



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KURUTMALIK BİBER (*Capsicum annum* L.) MEYVELERİNDE
MİKOTOKSİN OLUŞTURAN BAZI FUNGAL ETMENLERİN GELİŞİMİ
ÜZERİNE BİTKİ UÇUCU YAĞ, İSOTHİOCYANATE ve ANTAGONİST
BAKTERİ İZOLATLARININ *in vitro* KOŞULLARDA ANTİFUNGAL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

MEHMET ATAY

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
HAZİRAN-2019



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KURUTMALIK BİBER (*Capsicum annum* L.) MEYVELERİNDE
MİKOTOKSİN OLUŞTURAN BAZI FUNGAL ETMENLERİN GELİŞİMİ
ÜZERİNE BİTKİ UÇUCU YAĞ, İSOTHİOCYANATE ve ANTAGONİST
BAKTERİ İZOLATLARININ *in vitro* KOŞULLARDA ANTİFUNGAL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

MEHMET ATAY

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANSTEZİ

HATAY
HAZİRAN-2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KURUTMALIK BİBER (*Capsicum annum* L.) MEYVELERİNDE
MİKOTOKSİN OLUŞTURAN BAZI FUNGAL ETMENLERİN GELİŞİMİ
ÜZERİNE BİTKİ UÇUCU YAĞ, İSOTHİOCYANATE ve ANTAGONİST
BAKTERİ İZOLATLARININ *in vitro* KOŞULLARDA ANTİFUNGAL
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

MehmetATAY

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Soner SOYLU danışmanlığında hazırlanan bu tez **12/06/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Soner SOYLU
Başkan

Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi İ. Adem BOZKURT
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Proje No:17YL013

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelgelerin, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

12.06.2019

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yüksek Öğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Mehmet ATAY

ÖZET

KURUTMALIK BİBER (*Capsicum annum* L.) MEYVELERİNDE MİKOTOKSİN OLUŞTURAN BAZI FUNGAL ETMENLERİN GELİŞİMİ ÜZERİNE BİTKİ UÇUCU YAĞ, İSOTHIOCYANATE ve ANTAGONİST BAKTERİ İZOLATLARININ *in vitro* KOŞULLARDA ANTİFUNGAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Kurutulmuş biber meyveleri, toksijenik funguslar tarafından salgılanan mikotoksin sonuçlu fungus enfeksiyonlarıyla, çok sık enfekte olmaktadır. Yerel satıcı ve pazarlardan, hastalıklı olduğundan şüphelenilen 40 farklı kurutulmuş kırmızı biber numunesi rastgele seçilmiş ve ardından bu örneklerden, hasat sonrası bozulmalara neden olan 40 farklı fungus izolatı izole edilmiş ve tanımlanmıştır. *Aspergillus niger* (% 20) en baskın rastlanılan fungus türü olurken, *Fusarium incarnatum* (% 15) ve *Alternaria alternata* (% 12.5) takip etmiştir. Bitkisel kökenli maddeler ve biyolojik etmenler gıda ürünlerini fungus enfeksiyonlarından korumak adına çevre dostu ve güvenli yaklaşımlar sunduklarından isothiocyanate (ITC) bileşikleri ve bitki uçucu yağları gibi, bitkilerden elde edilen maddelerin uçucu antifungal potansiyelleri ile bazı antagonist bakteri izolatları, *in vitro* koşullarında *A. niger*, *A. alternata* ve *F. incarnatum*'nın misel gelişimlerini engellemeleri adına değerlendirilmiştir. Allyl (AITC), benzyl (BITC), ethyl (EITC) ve methyl (MITC) isothiocyanate bileşikleri test edilen tüm fungus izolatlarının gelişmelerini önemli derece engellemiştir. Misel gelişimi *A. niger* için 0.09-0.15 µl/petri, *A. alternata* için 0.09-0.21 µl/petri ve *F. incarnatum* için 0.06-0.21 µl/petri konsantrasyonlarında tamamen engellenmiştir. MITC en etkili antifungal bileşen olarak tespit edilirken *A. niger*, ITC bileşiklerine karşı en duyarlı patojen olarak saptanmıştır. Test edilen fungus izolatlarına karşı en güçlü antifungal etkinlik (% 100 engelleme) *Thymra spicata* (2.0-6.0 µl/petri), *Thymus vulgaris* (4.0-6.0 µl/petri) ve *Origanum syriacum* (4.0 µl/petri) uçucu yağlarında kaydedilmiştir. *Eucalyptus camaldulensis* test edilen tüm fungal izolatlara karşı en düşük antifungal aktiviteyi (16.0-40.0 µl / petri) göstermiştir. Taze ve sağlıklı olarak kurutulmuş biber meyvelerinin iç dokularından toplam 25 endofitik bakteri izolatı elde edilmiş, bu izolatlardan 16 tanesi, fungus izolatlarına karşı antagonistik potansiyelleri için seçilmiş ve MALDI-TOF MS analizi ile tanımlanmaları yapılmıştır. İkili kültür testinden sonra *Bacillus amyloliquefaciens* AFP1 (*F. incarnatum*'a karşı), *Bacillus atrophaeus* AFP2 (*A. alternata*'ya karşı) ve *Acinetobacter calcoaceticus* AFP24 (*Aspergillus niger*'e karşı) gibi farklı *Bacillus spp.* izolatları, *in vitro* koşullarında fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimlerini engelleyerek (misel gelişim engelleme değerleri % 70.8-75.4 arasında değişmektedir) güçlü antagonistik etki göstermişlerdir.

Sonuç olarak, isothiocyanate bileşikleri ve bitki uçucu yağları gibi bitkisel kaynaklı maddeler ile beraber antagonist bakteri izolatları, gıda kökenli funguslara karşı yüksek düzeyde antifungal etki göstermişler ve gıda ürünlerini fungus kontaminasyonu ve devamında oluşan mikotoksin üretiminden korumak için çevre dostu, güvenilir bir yaklaşım sunarak başarılı bir şekilde sentetik pestisitlerin yerini alabilirler. ITC ve uçucu yağ bileşenleri bitkisel fumigant olarak, *Bacillus* izolatları mikrobiyal biyofungisit olarak tarımsal ürünlere kolayca uygulanabilirler. Bu çalışma, biberde hasat sonrası fungal etmenlere karşı ITC, bitki uçucu yağ ve antagonist bakteri türlerinin antifungal etkinliklerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

2019, 87 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biber, isothiocyanate, uçucu yağ, antifungal aktivite, mikotoksin

ABSTRACT

DETERMINATION OF *in vitro* ANTIFUNGAL EFFICIENCIES OF PLANT ESSENTIAL OILS, ISOTHIOCYANATE COMPOUNDS and ANTAGONIST BACTERIAL ISOLATES ON DEVELOPMENT OF MYCOTOXIN PRODUCING FUNGAL AGENTS in DRIED PEPPER (*Capsicum annum* L.)

Dried pepper fruits are frequently contaminated by fungal infestations which result in mycotoxins secreted by toxigenic fungi. We have randomly collected 40 different suspected dried red pepper samples from local retailers/bazaar and 40 fungal isolates, which were responsible for postharvest deterioration of dried pepper fruits samples, were subsequently isolated and identified. *Aspergillus niger* (20%) was predominant fungal disease agent isolated followed by *Fusarium incarnatum* (15%) and *Alternaria alternata* (12.5%). Since plant derived substances and biological control are eco-friendly and safer approaches to protect food commodities from fungal deteriorations, volatile antifungal potentials of plant derived substances such as different isothiocyanate (ITC) compounds, plant essential oils (EOs) and antagonist bacterial isolates were evaluated against mycelial growth inhibition of *A. niger*, *A. alternata* and *F. incarnatum* *in vitro* conditions. Allyl (AITC), benzyl (BITC), ethyl (EITC) and methyl (MITC) isothiocyanates were strongly inhibited mycelial growth of all fungal isolates tested. Mycelial growth of *A. niger* was inhibited in 100% level by at concentrations of 0.09-0.15 µl/petri, *A. alternata* at concentrations of 0.09-0.21 µl/petri and *F. incarnatum* at concentration of 0.06-0.21 µl/petri. MITC was found as the most effective antifungal compound, *A. niger* was found as the most sensitive pathogen against ITC compounds. The strongest antifungal activities (100% inhibitions) were recorded for EOs of *Thymbra spicata* (2.0-6.0 µl/petri), *Thymus vulgaris* (4.0-6.0 µl/petri) and *Origanum syriacum* (4.0 µl/petri) against fungal isolates tested. *Eucalyptus camaldulensis* has showed the lowest antifungal activities (16.0-40.0 µl/petri) against all fungal isolates tested. A total of 25 endophytic bacterial isolates were obtained from the inner tissues of healthy dried and fresh pepper fruits, 16 of these isolates were selected for antagonistic potential against fungal isolates and identified by MALDI-TOF MS analysis. Following dual culture test, isolates of different *Bacillus* spp., such as *Bacillus amyloliquefaciens* AFP1 (against *F. incarnatum*), *Bacillus atrophaeus* AFP2 (against *A. alternata*) and *Acinetobacter calcoaceticus* AFP24 (against *Aspergillus niger*) displayed the strong *in vitro* antagonistic activities by inhibiting mycelial growth of the fungal disease agents (mycelial growth inhibition values ranging between 70.8-75.4%).

In conclusion, plant derived substances such as isothiocyanate and essential oils along with antagonist bacterial isolates have shown excellent antifungal potentials against food borne fungi and may successfully replace synthetic pesticides, offering, an eco-chemical and safer approach to protect food commodities from fungal contamination and subsequent mycotoxin production. ITC and EO compounds can be easily released as botanical fumigants, *Bacillus* isolates as microbial biofungicides to the agri-commodities. This is the first study which investigated the antifungal effect of ITC, EO and antagonist bacterial species against post-harvest fungal disease agents of pepper fruits.

2019, 87 pages

Keywords: Pepper, isothiocyanate, essential oils, antifungal activity, mycotoxin

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamasında değerli bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen; eğitim sürecimde her türlü desteği sağlayan, etik davranma ve düzenli çalışmayı felsefe edinmeme vesile olan, kendisiyle çalışmaktan çok mutlu olduğum kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Soner SOYLU'ya, bölümde yer alan deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Şener KURT, Prof. Dr. E. Mine SOYLU'ya, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm imkânlarından yararlanmamı sağlayan HMKÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 17YL013) teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bakteri ve fungus izolatlarımın tanısında ve *in vitro* etkinliklerin belirlenmesi aşamasında yardımcı olan Ar.Gör. Merve KARA ve Zir. Yük. Müh. Aysun UYSAL'a,

Beni her zaman en iyisini yapabileceğime inandıran, bu günlere gelmemi sağlayan ve maddi manevi her türlü desteklerini esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	8
2.1. Mikotoksin Oluşturan Fungal Etmenlerle Mücadelede Bitki Uçucu Yağlarının Kullanılması Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	8
2.2. Mikotoksin Oluşturan Fungal Etmenlerle Mücadelede Isothiocyanate (ITC) Bileşiklerinin Kullanılması Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	15
2.3. Mikotoksin Oluşturan Fungal Etmenlere Karşı Bakterilerle Biyolojik Mücadele Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma, Kimyasallar ve Aletler.....	23
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Fungal Hastalık Etmenlerinin Kurutmalık Biberlerden İzolasyonu ve Tanınması.....	24
3.2.2. Fungal Hastalık Etmeni İzolatların Patojenisite Testleri.....	26
3.2.3. Sağlıklı Kurutulmuş ve Taze Biber Meyvelerinden Aday Endofit Bakterilerin İzolasyonu ve Tanınması.....	28
3.2.4. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine ITC Bileşikleri, Bitki Uçucu Yağlar ve Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>in vitro</i> Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	31
3.2.4.1. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine ITC ve Bitki Uçucu Yağların <i>in vitro</i> Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi.....	31
3.2.4.2. Bitki Uçucu Yağlar ve ITC Bileşenlerinin Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Minimum Engelleme Konsantrasyonlarının Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	32
3.2.4.3. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Aday Endofit Bakteri İzolatlarının <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	33
3.2.4.4. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin <i>in vitro</i> Antagonistik	

Etkinliğinin Belirlenmesi.....	34
3.2.4.5. Antagonist Bakterilerin Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelledikleri Bölgelerin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	35
3.2.5. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler.....	37
4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Kurutmalık Biberlerde Bozulmalara Neden Olan Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanılanması.....	38
4.2. Farklı ITC ve Uçucu Yağların Buhar Fazında Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antifungal Etkileri.....	43
4.2.1 Farklı ITC ve Uçucu Yağların Buhar Fazında <i>Fusarium incarnatum</i> 'un Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antifungal Etkinliğinin Belirlenmesi.....	43
4.2.2. Farklı ITC ve Uçucu Yağların Buhar Fazında <i>Alternaria alternata</i> 'nın Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antifungal Etkinliğinin Belirlenmesi.....	48
4.2.3. Farklı ITC ve Uçucu Yağların Buhar Fazında <i>Aspergillus niger</i> 'in Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antifungal Etkinliğinin Belirlenmesi.....	52
4.3. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	61
4.4. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	66
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	86
EK-1.....	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	(A) Dünya genelinde 2017 yılı itibarıyla kuru biber üretimi yapan önemli ülkeler. (B) Dünya genelinde en fazla üretim yapan ilk 10 ülke sıralaması.....	2
Şekil 1.2.	FAO'nun 2015-2016 istatistik verilerine göre dünya genelinde kurutmalık biber ekim alanlarındaki artışa rağmen elde edilen ürünlerdeki azalış miktarı.....	3
Şekil 3.1.	Antakya ilçesi aktar ve halk pazar yerlerinde satışı yapılan sağlıklı görünüşte kurutulmuş (A ve B) biber meyveleri. (C ve D) Tipik hastalık belirtisi (ok) taşıyan tarla ve aktarlardan temin edilmiş kurutulmuş biber meyveleri ve iç kısımlarda görülen misel gelişimleri.....	25
Şekil 3.2.	Hastalık etmenlerin sağlıklı biber meyvelerinde patojenite testi...	27
Şekil 3.3.	Kurutulmuş biberlerden izole edilmiş hastalık etmenlerinin patojenite testi sonucu oluşan hastalık belirtileri. (A) sağlıklı kontrol meyve, (B) <i>A. alternata</i> ve (C) <i>F. incarnatum</i> hastalık etmeninin patojenite testi sonucu meyve içinde inokulasyon noktalarında (ok) oluşan belirtiler.....	27
Şekil 3.4.	Sağlıklı kurutulmuş biber meyvelerinin (A) içsel dokularından elde edilen bakteri süspansiyonlarından gelişen (B) farklı morfolojik görünüşlü endofit bakteri kolonileri (ok).....	29
Şekil 3.5.	Farklı uçucu yağların misel gelişiminin görülmediği minimum engelleme konsantrasyonlardaki (MIC) antifungal etkisinin fungisidal veya fungusitativ özelliklerinin belirlenmesi.....	33
Şekil 3.6.	Antagonist bakterilerin fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine olan etkinliğin belirlendiği ikili kültür testi. İkili kültür testinde misel gelişimini engelleyen (A ve B) veya engelleyemeyen (C) farklı türlere ait antagonist izolatların kontrol (D) ile karşılaştırılması.....	34
Şekil 3.7.	Antagonist bakteri izolatların ürettiği uçucu bileşen(ler)inin kapalı ikili kültür testlemeleri ile misel gelişimini (ok) engelleme (antagonistik) potansiyellerinin belirlenmesi. (A) Teslemenin yapıldığı parafilmle sarılmış bakteri (üst kapak) ve fungus kültürlerinin (alt kapak) farklı kapaklara yerleştirilmiş hali. (B) ölçüm için açılmış petri kapları (üst kapakta bakteri, alt kapakta fungus kültürünün gelişimi).....	36
Şekil 3.8.	Kurutulmuş biberlerin içsel dokularından elde edilen antagonist bakterilerin ürettiği bileşiklerin fungus miselleri üzerinde fungisidal/fungistatik özelliklerinin belirlenmesi. Sağlıklı hifin (ok) engelleme bölgesinde (*) gelişme göstermemesi etkinliğinin fungisidal özellikte olduğunu göstermektedir.....	

	36
Şekil 4.1. Antakya ilçesindeki aktar ve halk pazarlarından temin edilen şüpheli kuru biber meyve örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen farklı fungal koloniler.....	38
Şekil 4.2. İzolasyonlarda sık karşılaşılan fungal etmenlerden <i>Alternaria alternata</i> (A ve D), <i>Fusarium incarnatum</i> (B ve E) ve <i>Aspergillus niger</i> (C ve F)'nin koloni ve spor görünüşleri. (G-İ). (MALDI-TOF analizleri sonucu etmenlerin teşhis sonuçları teyit edilmiştir).....	39
Şekil 4.3. Hastalıklı bitkilerden izole edilen <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium incarnatum</i> ve <i>Alternaria alternata</i> 'nın (A) fungal misel disk ve (B) spor süspansiyonu enjekte edilmiş sağlıklı biber meyvesi içinde inokulasyon noktalarında oluşturduğu sporulasyon göstermiş tipik yumuşama ve çürüklük (ok) belirtileri.....	40
Şekil 4.4. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal etmen <i>F. incarnatum</i> 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri. (A) AITC, (B) BITC, (C) EITC, (D) MITC içeren petrilerdeki misel gelişimleri gösterir.....	45
Şekil 4.5. Fungal etmen <i>F.incarnatum</i> 'a karşı minimum engellemenin görüldüğü ITC konsantrasyonlarının fungisidal etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri (ok) yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde yeniden gelişme göstermemiştir.....	46
Şekil 4.6. Fungal etmen <i>F.incarnatum</i> 'a karşı minimum engellemenin görüldüğü uçucu yağ konsantrasyonlarının fungisidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde yeniden gelişme göstermiş (ok) veya göstermemiştir.....	47
Şekil 4.7. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal etmen <i>A. alternata</i> 'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri. (A) AITC, (B) BITC, (C) EITC, (D) MITC içeren petrilerdeki misel gelişimleri gösterir.....	49
Şekil 4.8. Fungal etmen <i>A. alternata</i> 'ya karşı minimum engellemenin görüldüğü ITC konsantrasyonlarının fungisidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde sadece EITC'den alınan misel diski (ok) yeniden gelişme göstermiştir...	50
Şekil 4.9. Fungal etmen <i>A. alternata</i> 'ya karşı minimum engellemenin görüldüğü uçucu yağ konsantrasyonlarının fungisidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde yeniden gelişme göstermiş (ok) veya göstermemiştir.....	52
Şekil 4.10. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal etmen <i>A. niger</i> 'in misel gelişimini engelleme potansiyelleri. (A) AITC, (B) BITC, (C) EITC, (D) MITC içeren petrilerdeki misel gelişimleri gösterir.....	54
Şekil 4.11. Fungal etmen <i>A. niger</i> 'e karşı minimum engellemenin görüldüğü ITC	

konsantrasyonlarının fungisidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde sadece MITC'den alınan misel diski (ok) yeniden gelişme göstermiştir.....	55
Şekil 4.12. Fungal etmen <i>A. niger</i> 'e karşı minimum engellemenin görüldüğü uçucu yağ konsantrasyonlarının fungisidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde yeniden gelişme göstermiş (ok) veya göstermemiştir.....	57
Şekil 4.13. Biberlerden izole edilmiş farklı türlerdeki antagonist bakteri izolatlarının ikili kültür testlemelerinde fungal etmen (A) <i>F. incarnatum</i> , (B) <i>A. alternata</i> ve (C) <i>A. niger</i> 'in misel gelişimini engelleme etkinlikleri.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Gıdalarda ve hayvan yemlerinde farklı mikotoksin üreten fungal etmenler ve oluşturdıkları mikotoksinler.....	4
Çizelge 4.1.	Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>F. incarnatum</i> misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği.....	44
Çizelge 4.2.	Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>F. incarnatum</i> misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği.....	44
Çizelge 4.3.	Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>F. incarnatum</i> misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği.....	46
Çizelge 4.4.	Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>F. incarnatum</i> misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği.....	47
Çizelge 4.5.	Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>A. alternata</i> misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği.....	48
Çizelge 4.6.	Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>A. alternata</i> misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği.....	49
Çizelge 4.7.	Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>A. alternata</i> misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği.....	51
Çizelge 4.8.	Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>A. alternata</i> misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği.....	51
Çizelge 4.9.	Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>A. niger</i> misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği.....	53
Çizelge 4.10.	Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>A. niger</i> misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği.....	53
Çizelge 4.11.	Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>A. niger</i> 'in misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği.....	56
Çizelge 4.12.	Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni <i>A. niger</i> 'in misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği.....	56
Çizelge 4.13.	Çalışmalarda kullanılan farklı ITC ve uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleyen minimum engelleme konsantrasyonları (MIC).....	58
Çizelge 4.14.	Çalışmalarda kullanılan farklı ITC ve uçucu yağ konsantrasyonlarının Probit analizi sonucu belirlenen fungal	

	hastalık etmenlerinin misel gelişimini %50 engelleyen etkili konsantrasyon değerleri (EC ₅₀).....	58
Çizelge 4.15	Farklı endofit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği.....	62
Çizelge 4.16	Farklı endofit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimini % engelleme potansiyelleri.....	63
Çizelge 4.17	Farklı endofit antagonist bakteri izolatların uçucu bileşenlerinin <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği.....	67
Çizelge 4.18	Farklı endofit antagonist bakteri izolatların uçucu bileşenlerinin <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimini % engelleme potansiyelleri.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Celsius (derece)
Da	: Dekar
Ha	: Hektar
µg	: Mikrogram
Mg	: Miligram
Gr	: Gram
Kg	: kilogram
µl	: Microlitre
Ml	: Mililitre
L	: Litre
µm	: Mikrometre
Mm	: Milimetre
Dak	: Dakika
Rpm	: rotation per minute (dakikada dönme sayısı)

