

Korkuteli Soğuk Hava Depolarında Armutta *Penicillium expansum*'a Karşı Bazı Alternatif Mücadele Yöntemlerinin Belirlenmesi

Şerife Evrim ARICI*¹, Şahan KOÇ¹

Ziraat Fakültesi Dergisi,
Cilt 16, Sayı 2,
Sayfa 226-233, 2021

Journal of the Faculty of Agriculture
Volume 16, Issue 2,
Page 226-233, 2021

Özet: *Penicillium expansum*'un neden olduğu mavi küf hastalığı, armutların en önemli hasat sonrası hastalıklarından biridir. Bazı mikroorganizmalar ve uçucu yağlar *P. expansum*'un büyümesini engelleme yeteneğine sahiptir. Bu çalışmada *Penicillium expansum*'a karşı 'Karyağdı' armut çeşidinde *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* ve kekik yağının antagonistik etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *In vitro* antagonizm testlerinde *T. harzianum*, *B. subtilis*'den daha etkili olmuş ve % engelleme oranları sırasıyla %55.97, %49.37 olarak tespit edilmiştir. Kekik yağının kontakt uygulamasında *P. expansum*'un misel gelişimi %59.62-100, fumigant uygulamasında %54.17-100 oranında engellenmiştir. Meyve biyo-etkinliklerde 25°C'de *B. subtilis*, *T. harzianum* ve kekik yağı meyve çürümesini %31.69-72.37, 0 °C'de soğuk hava deposunda %22.19-66.83 oranları arasında azaltmıştır. Çürük lezyonlarını en fazla kekik yağı kontak 500 µl/L uygulaması azaltırken, en düşük etkiyi kekik yağı fumigant %1 uygulaması göstermiştir. Çalışmalar sonucunda hem kekik yağının hem de antagonistik mikroorganizmaların (*B. subtilis*, *T. harzianum*) çevre dostu olmaları nedeniyle, armutlarda hasat sonrası *P. expansum* hastalığına karşı kullanılmasının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Armut, *Bacillus subtilis*, Kekik uçucu yağ, *Penicillium expansum*, *Trichoderma harzianum*

Determination of Some Alternative Methods Against *Penicillium expansum* in Pear in Korkuteli Cold Storages

Abstract: The blue mold disease caused by *Penicillium expansum* is one of the most important post-harvest diseases of pears. Some microorganisms and essential oils have the ability to inhibit the growth of *P. expansum*. The aim of this study was to determine the antagonistic effect of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* and thyme oil in the 'Karyağdı' pear cultivar against *Penicillium expansum*. *In vitro* antagonism tests, *T. harzianum* was more effective than *Bacillus subtilis* and the % inhibition rates were determined as 55.97% and 49.37%, respectively. The mycelial growth of *P. expansum* was inhibited by 59.62-100% in the contact application of thyme oil and 54.17-100% in the fumigant application. In fruit bioassays, *B. subtilis*, *T. harzianum* and thyme oil reduced fruit rot by 31.69-72.37 % at 25 °C and by 22.19 - 66.83 at 0°C. While the contact application of 500 µl / L thyme oil was most effective against caries lesions in pear fruits, the fumigant application of 1% thyme oil showed the least effect. As a result of the studies, it was concluded that it would be beneficial to use thyme oil and antagonistic microorganisms (*B. subtilis*, *T. harzianum*) against *P. expansum*, which is one of the postharvest diseases of pears, due to their environmental friendliness.

Keywords: Pear, *Bacillus subtilis*, Thyme essential oil, *Penicillium expansum*, *Trichoderma harzianum*

*Sorumlu yazar (Corresponding author)
evrimarici@isparta.edu.tr

Alınış (Received): 01/11/2021
Kabul (Accepted): 07/12/2021

¹Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü
Isparta, Türkiye.

1. Giriş

Armut, bugün dünyada hemen hemen her yerde yetiştirilmektedir. Dünyada armut üretiminde başlıca ülkeler Çin, İtalya, ABD'dir (Anonim, 2014). Ülkemizde ise özellikle bölgesel açıdan en çok Ege Bölgesi, Marmara Bölgesi ve İç Anadolu Bölgesinde olmak üzere en yoğun olan sırasıyla Bursa, Ankara Balıkesir, Aydın, Manisa, İzmir, Muğla, Çanakkale illerinde ve daha birçok farklı illerde yetiştiricilik yapılmaktadır. TÜİK verilerine göre, Türkiye'de toplam meyve veren armut ağaç sayısı 11554 olup toplam üretim 530723 tondur (TÜİK, 2019). Armut, ülkemizde birçok yörede üretilebildiği gibi Antalya Korkuteli ilçesinde üretilmekte, Antalya, Türkiye'nin armut üretiminin yüzde 20'sini karşılamaktadır. Üretimi en fazla yapılan çeşit, 2018 yılında Türk Patent Enstitüsü tarafından coğrafi işaret tescilinin ardından 'Karyağdı' olarak 'Coğrafi İşaretli Ürünler' arasına alınarak markalaştırılmıştır (Anonim, 2019).

