların biyolojik aktiviteleri, bitki genotipi ile belirlenen ve coğrafi köken, çevresel ve agronomik koşullar gibi çeşitli faktörlerden büyük ölçüde etkilenen kimyasal bileşimine bağlıdır (Giese, 1994; Rota et al., 2004; Yeşil Çeliktaş et al., 2007). Bitki uçucu yağları esas olarak terpenoidler ve diğer bazı

düşük molekül ağırlıkta bileşikler (alifatik hidrokarbonlar, asitler, alkol, aldehitler, fenolik bileşikler, asiklik esterler veya laktonlar)'den oluşur (Rota et al., 2004). Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerini bileşimi, yapısı ve ayrıca fonksiyonel gruplarında yer alan bu bileşikler belirler (Omidbeygi et al., 2007; Yeşil Çeliktaş et al., 2007). De Corato et al. (2010) süperkritik karbondioksit tekniği ile elde ettiği defne uçucu yağında 1,8-cineole (%24.84), linalool (%14.46), terpinil asetat (%12.36) ve metil öjenol (%10.09)'ü esas bileşenler olarak sınıflandırmışlardır. Mevcut çalışmada da GC/MS analizlerinde defne uçucu yağlarında 16 etken madde belirlenmiş olmasına karşın, bunlardan özellikle 1,8-cineole (%57.03) ve terpinil asetat (%13.35)'in öne çıktığı belirlenmiştir.

Çalışmada defne uçucu yağ ve hidrosölünün *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *M. phaseolina*, *R. solani* AG-4 ve *S. rolfii*'ye karşı antifungal etkileri hem *in vitro* hem de toprak testleri ile araştırılmıştır. *In vitro*'da defne uçucu yağı (40 µL/petri) *R. solani* ve *S. rolfii*'nin misel gelişmesini tamamen engellerken, diğer iki fungusu karşı engelleyici etkileri yüksek olmasına karşın tam engelleme gerçekleşmemiştir. Ayrıca defne uçucu yağının 40 µL/petri konsantrasyonu *F. oxysporum* f. sp. *cepae* ve *M. phaseolina* için fungistatik ve/veya fungisidal etkinlik göstermemesine karşın, *R. solani* AG-4 için fungistatik ve *S. rolfii* için fungisidal etkinlikte olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan defne yağ hidrosölünün bu dört fungusu karşı etkileri çok daha düşük olup, herhangi bir fungitoksik etki belirlenmemiştir. Önceki çalışmalarda mevcut sonuçlarla uyumlu olup, Müller-Riebau et al. (1995) defne yağının 1000 µL/lit konsantrasyonda *F. moniforme*, *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Phytophthora capsici*'nin miselyal gelişmelerini %0.0-38.3 oranında engelleyebildiğini belirtmişlerdir. Defne uçucu yağlarının *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. ve *Trichoderma viride*'ye karşı fungitoksik özellik gösterdiği ve MIC ve MFC değerlerinin üç fungus için de sırasıyla 40 µL/ml ve 50 µL/ml olarak belirlenmiştir (Simic et al., 2004). Başka bir çalışmada adaçayından elde edilen hem 1,8 cineole hem de camphor uçucu yağlarının *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* ve *F. proliferatum*'a karşı düşük bir engelleyici etki gösterirken, *R. solani*, *S. sclerotiorum* ve *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*'ye karşı daha yüksek bir engelleyici etki gösterdiklerini, ancak her iki etken maddenin test edilen en yüksek konsantrasyon (500 µL/Lt)'da bile fungusların