KISALTMALAR

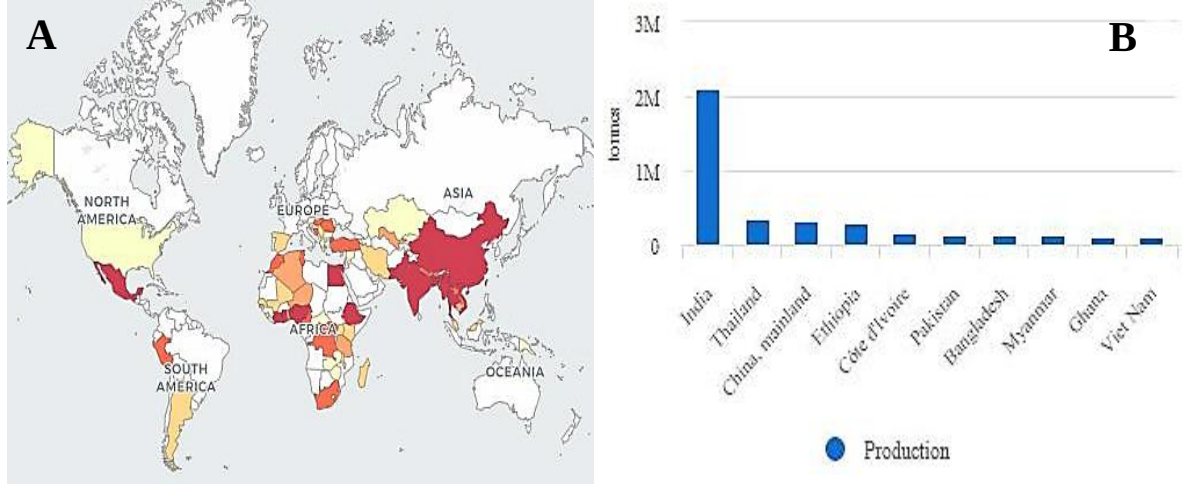
TÜİK	: T ürkiye İ statistik K urumu
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (F ood and A griculture O rganisation of The United Nations)
ITC	: I so th iocyanate
AITC	: 2-propenyl (A llyl) I so th iocyanate
BITC	: B enzyl I so th iocyanate
EITC	: E thyl I so th iocyanate
MITC	: M ethyl I so th iocyanate
CLA	: Karanfil Yaprak-Parçacık Agar (C arnation L eam-Piece A gar)
KB	: K ing's B Agar Besi yeri
LB	: L uria B ertaniAgar Besi yeri

NA	: Nutrient Agar Besi yeri
PDA	: Patates Dekstroz Agar Besi yeri
TSA	: Trypic Soybean Agar Besi Yeri
HR	: Tütün aşırı duyarlık testi (H ypersensitive T est)
MALDI-TOF	: M atriks A ssisted L aser D esorption I onization T ime of F light M ass Spectrometry
ITS	: I nternal T ranscribed S pacer
rDNA	: Ribosomal DNA
PCR	: P olimeraz C hain R eaction
NCBI	: The N ational C enter for B iotechnology I nformation
EC ₅₀	: Fungusmisel gelişimini %50 düzeyinde engelleyen Etkili Konsantrasyon (E fficient C oncentration)
MIC	: Fungal etmenin misel gelişimini engelleyen Minimum Engelleme Konsantrasyonu(M inimum I nhibition C oncentration, MIC)
SPSS	: S tatistical P ackage for the S ocial S ciences

1. GİRİŞ

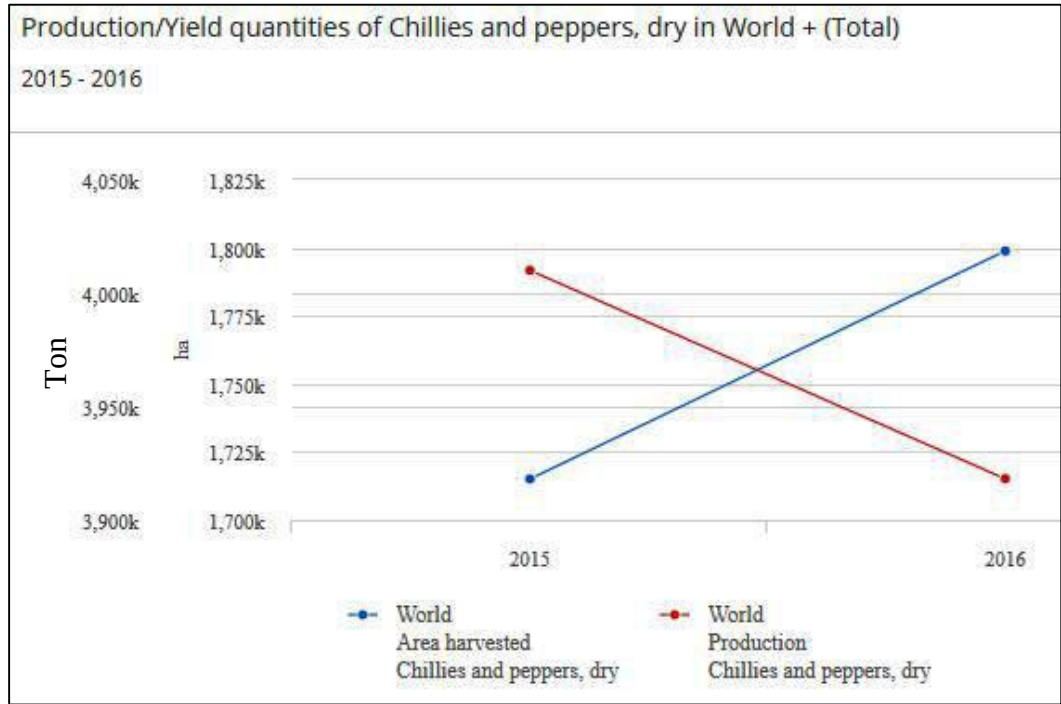
Biber (*Capsicum annum* L.) ülkemizde en fazla üretilen sebzelerin başında gelmektedir. Kurutulmuş formdaki biberler dünyada karabiberden sonra gelen 2.derecede önemli baharattır.Ülkemizde yetiştirilen biber meyvesi gerek taze ve kurutularak gerekse salça ve baharat olarak günlük en fazla tüketilen ürünlerinde başında gelir. Dünya Gıda ve Tarım Organizasyonunun 2017 yılı verilerine göre toplam 19.870.590 Da alanda 36.092.631 ton taze tüketime yönelik biber üretiminin yapıldığı dünyanın önde gelen ilk 10 ülke sıralaması Çin, Meksika, Türkiye, Endonezya, İspanya, A.B.D, Nijerya, Mısır, Cezayir ve Tunus olarak bildirilmiştir (Anonymous, 2017). Sıralamada'da görüleceği gibi Türkiye 944.440 da alanda 2.608.172 ton üretim miktarıyla dünyanın önde gelen 3. büyük ülkesi durumundadır (Anonymous, 2017). Akdeniz bölgesinde önemli biber ekim alanlarına sahip olan Hatay ilinde 2016 yılında toplam 35.552 Da alanda 66.333 ton biber üretimi yapılmıştır (Anonim, 2016).

Taze tüketiminin yanısıra biber meyvesi sanayi ve baharat olarakta tüketilmekte olup, birçok ülkenin geleneksel yemeklerinde en fazla kullanılan bir ürün pozisyonundadır. Kurutulmuş biber bünyesinde bulunan “capsaicin” bibere sahip olduğu tat, acılık ve aromayı verir. Acılık arttıkça biber içindeki capsaicin miktarı artış gösterir. Genelde kuru biberin %14 Vitamin E, %9 Vitamin A, %7 lif, %6 Vitamin K, Vitamin B6, bakır, %5 demir, %4 Vitamin B2, B3 ve mangan içerir (UNIDO/FAO, 2006; Anonymous, 2018). Dünya nüfusunun ¼'ünün her gün değişik şekillerde kullandığı bu ürünün tüketimi yıldan yıla artış göstermektedir. Dünya kurutmalık/baharat biber üretimi son on yılda tüketicinin artan talepleri doğrultusunda %3.9 oranında artış göstermiş olup, bu artış yıldan yıla düzenli olarak devam etmektedir.Dünya Gıda ve Tarım Organizasyonunun 2017 yılı verilerine göre toplam 18.566.410 Da alanda 4.625.833 ton kuru tüketime yönelik biber üretiminin yapıldığı, dünyada en önemli kurutulmuş biber üreten ülkelerin başında Hindistan gelmekte olup, bu ülkeyi sırasıyla Tayland, Etiyopya, Çin, Fildişi sahilleri, Pakistan, Bangladeş, Myanmar, Gana ve Vietnam ülkeleri takip etmektedir (Şekil 1.1). Bu ülkelerin üretimi dünya üretiminin %70'ni oluşturmaktadır (Anonymous, 2017). Türkiye 2016 yılı toplam kurutmalık/baharat biber üretiminde dünyada 23. sırada, Avrupa ülkeleri arasında ise 16.140 ton ile 4. büyük üretici ülke pozisyonundadır (Anonymous, 2016).



Şekil 1.1. (A) Dünya genelinde 2017 yılı itibarıyla kuru biber üretimi yapan önemli ülkeler. (B) Dünya genelinde en fazla üretim yapan ilk 10 ülke sıralaması.

Dünya genelinde 2016 yılı itibarı ile ekim alanlarındaki artış olmasına rağmen (Anonymous, 2016), toplam kurutmalık biber üretiminde azalış kaydedilmiştir (Şekil 1.2). Kurutmalık biberler mikotoksin üreten fungal etmenler tarafından en fazla etkilenen baharat ürünlerinin başında gelir (Duman, 2010). Kurutularak ve baharat olarak tüketilen biberler üzerinde gelişerek insan sağlığına zararlı mikotoksin üreten fungal mikroorganizmalar tarafından neden olunan ekonomik kayıplar son yıllarda ciddi oranlara ulaşmıştır (Ham ve ark., 2016; Öksüztepe ve Erkan, 2016). Mikotoksin (mycotoxin) latince **mykes** (mantar) ve **toxicum** (zehir) kelimelerin birleşmesi sonucu oluşur. Mikroorganizmalar için uygun, ürün depolaması için uygun olmayan çevre koşullarında yaklaşık 400 adet farklı fungal etmenin farklı ürünlerde farklı kimyasal yapılarda mikotoksin ürettiği bildirilmiştir (Smith, 2001; Fatima ve ark., 2009). Özellikle dünya tüketimin %25'ini karşılayan tahıllar ve kurutmalık tarımsal ürünler toksin oluşturan mikroorganizmalar tarafından tehdit altındadır (Dvegowda ve ark., 1998). Mikotoksin üreten fungal etmenlerin daha çok *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium* cinslerine ait olduğu, bazı türlerin toksin üretiminin yanısıra doğrudan insan ve bitki patojeni olarakta sorun olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (McKee, 1995; Kabak ve Dobson, 2017).



Şekil 1.2. FAO'nun 2015-2016 istatistik verilerine göre dünya genelinde kurutmalık biber ekim alanlarındaki artışa rağmen elde edilen ürünlerdeki azalış miktarı

Toksinler genel anlamda fungal, bakteriyel, viral mikroorganizmalarca oluşturulan kimyasallar olup, mikotoksinler sadece fungal kaynaklı zararlı kimyasallardır. Gıdalara toksinler doğrudan, dolaylı ve taşınma ile bulaşır (Öksüztepe ve Erkan, 2016). Mikotoksinler oluşturulduğu ürün üzerinde doğrudan zarar verdiği gibi, yapıları bozulmadan bir sonraki ürünlere de geçebilen (taşınabilen) kimyasallardır (Hontanaya ve ark., 2015). Bu bakımdan hayvansal yem içinde bulunan toksinler bu yemleri tüketen hayvanların etine, sütüne, yumurtasına bulaşarak oradan bu ürünleri tüketen insanlara geçebilmektedir. Mikotoksinlerin oluşumunu fiziksel (çevre sıcaklığı, nisbi nem, gıda maddesinin nemi), kimyasal (gıdanın bileşimi, asitliği, pH) ve biyolojik (mikroorganizmanın virülensliği, rekabet yeteneği, mikrobiyal detoksifikasyon yeteneği) faktörler önemli düzeyde etkiler (Line ve Brackett, 1995). Özellikle taze olarak hasat edilen ürünlerin baharat olarak kullanımı söz konusu ise, toksin oluşturan fungal etmenlerden etkilenmemesi için hasat sırasındaki nem oranının %65-80 oranında olması istenir, bu oranın hasattan hemen sonra kurutma aşamasında %10 seviyelerine düşürülmesi gerekir (Iqbal ve ark., 2010). Mikotoksinlerin hayvanlar ve insanlar

üzerinde kanserojenik, mutajenik, teratojenik ve immün (bağışıklık) sistemini baskılayan önemli olumsuz etkileri bulunmaktadır (Smith, 2001).

Farklı kimyasal yapıları ve biyosentetik kökenleri, biyolojik etkileri, farklı türlerde birçok fungal etmen tarafından üretilmeleri dolayı mikotoksinlerin farklı kategoriler altında sınıflandırılmaktadır (Çizelge 1.1). Mikotoksinleri Deuteromycota (Fungi imperfecti) içinde Hypomycetes sınıfında yer alan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* türleri oluşturduğu mikotoksinler olmak üzere 4 ana gruba ayırmak mümkündür (Kurtzman ve ark., 1987; Heperkan, 2003; Weidenbörner 2014; Kabak ve Dobson, 2017).

Çizelge 1.1. Gıdalarda ve hayvan yemlerinde farklı mikotoksin üreten fungal etmenler ve oluşturdukları mikotoksinler

<i>Aspergillus</i> spp.toksinleri	<i>Penicillium</i>spp. Toksinleri	<i>Fusarium</i>spp. Toksinleri	<i>Alternaria</i>spp. toksinleri
Aflatoksinler, AFB1 AFB2 AFG1 AFG2 AFM1 AFM2 AFB2a AFG2a AFB3 AFB3	Sitinin , Okratoksin A, Sitroviridin, Rubratoksin A, Rubratoksin B, Patulin, Penisilikasit, P-R (Pen. requeforti)-Tremortin, toksin, Luteosikrin, İzlanditoksin, Ksantosilin-X, Siklopiazonikasit, Sitromisetin, Rugulosin, Ksantomegnin, Rugulovasin A, Rugulovasin B, Verrukulotoksin, Emodin	Zearalenon(F-2 toksin), Triketesinler, Deoksinivalenol Nivalenol T-2 toksin Diasetoksisirpenol HT-2 toksin, Fusarin-C, Fumonisin B1, Moniliformin	Alternariol, Alternariolmo-no metil-eter, Altetoksin, Tenuazonikasit

Aspergillus türleri tarafından daha çok aflatoksin grubu mikotoksinler üretilir (Zorlugenç, 2009). Aflatoksinler daha çok *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* (Kurtzman ve ark., 1987; Line ve Brackett, 1995; Pitt, 2000) gibi fungus türleri tarafından oluşturulurlar. Aflatoksinin B1, B2, G1, G2, M1, M2 olmak üzere 6 farklı tipi bulunmaktadır. Aflatoksin grubu toksinler daha çok bitkisel ürünlerde

(yer fıstığı, fındık, antep fıstığı, badem, çam fıstığı, çeşitli cevizler), tahıllarda (buğday, çavdar, arpa, yulaf, pirinç), baklagillerde (soya fasulyesi, fasulye, bezelye, börülce, mercimekte), yağlı tohumlardan pamuk, ayçiçeği, susam ve kolza tohumları, baharatlardan özellikle kırmızı toz biber, pul biber, karabiber ve kuru meyvelerden incirde sıkça ortaya çıkarak önemli ekonomik kayıplara neden olur (McKee, 1995; Uylaşer ve ark., 2005).

Penicillium türleri daha çok akut veya teratojenik (gebelikte embriyonal gelişimi olumsuz etkileyen) etki gösteren toksinlerden Okratoksin, Citreoviridin, Citrinin, Penitrem A, PR Toksin ve Roquefortine türü toksinleri oluşturur (Abdel-Wahhab ve ark., 2005).

Aynı zamanda önemli bitki patojeni türleri içeren *Fusarium* spp çeşitli tahıl ürünlerinde dip çürüklüğü, yaprak ve başak yanıklığı ve koçan (dane) çürüklüğü hastalıklarına sebep olmakla birlikte bu ürünlerde deoxynivalenol ve fumonisin grubu toksinlerin üretilmesinden sorumludur (Hussein ve Brasel, 2001; Smith, 2002).

Bir diğer önemli bitki patojeni türlerini içeren *Alternaria* spp çeşitli kuru, yaş sebze ve meyvelerde farklı kimyasal formlarda toksinleri üretirler. *Alternaria* cinsi içerisinde toksin oluşturan yaklaşık 50 farklı tür bulunmaktadır. En çok bilinen türler ise *A. alternata* ve *A. tenuissima*'dır. Hem insanlarda hem de hayvanlarda önemli hasarlara neden olabilen *Alternaria* türleri tarafından sentezlenen en önemli mikotoksinler Alternariol (AOH), Alternariol monometil eter (AME), Tenuazonik asit (TEA), Altenuen (ALT) ve Alvertoksin (AT)'dir (Yiannikouris ve Jouany, 2002). Dünya genelinde hasat sonrası kurutulmuş yiyeceklerde sorun olan fungal hastalık etmenleri ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte, ülkemizde kurutmalık biberlerde sorun olan fungal hastalıkların belirlenmesine yönelik oldukça kısıtlı çalışma bulunmaktadır.

Mikotoksinlerin doğada çok yaygın olarak bulunmaları ve üretilen toksinlerinin çevre koşullarına çok dayanıklı olmalarından dolayı bunlardan üretilmesinden korunması ve bunları oluşturan fungal etmenlerin kontrol edilmesi oldukça zordur. Bu yüzden mikotoksinlerin zararından korunmak için önemli olan bitkisel ürünlerde hasat öncesi ve muhafaza sırasında toksin oluşumunun önlenmesidir. Nitekim hasat edilmiş ürünler üzerinde oluşan toksinlerin gıdalara bulaştıktan sonra uzaklaştırılması (detoksifikasyon) işlemi oldukça zordur (Dvegowda ve ark., 1998; Smith, 2001; Dwivedy ve ark., 2016).

Gıdalarda mikotoksin oluşturan fungal etmenlerle kimyasal mücadele oldukça zor olmakla birlikte, kullanılan pestisitlerin insan, hayvan ve çevreye verdiği önemli zararların yanısıra kullanıldığı patojenlerin dayanıklılık geliştirmesi bu tür uygulamalardan beklenen başarıyı getirmemektedir (Singh ve ark., 2010; Sonker ve ark., 2014; Ramdial ve ark., 2017). Son yıllarda tüketicinin sentetik kimyasal kullanımının insan sağlığına ve çevreye verdiği zarar hususunda bilinçlenmesi, gelişmiş ülkelerde pestisit uygulamalarına çeşitli yaptırım ve sınırlamalar getirilmesine sebep olurken, kullanılan kimyasalların olumsuzluklarından dolayı mikotoksin oluşturan fungal etmenlerle mücadelede kimyasal pestisitlere alternatif çevre dostu, doğal mikrobiyal ve kimyasalların kullanıldığı yeni mücadele yöntemlerinin araştırılması zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır (Soliman ve Badeaa, 2002).

Ülkemizde ve dünyada bitkilerde sorun olan fungal ve bakteriyel hastalıklarla kimyasal pestisitlere alternatif mücadele yolları arasında, (i) antagonist ve bitki gelişimini teşvik eden bakteriyel ve fungal biyokontrol ajanların kullanıldığı biyolojik mücadele; (ii) biyotik ve abiyotik uyarıcıların kullanıldığı teşvik edilmiş dayanıklılık; (iii) bitkisel (bitki ekstrakt ve uçucu yağlar) ve hayvansal kökenli antimikrobiyal bileşenler mikotoksin oluşturan mikroorganizmalar ile mücadelede pestisitlere alternatif mücadele yöntemleri olarak kullanılmakta olan temel mücadele yöntemleridir. Bu bağlamda doğal bitki uçucu yağ ve ekstraktların yanısıra Brassica (lahanagiller) bitki türlerinden elde edilen isothiocyanate gibi doğal uçucu bileşenlerin gıda, insan ve hayvan patojeni bir çok fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerine karşı antimikrobiyal etkinliği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Askun ve ark., 2008; Tyagi ve Malik, 2011; Bisht ve ark., 2011; Kurt ve ark., 2011; Nguefacka ve ark., 2012; da Silva ve ark., 2012; Cabral ve ark., 2013; Chen ve ark., 2014; Otoni ve ark., 2014; Bomfim ve ark., 2015; Hontanaya ve ark., 2015; López-Meneses ve ark., 2015; Císarová ve ark., 2016; Nazareth ve ark., 2016; Hu ve ark., 2017; Tracz ve ark., 2017).

Bu çalışmada Hatay ilinin önemli biber ekim alanlarında bölge ve ülkemiz ekonomisine önemli düzeyde katkısı olan biber meyvelerinde hasat öncesi ve sonrası mikotoksin oluşturma potansiyeli olan fungal etmenlerden *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* ve *Fusarium incarnatum*'a karşı kimyasal mücadeleye alternatif olabilecek farklı kekik (*Thymus vulgaris*, *Thymbra spicata*, *Origanum syriacum*), defne (*Laurus nobilis*), rezene (*Foeniculum vulgare*), okaliptüs (*Eucalyptus camaldulensis*) gibi bitki

türlerine ait bitki uçucu yağları ile farklı kimyasal yapıdaki isothiocyanate(ITC)'lerden methyl isothiocyanate (**MITC**), 2-propenyl (Allyl) isothiocyanate (**AITC**), benzylisothiocyanate(**BITC**) ve ethyl isothiocyanate (**EITC**) gibi doğal bileşiklerin yanısıra sağlıklı biber meyvelerinden izole edilen antagonist aday endofit bakteri izolatlarının fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine olan *in vitro* antifungal etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Mikokotoksin Oluşturan Fungal Etmenlerle Mücadelede Bitki Uçucu Yağlarının Kullanılması Üzerine Yapılan Çalışmalar

Son 20 yılda geliştirilen uçucu yağ bazlı formülasyonlar, gıda kökenli funguslara ve bu funguslarla ilişkilendirilmiş mikotoksinlere karşı mücadelede mükemmel bir potansiyel göstermeleri, doğa dostu-güvenilir bir yaklaşım sundukları gerekçelerinden dolayı gıda ürünlerini fungus kontaminasyonu ve devamında gerçekleşen mikotoksin oluşumundan korumak için, başarılı bir şekilde sentetik koruyucuların yerini alabileceklerdir. Farklı ülkelerde geliştirilen ticari preparatlardan olan SporanTM, PromaxTM, ‘DMC Base Natural’, EcoPCOR, EcoTrol gibi birçok uçucu yağ bazlı gıda koruyucuları ticari olarak kullanılmakta ve ‘genel olarak güvenilir olarak tanımlanmış’ (GRS, Generally Recognized as Safe) kategorisinde yer almaktadırlar (Dwivedy ve ark. 2016).