Sebze ve meyvelerde hasat sonrası çoğunluğu fungal kaynaklı olan ciddi ekonomik kayıplara neden olabilen birçok hastalık görülmektedir. Bu etmenler aynı zamanda meyve ve sebzelerde kalite düşüşlerine neden olmakta ve raf ömrünü azaltmaktadırlar. Bu kayıplar gelişmiş ülkelerde toplam meyve-sebze üretiminin %25'ni oluştururken, gelişmekte olan ülkelerde ise bu oranın %50'nin üzerinde olduğu ortaya konmuştur (Nunes, 2012). Meyvelerde hasat sonrası zarar yapan başlıca önemli fungal hastalıklar arasında *Colletotrichum gloeosporioides*, *Monilinia* spp., *Botrytis* spp., *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Alternaria* spp. ve *Rhizopus* spp. türleri bulunmaktadır (Antunes ve Cavaco, 2010). Mavi küf hastalığı olarak bilinen ve özellikle depolanan elma ve armutlarda yaygın olarak görülen *Penicillium expansum* önemli bir hastalık etmenidir (Bogiang ve ark., 2009). *P. expansum* tarafından enfekte olan meyveler ilk dönemlerde açık kahverengi bir renk almakta, çürümüş alanlar yumuşak sulu ve açık kahverengi renkte görülmektedir. Daha sonra etmenin mavi-yeşil spor kitlesi oluşmaktadır. Soğuk hava depolarında sorun olan fungal hastalıkların tespit ve yoğunluğunu araştıran bir çalışmada Antalya ili Korkuteli ve Elmalı ilçelerinde elmalarda hasat sonrası soğuk hava depolarında fazlaca soruna neden olan fungal kaynaklı hastalıkların büyük bir çoğunluğunun *P. expansum* tarafından gerçekleştiği bildirilmiştir (Kalın, 2011).

Fusarium, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Aspergillus* gibi bazı fungal cinsler ekonomik olarak çok büyük kayıplara sebep olabildiği gibi insan ve halk sağlığı içinde potansiyel tehlike oluşturan mitoksinler üretebildiği belirtilmiştir. Örneğin birçok meyvede mavi küf hastalığına neden olan *Penicillium expansum* ürettiği sekonder toksik metabolitleri nedeniyle (Patulin, Sitrinin ve Chaetoglobosin'ler) potansiyel olarak kanserojenik risk teşkil ettiği önemle vurgulanmıştır (Liu ve ark., 2013).

Hasat sonrası sebze ve meyvelerde oluşan hastalıkları kontrol etmek amacıyla sentetik fungusitler son zamanlarda dünyanın çoğu yerinde birincil olarak kullanılan preparatlardır. Bütün dünyada tüketicilerin gıdalarda zararlı kimyasalların azaltılmasına yönelme arzusu ve patojen fungusların fungusit direnci kazanması nedeniyle toksisitesi olmayan, kalıntı oranı düşük, ekonomi ve çevreye dost olabilecek alternatif biyolojik mücadele metotlarının bulunmasına yönelmişlerdir (Droby ve ark., 2009). *Trichoderma*'lar biyolojik mücadelede en çok kullanılan antagonistler arasında olup dünyanın çoğu yerine geniş bir yayılım göstermiştir (Batta, 2015). Bunun yanısıra bitki büyümesini teşvik eden bakterilerden (PGPB) biri olan *Bacillus subtilis*, patojenik olmayan ve bitki büyümesini, hastalık direncini ve abiyotik stres toleransını doğrudan veya dolaylı olarak teşvik edebilen bir bakteridir. Bu ürünlerin konukçu bitki metabolizmasında çeşitli fizyolojik değişiklikler vasıtası ile bitkiler, insanlar veya çevre üzerinde olumsuz etkilere neden olmadan sistemik direnci indükleyerek raf ömrünün uzamasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. (Van Loon, 2007, Punja ve ark., 2016; Arroyave ve ark., 2017; Çaltılı ve Arıcı, 2017; Medina ve ark., 2018).

Uçucu yağların mikotoksijenik funguslar ve çeşitli patojenlere karşı antifungal etkisi daha önce birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve etkileri gösterilmiştir. Uçucu yağların fungusit olarak kullanılmasının en güzel yanı bu doğal bileşiklerin çevreye zararlı etkileri olmayan 'çevre dostu' olması olarak düşünülmüştür (Isman, 2000). Ülkemizde "kekik" olarak tanımlanan *Lamiaceae* familyasına ait pek çok hoş kokulu bitki türü bulunmakta ve özellikle uçucu yağı karvakrol ve timol içermektedir. Yapılan çalışmalarda kekik yağının bir çok fungal hastalığı baskıladığı belirlenmiştir (Baydar, 2007; Bosquez ve ark., 2010; Camele ve ark., 2012).