hiçbiri için fungistatik bir etki göstermediği rapor edilmiştir (Pitarokili et al., 2003). Türkölmez ve Soylu (2014) 1,8 cineole'ün *S. rolfii*, *R. solani* ve *M. phaseolina* için üç farklı konsantrasyon (1500, 2010 ve 3000 µg/mL)'unun fungus misel gelişimini sırasıyla %44.1, 81 ve 100 oranında azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada kekik, rezene ve defne yağlarının uçucu fazlarının *S. rolfii*, *R. solani* ve *M. phaseolina*'ya karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*'un misel gelişimine karşı kekik, rezene, karabaş kekiği, defne ve yaban mersini uçucu yağlarının fungitoksik olduğu ve EC₅₀ konsantrasyonlarının sırasıyla 0.013, 0.07, 0.20, 0.34 ve 0.6 mg/mL olduğu rapor edilmiştir (Soylu and İncekara, 2017). Boyraz and Özcan (2005) biberiye, kimyon, fesleğen, geyik otu ve sarı çörtük otlarının hidrosöllerinin çalışmada kullandıkları en yüksek konsantrasyonda (%15, v/v) *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*'nin misel gelişmesini %18.82-89.41 arasında değişen oranlarda engelleyebildiğini, öte yandan geyik otu ve sarı çörtük otunun *R. solani*'nin misel gelişmesini tamamen engellerken, biberiye ve kimyonun sırasıyla %7.8 ve %39.64 oranında engelleyebildiğini, fakat fesleğenin hiçbir engelleyici etki göstermediğini rapor etmişlerdir.

Mevcut çalışmada, defne yağı *F. oxysporum* f. sp. *cepae*'nin spor çimlenmesini denemede kullanılan en yüksek konsantrasyonda bile nispeten azaltmasına karşın, daha düşük konsantrasyonlarda *S. rolfii*'nin sklerot çimlenmesini tamamen engellemiştir. Ayrıca defne yağ hidrosölü spor çimlenmesini hiç etkilemezken, sklerot çimlenmesi üzerine çok sınırlı bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda, Soylu et al. (2006) *Phytophthora infestans*'a karşı kekik, lavanta, biberiye, rezene ve defne bitki uçucu yağlarının buhar fazının değme fazına oranla daha yüksek düzeyde etkinlik gösterdiğini ve fungusun sporangiumlarının çimlenmesini engellediğini bildirmişlerdir. Köse (2007) *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* ve *Penicillium digitatum*'un spor çimlenmesi üzerine bazı kekik çeşitleri (Ak kekik, Suriye kekiği, karabaş kekik), karabaş lavanta, rezene ve defne uçucu yağlarının buhar ve değme etkilerini araştırdığı çalışmada, defne uçucu yağının yağlar arasında funguslara karşı en düşük antifungal etkinliğe sahip olduğunu belirlemiştir. Aynı çalışmada defne uçucu yağının buhar etkinliği denemelerinde tüm fungusların spor çimlenmelerini sırasıyla 160, 60, 60 ve 120 µg/mL

konsantrasyonlarda tamamen engellemesine karşın, aynı yağın değme etkinliği denemelerinde *A. alternata* ve *B. cinerea*'yı sırasıyla 2960 ve 3600 µg/mL konsantrasyonda engellerken, *P. digitatum* ve *A. niger* sporlarının çimlenmesini çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyon (3920 µg/mL)'da dahi tamamen engelleyemediği bildirilmiştir.

Çalışmada toprak testlerinde defne uçucu yağı *M. phaeseolina*, *R. solani* AG-4 ve *S. rolfsii*'nin miselyal gelişmelerini ya kuvvetli bir şekilde engellemiş ya da tamamen engellemiş, fakat çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyonda bile *F. oxysporum* f. sp. *cepae*'nin misel gelişimini tamamen durduramamıştır. Ayrıca defne yağ hidrosölü funguslar üzerine çok daha zayıf etkiler göstermişlerdir. Halbuki, geyik otunun yağ hidrosölünün %15'lük konsantrasyonunun *Alternaria mali* ve *B. cinerea*'nın misel gelişimini tamamen engellediği rapor edilmiştir (Boyras and Özcan, 2006). Soylu et al. (2007) origanum ve rezene uçucu yağlarının *S. sclerotiorum*'a karşı etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırdıkları bir çalışmada, bu yağların buhar fazının değme fazına oranla daha yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği, dahası toprağa uygulanan uçucu yağların fungus hiflerinde oldukça önemli morfolojik bozulmalara neden olduğunu ve aynı zamanda fungus sklerotlarını da öldürdüğünü tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, uçucu yağın toprağa uygulanması ile hastalık çıkışının da %53-70 oranında engellediğini belirlemişlerdir.