Yapılan literatür araştırmalarında bitki uçucu yağlarının ve ekstraktlarının, bitkipatojeni funguslara karşı gösterdikleri antifungal özelliklerinin araştırıldığı çok sayıda araştırma karşımıza çıkmaktadır. Bu tür araştırmalarda uçucu yağların, daha çok hasat sonrası ürün kayıplarını azaltmaya yönelik kullanılmakta olduğu görülmektedir.

Aşağıda daha çok, bu çalışmada hedef fungal etmenlerden olan *Aspergillus niger*, *Fusarium incarnatum* ve *Alternaria alternata* ile mücadelede bitki uçucu yağlarının ve ekstraktlarının kullanıldığı çalışmalara yer verilmiştir.

Kritzinger ve ark. (2002), kekik, karanfil, nane, soya fasulyesi ve yer fıstığı uçucu yağlarının antifungal aktivitelerini, börülce (*Vigna unguiculata* (L) Walp) tohumlarında sık karşılaşılan fungal patojenlerden *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti* ve *Penicillium chrysogenum*'a karşı *in vitro* koşullarda test etmişlerdir. Kekik ve karanfil uçucu yağları her 5 fungusun da gelişimlerini 500 ve 1000 ppm de engellerken, nane uçucu yağının 2000 ppm de fungus gelişimlerini engellediği bildirilmiştir.

Soliman ve Badeaa (2002), 12 tıbbi bitkinin uçucu yağının antifungal etkinliklerini aralarında *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* ve *Fusarium moniliforme*'nin yer aldığı farklı hastalık etmenlerine karşı test etmişlerdir. Kekik ve

tarçın yağları (4500 ppm), kadife çiçeği (4200 ppm), nane ve fesleğen (3000 ppm) uçucu yağları kullanıldıkları dozlarında test edilen tüm fungusların gelişimini tamamen engellemiştir. Kimyon uçucu yağı, 2000 ppm dozda *A. flavus*, *A. parasiticus* ve 3000 ppm dozda ise *A. ochraceus* ve *F.moniliforme*'i inhibe etmiştir. *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* ve *F. moniliforme*, anason uçucu yağı tarafından 4500 ppm'de tamamen engellenmiştir. Bununla birlikte papatya ve hazanbul ise, tüm konsantrasyonlarda test edilen funguslara karşı kısmen etkili olmuşlardır. Sonuç itibarıyla, test edilen toksijenik fungusların 12 uçucu yağa, özellikle kekik ve tarçına duyarlı olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte kekik, tarçın, anason ve nane gibi uçucu yağların fungus gelişimi ve buğday tanelerinde ilgili fungal türler tarafından üretilen mikotoksin üretimi üzerinde de önemli düzeyde etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Singh ve ark. (2006), *Foeniculum vulgare* (rezene) uçucu yağında GC-MS analiz yöntemiyle %70.1 ile *trans*-anethole bileşiği olduğunu saptamışlardır. Rezene uçucu yağıyla yapılan fumigasyon denemesiyle, 6 ml/petri yoğunluğunda *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* ve *Fusarium graminearum* etmenlerin gelişimlerinin tümüyle engellendiği bildirilmiştir.

Viuda-Martos ve ark. (2007), *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* etmenleriyle mücadelede *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* ve *Syzygium aromaticum* (karanfil) uçucu yağlarının değme etkilerini araştırmışlardır. Yapılan denemelerde kullanılan tüm uçucu yağların, 440 µl/L dozunda fungusların misel gelişimlerini tamamen engellediği gözlemlenmiştir. Antifungal etkinlik bakımından *Origanum vulgare* en etkili uçucu yağ olarak tespit edilmiş olup, etkinlik açısından *O. vulgare*'yi sırasıyla karanfil ve kekik uçucu yağlarının izlediği bildirilmiştir.

Szczerbanik ve ark. (2007), hasat sonrası fungal patojenlere karşı nane, çay, çam ve tarçın bitkilerinin uçucu yağlarının buhar formunda patojenlerin gelişimleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, çay ve nane uçucu yağlarının *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum* sp., *Geotrichum candidum*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger* ve *Cladosporium cladosporioides*'in gelişimlerini engellemede tarçın ve çam uçucu yağlarından daha etkili oldukları ancak bu yağların *Penicillium digitatum*'a karşı daha düşük seviyede etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir. Nane ve çay uçucu yağları *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger* ve *Rhizopus oryzae*'nin spor oluşturmalarını azaltmalarının yanı sıra *A. niger*'in de spor çimlenmesini

engellemişlerdir. Sonuç itibarıyla nane ve çay uçucu yağlarının buhar haldeki uygulamalarının, bazı hasat sonrası fungal etmenlerle mücadelede etkili oldukları bildirmiştir.

Feng ve Zheng (2007), bazı uçucu yağların (kekik, adaçayı, hindistan cevizi ve sinameki) *Alternaria alternata*'a karşı değme etkili antifungal etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak sinameki ve kekik uçucu yağlarının *A. alternata*'ya karşı antifungal etki gösterdikleri, sinemaki uçucu yağı 300-500 ppm dozda fungus gelişmesini tamamen durdurduğu görülürken, kekik uçucu yağının 500 ppm'de etmenin gelişimini kısmen (%62) durdurduğunu bildirmişlerdir.

Askun ve ark. (2008), bazı Lamiaceae türlerine dahil bitkilere ait (*Thymbra spicata* L., *Satureja hortensis* L., *Origanum onites* L., *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Iestswaart, *O. vulgare* L. subsp. *vulgare*, *O. minutiflorum* O. Schwarz&P.H. Davis, *Sideritis vuralii* H. Duman & Baser ve *S. caesarea* H. Duman, Aytac, & Baser) uçucu yağlarının antifungal etkinliğini belirlemek amacıyla dört fungus türüne (*Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* ve *Fusarium proliferatum*) karşı test edilmiştir. Üç bitki türü (*O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. minutiflorum* ve *T. spicata*)'nin metanol ekstraktları, dört potansiyel mikotoksin oluşturan fungal etmene karşı, en düşük engelleme dozu olan 1,6 mg / ml'lik konsantrasyonunda dahi antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir.

Vilela ve ark. (2009), *Eucalyptus globulus* yapraklarından elde edilen uçucu yağın ana bileşiği 1,8-cineole'in antifungal aktivitesini hasat sonu hastalık etmeni funguslardan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*' a karşı araştırmışlardır. Her iki fungus türünün gelişiminin tamamen engellemesi uçucu yağın, değme ve gaz halinde uygulanmasıyla mümkün olmuştur. Tek başına test edilen 1,8-cineole, sadece en yüksek 1.35 ml/L seviyesinde kısmi engelleme gösterdiği belirtilmiştir. Aflatoksin B1 üretimi ise test edilen uçucu yağ uygulamalarıyla azalmış olup, uçucu yağın 200 ml/L dozunda funguslarda kısmi engelleme gözlemlendiği bildirilmiştir.

Bisht ve ark. (2011), ticari açıdan önemli üç aromatik bitkiden (*Acorus calamus*, *Origanum vulgare* ve *Cinnamomum tamala*) ekstrakte edilen uçucu yağların antifungal aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Bu uçucu yağlarının antifungal etkinlikleri, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*'e karşı değerlendirilmiştir. Engelleyici özelliğin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Test edilen yağlar arasında *O. vulgare* uçucu yağı en yüksek engelleme aktivitesi göstermiştir. Bununla beraber her 3

uçucu yağın da *A. flavus* ve *A. niger*'in gelişimlerini önemli düzeylerde engelledikleri bildirilmiştir.

Tyagi ve Malik (2011), *Eucalyptus globulus* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesini sırasıyla, agar dilüsyon / disk difüzyon yöntemi kullanılarak değme ve buhar fazında, gıda ürünlerinde bozulmalara neden olan 14 mikroorganizmaya karşı araştırmışlardır. Uçucu yağların minimum engelleme dozu (minimum inhibitory concentration / MIC) bakteri ve fungus türlerinde 2.25 ila 9 mg / ml arasında, maya türlerinde ise 1.13 ila 2.25 mg / ml arasında değişmiştir. Kayda değer yüksek antimikrobiyal aktivitenin uçucu yağların buhar fazında gözlemlendiği bildirilmiştir.

da Silva ve ark. (2012), mikotoksin üreten funguslardan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*'e karşı rezene (*Foeniculum vulgare* Mill., Apiaceae), nane (*Mentha piperita* L., Lamiaceae) ve kekik (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) uçucu yağlarının antifungal aktivitelerini araştırmışlardır. Uçucu yağların farklı konsantrasyonlarının antifungal etkisi katı ortam disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. Katı ortam difüzyon testi ile konsantrasyonları belirlenen her bir uçucu yağ için miselyal gelişim ve sporulasyon kapasiteleri belirlenmiştir. Ayrıca beşinci, yedinci ve dokuzuncu günlerde miselyal çapı ve spor üretimi de belirlenmiştir. Sıvı besi yerinde mikrodilüsyon analizinden sonra hücre canlılığını değerlendirmek için FUN-1 boyaması yapılmıştır. Rezene, zencefil, nane ve kekik için etkili konsantrasyonlar sırasıyla, % 50, 80, 50 ve 50 (yağ / DMSO; v / v) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada analiz edilen dört uçucu yağ antifungal etki göstermiştir. Ayrıca uçucu yağlar ile muamelesinden sonra potansiyel mikotoksijenik funguslar *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'un hücre canlılığını değerlendirmek için FUN-1 boyamasının uygun bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Koç ve Kara (2014), yapmış oldukları çalışmada kekik (*Thymus vulgaris* L.), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve defne (*Laurus nobilis* L.) uçucu yağlarının antifungal etkilerini, gıda maddelerinde bozulmalara sebep olan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*'a karşı değerlendirmişleridir. Antifungal aktivitelerin belirlenmesinde agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Antifungal etkileri araştırılan uçucu yağlar, test edilen her iki fungus türünde de engelleyici etkiler sergilemişlerdir. Kekik yağı, fungus gelişimi üzerinde en yüksek antifungal etkiyi göstermiş olup, bu yağı sırasıyla biberiye ve defne uçucu yağları izlemiştir. Bu çalışmayla kekik uçucu

yağının depolanmış ürünlerde zarara yol açan funguslara karşı etkili olduğu, bu etkileriyle uçucu yağların gıdalarda yaygın olarak kullanılan koruyucu katkı maddelerinden potassium sorbate'a alternatif olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Sonker ve ark. (2014), Hindistan'ın Utrak Pradesh bölgesindeki Gorakhpur şehrinin farklı pazarlarından rastgele topladıkları 35 farklı depolanmış üzüm (*Vitis vinifera* L.) örneğinden, 11 fungus türü izole etmişlerdir. Elde edilen fungal türlerden *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus ochraceus*'un ürünlerde sırasıyla % 58, % 52 ve % 67 oranlarında çürümelere neden olmuşlardır. Test edilen 15 uçucu yağın 0.33 µL/mL'de uygulanması sonucunda, *Cymbopogon citratus* yağı, yukarıda bahsedilen baskın funguslara karşı %100 misel gelişimin engellenmesine neden olmuştur. Uçucu yağ, 0.29 µL / mL'de fungistatik olup, toplanan örneklerde meyve çürüklüğüyle ilişkilendirilmiş diğer fungal türlere karşı da geniş bir mikotoksitite sergilemiştir. *Cymbopogon citratus* yağı 0.8 µL/mL dozunda *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus ochraceus*'un mikotoksijenik izolatların gelişimini ve mikotoksin (AFB1 ve OTA) üretimlerini tamamen engellemiştir. Yapılan çalışmada, 1 kg depolanmış üzümün üzerine 200 - 300 µL *C. citratus* yağı uygulamasının ürün üzerinde herhangi bir fitotoksitite göstermediği ve raf ömrünü 10 güne kadar arttığı belirtilmiştir. Bu sonuçlarla *C. citratus* uçucu yağının, depolanmış üzümlerdeki hasat sonu çürümlere neden olan funguslarının kontrolü için ticari fungusitlere doğal bir alternatif olabileceği bildirilmiştir.

López-Meneses ve ark. (2015), okaliptüs (*Eucalyptus globulus* L.), kekik (*Thymus capitatus* L.), yalancı karabiber (*Schinus molle* L.) uçucu yağlarının *Aspergillus parasiticus* ve *Fusarium moniliforme*'nin misel gelişimini engellemeleri üzerine olan potansiyellerinin yanısıra uçucu yağların funguslarca mikotoksin üretme yeteneklerini kontrol etme potansiyelleri yönünden de değerlendirilmişlerdir. Yarı maksimum engelleme konsantrasyonunu elde etmek için kinetik yarıçap büyüme verileri kullanılmıştır. Tüm uçucu yağlar, her iki türün yarıçap büyümesi üzerinde önemli düzeyde etki göstermiştir. Fungal etmenlerin 96 saatlik inkübasyondan sonra kekik uçucu yağı, 1000 ve 2500 µL/L konsantrasyonlarında sırasıyla, *F. moniliforme* ve *A. parasiticus*'un gelişimini tamamen engellemiştir. Okaliptüs ve kekik uçucu yağları, *A. parasiticus*'un spor çimlenmesini önemli ölçüde azaltmıştır. *F. moniliforme*'nin spor çimlenme inhibisyonu okaliptüs, yalancı karabiber ve kekik uçucu yağlarına maruz

kaldığında %84.6, %34.0 ve% 30.6 olarak saptanmıştır. Kekik ve okaliptüs uçucu yağları sırasıyla, aflatoksinde %4 ve fumonisinde %31 oranlarında üretimi azaltmıştır. Uçucu yağ konsantrasyonu artırıldığında spor canlılığı etkilenmiştir ve kekik uçucu yağı her iki fungusun çoğalmasını azaltmıştır. Yine bu uçucu yağın *F. moniliforme* ve *A. parasiticus*'un gelişimini ve mikotoksin üretimini etkilediği bildirilmiştir.

Bomfim ve ark. (2015), *Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağının antifungal etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, *Fusarium verticillioides*'in misel gelişiminin uçucu yağın 150 mg/mL dozunda önemli ölçüde azaldığını, 300 mg/mL dozuygulanmasıyla, fungusun hücre duvarının bozulması ve sitoplazmik sızıntılar gibi belirgin mikroskobik ve morfolojik değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Uçucu yağın 300 mg/mL' deki konsantrasyonları fumonosin ve ergosterol üretimini etkilemek suretiyle antifungal etkinlik göstermiştir. Sonuç olarak uçucu yağın, hücre duvarının yapısını bozarak, hücre bileşenlerde zarara yol açtığı böylece fumonisin ve ergosterol üretimini engelleyerek ederek *F. verticillioides*'e karşı etkin olduğu bildirilmiştir.

de Lima ve ark. (2016), *Alternaria alternata* ve *Alternaria dauci*'nin kontrol edilmesi amacıyla sarımsak, biber ve kişniş bitki ekstraktının yanı sıra tespih ağacı ve portakal kabuğu uçucu yağlarının aktivitelerini ve bu yağların havuç tohumlarının çimlenmesine olan etkilerini araştırmışlardır. Sarımsak ekstresi ve portakal uçucu yağları daha düşük konsantrasyonlarda başarılı şekilde fungusları engellediklerinden, havuç tohumlarının çimlenmesini ve ekim sonrası çıkışlarını etkilemediklerinden, *A. dauci* ve *A. alternata* ile mücadelede potansiyel olarak görüldükleri belirtilmiştir.

Farah ve ark. (2016), *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Penicillium chrysogenum*'a karşı fesleğen, tarçın, okaliptüs, mandalina, keklik otu, nane, çay ve kekik gibi bitkilerden elde edilen sekiz uçucu yağın antifungal aktivitelerini, bu fungusların gelişmeleri üzerine olan etkinliklerini araştırmışlardır. En yüksek antifungal etkinlik, test edilen tüm funguslara karşı en düşük engelleme dozu sergileyen kekik ve oregano uçucu yağlarında görülmüştür. Diğer uçucu yağların antifungal aktivitesi ise azalan şekilde tarçın, nane, çay ve fesleğen bitkilerinden elde edilen yağlar olarak sıralanmıştır. Okaliptüs ve mandarin, 10.000 ppm de fungus gelişimini herhangi bir şekilde engelleyemediklerinden en düşük etkili uçucu yağlar olmuşlardır. Ayrıca bu iki uçucu yağın karışımı da test edilen türler üzerinde hiçbir etki

göstermemiştir. Kekik ve keklik otu karışımı *A. flavus*, *A. parasiticus* ve *P. chrysogenum*'a karşı yüksek sinerjik etki gösterdiği, yine nane ve çay karışımları *A. niger*'e karşı sinerjik etki yarattığı bildirilmiştir.

Cisarova ve ark. (2016), yaptıkları çalışmalarında *Aspergillus* cinsine dahil üç fungus izolatına (*A. parasiticus*, *A. parasiticus* ve *A. flavus*) karşı 15 uçucu yağın antifungal ve anti-toksinogenik aktivitesini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Test edilen uçucu yağların en düşük engelleme dozu mikro atmosfer yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Test edilmek üzere *Jasminum officinale* L., *Thymus vulgaris* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry, *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus globulus* Labill., *Salvia officinalis* L., *Citrus limon* (L.) Burm, *Origanum vulgare* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Carum carvi* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck., *Zingiber officinalis* Rosc., *Mentha piperita* L. ve *Cinnamomum zeylanicum* Nees. (C. verum J.S.Presl.) bitkilerinden elde edilen orijinal ticari uçucu yağlar kullanılmıştır. Bütün uçucu yağlar, test edilen tüm fungus türlerine karşı aktivite göstermişlerdir. İnkübasyondan 14 gün sonra *A. flavus* (KMi-202-LR) misel gelişimi *C. limon* tarafından %18.70, *C. sinensis* tarafından %5.92 oranları ile en yüksek düzeyde engelleme gösterirken, *A. parasiticus* (KMi-220-LR) izolatı *R. officinalis* tarafından % 20.56'lık bir engelleme yapmıştır. Mikro-atmosfer yöntemi kullanarak test edilen tüm funguslara karşı en iyi antifungal aktivite sırasıyla *S. aromaticum*, *T. vulgaris* ve *O. vulgare* tarafından gösterilmiştir. Uçucu yağlardan *C. carvi*, *R. officinalis*, *S. officinalis*, *Eucalyptus globulus* ve *O. basilicum* uygulamalarından sonra AFB1 ve AFG1 mikotoksinlerinin üretimlerinin engellendiği belirtilmiştir.

Hu ve ark. (2017), *Aspergillus flavus*'a karşı zerdeçal (*Curcuma longa* L.) uçucu yağının, *in vitro* şartlarında antifungal aktivitesi ve potansiyel mekanizmasını ek olarak *in vivo* koşullarında anti-aflatoksijenik etkinliğini araştırmışlardır. Bu uçucu yağın antifungal aktivitesinin, misel büyümesi, spor çimlenmesi ve aflatoksin üretimi üzerine etkisini doza bağlı bir şekilde gözlemlemiştir. Yapılan detaylı gözlemler sonucunda, bu yağın sahip olduğu antifungal etki mekanizmasının fungusun plazma membranı ve mitokondride de dahil hücre endomembran sisteminin bozulması, başka bir deyişle özellikle ergosterol sentezinin inhibasyonu, mitokondriyal ATPaz, malat dehidrogenaz ve süksinat dehidrogenaz aktivitelerini bozmak suretiyle gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, mısırdaki fungus kontaminasyonu baskılayabilme

yeteneğinden dolayı zerdeçal uçucu yağının çevre dostu bir antifungal madde olma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir.

Lema ve ark. (2018), Nijerya'nın önemli biber üretim alanlarında yetişen 3 farklı önemli biber türlerinde (*Capsicum chinense*, *C. frutescens* L. ve *C. annum* L.) sorun olan fungal hastalık etmenlerin belirlenmesine yönelik yapmış oldukları çalışmalarında, 27 farklı örnekten izolasyon yapmışlar, elde edilen fungal etmenlerin teşhis çalışması sonucunda biber çeşitlerinde sorun olan fungal türlerin *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium corylophilum*, *Rhizopus stolonifer* ve *Verticillium* spp. olduğunu belirlemişlerdir.

2.2. Mikokotoksin oluşturan Fungal Etmenlerle Mücadelede Isothiocyanate (ITC) Bileşiklerinin Kullanılması Üzerine Yapılan Çalışmalar

Gıda ürünlerinde fungus gelişimlerini önlemek adına çeşitli yöntemler önerilmektedir. Bitki uçucu yağları geniş antifungal etkinlikleri ve tüketim güvenliğinden dolayı büyük bir ilgiyle araştırılmaktadırlar (Chen ve ark. 2014). Isothiocyanate bileşikleri de bitkilerden (özellikle Brassicaceae familyası) elde edilen etkili uçucu yağlar olup mikotoksijenik *Aspergillus* (Hontanaya ve ark. 2015), *Alternaria* (Troncoso-Rojas ve ark. 2005), *Fusarium* (Nazareth ve ark. 2016) ve *Penicillium* (Tunç ve ark. 2007) türlerine karşı antifungal etkinlik göstermektedirler.

Yapılan literatür araştırmalarında, kurutmalık biberlerde mikotoksin oluşturan funguslara karşı isothiocyanate bileşiklerinin kullanımı ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Önceden yapılmış diğer çalışmalarda ise özellikle hasat sonrasında ürünlerde zararlara yol açabilen ve bu çalışmadaki hedef patojenleri (*Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum* ve *Aspergillus niger*) de içeren *Alternaria*, *Aspergillus* ve *Fusarium* cinslerine ait türlerin gelişimlerinin engellenmesi adına isothiocyanate bileşiklerinin kullanıldığı çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

Drobnica (1967), yapmış olduğu çalışmada bazı Isothiocyanate (ITC) bileşiklerinin funguslara karşı etkinliklerini araştırmışlardır. Yapılan denemeler sonrasında ITC türevlerinin *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *P. cyclopium* ve birçok saprofit fungal etmen üzerinde antifungal etkinliklerinin görüldüğü belirtilmiştir. Test

edilen bileşiklerden çoğu, *R. oryzae*'ye karşı göstermiş oldukları düşük etkinlileriyle, β -phenylethyl ITC ve benzyl ITC (BITC)'ın alt bileşenlerinin aksine bir birine yakın etkiler gösterdikleri bildirilmiştir.