Yapılan bu çalışmada Korkuteli, Antalya soğuk hava depolarında armutlarda hasat sonrası mavi küf hastalığına neden olan *P. expansum* etmenine karşı sentetik fungusitlere alternatif olarak kullanım olanağı olabilecek ve insan sağlığına olumsuz etkisi olmayan, mikrobiyal etmenler (*T. harzianum*, *B. subtilis*) ve uçucu (kekik) yağı, preparatlarının *in vivo* ve *in vitro* koşullarda *Penicillium expansum* hastalığına karşı etkinlikleri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışma 2019 yılında Antalya iline bağlı Korkuteli ilçesinde Koç Soğuk Hava Deposu ve Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Denemede Karyağdı armut çeşidi kullanılmıştır. Çalışmada Korkuteli ilçesinde bulunan Karyağdı armudu depolanan 6 farklı

depodan alınan *P. expansum* ile enfekteli armut örneklerinden fungus izolasyonu gerçekleştirilmiş, tanı ve teşhisi ile patojenite testi yapılmıştır (Barnett ve Hunter, 1972; Domsch ve ark., 1980; Rosenberger, 1990; Frisvad ve Samson, 2004; Amiri ve ark., 2008; Pitt ve Hocking, 2009). Yapılan patojenite testi sonucunda virulansı en yüksek olan K3 izolatu denemelerde kullanılmıştır. Denemede kullanılan uçucu yağ (*Origanum monites* L.) İzmir Kekikçi ISIBU Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri bölümünden Doç. Dr. Arif Şanlı'dan temin edilmiştir. Denemede kullanılan uçucu yağ (*Origanum onites* L.) İzmir kekikçi'nin bazı önemli uçucu yağ bileşenleri Tablo 1'de verilmiştir. Antagonist biyolojik preparat olarak fungus daha önce topraktan izole edilen tanı ve teşhisi yapılmış olan *T. harzianum* ve *B. subtilis* izolatu kullanılmıştır.

Tablo 1. Denemede kullanılan uçucu yağ İzmir Kekikçi (*Origanum onites* L.)'nin bazı önemli uçucu yağ bileşenleri

Uçucu Yağ Bileşeni	% Oranı
Carvacrol	80,1
Thymol	0,34
Linalool	7,37
Borneol	6,05
1.8-Cineol	4,58
γ-Terpinen	0,95
β-Pinen	0,61

2.1. *Penicillium expansum*'a karşı *in vitro* antagonistik testler

2.1.1 *Trichoderma harzianum* ve *Penicillium expansum* ikili kültür denemesi:

Trichoderma harzianum ve *P. expansum* Patates Dekstroz Agar (PDA) besi ortamı üzerinde ayrı ayrı olarak 7 gün 25°C'de geliştirilmiştir. Daha sonra her iki petriden alınan 5 mm çapındaki misel disk parçaları birbirinden 4 cm mesafe uzaklığında PDA besi ortamı üzerine konularak 25°C'de inkübasyona bırakılmış ve 7 gün sonra *P. expansum*'un gelişim çapı ölçümleri yapılmıştır. Deneme 4 tekrarlı olarak kurulmuş ve kontrol petrilerinin merkezine *P. expansum* 5 mm çapındaki misel disk parçası konulmuştur.

2.1.2. *Bacillus subtilis* ve *Penicillium expansum* ikili kültür denemesi:

Nutrient Agar (NA) besi ortamında geliştirilen *B. subtilis* kültüründen steril öze ile alınarak Nutrient broth (NB) besi yeri içerisine konulmuş ve 48 saat çalkalayıcı inkübatörde bekletilerek spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Spor süspansiyonun son konsantrasyonu 10⁸ spor/ml olacak şekilde belirlenmiştir. PDA besi ortamı üzerinin her bir noktaya 10 µl olacak şekilde merkezden 2 cm uzaklıkta *B. subtilis* spor süspansiyonu uygulanarak 25°C inkübasyona bırakılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra ise *P. expansum* 5 mm

çapındaki miselyum disk parçası merkeze konularak tekrar 25°C inkübasyona bırakılmıştır. Deneme 4 tekrarlı olarak kurulmuş ve patojen fungus gelişim çapı ölçümleri 7 gün sonra yapılmıştır. Kontrol olarak kullanılan petrilere bakteri yerine su kullanılmıştır (Erdoğan ve Benlioğlu, 2010).

2.1.3. *Penicillium expansum*'a karşı uçucu yağın (kekik yağı) kontakt ve fumigant etkisi:

2.1.3.1. Kontakt etki:

Kekik yağı 0, 100, 300, 500 µl/L konsantrasyonlarında ayrı ayrı PDA besi ortamı içerisine ilave edilerek steril petrilere dökülmüştür. *P. expansum* mantar delici ile alınarak (5mm) uçucu yağ + PDA besi ortamı içeren petri kaplarının ortasına yerleştirilmiş, parafilm sarılan petri kapları 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Soliman ve Badeaa, 2002). Deneme 4 tekrarlı olarak kurulmuştur.