Bu çalışmada hem *in vitro* hem de toprak testlerinde defne uçucu yağının *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, *M. phaeseolina*, *R. solani* AG-4 ve *S. rolfsii*'ye karşı defne yağ hidrosölünden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle mücadelesi zor olan toprak kökenli patojenlere karşı sentetik fungusitlere alternatif olarak kullanılacak insan ve çevre sağlığı açısından güvenli olarak kabul edilen defne ve diğer bitkisel uçucu yağların etkinliklerinin daha detaylı araştırılması gerekir.

Teşekkür

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje No:AR-1330).

Kaynaklar

- Adams, R.P., 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation Carol Stream, IL, USA, 469 p.
- Agrios, G. N., 2005. Plant pathology, 5 th. edn. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 948 p.
- Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., Armengol, J., 2011. Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum in vitro*, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. Crop Protection, 30: 489-494.
- Anonymous, 2018. Bitki koruma ürünleri veri tabanı programı. Available at <https://bku.tarim.gov.tr>. (Erişim tarihi: 11 Ekim 2018).
- Arslan, Ü., İlhan, K., Vardar, C., Karabulut, Ö. A., 2009. Evaluation of antifungal activity of food additives against soilborne phytopathogenic fungi. World J Microbiol Biotechnol, 25: 537-543.
- Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Ruberto, G., 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal, 13: 235-244.
- Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M., Hmamouchi, M., 2003. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils of Seven Moroccan Labiatae Against *Botrytis cinera*. Fr. Journal of Ethnopharmacology, 89: 165-169.
- Bowers, J.H., Locke, J.C., 2004. Effect of Formulated Plant Extract and Oils on Population Density of *Phytophthora nicotianae* in Soil and Control of Phytophthora blight in the Greenhouse. Plant Disease, 88: 11-16.
- Boyras, N., Özcan, M., 2005. Antifungal effect of some spice hydrosols. Fitoterapia, 76: 661- 665.
- Boyras, N., Özcan, M., 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. International Journal of Food Microbiology, 107: 238-242.
- Çakır, C., 1992. Antalya ve çevresinde doğal olarak yetişen bazı bitkilerin fungitoksik potansiyellerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, 91sayfa.

- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters of Applied Microbiology, 29: 130-135.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., 2003. The Effectiveness of Plant Essential Oils on the Growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection, 22: 39-44.
- De Corato, U., Maccioni, O., Trupo, and Di Sanzo, G., 2010. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. Crop Protection, 29: 142-147.
- Duniway, J.M., 2002. Status of Chemical Alternatives to Methyl Bromide for Preplant Fumigation of Soil. Phytopathology, 92: 1337-1343.
- Fan, C.M., Xiong, G.R., Qi, P., Ji, G.H., He, Y.Q., 2008. Potential biofumigation effects of *Brassica oleracea* var. *caulorapa* on growth of fungi. Journal of Phytopathology, 156:321-325.
- Farih, A., Menge, J.A., Tsao, P.H., Ohr, H.D., 1981. Metalaxyl and fosite aluminum for control of *Phytophthora gummosis* and root rot on citrus. Plant Disease, 65: 654-657.
- Giese, J., 1994. Spices and seasoning blends: A taste for all seasons. Food Technology, 48: 87-98.
- Isman, B.M., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19: 603-608.
- Köse, F., 2007. Turunçgillerde hasat sonrası patojenlere karşı bazı bitki uçucu yağlarının antifungal etkinliği. Y. Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay, 55s.
- Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y., Kim, J., 2007. Antifungal Activity of Five Plant Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. Plant Pathol. Journal, 23 (2): 97-102.
- McLafferty, F.W., 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data. New York: Wiley.
- Müller-Riebau, F., Berger, B., Yeğen, O., 1995. Chemical composition and Fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. J. Agric. Food Chem., 43: 2262-2266.
- Omidbeygi, M., Barzegar M., Hamidi Z., Naghdibadi H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control, 18: 1518-1523.
- Paulitz, T.C., Belanger, R.R., 2001. Biological control in greenhouses systems. Annu. Rev. Phytopathol., 39: 103-133.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A. and Harvala, C., 2003. Volatile Metabolites from *Salvia fruticosa* as Antifungal Agents in Soilborne Pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (11): 3294-3301.
- Ristic, M.D., Duletic-Lausavic, S., Knezevic-Vukcevic, J., Marin, P.D., Simic, D., Vukojevic, J., Janackovic, P., Vajs, V., 2000. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Ethanol Extract of *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae). Phytotherapy Research, 14: 267-271.
- Rota, C., Carramiñana J.J., Burillo, J., Herrera, A., 2004. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. Journal of Food Protection, 67: 1252-1256.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., Khan, G.H., Zaki, M.J., 2002. Evaluation of *Argemone mexicana* for control of root-infecting fungi in tomato. Journal of Phytopathology, 150: 321-329.
- Soylu, E.M., Tok, M.F., Soyly, S., Kaya, A.D., Evrendilek, G.A., 2005a. Antifungal Activities of the Essential Oil on Post-harvest Disease Agent *Penicillium digitatum*. Pakistan J. Biol Sci, 8: 25-29.
- Soylu, E.M., Yiğitbağ, H., Tok, M.F., Soyly, S., Baysal, O., Kaya, A.D., 2005b. Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of *Artemisia annua* L. Against Foliar and Soilborne Fungal Pathogens. Z. Pflanzenk Pflanze, 112: 229-239.
- Soylu, E.M., Soyly, S., and Kurt, Ş., 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia, 161: 119-128.
- Soylu, S. Yiğitbas, H., Soyly E.M. and Kurt, S., 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology, 103: 1021-1030.
- Soylu, E. M., İncekara, R., 2017. Biofungicidal activities of plant essential oils against cucumber root and stem rot disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. Journal of Plant Pathology, 99 (2): 437-444.
- Thompson, D.P., 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. Mycologia, 81: 151-153.
- Türkölmez, Ş., Soyly, E. M., 2014. Antifungal Efficacies of Plant Essential Oils and Main Constituents Against Soil-Borne Fungal Disease Agents of Bean. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17(2): 203-211.

- Tripathi, P., Dubey, N.K., Banerji, R., Chansouria, J.P.N., 2004. Evaluation of some essential oils as botanical fungi toxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits. *World J Microbiol Biotechnol*, 20: 317-321.
- Walter, M., Jaspers, M.V., Eade, K., Frampton, C.M., Stewart, A., 2001. Control of *Botrytis cinerea* in Grape using Thyme Oil. *Australasian Plant Pathology*, 30: 21-25.
- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E., 1997. Rapid Evaluation of Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81: 204-210.
- Yangui, T., Rhouma, A., Triki, M.A., Gargouri, K., Bouzid, J., 2008. Control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* using olive mill waste water and some of its indigenous bacterial strains. *Crop Protection*, 27: 189-197.
- Yeşil Çeliktaş, O., Hames Kocabaş, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Özek, T., Baser, K.H.C., 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100: 553-559.
- Yuen, G.Y., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Hancock, J.G., 1991. Effects of soil fumigation with methyl bromide and chloropicrin on root health and yield of strawberry. *Plant Disease*, 75: 416-420.
- Zambonelli, A., Zechini D'aulerio, A., Bianchi, A., Albasin, A., 1996. Effects of Essential Oils on Phytopathogenic Fungi *In vitro*. *Journal of Phytopathology*, 144: 380-383.