Mari ve ark. (2002), armutlarda mavi küf etmeni *Penicillium expansum*'a karşı allyl isothiocynate (AITC) bileşiğinin antifungal etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, 24 saat boyunca 5 mg/L AITC uygulanmış ortamda fungusun gelişimi en etkili şekilde durdurulduğu, sonuç itibariyle uygulamaların, maviküfün ortaya çıkış oranını %90 oranında azalmaya neden olmak suretiyle, *Penicillium expansum* ile mücadelede AITC bileşiğinin kullanılmasının ekonomik açıdan kimyasal fungusitlere bir alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Troncoso ve ark. (2005), dolmalık biberlerde sorun olan *Alternaria* kaynaklı fungal çürümeleri kontrol etmek amacıyla lahana kökenli bazı isothiocynate bileşikleri kullanmışlardır. Katı faz mikro ekstraksiyonu ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile lahana yapraklarından sırasıyla 1:3.5:5.3:9.6 oranında allyl, benzyl, 2-phenylethyl ve methyl isothiocyanate bileşikleri elde edilmiştir. Düşük yoğunluklu polietilen torbalarda ambalajlı veya paketsiz 0.28 ve 0.56 mg/ml methyl isothiocyanate (MITC) uygulaması ve pozitif kontrol olarak bir ticari fungusit kullanılarak *A. alternata* uygulanmış biberler üzerinde test edilmiştir. MITC'in 0.03 mg/ml konsantrasyonun, *in vitro* ortamda *Alternaria* gelişimini % 100 oranında engellediği bildirilmiştir.

Troncoso-Rojas ve ark. (2009), allyl-isothiocyanate (AITC), benzyl-isothiocyanate (BITC) ve birbirleriyle karıştırılmış isothiocyanateler (AITC, BITC, phenyl-isothiocyanate (PITC) ve 2-phenylethyl-isothiocyanate (MITC)'ların fungisidal etkilerini hasat sonrası kavun meyvelerinde kalite kaybına neden olan *Alternaria alternata*'ya karşı test edilmiştir. Test edilen konsantrasyonlarda hem AITC hem de MITC'in *Alternaria* kaynaklı çürümeleri % 82.73 ile % 88.67 arasındaki oranlara kadar düşürdüğü gözlemlenmiştir. Uygulamalar sonrasında AITC, BITC ve MITC'in kavunlarda hasat sonrası hastalıkların kontrol edilmesi amacıyla sentetik fungusitlere alternatif mücadele yöntemi olabileceği bildirilmiştir.

Santos ve ark. (2010), uçucu bir bileşik olan allyl isothiocynate (AITC)'nın fumigant özelliklerinden faydalananarak, özellikle depolarda mısır tanelerinde sorun olan mikotoksin üreticisi funguslara karşı 30 günlük depolama süresince patojenler tarafından kontamine olmuş mısırdaki mikotoksin üretimini azaltmak için AITC'nin gaz

fazında kullanımını araştırmışlardır. Mısır taneleri fungus gelişimine oldukça duyarlı olup mikotoksinler yaygın olarak depolanmış mısırdaki bulunmaktadırlar. Sonuç olarak yapılan denemelerin başarılı olduğu, fungus gelişmesi ve bunların ürettikleri mikotoksinlerin oluşumunun engellendiği bildirilmiştir.

Otoni ve ark. (2014), yapmış oldukları bir çalışmada, allyl isothiocyanate (AITC)'nin *Aspergillus flavus*'a karşı antifungal etkisini değerlendirmeyi, yer fıstıklarında *Aspergillus flavus* sporulasyonunu kontrol etmek için AITC bileşenlerini içeren bir paket geliştirmeyi ve 90 günlük bir süreçte ürün ve paket boşluklarındaki kalıntı AITC miktarını ölçmeyi amaçlamışlardır. *In vitro* şartlarında difüzyon ve uçucu duyarlılık testleri, *A. flavus*'a karşı 0.215 ppb AITC'in etkinliğini göstermiştir. *In vitro* ile gerçek gıda analizlerinde farklı bileşenlerinden kaynaklı farklı antimikrobiyal verim görüldüğü için AITC ile uygulanmış paketler, 25 ° C'de 90 gün yer fıstıklarıyla depolanmıştır. Bir hafta sonunda *Aspergillus flavus*'un canlı kalma oranında 10 kat azalma görülmüş ve 60 gün sonraki canlı kalma 4.81 log olacak kadar azalmıştır. Depolama periyodu boyunca ürünlerde kalıntı AITC saptanmazken, paket boşluklarındaki uçucu AITC ise zamanla azalmıştır. Uçucu AITC'nin %92.4'ü ilk 15 gün içerisinde azalmıştır ve 30 gün sonra artık AITC tespit edilmemiştir. Yapılan bu çalışmada AITC'nin *A. flavus* sporulasyonunu geciktirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca yer fıstıklarının yerleştirileceği bu paketlerin, AITC'nin antimikrobiyal bir madde olarak kullanılabilmesi adına umut vaat eden bir sistem olduğu bildirilmiştir.

Okano ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada, depolanmış mısırlarda aflatoksin üreticisi fungusları kontrol etmek amacıyla ticari bir hardal tohumu özütü (Wasaouro®) ile allyl isothiocyanate (AIT)'in buhar etkisinin etkinliğini belirlemeyi amaçlamışlardır. Kapalı konteynir içerisindeki AIT konsantrasyonu, 14. günde 54.6 ng/mL ile en üst seviyesindeyken 42. günde 21.8 ng / mL'de seviyesinde kalmıştır. AIT çeşitli aflatoksijenik funguslarla bulaşık steril edilmiş ve edilmemiş mısır tanelerinde, fungusların gelişmelerini gözle görülür bir şekilde engellemiştir. Bununla birlikte örnekleri kültüre alma yoluyla ile *Aspergillus penicillioides* ve *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus glaucus* grubu gibi funguslar tespit edildiği bildirilmiştir.

Nazareth ve ark. (2016), yapmış oldukları çalışmada, allyl isothiocyanate (AITC) bileşiğini kullanarak, buğday unu içerisinde *Aspergillus parasiticus* (aflatoksin üreticisi) ve *Fusarium poae* (beauvercin ve enniatin üreticisi) tarafından mikotoksin üretiminin

engellenmesini amaçlamışlardır. Buğday unu (2gr) ile doldurulmuş petri kapları, *A. parasiticus* veya *F. poae*'nin her biri için 10^4 konidi/g olacak şekilde inokulasyon yapılmış ve örnekler 1 L cam kavanozlara konulmuştur. Kavanozlar hava geçirmeyecek şekilde kapatılmış ve 23 ° C'de 30 gün boyunca tutulmuşlardır. Mikotoksinlerin tanısı ve miktarları LC-MS/MS yoluyla yapılmıştır. Denemeler sonunda 0.1 µL/L allyl isothiocyanate (AITC)'ın bile mikotoksin üretimini %6.9–23 oranında engelleme sağladığı bildirilmiştir.

Tracz ve ark. (2017), *Aspergillus parasticus*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium verticillioides*, *Alternaria alternata* ve *Gibberella zeae* fungusları tarafından mısır tohumlarında oluşturulan mikotoksin üretiminin engellenmesi adına allyl isothiocyanate (AITC) bileşiğinin antifungal etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Mısır tohumları 48 saat boyunca 50, 100 veya 500 mL / L'de gaz halindeki AITC ile muamele edilmiştir. Daha sonra, şişeler 24 saat boyunca şişeler açılmıştır ve 100 gr mısıra, her iki fungus türünden 105 konidi/g olacak şekilde bu mısırlara inoküle edilmiştir. Şişeler 30 gün boyunca 23 C'de tutulmuş ardından mısırlardaki mikotoksin miktarı ile AITC kalıntısı değerlendirilmiştir. AITC kullanılmayan tüm kontrol gruplarında mikotoksinler üretilirken AITC muamelesi yapılmış gruplarda 12 mikotoksinin üretimi tespit edilemeyen seviyelerde tutabilmiştir. AITC penetre edilmiş tohumlarda 30 dakika sonra (~16%) kalıntı dozu belirlenmiş ve bunlar uzun bir koruma periyodu sergilemişlerdir. Yapılan bu çalışmayla gaz halindeki AITC'nin mısırdaki mikotoksin üretimini önlemek için potansiyel bir koruyucu madde olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Nazareth ve ark. (2018), depolanmış mısırlarda *Aspergillus parasiticus* ve *Fusarium verticillioides*'in ürettiği oldukları mikotoksinleri (aflatoxins B1, B2, G1 and G2, fumonisins B1 and B2) ve bu fungusların gelişimlerini engellemek amacıyla allyl isothiocyanate (AITC)'ın antifungal etkinliğini değerlendirmişlerdir. AITC'nin 50 µL/L konsantrasyonundaki AITC uygulaması sonrası kontrollerle karşılaştırıldıklarında *A. parasiticus* ve *F. verticillioides* sırasıyla, 3.17 log (CFU/g) ve 3.9 log (CFU/g) olarak belirlenmiş ve 180 günün ardından fungus popülasyonu önemli derecede azalmıştır. Ayrıca AITC'nin 10 ve 50 µL/L uygulaması, her dönem için fumonisin B1 üretimini engellemiştir. AITC uygulanmış gruplarda ise aflatoksinler tespit edilmemiştir.

2.3. Mikokotoksin Oluşturan Fungal Etmenlere Karşı Bakterilerle Biyolojik Mücadele Üzerine Yapılan Çalışmalar

Bitkilerde hastalık oluşturan patojenlerle mücadelede başvurulan yöntemlerden biri de biyolojik mücadele olup (Tjamos ve ark. 2010), yapılan literatür araştırmalarında, özellikle kurutmalık biberlerde mikotoksin oluşturan fungal kökenli patojenlerle biyolojik mücadelede antagonist bakterilerin kullanıldığı çalışmalara oldukça kısıtlı sayıda rastlanılmıştır. Farklı bitkilerde meydana gelen fungal kökenli hastalıklarla biyolojik mücadelede çeşitli bakteri türlerinin kullanıldığı çok sayıda çalışma karşımıza çıkmaktadır. Bundan dolayı, özellikle bu çalışmada hedef olarak belirlenen patojenler (*Fusarium incarnatum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*) ve bu patojenlere yakın türlere karşı mücadelede bazı antagonist bakterilerin kullanıldığı çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

Sid ve ark. (2003), İspanya'nın farklı üretim alanlarındaki biberlerden izole ettikleri ve saflaştırdıkları 500 den fazla bakteri izolasyonunu, *in vitro* ortamında *Phytophthora capsici* ve *Alternaria alternata*'ya karşı antifungal etkinliklerini değerlendirmişlerdir. İzolatlardan 60 tanesi (% 12), patojenlerden en az birine karşı engelleme zonu oluştururken 10 tanesi test edilen her iki patojen üzerinde de güçlü engelleme etkisi göstermiştir. Bu 10 izolat daha sonra *in vivo* şartlarında biber bitkilerinde *Phytophthora* kök çürüklüğü ve *Alternaria* yaprak lekelerinin biyolojik kontrolü için seçilmişlerdir. Bu izolatlardan HS93, LS234, LS523 ve LS674 olarak adlandırılan 4 tanesi sırasıyla, *P. capsici* kök çürümesini % 80, 51, 49,54 ve *A. alternata* yaprak lekelerini %54, 74, 62 ve 53 oranında azaltmıştır. Ayrıca HS93'ün muhtemelen, *Bacillus subtilis* LS234, LS523 ve LS674 ise *Bacillus licheniformis* türüne ait oldukları bildirilmiştir.

Zhang ve arkadaşları (2009), *Fusarium oxysporum* ve *F. graminearum* tarafından oluşturulan hastalıkların tedavisinde kullanılan kimyasal pestisitlere alternatif olarak antagonist bakterilerin etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Soya fasulyesi ve mısır köklerinden izole edilen 22 *Bacillus subtilis* izolatu bu fungusların misel gelişimlerini engellenmesini değerlendirmek amacıyla ikili kültür denemeleriyle test edilmiştir. Bütün izolatların, *F. oxysporum*'un misel gelişimini yaklaşık % 17-48 ve *F. graminearum*'un misel gelişimini % 10-32 oranında azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca daha

etkili 10 *Bacillus subtilis* izolatının ise spor çimlenmesini, *F. oxysporum* için % 20-48, *F. graminearum* için ise % 14-32 oranlarında engellediği belirlenmiştir. Sonuçta, tanımlanan *Bacillus subtilis* izolatlarının toprağa verilmek suretiyle soya fasulyesinde *Fusarium*'lar ile mücadelede pestisitlere alternatif olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Pastor ve ark. (2012), domates ve biber bitkisinin rizosfer topraklarından izole ettikleri fluorescent *Pseudomonas spp.* türlerini fungal patojenlere karşı potansiyel antagonistler olarak *in vitro* şartlarında değerlendirmişlerdir. Bakteri türleri yaprak yanıklığı (*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*), güney yanıklığı (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), ve kök çürüklüğü (*Fusarium solani*) etmenlerine karşı test edilmişlerdir. Seçilen bakteri türleri özellikle %25 TSA ortamında *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* gelişimini engellemiştir. *Sclerotium rolfsii* Sacc. ve *Fusarium solani* üzerindeki antagonist etkinin ise King B ortamında daha büyük olduğu bildirilmiştir.

Raut ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada mikrobiyal antagonistler kullanarak *Aspergillus niger* gelişimini ve bu fungus tarafından oluşturulan mikotoksin oluşumunun engellenmesini amaçlamışlardır. İki *Bacillus*, bir *Trichoderma* ve üç *Pseudomonas* olmak üzere 6 mikrobiyal bakteri türü biyokontrol etkinlikleri açısından değerlendirilmişlerdir. Bakteri türlerinin ürettikleri bileşiklerin antifungal etkinlikleri kuru maddenin tespiti, mikroskopik gözlemler ve enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) testisiyle gözlemlenmiştir. Test edilen türlerin dışında, *B. amyloliquefaciens* 1014 kültürünün *A.niger*'e karşı daha yüksek antifungal aktiviteye sahip metabolitler ürettiği belirlenmiştir. Sonuç olarak *B. amyloliquefacines* 1014'ün metabolitlerinin termostabil olduğu ve sterilizasyondan sonra antifungal aktiviteyi devam ettirdiği bildirilmiştir.

Song ve ark. (2014), *Fusarium cf. incarnatum*'un neden olduğu ginseng kök çürüklüğüne karşı biyolojik mücadele amacıyla, ginseng köklerinden ve çeşitli topraklardan izole edilen 392 bakteri izolatının antifungal etkinliğini değerlendirmişlerdir. Patojene karşı güçlü antagonist özelliklerinden dolayı 12 bakteri izolatı seçilmiştir. Test edilen bakteri izolatları içerisinde B2-5 izolatı patojenin miselyal gelişimini en fazla engelleyen izolat olurken bunu B8 izolatı izlemiştir. Yapılan tür teşhisi sonrasında B2-5 izolatının *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (B-25)'in *Fusarium cf. incarnatum* 'un

neden olduğu ginseng kök çürüklüğüne karşı biyolojik mücadelede bir mikrobiyal madde olarak iyi bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir.

Zhu ve ark. (2015), tütünden izole edilmiş bir *Bacillus megaterium* izolatı olan Strain L2 izolatını, tütünlerde kahverengi nokta hastalığı etmeni *Alternaria alternata* 'nın miselyum büyümesini, spor çimlenme oranını ve spor çıkışını sınırlandırmak üzere uygulamışlardır. Sonuçlar, bakterilerin yaklaşık % 1.5-% 20'lik bir konsantrasyonunun hiflerin gelişimini etkili bir şekilde önleyebildiğini göstermiştir. Ayrıca bakteri yoğunluğu ne kadar fazla olursa, *A. alternata* üzerindeki etkinliğin de o kadar fazla olduğu bildirilmiştir.

Catello ve Massimo (2015), domateslerde erken yanıklık etmeni *Alternaria alternata*'ya karşı bazı Solanaceae türlerinden izole edilmiş 93 bakteri izolatının antifungal etkinliği değerlendirmişlerdir. En aktif 20 tür çeşitli metodlarla karakterize edilmiştir. Seçilen dört izolat ile yapılan denemelerde *A. alternata*'nın domates üzerindeki hastalık şiddetini azalttığı bildirilmiştir. Yapılan mikroskopik çalışmalarla, fungus hiflerinde *Bacillus* kaynaklı deformasyonların oluştuğu belirtilmiştir.

Kumari ve ark. (2017), nohut rizosferinden izole ettikleri 69 *Rhizobacteria*'yı, *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris*'e karşı antagonistik potansiyelleri açısından *in vitro* koşullarda değerlendirmişlerdir. Bunlardan 30 tanesi patojen fungusun gelişimini sınırlandırmış ve 13 tane güçlü antagonist ise fonksiyonel özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Potansiyel Ps14c izolatı tek başına ve *Mesorhizobium ciceris* ile birlikte nohut tohumlarına uygulanmasıyla birlikte bitkilerde, kontrol gruplarına (% 74) göre daha az solgunluk (sırasıyla % 48 ve % 28) görüldüğü ayrıca bitkinin gelişmesinde gözle görülür bir artışın yaşandığı bildirilmiştir.

Oniel ve ark. (2018), *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsi antagonist bakterilerin *Botrytis cinerea* ve *Alternaria alternata*'nın misel gelişmesi üzerine olan etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu bakteriler ayrıca depolanmış yaban mersini üzerindeki *Alternaria* çürüklüğünün ve bunların oluşturdukları hifsel yapıların engellenmesi açısından da değerlendirilmiştir. Sonuç itibarıyla çeşitli antagonist bakterilerin, *B. cinerea* ve *A. alternata*'nın misel gelişimini sırasıyla %42 ve %27'ye kadar azalttığı gözlenmiştir. Bu bakterilerin, ayrıca her iki türün yaban mersini üzerinde oluşturdukları çürümelerin sıklığını ve şiddetini de sırasıyla %50 ve %64'e kadar azalttığı görülmüştür.

Çalışma sonuçlarıyla antagonistik bakterilerin, yaban mersininde hasat sonrası meyve çürümelerinin kontrolü için potansiyel bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar, Kimyasalar ve Aletler

Çalışmanın ana materyalini oluşturan fungal etmenler *Fusarium incarnatum*, *Alternaria alternata* ve *Aspergillus niger* Hatay ilinin önemli biber ekim alanlarında (Antakya, Altınözü, Reyhanlı) ve Antakya ilçesinde kurutmalık ürün ve baharat satışı yapan aktarlarda ve halk pazarlarında satılan kırmızı biber örneklerinden Patates Dekstroz Agar (**PDA**) üzerinde izole edilmiş olup, tür teşhisleri gerek morfolojik gerekse moleküler yöntemlerle yapılmıştır. Fungal etmenlerin patojenite testi sağlıklı biber meyveleri üzerine inokule edilmek suretiyle yapılmış ve benzer simptomlar elde edilmek suretiyle patojenite düzeyleri teyit edilmiştir. Fungal izolatlar PDA besi yerinde, +4 °C de muhafaza edilerek denemelerde kullanılmıştır. Hastalık etmenlere karşı etkinliği belirlenen antagonist bakteri izolatları ise kurutmalık biberlerin temin edildiği bölgelerden alınan sağlıklı taze ve yine hastalıklı kuru biberlerin alındığı yerlerdeki sağlıklı kurutmalık biberlerin içsel (endofitik) dokularından seçici King's B Agar (**KB**) ve genel Trypic Soybean Agar (**TSA**) besi ortamlarına üzerinde izole edilmiş olup, tür teşhisleri gerek morfolojik gerekse moleküler yöntemlerle yapılmıştır.

Çalışmanın bir diğer önemli ana materyallerinden farklı kimyasal yapılarıdaki isothiocyanate(**ITC**)'lerden; methyl isothiocyanate (**MITC**), 2-propenyl (Allyl) isothiocyanate (**AITC**), benzyl isothiocyanate(**BITC**) ve ethyl isothiocyanate (**EITC**)'lar saf olarak ticari firmadan(Sigma-Aldrich) sağlanmıştır. Bitki uçucu yağları ise daha önce yapılan çalışmalarda etkinliği ve kimyasal bileşenleri belirlenmiş olan ve -20 °C muhafaza edilen bitki uçucu yağlardır.

Çalışmanın diğer materyallerini mikoloji laboratuvarı alet-ekipmanları, çeşitli cam ve plastik laboratuvar malzemeleri ve kimyasal maddeler oluşturmuştur.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları

Çalışmada kullanılan besi ortamları kullanılmadan önce 121°C’de 15 dk. otoklav edilmiştir. Fungal hastalık etmenleri ile antagonistbakteriyel etmenlerin izolasyonu, tanısı ve etkinliklerinin belirlendiği çalışmalarda kullanılan King’s B Agar (**KB**), Trypic Soybean Agar (**TSA**) ve Patates Dekstroz Agar (**PDA**) gibi besi yerlerin hazır ticari olarak (Merck, Darmstad, Germany)satın alınmak suretiyle, Karanfil Yaprak-Parçacık Agar (**Carnation Leaf-Piece Agar, CLA**) ise laboratuvarda yapılarak çalışmalarda kullanılmıştır (besi yerlerinin içerikleri Ek-1 de verilmiştir).