2.1.3.2. Fumigant etki:

P. expansum disk parçasının (5 mm) yerleştirildiği PDA içeren petrilerin kapaklarına steril edilen filtre kağıtları yerleştirildikten sonra her bir filtre kağıdına kekik yağının fumigant etkisinin belirlenmesi amacıyla ayrı ayrı 1 µl/ petri, 3 µl/ petri, 5 µl/ petri, 7 µl/ petri, 9 µl/ petri dozlarında uygulanmıştır. Kontrol petrilerinin kapaklarındaki kağıtlara aynı oranlarda steril destile su uygulanmıştır. Petri kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra ters çevrilerek 7 gün boyunca 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Feng ve ark., 2011). Deneme 4 tekrarlı olarak kurulmuştur. *In vitro* etkinlikleri denemelerde antagonist mikroorganizmalar ve uçucu yağ uygulamalarının % engellemeleri aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

% Engelleme = $\frac{[\text{Kontrol petride fungal koloni çapı} - \text{Uygulama yapılan petride koloni çapı}]}{\text{Kontrol petride fungal koloni çapı}} \times 100$ formül yardımı ile yüzde engellemeler hesaplanmıştır.

2.2. *Penicillium expansum*'a karşı *in vivo* antagonistik testler:

Antagonistik mikroorganizmalar ve kekik yağının *P. expansum*'un neden olduğu meyve çürüklüğü enfeksiyonunu azaltma etkisini değerlendirmek amacıyla Karyadı' çeşidinin armut meyvesi üzerinde *in vivo* testleri yürütülmüştür. *In vivo* testleri kontrollü koşullarda 25°C inkübatör de ve 0°C de Korkuteli soğuk hava deposunda yapılmıştır. Armut meyveleri %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 3 dk bekletildikten sonra oda sıcaklığında kurutma kâğıtları üzerinde kurumaya bırakılmıştır. PDA ortamında 10 gün boyunca 25°C'de kültüre alınan *P. expansum* üzerine 10 ml steril destile su eklenerek spor süspansiyonu hazırlanmış ve spor yoğunluğu 10⁵ spor/ml

olacak şekilde ayarlanmıştır. Armut meyvesinin ekvatorial yüzeyinden 2 farklı noktadan 3 mm derinliğinde ve 3 mm çapında yaralar açılmış ve 10 µl *P. expansum*'un spor süspansiyonu mikropipetle damlatılmıştır. Daha sonra armut meyvesi steril plastik kaplar içerisine, steril saf su ile nemlendirilmiş, steril kurutma kağıtları üzerine yerleştirilmiş ve 12 saat süreyle %80 nem 25°C inkübasyona bırakılmıştır. *P. expansum*'un inokulasyonundan 12 saat sonra kekik uçucu yağlarının kontakt etkisi uygulamasında yağlardan belirlenen dozlar (100 µl/L, 300 µl/L ve 500 µl/L) *B. subtilis* (10⁸ hücre/ml) ve *T. harzianum*'da (10⁶ spor/ml) yaralara 10 µl damlatılmıştır. Kekik yağının fumigant etkisi için kekik yağı 2X 3 cm steril kağıt üzerine %1, %3 ve %5 konsantrasyonlarında 10 µl damlatıldıktan sonra armut meyvelerinin bulunduğu kapların kapaklarına yapıştırılmıştır. Nem kontrolünü sağlamak amacıyla da steril kurutma kağıtları kesilerek tabanına serilmiş ve stereril su ile ıslatılmıştır. Daha sonra plastik sızdırmaz kaplar streç film ile kaplanmış, 25°C'de %80 nemde 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Aynı gün depo denemeleri için hazırlanan armut meyveleri ISIBU Ziraat Fakültesinden alınarak Korkuteli soğuk hava deposuna götürülmüş burada depo koşullarında 0°C %80 nemde 60 gün inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda ölçümler yapılmıştır. Ölçümler çürük çapına dik yüzeyel iki yönde olacak şekilde yapılmış, cm olarak kaydedilmiştir Deneme 4 tekrarlı olarak kurulmuştur.

2.3. İstatistik

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Tukey çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler için IBM® SPSS® 22 Statistics paket programlarından yararlanılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. *In vitro* denemelerinin sonuçları

3.1.1. *Penicillium expansum*'a karşı mikrobiyal antagonistlerin etkileri

İkili kültür uygulamasında biyolojik etmenler kendi aralarında değerlendirildiğinde; iki uygulama *B. subtilis* (5.26 cm), *T. harzianum* (3.52 cm) arasında istatistiksel açıdan (P≤0.05) fark bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre *T. harzianum* *Bacillus subtilis*'ten daha etkili olup % engelleme oranları sırasıyla %55.97, %49.37'dir (Tablo 2).

Tablo 2. *Bacillus subtilis* ve *Trichoderma harzianum* ikili kültür uygulamalarının koloni ölçümleri ve yüzde engelleme oranları

Uygulama	<i>P. expansum</i> Koloni Çapı (Cm)	Engelleme Oranı (%)
Kontrol	7.91±0.33 c	0±0 c
<i>B. subtilis</i>	5.26±0.47 b	49.37±4.53 b
<i>T. harzianum</i>	3.52±0.23 a	55.97±2.13 a

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (P≤0.05).

3.1.2. *Penicillium expansum*'a karşı kekik yağının kontakt ve fumigant etkisi

Kekik yağının kontakt uygulamaları kendi aralarında patojenin koloni çapı açısından değerlendirildiğinde uygulamalar arasında istatistiksel açıdan (P≤0.05) fark bulunmuştur. Patojenin koloni gelişimi 5 µl/L uygulamasında 2.77 cm, 15 µl/L uygulamasında 1.31 cm ve 25 µl/L uygulamasında 0 cm olarak belirlenmiştir. Kekik yağının patojen gelişimini engelleme oranları sırasıyla %59.62 (5 µl/L), %85.47 (15 µl/L) ve %100 (25 µl/L) olarak tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. *Penicillium expansum*'a karşı uçucu yağın (kekik yağı) kontakt etkisi

Uygulama (µl/L)	<i>P. expansum</i> Koloni Çapı (cm)	Engelleme Oranı (%)
5 µl/L	2.77±0.81 c	59.62±6.21 c
15 µl/L	1.31±0.23 b	85.47±4.95 b
25 µl/L	0±0 a	100±0 a
Kontrol	7.91±0.33 d	0±0 d

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (P≤0.05).

Kekik yağının fumigant uygulamaları kendi aralarında koloni çapı açısından değerlendirildiğinde 1 µl/petri fumigant uygulaması dışında bütün uygulamalarda fungal gelişim gözlenmemiş olup 3 µl/petri (0 cm), 5 µl/petri (0 cm), 7 µl/petri (0 cm), 9 µl/petri (0 cm) uygulamalarının arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı belirlenmiştir (P≥0.05). Kekik yağının 1 µl/petri fumigant uygulamasında koloni çapı 3.56 cm olarak belirlenmiş ve istatistiksel açıdan (P≤0.05) fark bulunmuştur. Kekik yağının fumigant uygulamalar sırasıyla 1 µl/petri, 3 µl/petri, 5 µl/petri, 7 µl/petri, 9 µl/petri % engelleme oranı sırasıyla %54.17, %100, %100, %100 oranlarında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Sonuç olarak *in vitro* denemelerinde kontrollere göre kekik yağının fumigant etkisinin koloni gelişimini tamamen durdurduğu en düşük dozun 3 µl/petri (0 cm) ve kekik yağının kontakt etkisinin en fazla etkilediği dozun 25 µl/L (0cm) uygulamasında, en düşük engelleme ise 1 µl/petri (3.56 cm) fumigant ve 5 µl/L (2.77 cm) kontakt uygulamalarında tespit edilmiştir.

Tablo 4. *Penicillium expansum*'a karşı uçucu yağın (kekik yağı) fumigant etkisi

Uygulama (µl/petri)	<i>P. expansum</i> Koloni Çapı (cm)	Engelleme Oranı (%)
1 µl/petri	3.56±0.57 b	54.17±10.87 b
3 µl/petri	0±0 a	100±0 a
5 µl/petri	0±0 a	100±0 a
7 µl/petri	0±0 a	100±0 a
9 µl/petri	0±0 a	100±0 a
Kontrol	7.91±0.33 c	0±0 c

* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (P≤0.05).

Tablo 5. Mikrobiyal antagonistlerin ve kekik yağının *in vivo* koşullarda Karyagdı armut meyvesinde *P. expansum*'a karşı etkisi

Uygulama	Sıcaklık				
	25°C		0°C		
	Lezyon Çapları (cm)	Engelleme oranı (%)	Lezyon Çapları (cm)	Engelleme oranı (%)	
<i>B. subtilis</i>	2.29±0.02 c	50.96±0.65 d	1.86±0.02 b	52.55±0.47 b	
<i>T. harzianum</i>	1.76±0.05 b	62.13±1.48b	2.12±0.03 cd	45.91±0.57 c	
Kekik yağı kontakt etki	100 µl/L	3.05±0.04 d	34.68±0.98 e	3.05±0.04 f	22.19±1.33 e
	300 µl/L	1.98±0.05 b	57.60±0.82c	1.98±0.05 bc	49.48±0.98 b
	500 µl/L	1.29±0.03 a	72.37±0.88 a	1.30±0.02 a	66.83±0.55 a
Kekik yağı fumigant etki	%1	3.19±0.05 d	31.69±0.60 e	2.48±0.03 e	36.73±0.37 d
	%3	3.17±0.05 d	32.11±0.68e	2.19±0.05 d	44.13±0.43 c
	%5	2.48±0.05 c	46.89±0.58d	1.98±0.05 bc	49.48±0.68 b
Kontrol	4.67±0.07 e		3.92±0.04 g		

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (P≤0.05).