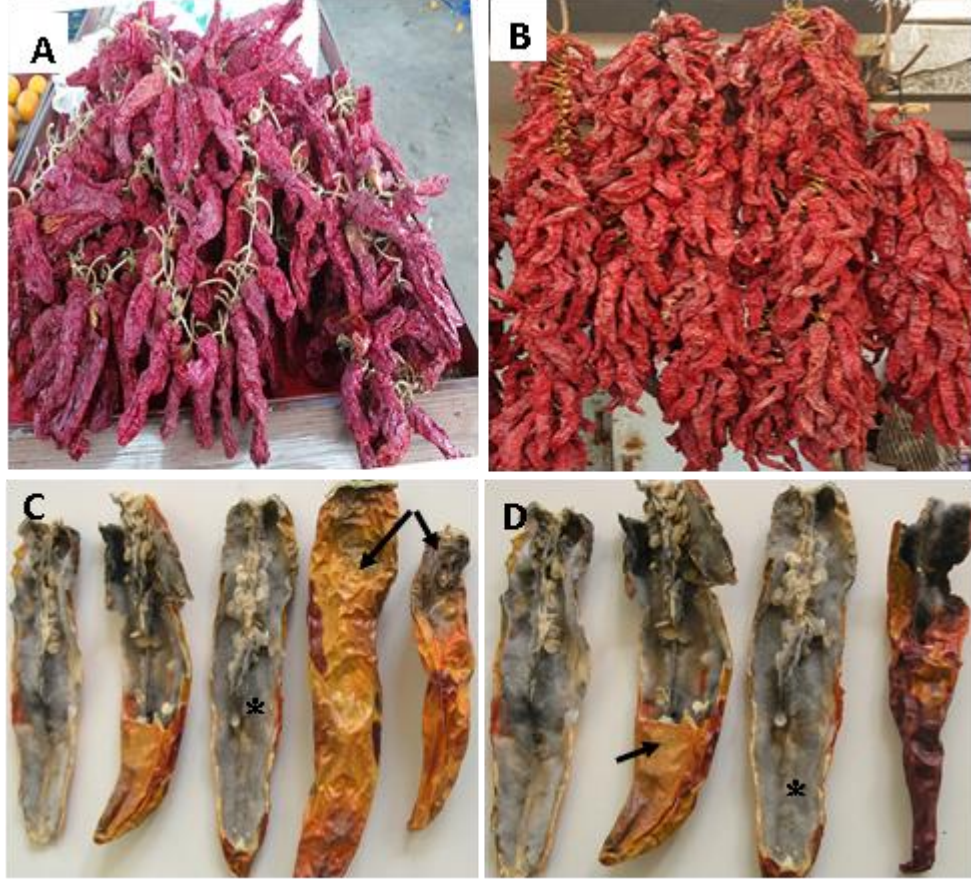
3.2. Yöntem

3.2.1. Fungal Hastalık Etmenlerinin Kurutmalık Biberlerden İzolasyonu ve Tanılanması

Çalışmalarda kullanılan ve izolasyon çalışmalarında en sık karşılaşılan fungal hastalık etmenlerinden *Fusarium incarnatum*, *Alternaria alternata* ve *Aspergillus niger* izolatları 2017 yılında Hatay ilinin önemli biber ekim alanlarında (Antakya, Altınözü, Reyhanlı vb.) ve Antakya ilçesi aktar ve pazar yerlerinden elde edilmiştir (Şekil 3.1).

Özellikle taze tüketime ve kurutmalık baş/toz-yaprak biber meyvelerinin yetiştiriciliği yapılan Antakya, Altınözü, Reyhanlı ilçelerindeki tarlalarda hasat öncesi, bitki üzerinde kurumuş veya çürümüş, hasat sonrasında ise aktar ve pazaryerlerinden temin edilen şüpheli kurutulmuş meyveler steril kabin içerisinde aseptik olarak ikiye ayrılmış (Şekil 3.1C,D), infekteli doku parçaları, sağlam dokuyu da içerecek şekilde 3-5 mm büyüklükte kesilerek 50 µg ml⁻¹ streptomisin sülfat antibiyotik içeren seçici PDA besi yeri içeren petri kaplarına, her petriye 3 parça olacak şekilde, yerleştirilmiştir. Ekimi yapılan petriler 24°C’de 3-5 gün inkubasyona bırakılmıştır. Besi yerleri üzerinde dokulardan gelişen fungal izolatların uç kısmından alınan misel parçaları yeni besi yerlerine aktarmak suretiyle saflaştırmalar yapılmıştır. *Fusarium* türlerinin teşhislerinde PDA besiyerinin (koloni morfolojileri, pigmentasyon ve büyüme oranları baz alınmış) yanı sıra, klamidospore, mikro ve makrokonidilerin teşvik edildiği CLA besi yeri kullanılmıştır ve ön teşhisleri yapılmıştır (Booth, 1971; Ellis, 1971; Domsch ve ark., 1980; Nelson ve ark., 1983; Dix ve Webster,1995; Erwin ve Ribeiro, 1996; Barnett ve

Hunter, 1998; Dugan, 2006). Denemelerde elde edilen 3 fungal izolatın tek spordan elde edilmiş kültürleri kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Antakya ilçesi aktar ve halk pazar yerlerinde satışı yapılan sağlıklı görünüşte kurutulmuş (A ve B) biber meyveleri. (C ve D) Tipik hastalık belirtisi (ok) taşıyan tarla ve aktarlardan temin edilmiş kurutulmuş biber meyveleri ve iç kısımlarda görülen misel gelişimleri (*)

Elde edilen fungal izolatların moleküler teşhisi ITS4/ITS5 primer çifti ile rDNA'nın ITS bölgesi ve translation elongation factor 1 (EF1-728F ve EF1-986R) primer çiftleri ile amplifiye edilen nükleotid sekansı kullanılarak BLAST analizi ile doğrulanmıştır.

Bu amaçla, morfolojik olarak ön teşhisleri yapılmış izolatlara patojenisite testleri uygulanmış ve hastalık belirtilerinden geri izole edilen izolatların besi ortamından alınan misellerinde (100 mg) toplam genomik DNA izolasyonu yapmak için, sıvı nitrojen içerisinde toz haline getirilmiştir. Bu misellerden genomik DNA izolasyonu DNeasy Mini Kiti (Qiagen, GeneMark Teknoloji Co, Valencia, CA, Katalog No.

69104) ile üretici firmanın önerdiği protokollere göre kullanılarak yapılmıştır. İzolatların rDNA'ları *A. alternata* ve *A. niger* için ITS (ITS4/ITS4)ve *F. incarnatum* için elongation factor 1 (EF1-728F ve EF1-986R)primerleri (Carbone and Kohn, 1999) ile PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR koşulları ve programı Geiser ve ark. (2004)'e göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 94 °C'de 2 dakika denatürasyondan sonra, 94°C'de 30 saniye, 55-58 °C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniyeden oluşan 35 döngü ve 72 saniyede 10 dakika amplifikasyon koşulları uygulanmıştır.

PCR ürünleri, %1-1,5'lik agaroz jel ile elektroforeze tabi tutulmuş ve EtBr ile boyanarak jel görüntüleme sisteminde oluşan bandlar görüntülenmiştir.

3.2.2. Fungal Hastalık Etmeni İzolatların Patojenisite Testleri

Hastalıklı biberlerden elde edilen *Fusarium incarnatum*, *Alternaria alternata* ve *Aspergillus niger* izolatları PDA besiyeri üzerinde 7 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. Fungusların inokulum süspansiyonu, fungusun tamamen gelişerek yüzeyini kapladığı 5 petri içeriğinin 500 ml steril saf suda düşük hızda (200 rpm) 1 dakika karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan süspansiyonun konsantrasyonu 10^5 spor/ml(olacak şekilde ayarlanmıştır. Patojenisite çalışmaları, sağlıklı taze kırmızı biber meyveleri üzerinde 2 farklı şekilde uygulanan inokulasyon yöntemleri ile araştırılmıştır.

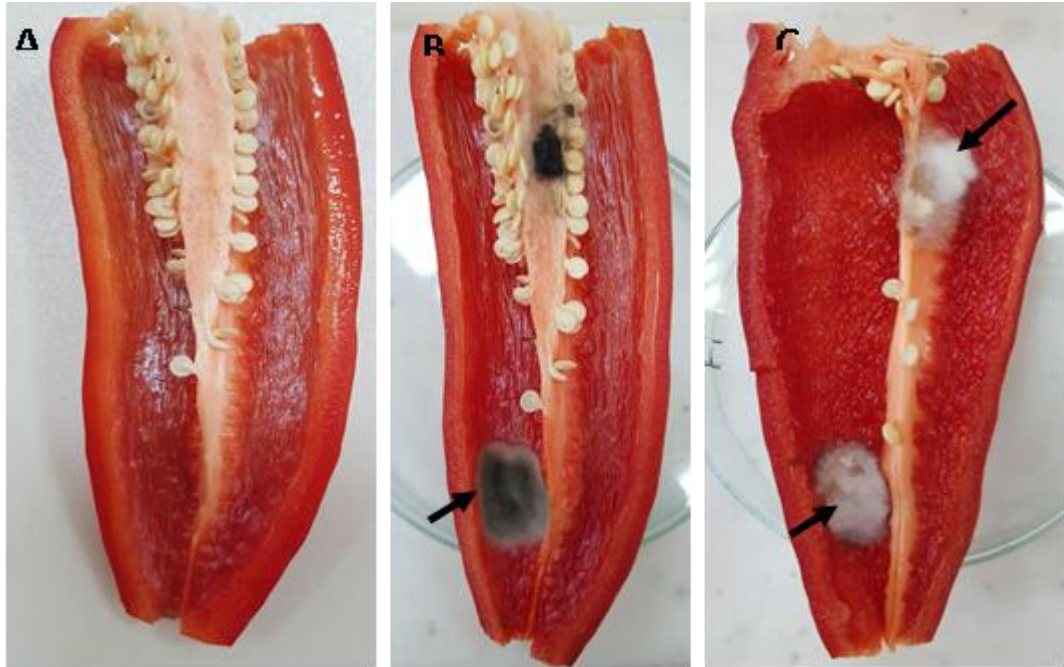
Birinci yöntemde spor süspansiyonları sağlıklı olgunlaşmış kırmızı biberlere hiçbir şekilde zarar vermeden doğrudan meyve içerisine (50 µl/biber) enjeksiyon edilmesi yöntemiyle bulaştırılmıştır. İkinci yöntemde sağlıklı olgunlaşmış kırmızı biber meyveleri uç kısmından steril bistürü ile kesilip, aseptik olarak doku içerisine 1 adet 6 mm çapında 3-5 günlük petri kültüründen steril olarak alınan fungus misel disklerinin biber meyvesi içerisine yerleştirilmesi ve sonradan kesilen dokunun parafilm ile sarılması ile yapılmıştır (Şekil 3.2).

Her iki şekilde de inokulasyonu yapılmış biber meyveleri önce 15x25x15 cm ebatlarında steril plastik saklama kapları içerisine konulmuştur. Kapların tabanına önceden steril su ile ıslatılmış kurutma kağıtları yerleştirilerek gerekli nem koşulları sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış ve kapağı kapalı kutular daha sonra 16:8

aydınlık/karanlık foto periyoda, 20-24 °C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörlerde 5-10 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.2. Hastalık etmenlerin sağlıklı biber meyvelerinde patojenite testi



Şekil 3.3. Kurutulmuş biberlerden izole edilmiş hastalık etmenlerinin patojenite testi sonucu oluşan hastalık belirtileri. (A), sağlıklı kontrol meyve; (B), *A. alternata* ve (C) *F. incarnatum* hastalık etmeninin patojenite testi sonucu meyve içinde inokulasyon noktalarında (ok) oluşan belirtiler

İnokule edilen biber meyveleri inokulasyondan 10 gün sonra inokulasyon noktaları (doku içleri) açılarak hastalık belirtileri esas alınarak hastalık oluşumu değerlendirilmiştir. Hastalık etmenleri inokulasyon noktalarında ortaya çıkan belirtilerden (Şekil 3.3) tekrar izole edilmiş ve orijinal izolatlarla karşılaştırılmıştır. Orijinal izolatlarla benzeyen re-izolatlarla benzer teşhis yöntemleri uygulandıktan sonra türleri teyit edilen izolatlar denemelerde kullanılmak üzere +4 °C de PDA besi yerlerinde korunmuştur.

3.2.3. Sağlıklı Kurutulmuş ve Taze Biber Meyvelerinden Aday Endofit Bakterilerin İzolasyonu ve Tanınması

Çalışmalarda kullanılan antagonist karakterli endofitik bakteriler Hatay ilindeki hastalıklı biber örneklerinin temin edildiği aktar ve Pazar yerleri ile bu biberlerin temin edildiği bölgelerden temin edilen sağlıklı taze olgun kırmızı biberlerin içsel dokularından elde edilmiştir.

Endofit bakterilerin araziden alınan sağlıklı biber meyvelerinin dış yüzeyleri ilk aşamada temiz çeşme suyu ile iyice yıkanmış ve %70'lik etil alkol ile silinerek dezenfekte edilmiştir. Daha sonra bu meyveler steril kabin içerisinde steril bistürü ile kesilerek biberlerin içsel doku yüzeyleri steril 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi içine konulmuş ve 30 dak. 200 rpm orbital çalkalayıcı içerisinde çalkalamaya bırakılmıştır. Daha sonra buradan alınan süspansiyonlar seri olarak sulandırıldıktan (10²-10⁶) sonra seçici KB besi yerlerine bagetle yayılmak suretiyle besi yerlerinde izole edilmişlerdir (Şekil 3.4).

İzole edilen petri kapları 26 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılarak bakteri gelişimi kontrol edilmiştir. Farklı seçici ve genel besi yerlerinde gelişen morfolojik olarak birbirinden farklı görülen bitki örneğinin temsil edecek sayıda bakteri kolonileri daha sonra teşhis ve çalışmalarda kullanılmak üzere uygun besi yerleri üzerinde tek koloniden saflaştırılmıştır.

Her bir izolat, rutin çalışmalar için uygun besi yeri içeren petri kabında (6 cm) veya eğik Agarda +4 °C de kısa süreli veya steril %40'lık steril Gliserol içeren Cryo Eppendorf tüpler içerisinde -80 °C de saklanmıştır.



Şekil 3.4. Sağlıklı kurutulmuş biber meyvelerinin (A) içsel dokularından elde edilen bakteri süspansiyonlarından gelişen (B) farklı morfolojik görünüşlü endofit bakteri kolonileri (ok)

Elde edilen antagonist aday endofit bakteri izolatlarının fitopatogen olup olmadığını belirlemek amacı ile tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) testine tabi tutulmuştur (Lelliot ve Stead, 1987). TSA besiyerinde 24-48 saat geliştirilen aday bakteri izolatları ve Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan ve tanılması yapılmış bitki patojeni izolat (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Psp 12 izolatı) kültürlerinin steril 50 mM $MgCl_2$ tampon çözeltisi içinde 10^8 hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonları steril bir enjektör yardımıyla genç tütün (*Nicotiana tobaccum*) yaprağının (8 haftalık) damar aralarına alt yüzeyinden enjekte edilmiştir. İnokulasyon her bakteri izolatı bir damar arasına gelecek şekilde ve izolatlar arasında bir damar boşluk bırakılmak suretiyle yapılmıştır. İnokulasyondan 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif (test edilen izolatın bitki patojeni olduğunu gösterir) olarak kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

Tütünde HR oluşturmeyan aday antagonist bakteri izolatları daha sonra patates dilimi üzerinde yumuşak çürüklük testine tabi tutulmuştur (Lelliot ve Stead, 1987). Patatesler, %3'lük NaOCl'de 1 dakika bekletilerek dezenfekte edilmiş, kabukları

soyulduktan sonra steril bistürü ile ortadan ikiye kesilmiş, daha sonra tekrar steril bir bistürü ile 1 cm eninde dilimlenmiştir. Patates dilimleri daha sonra steril ıslak filtre kâğıdı içeren steril petriler içine yerleştirilmiştir. Hazırlanmış olan patates dilimleri üzerine öze dolusu HR negatif bakteri izolatları doku üzerinde açılan küçük yaralanmış doku içerisine bulaştırılmıştır. Bulaştırılmış dilimlerin yer aldığı petriler 26 °C 2 günlük inkübasyona bırakılmış, daha sonra inokulasyon noktasında çürümelerin varlığı yönünden değerlendirme yapılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987). Kontrol olarak Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan ve *Pectobacterium caratovorums* subsp. *caratovorum* olarak tanımlanmış izolat kullanılmıştır.

Gerek bütün HR gerekse patates dilimi üzerinde yumuşak çürüklük testlerinde negatif sonuç veren izolatların ön seçimleri için morfolojik (koloni rengi, koloni formu, hücre morfolojisi) ve biyokimyasal (gram reaksiyonu, oksidaz ve katalaz üretimi, levan oluşumu) testler yapılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987). Biyokimyasal testlerde benzerlik gösteren izolatlardan gerekli ön seçimler yapıldıktan sonra kalan tüm izolatların kesin tür teşhisleri amacıyla MALDI-TOF cihazının (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanıldığı metod kullanılmıştır (Pavlovic ve ark., 2012; Aktan, 2018).

Saf kültürden alınan ve TSA besi yeri üzerinde 24-36 saat gelişen saf bakteri kolosinden kürdan yardımıyla bir miktar bakteri kütlesi içerisinde 300 µl steril su bulunan eppendorf tüpleri içerisine eklenmiş ve tüpler vortex cihazında karıştırılarak bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Daha sonra tüplerin içerisine 900 µl saf ethanol (Merck, Damstrad, Germany) eklendikten sonra karışım 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış oluşan pellet tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Herhangi bir şekilde kalan ethanol kalıntısı görülmüş ise pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve oluşan pelletin oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır (yaklaşık 5 dak. kadar). Pellet kuruduktan sonra üzerine 30 µl %70 formik asit (Merck, Darmstad, Germany) eklenerek 13.000 rpm'de 1 dakika tekrar vortekslenmiştir. Ardından 30 µl acetonitril eklenmiş tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika vortekslenerek karışım iyice çözdürülmüştür. Son olarak süpernatant'dan 1µl alınarak örnek plakasındaki (target) noktalara iki tekrarlı olacak şekilde eklenmiş, oda sıcaklığında yaklaşık 3-5 dak.kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler üzerine 1 µl HCCA Matrix (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) solüsyonu (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) eklenmiş ve tekrar beklenerek (3-4 dak.) kuruması sağlanmıştır.

Cihazın kalibrasyon standardı olarak Bruker's Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanılmıştır. Daha sonra örnekler MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) cihazına Flex Control Software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) yazılımı ile yüklenmiştir. Her bir spektrum otomatik modda örneklerin iyonlaşması için gereken minimum lazer gücü olan 500 lazer ışını ile elde edilmiştir. Spektrum 2-20 kDa aralığındaki m/z (kütle/yük) oranında analiz edilmiştir. Mikroorganizma kütüphanesi olarak BIOTYPER™ 1.1 software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanılmıştır.

MALDI-TOF cihazı tarafından belirlenen teşhisleri firma tarafından önerilen değerlere göre yapılmıştır. Teşhis sonucunda ortaya çıkan skor değeri 2.30-3.0 aralığında tanının tür düzeyinde oldukça güvenilir olduğu; 2.00-2.299 aralığında kesin cins düzeyinde güvenilir, tür düzeyinde yüksek güvenilir olduğu; 1.70-1.999 arasında tanının cins düzeyinde güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde olduğu; 1.7 değerinden aşağı olan değerler ise güvensiz tanı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine ITC Bileşikleri, Bitki Uçucu Yağlar ve Antagonist Bakteri İzolatlarının *in vitro* Antifungal Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.4.1. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine ITC ve Bitki Uçucu Yağların *in vitro* Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi

Çalışmalarda kullanılan uçucu yağlar kurutulan bitkilerin yaprak (*Thymus vulgaris*, *Thymbra spicata*, *Origanum syriacum*, *Laurus nobilis*, *Eucalyptus camaldulensis*) ve tohumlarından (*Foeniculum vulgare*) daha önceden bildirildiği şekilde Clevenger tipi uçucu yağ çıkartma aletinin yardımı ile 3 saatlik buhar distilasyonu ile elde edilmiş olup (Soylu ve ark., 2010), elde edilen uçucu yağlar içerisinde anhidroz sodyum sülfat bulunan koyu renkli cam şişelerde -20 °C de korunmuştur. Farklı kimyasal yapıdaki ITC'ler ise saf olarak firmalardan temin edilmiş ve antifungal etkinlik çalışmalarında kullanılmıştır.

Uçucu yağların ve ITC'lerin fungal etmenlerin misel gelişimine antifungal etkinliğinin buhar etkisi, 9 cm çapındaki steril petri kaplarında genel fungus ortamı olan

PDA ortamı üzerinde araştırılmıştır. PDA içeren (20 ml/petri) petri kabının merkezine mantar delici ile alınan 5 günlük fungalkültürlerinin 6 mm çapındaki diskleri miselli yüzeyi PDA ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Uçucu yağların (0.25-40.0 µl/petri) ve ITC'lerin farklı konsantrasyonları (0.01-0.24 µl/petri), petri kabının kapağının merkezine yapıştırılmış steril filtre kağıdına (6 mm çapında) pipet yardımı ile emdirilmiş, daha sonra petri kabının boşlukları parafilm (2-3 kez) ile kapatılıp, ters çevrilerek (kapak altta kalacak şekilde) 25 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak kabul edilen aynı şekilde inoküle edilmiş petri kapaklarına uçucu yağ yerine saf su damlatılarak aynı işlemler uygulanmıştır. Değerlendirmeler kontrol olarak kabul edilen petrilerinde fungus gelişimi petriyi tamamen kapladığı zaman, uygulama yapılmış tüm petrilerdeki fungal koloni çaplarının ölçülmesiyle yapılmıştır. Her bir uçucu yağın farklı konsantrasyonlarında engelleme oranı, (%) Abbott formülüne göre hesaplanmıştır.

$$\text{Engelleme (\%)} = [(KFG - UFG) / KFG] \times 100 \quad (3.1)$$

KFG = Kontrol petrilerdeki fungal gelişim (mm)

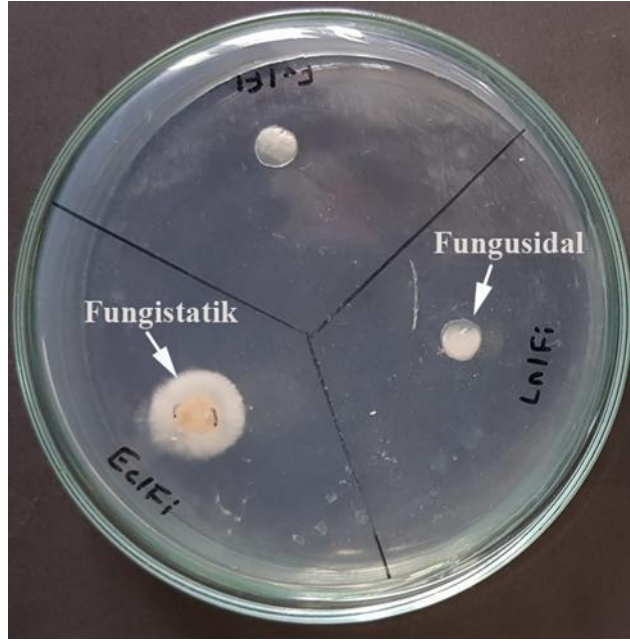
UFG = Uygulama yapılmış petrilerdeki fungal gelişim (mm)

Denemelerde her petri 1 tekerrür ve her konsantrasyon 3 tekerrür olacak şekilde Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre kurulmuştur. Her deneme en az 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

3.2.4.2. Bitki Uçucu Yağlar ve ITC Bileşenlerinin Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Minimum Engelleme Konsantrasyonlarının Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi

Uçucu yağ ve ITC'lerin misel gelişimi üzerine buhar etkilerinin belirlendiği çalışmalarda, uçucu yağın minimum engellemenin görüldüğü konsantrasyonlarında (MIC) fungusa karşı antifungal etkinliğinin fungisidal veya fungistatik özellikte olup olmadığını belirlemek amacıyla petrilerdeki gelişme göstermeyen misel diskleri herhangi bir uygulama (ITC veya uçucu yağ) içermeyen taze PDA besi yeri üzerine konulmuş ve 25°C' de tekrar inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5).