3.2. *Penicillium expansum*'a karşı *in vivo* antagonistik denemelerinin sonuçları

Armutta 25°C'de %80 nemde 10 gün inkübasyona bırakılan meyvelerin biyo-etkinliklerinde *B. subtilis*, *T. harzianum* ve kekik yağı, meyve çürümesini %31.69-72.37, +0 °C'de soğuk hava deposunda %22.19-66.83 oranları arasında azaltmıştır. Çürük lezyonlarını en fazla kekik yağı kontak 500 µl/L (%72.37) uygulaması azaltırken, en düşük etkiyi kekik yağı fumigant %1 (%31.69) oranı uygulaması göstermiştir. Lezyon çapı en az kekik yağı kontak 500 µl/L (1.29 cm) uygulamasında en fazla ise kontrol uygulamasında (4.67 cm) hesaplanmıştır (Şekil 1). Kekik yağı fumigant uygulamaları kendi aralarında değerlendirildiğinde %1'lik ve %3'lük uygulamalarının kendi aralarında istatistiksel olarak bir farkın bulunmadığı, %5'lik uygulamanın ise istatistiksel olarak (P≤0.05) farklı olduğu bulunmuştur. Kekik yağı kontakt uygulamaları kendi aralarında değerlendirildiğinde bütün uygulamaların istatistiksel olarak (P≤0.05) birbirinden farklı bulunduğu, çürük lezyonun en fazla 500 µl/L uygulamasının engellediği görülmüştür. Biyolojik etmenlerden ise *T. harzianum*'un (%62.13) daha etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 5).



Şekil 1. Mikrobiyal antagonistlerin ve kekik yağı uygulamalarının 25°C'de Karyagdı armut çeşidinde *P. expansum*'a etkileri



Şekil 2. Mikrobiyal antagonistlerin ve kekik yağı uygulamalarının 0°C'de Karyagdı armut meyvesinde *P. expansum*'a etkileri

Armutlar 0°C'de %80 nemde 60 gün inkübasyona bırakılan meyvelerin biyo-etkinliklerinde *P. expansum*'a

karşı en fazla etkinin kekik yağının kontak 500 µl/L uygulaması (1.30 cm), en düşük etkinin ise kekik yağının kontak 100 µl/L (3.05 cm) uygulamasında tespit edilmiştir (Şekil 2). Kontrol meyvelerde çürük lezyonu 3.92 cm olarak belirlenmiştir. Çürük lezyonlarını en fazla kekik yağı kontak 500 µl/L (%66.83) uygulaması azaltırken, en düşük etkiyi kekik yağı kontak 100 µl/L (%22.19) uygulaması göstermiştir. Biyolojik etmenler kendi aralarında değerlendirildiğinde *B. subtilis*'in (%52.55) *T. harzianum*'dan (%45.91) daha etkili olduğu ve çürük lezyonunu daha fazla engellediği sonucuna varılmıştır (Tablo 5).

4. Tartışma

Geleneksel olarak, hasat sonrası hastalık kontrolü kimyasal fungusit uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir, fakat bu durum çevre ve sağlık sorunları ve mikrobiyal direnç gibi sorunlara neden olabilmekte hastalıkların kontrolüne yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır (Sharma ve ark., 2009). Artan gıda güvenliği endişeleri ve çevre sorunları nedeniyle tüm dünyada sentetik fungusitlerden kaçınma ve biyolojik ve doğal yöntemlere bir eğilim söz konusudur. Hasat sonrası meyve hastalıklarının kontrolünde, antagonistik fungusların kullanımı büyük potansiyele sahip bir alternatif olabileceği; özellikle *Trichoderma* ve çeşitli türlerinin başarılı sonuçlar vermesi, ticari biyokontrol ürünlerinin üretilmesine yol açan oldukça umut verici sonuçlar elde etmişlerdir (Woo ve ark., 2006). Yapmış olduğumuz çalışmada *T. harzianum* *in vitro* koşullarda *P. expansum*'un gelişimini %55.97 engellemiştir.

Armutta 25°C'de %80 nemde 10 gün inkübasyona bırakılan meyvelerin biyo-tahlillerinde biyolojik etmenlerden *T. harzianum*'un (%62.13) daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Amin ve ark., (2017), Yıldız (2015) ve Batta (2006)'nın yaptıkları çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Tozlu ve ark., (2019) ve Zhimo ve ark., (2020)'nun yaptıkları çalışmalarla benzer olarak bu çalışmada *B.*

subtilis'in etkili bir biyokontrol ajanı olduğu sonucuna varılmıştır. Denemede kullandığımız antagonistik bakteri *B. subtilis* 0°C'de çürük lezyon çapı (1.86 cm) olarak ölçülmüş, fakat 25°C'de çürük lezyon çapı (2.29 cm) olarak ölçülmüştür. *P.expansum* çürüklük lezyon engelleme oranı 0°C'de %52.55 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç Morales ve ark., (2008)'nin yaptıkları çalışmayla tutarlı olarak düşük sıcaklıklarda bakteriyel ajanların biyolojik etkinliğinin yüksek olduğu düşünülmüştür

Hasat sonrası hastalıkları kontrol etmek için uçucu yağların kullanımı, güvenlik özellikleri, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve çevre dostu bileşikler olmaları nedeniyle gittikçe daha önemli hale gelmişlerdir (Sivakumar ve Bautista, 2014). Yapmış olduğumuz çalışmada Yılmaz, (2012) ve Sellamuthu ve ark., (2013)'nun elde ettiği sonuçlar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kekik yağının güçlü antifungal etkileri çalışmalarımızda da gözlemlenmiştir. *In vitro*'da yapmış olduğumuz çalışmalarda kekik uçucu yağının 1 µL /petri dozu hariç diğer bütün dozları *P. expansum*'un misel gelişimini tamamen inhibe etmiştir. Hem 25°C'de hem de 0°C'de kekik yağı kontak (500 µl/L) uygulamaları fumigant uygulamalara kıyasla en yüksek etkiyi göstermiştir. Kekik yağı kontakt (500 µl/L) uygulamasında 25°C'de çürük lezyon çapı 1.29 cm, 0°C'de ise 1.30 cm olarak ölçülmüştür. Kekik yağı kontakt (500 µl/L) uygulamasında 25°C'de çürük engelleme oranı %72.37 ve 0°C'de ise %66.83 olarak hesaplanmıştır.

Marandi ve ark., (2011)'de yapmış oldukları çalışmada armutlarda hasat sonrası kayıplara yol açan (*Botrytis cinerea* ve *Penicillium expansum* etmenlerine karşı 3 farklı bitkinin *Thymus kotschyanus* (kekik), *Ocimum basilicum* (fesleğen) ve *Rosmarinus officinalis* (biberiye) yağlarının etkinlikleri araştırılmış, kekik yağının diğer yağlara kıyasla hastalık şiddetini azalttığını, ayrıca *B. cinerea* ve *P. expansum* ile enfekteli meyve sayısının azaldığını tespit etmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada *in vitro* koşullarda kekik yağının fumigasyon uygulamaları çok etkili sonuçlar göstermiş, fakat *in vivo* koşullarda ise bu güçlü etki gözlenmemiştir. Bu sonuçlar (Xing ve ark., 2010)'nin yapmış olduğu çalışmayla tutarlı olarak, armut örneklerinde fumigasyon uygulamalarının etkinliğinin kontakt uygulamalara kıyasla daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

Hasat sonrası patojenleri kontrol etkinliğini artırmak ve ürünlerin raf ömrünü uzatmak amacıyla uçucu yağların, kitosan gibi doğal yenilebilir filmler ve kaplama ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur. Uçucu yağların kitosan ile birlikte kullanımlarının sadece uçucu yağ uygulamasına kıyasla etkinliği artırdığı bulunmuştur. Farklı elma çeşitlerinde *in vivo* denemelerde, fumigasyon uygulaması yapılan elma örneklerinde uçucu yağların etkisinin kısa bir süre içerisinde kaybolduğu; ve bu etkinin devamlılığı

için elma örneklerinin kitosan gibi materyallerle kaplanması gerektiği bildirilmiştir (Xing ve ark., 2010). Kitosan ve kekik yağının hasat sonrası üzümün raf ömrü ve fungal hastalıklara olan etkisi araştırılmış %1'lik kitosan ve 300 µl kekik yağı uygulamasının hasat sonrası patojenik fungusun etkinliğini azaltarak çürümeyi azalttığı aynı zamanda üzümün meyve kalitesini ve raf ömrünü artırdığı sonucuna varmışlardır (Dehestani ve Mostofi 2019).

5. Sonuç

Sonuç olarak hasat sonrası hastalıklarda sentetik fungusit kullanımını en aza indirmek ve hasat sonrası kayıpları minimuma düşürmek amacıyla doğal ve biyolojik yaklaşımların yaygınlaşması gerekmektedir. Tek başına antagonist mikroorganizmalar hastalık kontrolünde sentetik fungusitler kadar başarı sağlayamamaktadır, fakat değişik mikroorganizma kombinasyonlarının bir arada kullanılmasının başarıyı oldukça arttırdıkları kabul edilmiştir. Ülkemizde daha sonra yapılacak çalışmalarda hasat sonrası hastalıkların kontrolünde farklı mikroorganizma kombinasyonlarının farklı sebze ve meyvelerde denenerek etkinliklerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Uçucu yağların hem insan sağlığına güvenli hem de çevreye dost doğal bileşikler olması sebebiyle hasat sonrası hastalıkların kontrolünde kullanım olanaklarının yaygınlaştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Elde edilen bu çalışmanın sonuçları, hasat sonrası armut *P. expansum* hastalığına karşı daha sonra yapılacak olan çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

Kaynaklar

- Amin S, Ismail A, Kasnazany S, Mahmood H (2017). Biological control of post-harvest disease of blue mould (*Penicillium expansum*) of pear fruit by using antagonist microorganisms under laboratory and cold storage conditions. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 4: 20-31.
- Amiri A, Dugas R, Pichot A, Bompei G (2008). *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food microbiology*, 126: 13-19.
- Anonim (2019). Trt Haber <https://www.trthaber.com/haber/yasam/karyagdi-armudunda-bu-yil-verim-yuksek-439426.html> (Son erişim tarihi:11 Aralık 2019)
- Antunes MDC, Cavaco AM (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25: 351-366.