Gelişme göstermeyen misel diskleri yeni konuldukları PDA besiyeri üzerinde, misel gelişiminin hala görülmediği konsantrasyonlardauçucu yağ ve ITC'lerin MIC antifungal etkisi **fungisidal** (tamamen engelleyen, öldürücü), misel gelişiminin tekrar başladığı konsantrasyonlarda ise Uçucu yağ ve ITC'lerin MIC etkisi **fungistatik** (geçici) olarak kayıt edilmiştir.



Şekil 3.5. Farklı uçucu yağların misel gelişiminin görülmeyen minimum engelleyici konsantrasyonlardaki (MIC) antifungal etkisinin fungisidal veya fungistatik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.3.Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Antagonist Bakteri İzolatlarının *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

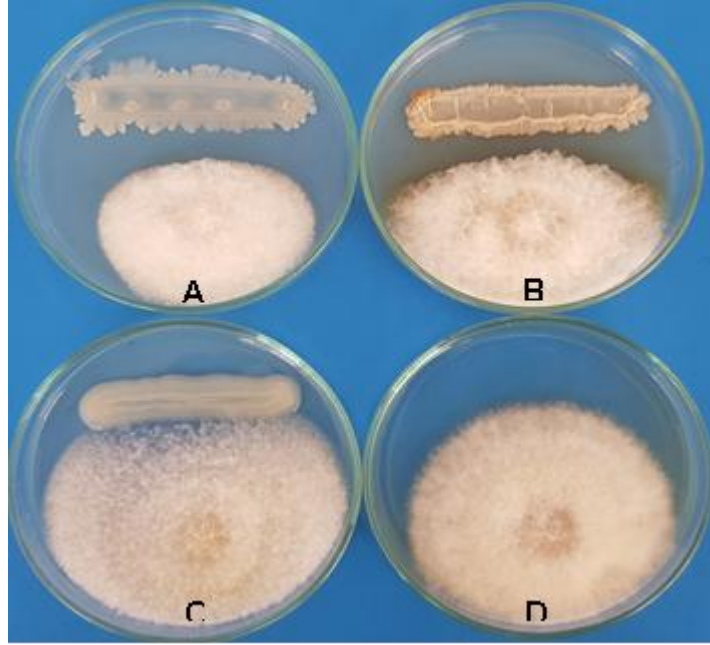
Sağlıklı taze ve kurutmalık biberlerin içsel dokularından izole edilen antagonist bakteri izolatların hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleme (antagonistik) potansiyelleri 9 cm çapında PDA içeren petri kaplarında “**ikili kültür testlemeleriyle**” belirlenmiştir (Landa ve ark, 1997). Tanısı yapılan, tütün HR ve patates yumuşak çürüklük testlerinde negatif sonucu veren aday antagonistbakteri izolatları, çizgi ekim yöntemi ile petrinin üst noktasından 2 cm gerisine çizilmiştir ve 48 saat süre ile 25 °C de inkübatörler içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda çizimi yapılan bakteri noktasının 4 cm gerisine test edilen funguslardan alınan 5 günlük 6 mm çaplı

fungus misel diskleri yerleştirilmiştir (Şekil 3.6). Kontrol petrilere herhangi bir bakteri izolatu çizilmemiştir.

Uygulama yapılan tüm petriler 25 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrilere hastalık etmeni bakterilerin çizildiği noktaya ulaşması ile birlikte (fungal etmenlerin gelişmesine bağlı olarak inokulasyondan 4-7 gün sonra), bakterilerin çizildiği tüm ikili kültür petrilindeki fungal etmenlerin bakteriye doğru yönelen misel gelişimi (MGu) ölçülmüş ve kontrol petrilere miselyal (MGk) gelişmeye göre engelleme oranlarının % si hesaplanmıştır (Ahmed ve ark. 1999).

$$\% \text{Engelleme} = ((\text{MGk} - \text{MGu}) / \text{MGk}) * 100 \text{ (3.2)}$$

Her bakteri-fungus kombinasyonu için misel gelişim ölçümleri 3 farklı petri kabında yapılmıştır. Denemeler 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.



Şekil 3.6. Antagonist bakterilerin fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine olan etkinliğin belirlendiği ikili kültür testi. İkili kültür testinde misel gelişimini engelleyen (A ve B) veya engelleyemeyen (C) farklı türlere ait antagonist izolatların kontrol (D) ile karşılaştırılması

3.2.4.4. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Aday Endofit Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Sağlıklı taze ve kurutmalık biberlerin içsel dokularından izole edilen antagonist bakteri izolatların ürettiği uçucu bileşen(ler)inin hastalık etmenlerinin misel

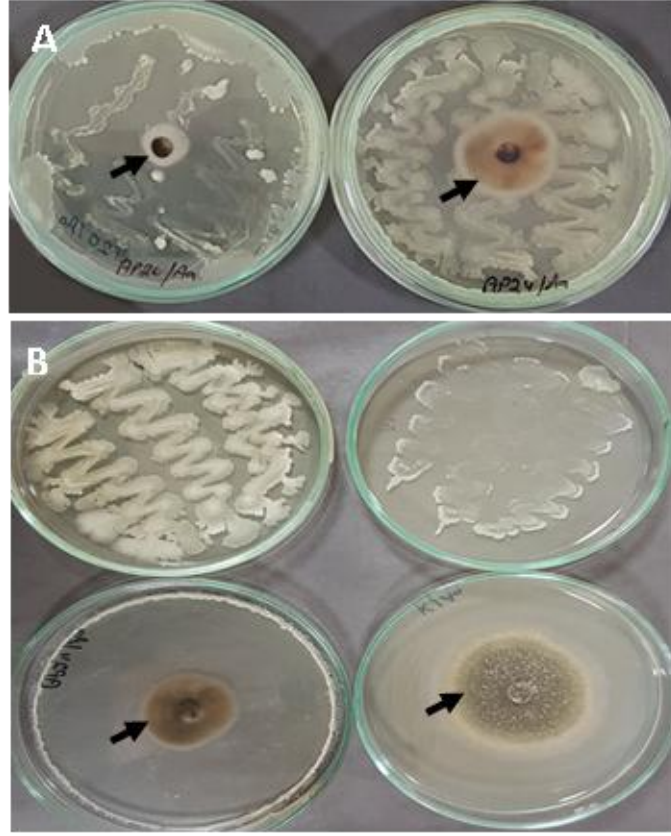
gelişimini engelleme (antagonistik) potansiyelleri 9 cm çapında bir kapağında NA diğer kapağında PDA besi yeri içeren petri kaplarında yüz yüze bakan, birbirleri ile temas etmeyecek şekilde dizayn edilmiş (Şekil 3.7) kapalı ikili kültür testlemeleriyle (sealed plate method) belirlenmiştir (Fiddman ve Rossall, 1993). Tanılaması yapılan, Tütün HR ve patates yumuşak çürüklük testlerinde negatif sonucu veren aday bakteri izolatları, zig zag çizgi ekim yöntemi ile 15 ml NA besi yeri içeren petrinin üst kapağına çizilmiş, bakteri çizimi yapılan petrinin 15 ml PDA içeren alt kapağına test edilen funguslardan alınan 5 günlük 6 mm çaplı fungus misel diskleri yerleştirilmiş ve 2 kapak birbirlerine bakacak şekilde birleştirilip petri kapaklarının kenarları parafilm ile sarılmak suretiyle oluşan uçucu bileşenlerin ortamdan uzaklaşması engellenmiştir (Şekil 3.7A). Kontrol petrilerine herhangi bir bakteri izolatu çizilmemiştir. İkili kültür testleri uygulama sonrası 25 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrilerinde hastalık etmenleri petriyi tamamen kaplamasını müteakiben (fungal etmenlerin gelişmesine bağlı olarak inokulasyondan 4-7 gün sonra), fungal etmenlerin misel gelişimi (MG_u) ölçülmüş ve kontrol petrilerdeki miselyal (MG_k) gelişmeye göre engelleme oranlarının % si hesaplanmıştır (Ahmed ve ark. 1999).

$$\% \text{Engelleme} = ((\text{MG}_k - \text{MG}_u) / \text{MG}_k) * 100 \quad (3.3)$$

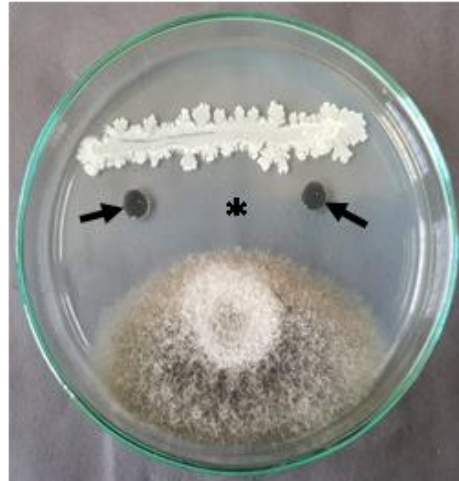
Her bakteri-fungus kombinasyonu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

3.2.4.5. Antagonist Bakterilerin Fungal Etmenlerin Misel Gelişimini Engelleyen Bölgelerinin Fungisidal ve Fungistatik Özelliklerinin Belirlenmesi

Fungal etmenlerin misel gelişimini engelleyen antagonist bakterilerin engelleme bölgelerindeki etkinliğin fungisidal veya fungistatik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla fungus miseli ile bakteri arasında kalan engelleme bölgesi üzerine 5 günlük sağlıklı fungal misel diskleri (6 mm çapında) yerleştirilmiş ve 3-5 gün tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Yerleştirilen sağlıklı misel diski engelleme bölgesinde gelişme göstermemiş ise bu bölgedeki antagonistin ürettiği antimikrobiyal bileşik(ler)in etkinliği **fungisidal** (Şekil 3.8), gelişme göstermiş ise bu bölgedeki antagonistin ürettiği antimikrobiyal bileşik(ler)in etkinliği **fungistatik** olarak kayıt edilmiştir.



Şekil 3.7. Antagonist bakteri izolatların ürettiği uçucu bileşen(ler)inin kapalı ikili kültür testlemeleri ile misel gelişimini (ok) engelleme (antagonistik) potansiyellerinin belirlenmesi. (A) Teslemenin yapıldığı parafilmle sarılmış bakteri (üst kapak) ve fungus kültürlerinin (alt kapak) farklı kapaklara yerleştirilmiş hali. (B) ölçüm için açılmış petri kapları (üst kapakta bakteri, alt kapakta fungus kültürünün gelişimi)



Şekil 3.8. Kurutulmuş biberlerin içsel dokularından elde edilen antagonist bakterilerin ürettiği bileşiklerin fungus miselleri üzerinde fungusidal/fungistatik özelliklerinin belirlenmesi. Sağlıklı hifin (ok) engelleme bölgesinde (*) gelişme göstermemesi etkinliğinin **fungusidal** özellikte olduğunu göstermektedir

3.2.5. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Tüm *in vitro* denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre, her bir uygulama için 3 tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Farklı uygulamaların (farklı ITC ve uçucu yağ konsantrasyonları ile antagonist bakterilerin bulunduğu petrilerdeki antifungal etkinlik çalışmaları) yapıldığı petrilerdeki misel gelişiminin engellenme oranları % oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve uygulamalar arasındaki farklılık Tukey HSD Testi ile analiz edilmiştir ($P \leq 0.05$). Gerek ITC gerekse uçucu yağların farklı konsantrasyonlarda misel gelişimini %50 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyonları (EC_{50}) her bir kimyasal için farklı konsantrasyonlarda elde edilen değerleri kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

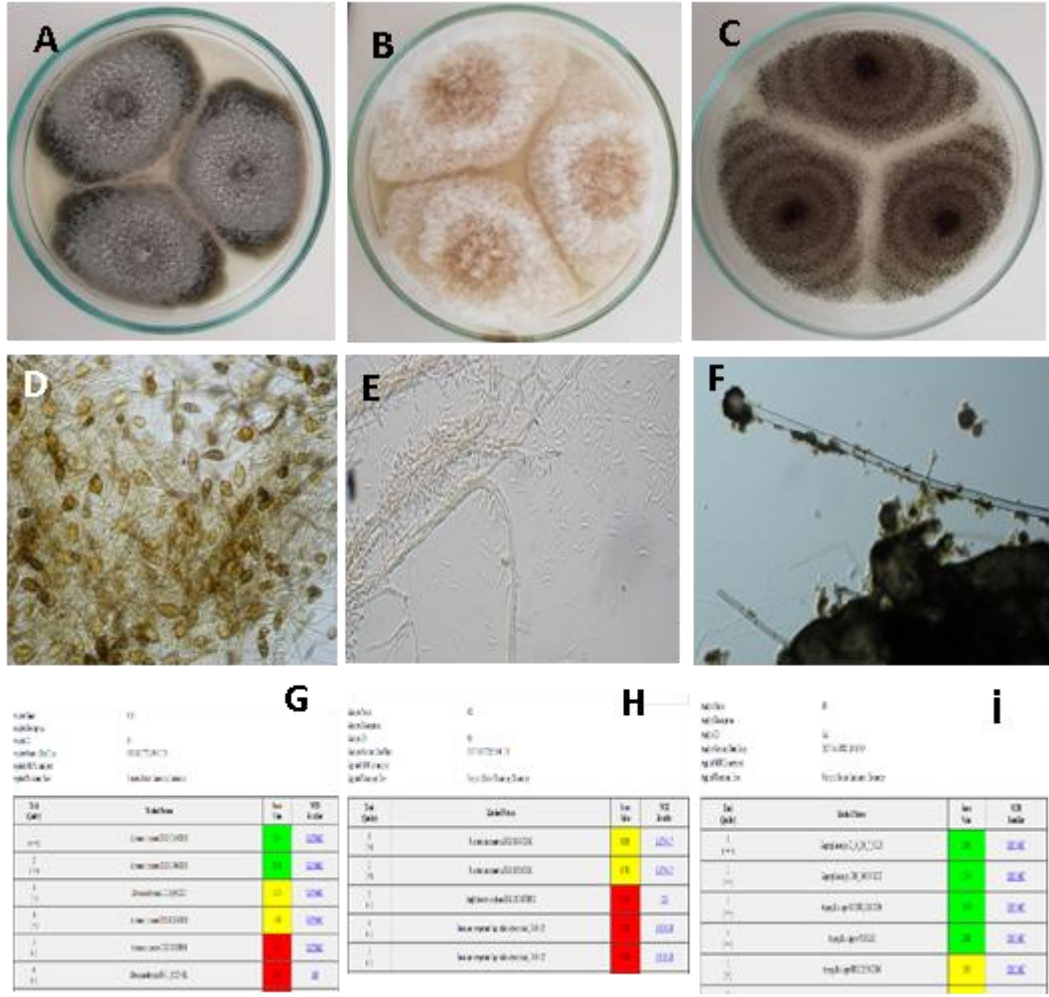
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kurutmalık Biberlerde Bozulmalara Neden Olan Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanılanması

Kurutmalık biberlerde bozulmalara neden olan hastalık etmenlerini belirlemek amacıyla 2017 yılında Antakya ilçesindeki aktar ve halk pazarlarından temin edilen şüpheli kuru biber meyve örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu (Şekil4.1) farklı koloni morfolojisine ait 40 fungal izolat elde edilmiştir. Elde edilen fungus kolonilerinden yapılan tek spor kültürlerinin morfolojik çalışmaları sonucu en sık karşılaşılmış fungal etmenin 8 izolat ile (%20) *Aspergillus niger* olduğu, bu etmeni 6 izolat (%15) ile *Fusarium incarnatum*, 5 izolat (%12.5) ile *Alternaria alternata*, 4'er izolat (%10) ile *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Cladosporium* spp, 3 izolat (%7.5) ile *Rhizopus stolonifer*, 2 izolat (%5) ile *Penicillium italicum* takip etmiştir. İzolasyonlarda en sık karşılaşılan ilk 3 fungus türü olan *Aspergillus niger*, *Fusarium incarnatum* ve *Alternaria alternata* çalışmaların diğer aşamalarında çalışılmak üzere seçilmiş, morfolojik teşhisleri ileri moleküler ve MALDI-TOF analizleri ile teyit edilmiştir (Şekil 4.2).

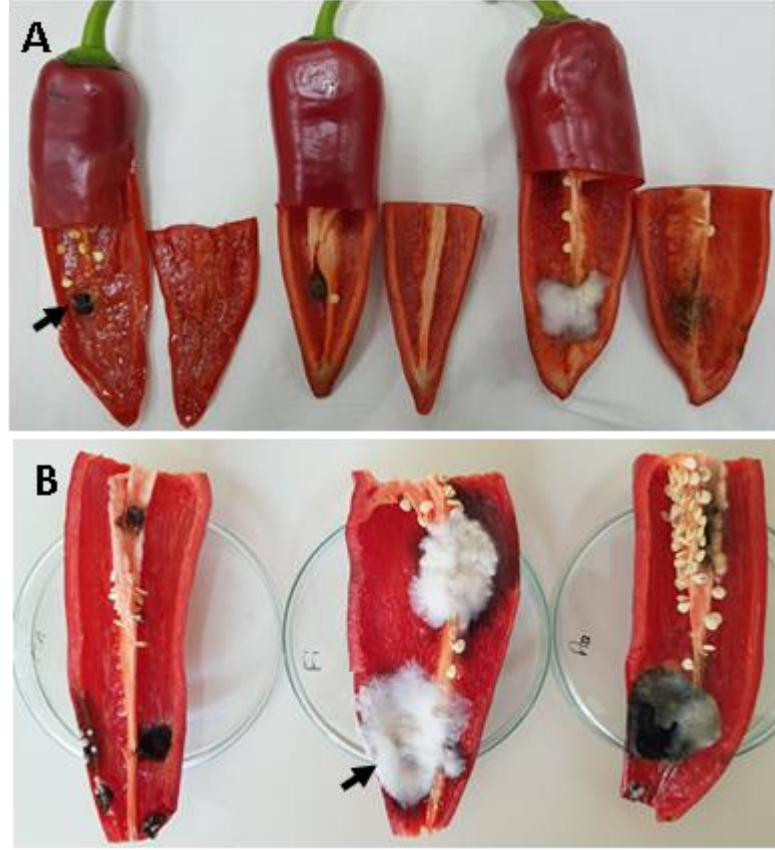


Şekil 4.1. Antakya ilçesindeki aktar ve halk pazarlarından temin edilen şüpheli kuru biber meyve örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen farklı fungal koloniler



Şekil 4.2. İzolasyonlarda en sık karşılaşılan fungal etmenlerden *Alternaria alternata*(A ve D), *Fusarium incarnatum* (B ve E) ve *Aspergillus niger*(C ve F)’nin koloni ve spor görünümleri. (G-İ). (MALDI-TOF analizleri sonucu etmenlerin teşhis sonuçları teyit edilmiştir.)

Moleküler teşhisi yapılmış ve müteakip etkinlik çalışmalarında kullanılacak olan fungal hastalık etmenlerinin patojenite testleri sağlıklı biber meyvelerinde 2 farklı inokulasyon şekliyle yapılmış olup (Şekil 3.3), sonuçta izole edildikleri örneklerdeki belirtilere benzer belirtiler elde edilmiştir (Şekil 4.3).Hastalık etmenleri inokulasyon noktalarında ortaya çıkan belirtilerden tekrar izole edilmiş ve orijinal izolatlarla karşılaştırılmıştır.Orijinal izolatlarla benzeyen re-izolatlarla benzer teşhis yöntemleri uygulandıktan sonra moleküler çalışmalar sonucunda türleri teyit edilen izolatlar tüm denemelerde kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Hastalıklı bitkilerden izole edilen *Aspergillus niger*, *Fusarium incarnatum* ve *Alternaria alternata*'nın (A) fungal misel disk ve (B) spor süspansiyonu enjekte edilmiş sağlıklı biber meyvesi içinde inokulasyon noktalarında oluşturduğu sporulasyon göstermiş tipik yumuşama ve çürüklük (ok) belirtileri

Bitkilerde gerek açık alanlarda gerekse hasat sonrasında hastalık oluşturan etmenlerle mücadelede hastalık kaynağı etmenlerin tespiti, patojenlerin kontrolü adına ilk önemli adımı oluşturmaktadır. Biber dünyada en fazla yetiştiriciliği yapılan, oldukça farklı tüketim amaçları olan sebzelerden biri olup, aralarında bu çalışmada kullanılan fungal hastalık etmeni türlerin (*Aspergillus niger*, *Fusarium incarnatum* ve *Alternaria alternata*) yanısıra bu türlerin bağlı oldukları cinslerdeki diğer başka türler (*Aspergillus* sp. *Fusarium* sp. ve *Alternaria* sp.) tarafından sıkça enfekte edildiği yapılan birçok çalışmalarda bildirilmiştir (Miller ve ark., 1984; Hardenburg ve ark., 1990; Snowdon, 1991). Biber meyvelerinde fungal enfeksiyonlar sonucu içsel çürüme, çürüyen meyvelerde toksin oluşumu, meyve kabuğu renginde renk açılması şeklinde belirtiler ve muhtemel hastalık etmenleri üzerine yapılmış çalışmalarda genellikle *Aspergillus* spp ve *Alternaria* spp belirlenmiş olup, *Fusarium incarnatum* etmeni sadece Trinidad'ta yetişen biberlerde bildirilmiştir (Ramdial ve ark., 2016). Yapılan literatür

araştırmalarına göre ülkemizde yetiştirilen biber meyvelerinde *Fusarium incarnatum*'un neden olduğu hasat sonu hastalık belirtileri, etmenin izolasyonu ve teşhisi ilk kez bu çalışma ile yapılmış olup, izolatımızdan elde edilen sekans GenBankası'na yüklenmiştir (GenBank erişim No: MK307896). Hastalık etmenin varlığı ülkemiz için ilk kayıt olarak belirlenmiştir.

Kurutulmuş biberlerde sorun olan mikotoksijenik fungal türlerin belirlenmesine yönelik yapılan birçok çalışma sonucunda çalışmalarımızda elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir (Erdogan, 2004; Bokhari, 2007; Santos ve ark., 2011; Jeswal ve Kumar, 2015). Bokhari (2007) Suudi Arabistan'da satılan biber baharatlarında *A. niger* etmenin en sık izole edilen baskın mikotoksin fungusu olduğu, bunu bir diğer fungu türü olan *A. flavus*'un takip ettiğini bildirmiştir. Jeswal ve Kumar (2015) Hindistan'nın Bihar eyaletindeki lokal pazarlarında satılan baharatlık biberlerde en sık izole edilen fungal cinsin *Aspergillus* olduğunu, bu cinsi sırasıyla *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* ve *Rhizopus* cinslerinin takip ettiğini bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, Erdoğan (2004) topladıkları baharat biber örneklerinde en sıklıkla karşılaşılan cinsin %84.6 karşılaşma sıklığı ile *Aspergillus* olduğunu, *Penicillium* (%80.1), *Rhizopus* (%69.2) ve *Geotrichum* (%50) *Penicillium* spp en sık karşılaşılan diğer dominant fungal cinslerin olduğunu bildirmiştir. *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium*, ve *Fusarium*spp tarla koşullarında, *Aspergillus* ve *Penicillium* spp ise hasat sonu depolanan biber meyvelerinde görülen fungal türler olmakla birlikte (Mandeel, 2005; Santos ve ark., 2011), bu türlerin her iki dönemde de biber meyvelerinde görülebileceği bildirilmiştir.

Fatıma ve ark. (2009), Pakistan'da yaptıkları çalışma sonrasında bazı taze sebze ve meyveler ile baharatlık ürünlerin hasat sonrası   r melerinden sorumlu olan *Alternaria alternata*, *A. citri*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Drechslera australeinsis*, *Fusarium solani*, *Fusarium* sp., *Geotrichum candidum*, *Penicillium* spp., *Phytophthora capsici* ve *Rhizopus stolonifer* gibi fungal türleri izole ederek, bunların tanımlamalarının yapıldığı bildirilmiştir.

Ham ve ark. (2016), öğütülmüş kırımızı biberlerde sorun olan fungal türler ile bu türlerden kaynaklı mikotoksin oluşumlarını araştırmak için Kore'deki başlıca 15 kırımızı biber üreticisinden 30 farklı öğütülmüş biber örneğini incelemişlerdir. Fungus

kontaminasyonlarının araştırıldığı örneklerde *Aspergillus* cinsine dahil türler en yüksek oranda bulunurken, *Paecilomyces* en sık izole edilen fungus cinsi olmuştur. Diğer en sık görülen fungus cinsleri *Rhizopus*, *Penicillium*, *Cladosporium* ve *Alternaria* olmuştur. *Aspergillus* cinsi içinde *A. ruber* baskın tür olup bunu bu türü sırasıyla *A. niger*, *A. amstelodami*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. flavus* ve *A. fumigatus* izlemiştir. Hastalıkla bulaşık üç örnekte, 0.3–2.08 µg/kg oranında Oraktotoksin A tespit edilmesine rağmen diğer önemli mikotoksinlerden olan aflatoksin veya citrinin tespit edilmemiştir. Bu çalışmada, toksijenik fungus kontaminasyonundan dolayı, öğütülmüş kırmızıbiberlerin sürekli olarak fungal kontaminasyonlar açısından izlenmesinin mikotoksin kontaminasyonunu en aza indirmek için gerekli ön koşullardan biri olduğunu bildirilmiştir.

Hammami ve ark. (2014) Katar’da lokal marketlerden toplanan 14 baharat üzerinde yapmış oldukları toksin ve toksin üreten mikroorganizma sörveyleri sonucunda, acı biber baharatının fungal etmenler ile en fazla bulaşık örnek olduğunu, zencefil, sarımsak ve curry tozlarında herhangi bir kontaminasyona rastlanılmadığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar en sık karşılaşılan fungal türlerin *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* ve *Aspergillus niger* olduğunu bildirmişlerdir.

Elshafie ve ark. (2002) Umman’da aktarlarda satılan baharatların fungal bulaşıklığı üzerine yapmış olduğu bir diğer çalışmada kimyon, tarçın, karanfil, karabiber, cardamon, zencefil ve kişniş örneklerinde 20 fungal türün tespit edildiği, bu türler arasında *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Syncephalastrum racemosum*’un en yağın sıklıkla karşılaşılan türler olduğunu bildirmişlerdir.

Ravikiran ve ark. (2009) soğuk odalarda depolananan biberlerde zamana bağlı örneklemeler yaparak 1 yıl boyunca örnekler üzerinde gelişen mikofloranın tespiti üzerine yaptıkları çalışmalarda, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*’in en sık karşılaşılan türler olduğu, bu türlerin sırasıyla *Mucor* spp., *Fusarium* spp. ve *Alternaria alternata* tarafından takip edildiğini bildirmişlerdir. Soğuk havada muhafaza edilmesine rağmen funguslarla kontamine olmuş örneklerde aflatoxin B-1’in tespit edildiğini belirlemişlerdir.

Ko ve ark. (2004) güneş altında kurutulan ve renk açılması şeklinde bozulmalara neden olan biber örneklerinde baskın türler olarak *Colletotrichum*, *Diaporthe*, ve *Alternaria* cinsine dahil 197 farklı mikotoksijenik fungal tür/izolatın elde edildiğini

bildirmişlerdir. Araştırmacıların yapmış olduğu fungal izolasyonlar sonucunda elde edilen fungal izolatların %66.5'ni *Colletotrichum* sp., oluşturduğunu bu izolatları %14.2 ve %8.6 ile *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* ve *Alternaria alternata*'nın izlediğini belirtmişlerdir. Çalışmalarımızda da benzer renk açılmaların gözleendiği, bu örneklerin genelde *Alternaria alternata* izolatları tarafından etkilendiği belirlenmiştir.

Kore'de kurutulmuş biberin özellikle milli yiyecekleri olan Kimchi turşularında yaygın olarak kullanıldığı, kullanılan kurutulmuş biberlerde toksijenik fungal türlerin önemli bir sorun olduğunu belirttikleri çalışmalarında, 15 farklı biber üreticisinden temin ettikleri 30 biber baharatında fungal etmenleri belirlemişlerdir. Yapılan izolasyon sonucunda *Aspergillus* cinsinin en fazla gözlenen fungal etmenler olduğu, *Paecilomyces* izolatların ise en sık elde edilen fungal etmen olduğunu belirlemişlerdir. Bu cinslere dahil fungal türleri takip eden diğer önemli fungal cinslerin sırasıyla *Rhizopus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, ve *Alternaria* spp olduğu, *Aspergillus* cinsi içerisinde *A. ruber* predominant tür olduğu, bu türü *A. niger*, *A. amstelodami*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. flavus* ve *A. fumigatus* türlerinin takip ettiği bildirilmiştir (Ham ve ark., 2016).

Wall ve Biles (1993) Meksikan tipi acı biberlerde *A. alternata*'nın olgun biber meyvelerinde çürümelere neden olduğu, hastalık şiddetinin biber olgunluğu ile arttığı, en fazla çürümenin çiçeklenmeden 61 gün sonra oluşan biber meyvelerinde görüldüğünü bildirmişlerdir. Olgun biber meyvelerinin içinde çürümeler şeklinde ortaya çıkan bozulmalar meiri ve Rylski (1983) tarafındanda bildirilmiştir.

4.2. Farklı ITC ve Uçucu Yağların Buhar Fazında Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antifungal Etkileri

Denemede kullanılan ITC bileşikleri ve uçucu yağların farklı konsantrasyonlarının buhar fazında fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimini engellenmesi üzerine olan etkinliği *in vitro* koşullarda 80 ml hava kapasiteli kapalı petri kapları içerisinde belirlenmiştir.

4.2.1. Farklı ITC ve Uçucu Yağların Buhar Fazında *Fusarium incarnatum*'un Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antifungal Etkinliğinin Belirlenmesi

Farklı ITC bileşiklerinin buhar fazında *Fusarium incarnatum*'un *in vitro* koşullarda misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinliklerinin belirlendiği testlemeleri sonucunda elde edilendeğerler Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4'de verilmiştir. Elde edilen minimum engelleme konsantrasyon (MIC) değeri incelendiğinde etkili ITC bileşeninin, 0.06 µl/petri dozlamethyl isothiocyanate (**MITC**) olduğu, bunu sırasıyla 0.12, 0.15 ve 0.21 µl/petri dozları ile benzyl isothiocyanate (**BITC**), 2-propenyl (Allyl) isothiocyanate (**AITC**) ve ethyl isothiocyanate (**EITC**) bileşikler tarafından gösterildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Yapılan istatistik analiz sonucunda farklı kimyasal yapıdaki ITC konsantrasyonlar arasında farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *F. incarnatum* misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği

Doz (µl/petri)	AITC	BITC	EITC	MITC
0	90.0f	90.0e	90.0e	90.0g
1	72.3e	66.0d	70.7d	74.0f
2	64.0d	40.7c	63.7c	64.0e
3	33.7c	28.3b	62.3c	54.3d
4	8.3b	0.0a	33.7b	43.3c
5	0.0a	Nt	0.0a	24.3b
6	Nt	Nt	nt	0.0a
EC ₅₀	0.064	0.050	0.146	0.029

AITC ve BITC Dozları: 0, 0.03, 0.06, 0.09, **0.12**, **0.15**, 0.18 µl/petri

EITC Dozları: 0, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18, **0.21**, 0.24 µl/petri

MITC Dozları: 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, **0.06** µl/petri

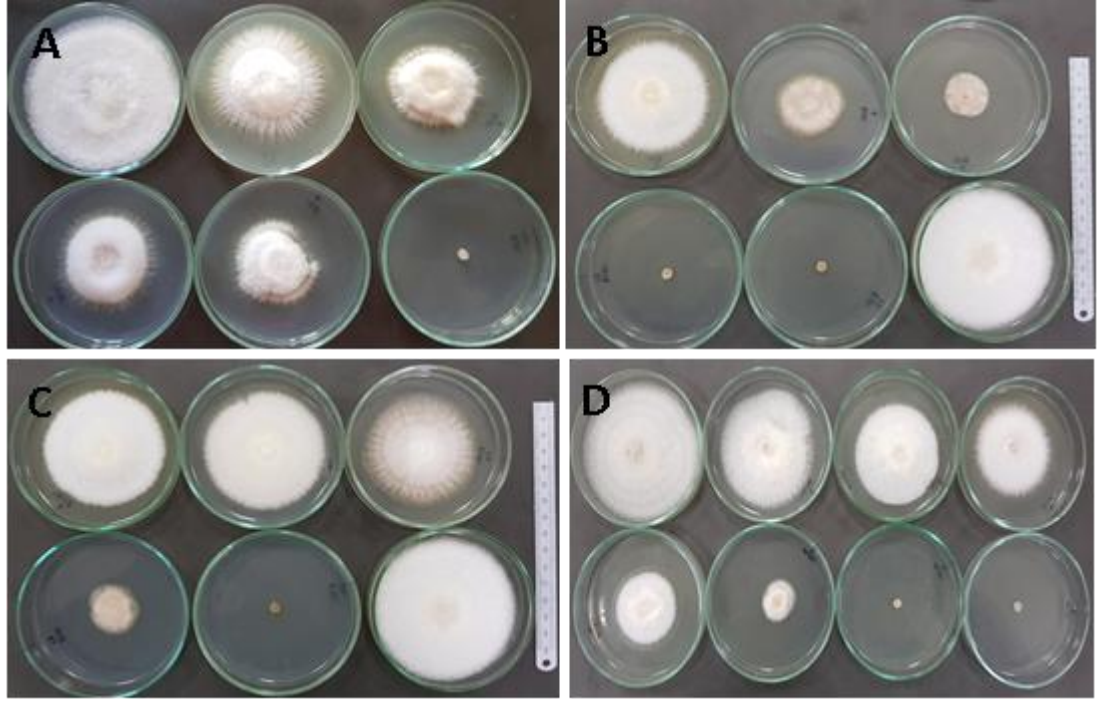
Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Tukey HSD testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

nt: bu dozda test edilmedi

Çizelge 4.2. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *F. incarnatum* misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	AITC	BITC	EITC	MITC
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	19.6	26.7	21.5	17.8
2	28.9	54.8	29.3	28.9
3	62.6	68.5	30.7	39.6
4	90.7	100.0*	62.6	51.9
5	100.0*	Nt	100.0*	73.0
6	Nt	Nt	nt	100.0*

* %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilere alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilere gelişme göstermemesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisidal** olarak belirlenmiştir.



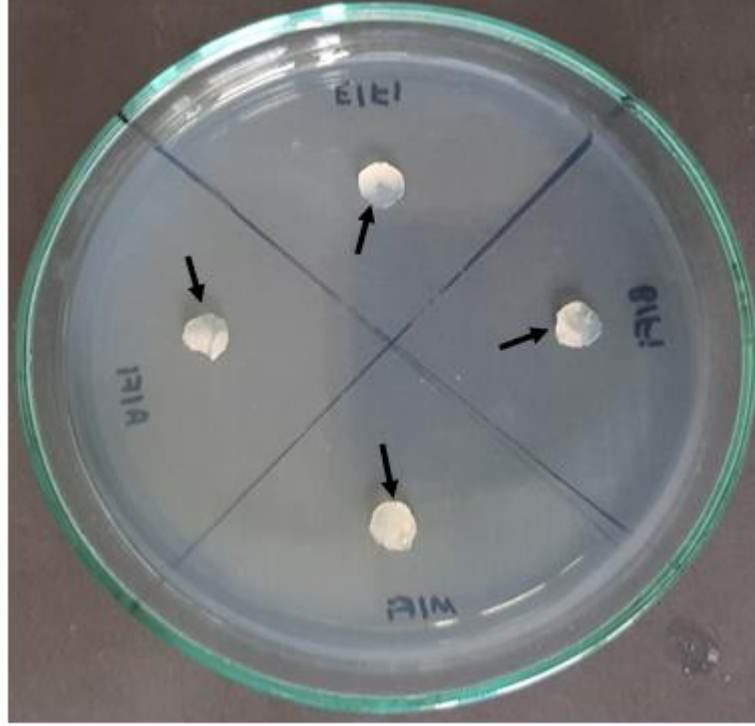
Şekil 4.4. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal etmen *F. incarnatum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri. (A) AITC, (B)BITC, (C) EITC, (D) MITC içeren petrilerdeki misel gelişimleri gösterir

Probit analiz sonucunda fungal misel gelişimini %50 oranında engelleyen etkili konsantrasyon (EC_{50})değerleri, MITC için 0.029 μ l/petri, BITC için 0.050 μ l/petri, AITC için 0.064 μ l/petri olarak hesaplanırken, en yüksek EC_{50} değeriEITC için 0.146 μ l/petri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

ITC'lerin farklı kimyasal bileşenlerinin misel gelişimlerini engelleyen MIC değerlerinin antifungal etkinliğin fungusidal/fungistatik özellikte olup olmadığının araştırıldığı çalışmada, fungus misellerinin hiç gelişmediği konsantrasyonların (MIC) bulunduğu petrilerden alınan misel disklerin ITC içermeyen PDA üzerine konduklarında misel gelişiminin görülmediği, bu sebepten dolayı ITC'lerin tamamının minimum engelleme konsantrasyonlardaki antifungal etkinliğinin **fungisidal** olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Farklı uçucu yağların buhar fazında *Fusarium incarnatum*'unmisel gelişimini engellemesi üzerine olanantifungal etkinlik sonuçları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'de verilmiştir. Elde edilen minimum engelleme konsantrasyon (MIC) değerlerine bakıldığında en etkili uçucu yağın, 4.0 μ l/petri dozla *O. syriacum* uçucu yağının olduğu, bunu sırasıyla 6.0, 6.0, 20.0, 25.0, 25.0 μ l/petri dozlarla *T.spicata*, *T. vulgaris*, *F.*

vulgare, *L. nobilis* ve *E. camaldulensis* uçucu yağları tarafından gösterildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Yapılan istatistik analiz sonucunda farklı uçucu yağ konsantrasyonları arasında farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.5. Fungal etmen *F.incarnatum*'a karşı minimum engellemenin görüldüğü ITC konsantrasyonlarının fungisidal etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilere alınan fungal misel diskleri (ok) yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde yeniden gelişme göstermemiştir

Çizelge 4.3. Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *F. incarnatum* misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	Tss	Tv	Os	Ln	Ec	Fv
0	75.7f	75.7e	75.7e	75.7f	75.7f	75.7f
1	35.3e	37.3d	46.0d	46.7e	48.3e	48.3e
2	14.7d	27.3c	18.3c	38.3d	41.3d	41.3d
3	9.0c	9.0b	6.3b	20.7c	34.0c	30.3c
4	5.7b	6.7b	0.0a	13.3b	25.7b	9.3b
5	0.0a	0.0a	Nt	0.0a	0.0a	0.0a
EC ₅₀	0.408	0.541	0.613	7.881	9.446	3.966

Tss, Tv ve Os Dozları: 0, 0.5, 1.0, 2.0, **4.0**, **6.0** µl/petri

Ln ve Ec Dozları: 0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, **25.0** µl/petri

Fv Dozları: 0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, **20.0** µl/petri

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Tukey HSD testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

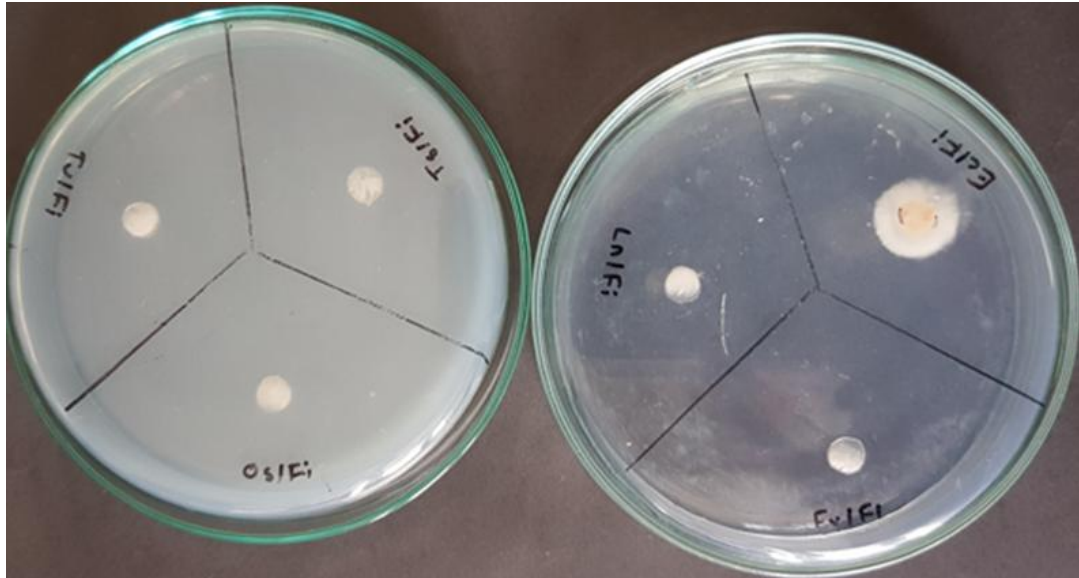
Çizelge 4.4. Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *F. incarnatum* misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	Tss	Tv	Os	Ln	Ec	Fv
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	53.3	50.7	39.2	38.3	36.1	36.1
2	80.6	63.9	75.8	49.3	45.4	45.4
3	88.1	88.1	91.6	72.7	55.1	59.9
4	92.5	91.2	100.0*	82.4	66.1	87.7
5	100.0*	100.0*	nt	100.0*	100.0**	100.0*

* %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilerden alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilerinde gelişme göstermemesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisidal** olarak belirlenmiştir.

** %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilerden alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilerinde gelişme göstermesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisitativ** olarak belirlenmiştir.

Probit analiz sonucunda uçucu yağların fungal misel gelişimini %50 oranında engelleyen etkili konsantrasyon (EC_{50}) değerleri, *T. spicata* için 0.408 μ l/petri, *T. vulgaris* için 0.541 μ l/petri, *O. syriacum* için 0.613 μ l/petri, *F. vulgare* için 3.966 μ l/petri, *L. nobilis* için 7.881 μ l/petri olarak hesaplanırken, en yüksek EC_{50} değeri *E. camaldulensis* için 9.446 μ l/petri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.6. Fungal etmen *F. incarnatum*'a karşı minimum engellenmenin görüldüğü uçucu yağ konsantrasyonlarının fungisidal/fungistativ etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde yeniden gelişme göstermiş (fungisitativ, ok) veya göstermemiştir (fungisidal)

Uçucu yağların misel gelişimlerini engelleyen MIC değerlerinin antifungal etkinliğinin fungusidal/fungistatik özelliği, fungus misellerinin hiç gelişmediği konsantrasyonların (MIC) bulunduğu petrilerden alınan misel disklerin uçucu yağ içermeyen PDA üzerinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *T. spicata*, *T. vulgaris*, *O. syriacum*, *F. vulgare* ve *L. nobilis* uçucu yağlarının göstermiş olduğu antifungal etkinliğinin **fungisidal**, *E. camaldulensis* uçucu yağının antifungal etkinliğinin ise **fungistatik** olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.6).