- Arroyave JJ, Mosquera S, Villegas-Escobar V (2017). Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control* 114: 195–200.
- Barnett HL, Hunter BB (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, Burgess Publishing Company, USA, 240 p.
- Batta Y (2015). Production and Testing of biopesticide for control of postharvest mold infections on fresh fruits of apple and pear. *Advances in Microbiology*, 5: 787-796.
- Baydar H (2007). *Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi*. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, S.D.Ü. Yayın No: 51, 216 s.
- Bogiang L, Tongfei L, Guozheng Q, Shiping T (2009). Ambient pH inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding: A Proteomic-Based Study. *Journal of Proteome Research*, 9: 298-307.
- Bosquez-Molina E, Ronquillo-de Jesus E, Bautista-Banos S, Verde-Calvo JR, Morales-Lopez J (2010). Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57: 132-137.
- Camele I, Altieri L, De Martino L, De Feo V, Mancini E, Rana GL (2012). In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(2): 2290-2300.
- Çaltılı O, Arıcı ŞE (2017). The determination of the efficacy of some microbial preparations against apple scab disease (*Venturia inaequalis* Cke Wint) in Isparta. 3rd ASM, International congress of agriculture and environment, 16-18.11.2017, Kasım 16-18.
- Dehestani-Ardakani M, Mostofi Y (2019). Postharvest application of chitosan and *Thymus* essential oil increase quality of the table grape cv. 'Shahroudi'. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 2(1): 31-42.
- Domsch KH, Gams V, Anderson TH (1980). *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London, pp:859.
- Droby S, Wisniewski M, Macarisin D, Wilson C (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2): 137-145.
- Erdogan O, Benlioglu K (2010). Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*, 53: 39–45.
- Feng W, Chen J, Zheng X, Liu Q (2011). Tyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments. *Food Control*, (22): 78-81.
- Frisvad CJ, Samson AR (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, (49): 1-174.
- Isman MB (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8-10): 603-608.
- Kalın A (2011). Antalya İlinin Elmalı ve Korkuteli ilçelerinde soğuk hava depolarında sorun olan hasat sonrası hastalıkların belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Liu J, Wisniewski M, Artlip T, Sui Y, Droby S, Norelli J (2013). The potential role of PR-8 gene of apple fruit in the mode of action of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, in postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 85: 203-209.
- Medina-Cordova N, Rosales Mendoza S, Hernández-Montiel L, Angulo C (2018). The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biological Control*, 121: 216-222.
- Marandi RJ, Hassani A, Ghosta Y, Abdollahi A, Pirzad A, Sefidkon F (2011). Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(4): 626-634.
- Morales H, Sanchis V, Usall J, Ramos AJ, Marín S (2008). Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2): 61-67.
- Nunes C (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 181-196.
- Pitt JI, Hocking AD (2009). *Fungi and food spoilage*. New York, NY: Springer
- Punja Z, Rodríguez G, Tirajoh A (2016). Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. *Crop Protection*, 84: 98-104.

- Rosenberger DA (1990). Blue mold. In A. L. Jones and H. S. Aldwinke (Eds) Compendium of apple and pear diseases. St. Paul, MN: APS Press.
- Sellamuthu PS, Sivakumar D, Soundy P (2013). Essential oils control Postharvest Diseases. Journal of Food Safety, (3): 86-93.
- Sharma R, Singh D, Singh R (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control, (50): 205-221.
- Sivakumar D, Bautista-Baños S (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. Crop Protection. (64): 27-37.
- Soliman KM, Badeaa RI (2002) Effect of oil extract from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and Chemical Toxicology, 40: 1669 - 1675.
- Tozlu E, Kotan MS Tekiner N, Dikbaş N, Kotan R (2019). Biological control of postharvest spoilage in fresh mandarins (*Citrus Reticulata* Blanco) fruits using bacteria during storage. Erwerbs-Obstbau, (61): 157-164.
- TÜİK (2019). www.tuik.org.tr (Son erişim tarihi:11 Aralık 2019)
- Van Loon LC (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology, (119): 243–254.
- Woo S, Scala F, Ruocco M, Lorito M (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology. (96): 181-185.
- Xing Y, Li X, Xu Q, Yun J, Lu Y (2010). Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. International Journal of Food Science & Technology, 45(9): 1837-1842.
- Yıldız C (2015). Elmalarda bazı fungal hastalıkların hasat sonrası kontrol olanakları. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yılmaz A (2012). Bazı bitki uçucu yağlarının hasat sonrası fungal meyve çürüklüğü etmenlerine karşı *in vitro* ve *in vivo* etkilerinin araştırılması. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Zhimo VY, Biasi A, Kumar A (2020). Yeasts and bacterial consortia from kefir grains are effective biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. Microorganisms, 8(3): 428.