4.2.2.Farklı ITC ve Uçucu Yağların Buhar Fazında *Alternaria alternata*'nın Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antifungal Etkinliğinin Belirlenmesi

Farklı ITC bileşiklerinin buhar fazında *Alternaria alternata*'nın *in vitro* koşullarda misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlikleri çalışmaları sonucu elde edilen değerler Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. Elde edilen minimum engelleme konsantrasyon (MIC) değerine bakıldığında en etkili ITC bileşeninin, 0.09 µl/petri dozla methyl isothiocyanate (**MITC**) olduğu, bunu sırasıyla 0.18, 0.21, 0.21 µl/petri dozları ile ethyl isothiocyanate (**EITC**), 2-propenyl (Allyl) isothiocyanate (**AITC**) ve benzyl isothiocyanate(**BITC**) bileşikler tarafından gösterildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6). Yapılan istatistik analiz sonucunda farklı kimyasal yapıdaki ITC konsantrasyonlar arasında farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *A. alternata* misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	AITC	BITC	EITC	MITC
0	84.0f	84.0f	84.0f	84.0d
1	77.7e	73.3e	73.0e	48.3c
2	66.0d	61.7d	58.0d	34.7b
3	58.3c	53.0c	44.7c	0.0a
4	16.7b	34.0b	27.0b	nt
5	0.0a	0.0a	0.0a	nt
EC ₅₀	0.148	0.149	0.110	0.038

AITC ve BITC Dozları: 0, 0.09, 0.12, 0.15, 0.18, **0.21** µl/petri

EITC Dozları: 0, 0.06, 0.09, 0.12, 0.15, **0.18** µl/petri

MITC Dozları: 0, 0.03, 0.06, **0.09**, 0.12, 0.15 µl/petri

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Tukey HSD testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

nt: bu dozda test edilmedi

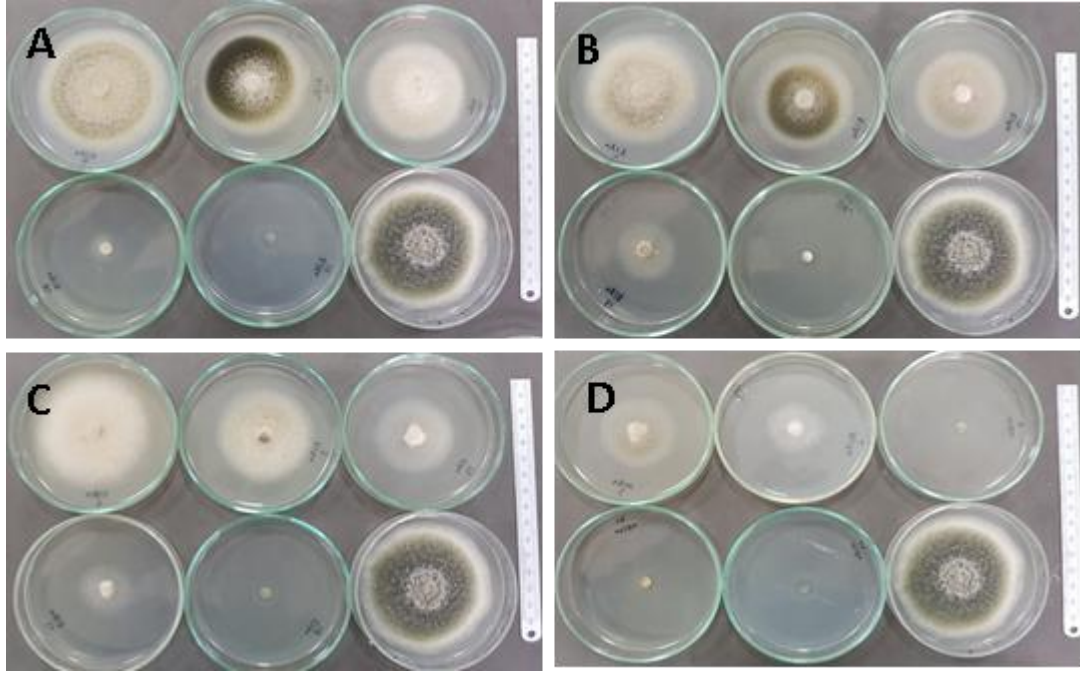
Çizelge 4.6. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *A. alternata* misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	AITC	BITC	EITC	MITC
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	7.5	12.7	13.1	42.5
2	21.4	26.6	31.0	58.7
3	30.6	36.9	46.8	100.0*
4	80.2	59.5	67.9	nt
5	100.0*	100.0*	100.0**	nt

* %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilere alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilere gelişme göstermemesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisidal** olarak belirlenmiştir.

** %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilere alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilere gelişme göstermesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungistatik** olarak belirlenmiştir.

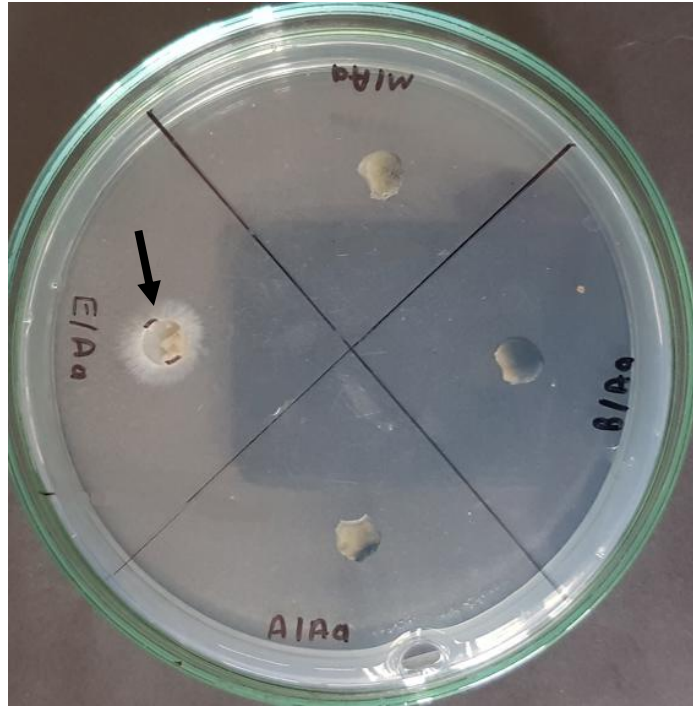
nt: bu dozda test edilmedi



Şekil 4.7. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal etmen *A. alternata*'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri. (A) AITC, (B) BITC, (C) EITC, (D) MITC içeren petrilere misel gelişimleri gösterir

Probit analiz sonucunda fungal misel gelişimini %50 oranında engelleyen etkili konsantrasyon (EC_{50}) değerleri, MITC için 0.038 μ l/petri, EITC için 0.110 μ l/petri, AITC için 0.148 μ l/petri olarak hesaplanırken, en yüksek EC_{50} değeri BITC için 0.149 μ l/petri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

ITC'lerin farklı kimyasal bileşenlerinin misel gelişimlerini engelleyen MIC değerlerinin antifungal etkinliğin fungusidal/fungistatik özellikte olup olmadığının araştırıldığı çalışmada, fungus misellerinin hiç gelişmediği konsantrasyonların (MIC) bulunduğu petrilerden alınan misel disklerin ITC içermeyen PDA üzerine konduklarında EITC dışında misel gelişiminin görülmediği, bu sebepten dolayı EITC dışındaki diğer ITC'lerin minimum engelleme konsantrasyonlardaki antifungal etkinliğinin **fungusidal** EITC'nin antifungal etkinliğinin ise **fungistatik** olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Fungal etmen *A. alternata*'ya karşı minimum engellemenin görüldüğü ITC konsantrasyonlarının fungusidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde sadece EITC'den alınan misel diski (ok) yeniden gelişme göstermiştir

Farklı uçucu yağların buhar fazında *A. alternata*'nın *in vitro* koşullarda misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlik sonuçları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6'de verilmiştir. Elde edilen minimum engelleme konsantrasyon (MIC) değerlerine bakıldığında en etkili uçucu yağın, 2.0 µl/petri dozla *T. spicata* uçucu yağının olduğu, bu yağ sırasıyla 4.0 µl/petri dozla *T. vulgaris* ve *O. syriacum*, 8.0 µl/petri dozla *F. vulgare*, 16 µl/petri doz ile *L. nobilis* ve *E. camaldulensis* uçucu yağları tarafından gösterildiği

belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8). Yapılan istatistik analiz sonucunda farklı uçucu yağ konsantrasyonlar arasında farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *A. alternata* misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	Tss	Tv	Os	Ln	Ec	Fv
0	84.3e	84.3f	84.3f	81.7f	81.7f	73.7h
1	43.3d	53.7e	48.3e	47.3e	55.0e	49.3g
2	20.7c	25.3d	21.3d	38.3d	34.3d	44.0f
3	11.7b	16.7c	15.3c	31.0c	27.7c	40.3e
4	0.0a	11.0b	9.7b	22.3b	17.0b	33.7d
5	0.0a	0.0a	0.0a	0.0a	0.0a	16.7c
6	Nt	nt	Nt	Nt	nt	6.3b
7	Nt	nt	Nt	Nt	nt	0.0a
EC ₅₀	0.548	0.682	0.596	3.351	3.555	1.305

Tss, Tv ve Os Dozları: 0, 0.5, 1.0, 1.5, **2.0, 4.0** µl/petri

Ln ve Ec Dozları: 0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, **16.0** µl/petri

Fv Dozları: 0, 0.05, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, **8.0** µl/petri

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Tukey HSD testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

nt: bu dozda test edilmedi

Çizelge 4.8. Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *A. alternata* misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	Tss	Tv	Os	Ln	Ec	Fv
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	48.6	36.4	42.7	42.1	32.7	33.1
2	75.5	70.0	74.7	53.1	58.0	40.3
3	86.2	80.2	81.8	62.1	66.1	45.3
4	100.0	87.0	88.5	72.7	79.2	54.3
5	100.0*	100.0*	100.0*	100.0**	100.0**	77.4
6	Nt	nt	nt	Nt	nt	91.4
7	Nt	nt	nt	Nt	nt	100.0**

* %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilerden alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilerinde gelişme göstermemesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisidal** olarak belirlenmiştir.

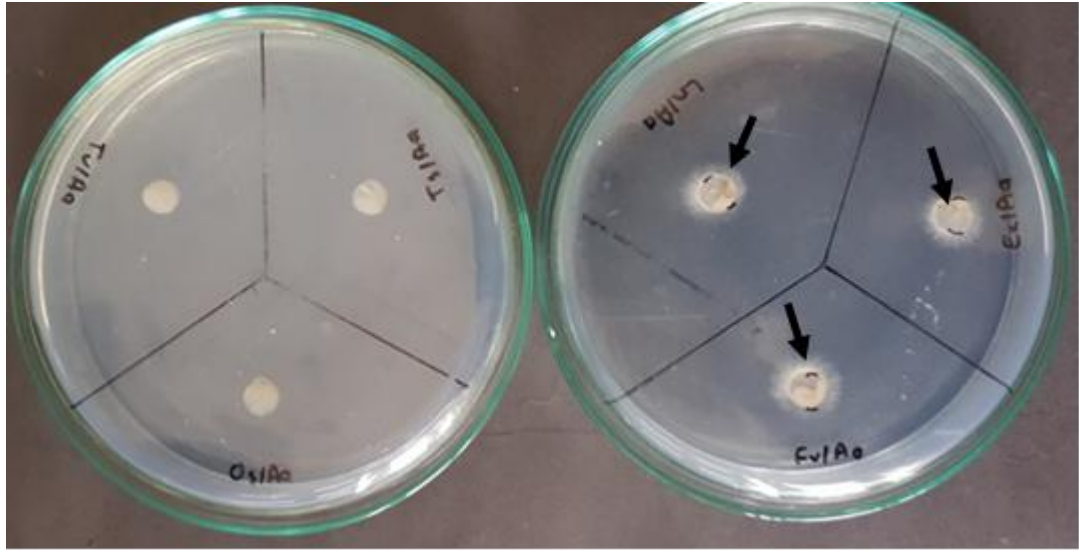
** %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilerden alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilerinde gelişme göstermesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisitativ** olarak belirlenmiştir.

nt: bu dozda test edilmedi

Probit analiz sonucunda uçucu yağların fungal misel gelişimini %50 oranında engelleyen etkili konsantrasyon (EC₅₀) değerleri, *T. spicata* için 0.548 µl/petri, *O. syriacum* için 0.596 µl/petri, *T. vulgaris* için 0.682 µl/petri, *F. vulgare* için 1.305

$\mu\text{l/petri}$, *L. nobilis* için 3.351 $\mu\text{l/petri}$ olarak hesaplanırken, en yüksek EC_{50} değeri *E. camaldulensis* için 3.355 $\mu\text{l/petri}$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Uçucu yağların misel gelişimlerini engelleyen MIC değerlerinin antifungal etkinliğinin fungusidal/fungistatik özelliğinin belirlendiği çalışmada, *T. spicata*, *T. vulgaris* ve *O. syriacum* uçucu yağlarının göstermiş olduğu antifungal etkinliğinin **fungusidal**, *F. vulgare*, *L. nobilis* *E. camaldulensis* uçucu yağının antifungal etkinliğinin ise **fungistatik** olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Fungal etmen *A. alternata*'ya karşı minimum engellemenin görüldüğü uçucu yağ konsantrasyonlarının fungusidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilerden alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde yeniden gelişme göstermiş (fungistatik, ok) veya göstermemiştir (fungusidal)

4.2.3. Farklı ITC ve Uçucu Yağların Buhar Fazında *Aspergillus niger*'in Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antifungal Etkinliğinin Belirlenmesi

Farklı ITC bileşiklerinin buhar fazında *Aspergillus niger*'in misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlikleri çalışmaları sonucu elde edilen değerler Çizelge 4.9 ve Şekil 4.10'de verilmiştir. Elde edilen minimum engelleme konsantrasyon (MIC) değerine bakıldığında en etkili ITC bileşenin, 0.09 $\mu\text{l/petri}$ dozla methyl isothiocyanate (**MITC**) olduğu, bunu sırasıyla 0.12, 0.12, 0.15 $\mu\text{l/petri}$ dozları ile 2-benzyl isothiocyanate (**BITC**), 2-propenyl (Allyl) isothiocyanate (**AITC**) ve ethyl isothiocyanate (**EITC**) bileşikler tarafından gösterildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve

Çizelge 4.10). Yapılan istatistik analiz sonucunda farklı kimyasal yapıdaki ITC konsantrasyonlar arasında farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *A. niger* misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	AITC	BITC	EITC	MITC
0	82.7e	82.7e	82.7f	82.7e
1	73.7d	66.7d	73.7e	72.7d
2	63.7c	53.7c	59.7d	60.0c
3	43.7b	47.7b	46.3c	50.3b
4	0.0a	0.0a	39.3b	0.0a
5	Nt	Nt	0.0a	nt
EC ₅₀	0.072	0.068	0.086	0.040

EITC, AITC ve BITC Dozları: 0, 0.03, 0.06, 0.09, **0.12**, **0.15** µl/petri

MITC Dozları: 0, 0.01, 0.03, 0.06, **0.09**, 0.12 µl/petri

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Tukey HSD testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

nt: bu dozda test edilmedi

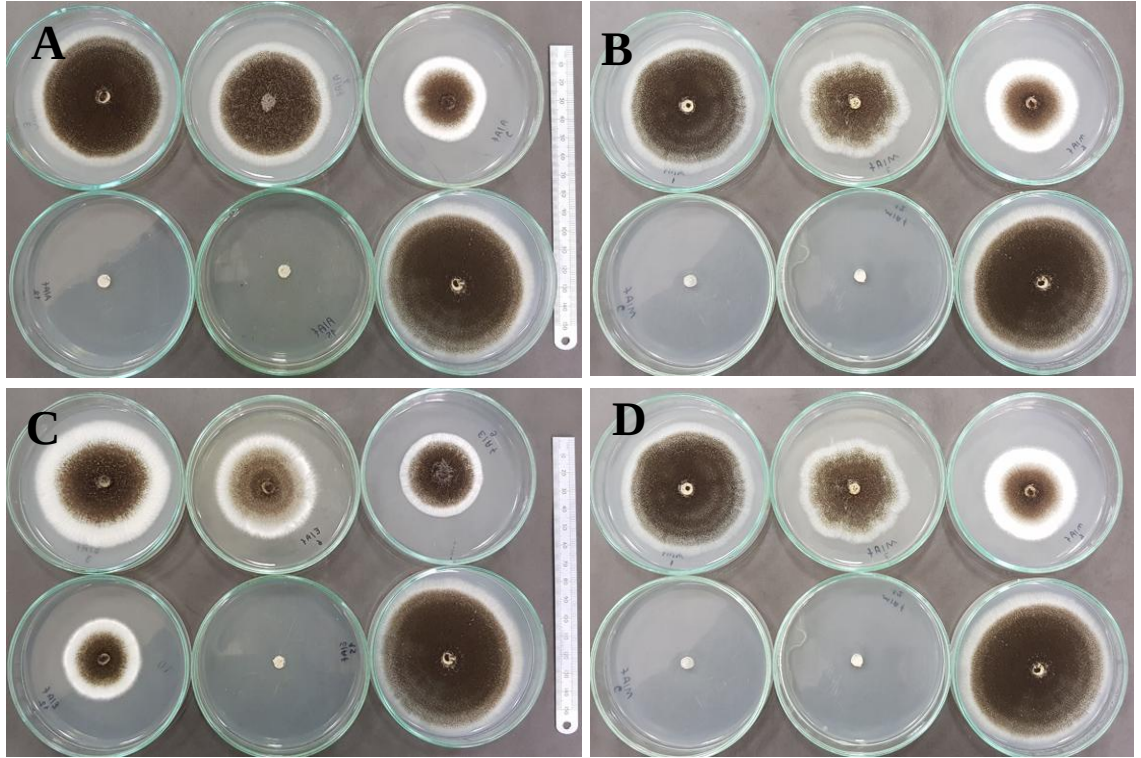
Çizelge 4.10. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *A. niger* misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	AITC	BITC	EITC	MITC
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	10.9	19.4	10.9	12.1
2	23.0	35.1	27.8	27.4
3	47.2	42.3	44.0	39.1
4	100.0*	100.0*	52.4	100.0**
5	nt	Nt	100.0*	nt

* %100 engelleme gözlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilerden alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilerinde gelişme göstermemesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisidal** olarak belirlenmiştir.

** %100 engelleme gözlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilerden alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilerinde gelişme göstermesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisitatik** olarak belirlenmiştir.

nt: bu dozda test edilmedi



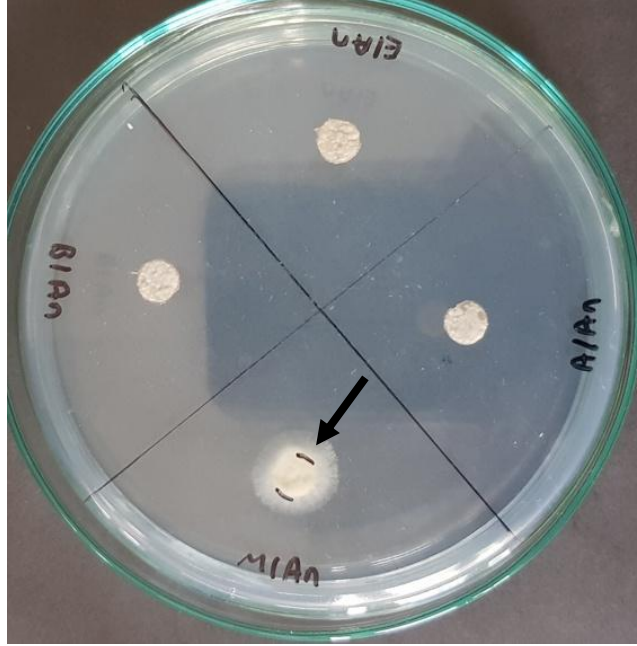
Şekil 4.10. Farklı ITC konsantrasyonlarının fungal etmen *A. niger*'in misel gelişimini engelleme potansiyelleri. (A) AITC, (B) BITC, (C) EITC, (D) MITC içeren petrilerdeki misel gelişimleri gösterir

Probit analiz sonucunda fungal misel gelişimini %50 oranında engelleyen etkili konsantrasyon (EC_{50}) değerleri, MITC için 0.040 μ l/petri, BITC için 0.068 μ l/petri, AITC için 0.072 μ l/petri olarak hesaplanırken, en yüksek EC_{50} değeri EITC için 0.086 μ l/petri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

ITC'lerin farklı kimyasal bileşenlerinin misel gelişimlerini engelleyen MIC değerlerinin antifungal etkinliğin fungusidal/fungistatik özelliklerinin belirlendiği çalışmada, MITC dışında misel gelişiminin görülmediği, bu sebepten dolayı MITC dışındaki diğer ITC'lerin minimum engelleme konsantrasyonlardaki antifungal etkinliğinin **fungisidal olduğu**, misel gelişiminin gözlemlendiği MITC'nin antifungal etkinliğinin ise fungistatik olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

Farklı uçucu yağların buhar fazında *A. niger*'in misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlik sonuçları Çizelge 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Elde edilen minimum engelleme konsantrasyon (MIC) değerlerine bakıldığında en etkili uçucu yağın, 4.0 μ l/petri dozla *T. spicata* ve *O. syriacum* uçucu yağlarının olduğu, bu yağları sırasıyla 6.0 μ l/petri dozla *T. vulgaris*, 8.0 μ l/petri dozla *F. vulgare*, 35.0 ve 40.0

μ l/petri dozlar ile *L. nobilis* ve *E. camaldulensis* uçucu yağları tarafından gösterildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12). Yapılan istatistik analiz sonucunda farklı uçucu yağ konsantrasyonlar arasında farkın önemli olduğutespit edilmiştir (Çizelge 4.11).



Şekil 4.11. Fungal etmen *A. niger*'e karşı minimum engellemenin görüldüğü ITC konsantrasyonlarının fungisidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilere alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde sadece MITC'den alınan misel disk (ok) yeniden gelişme göstermiştir

Farklı uçucu yağların buhar fazında *A. niger*'in misel gelişimini engellemesi üzerine olan antifungal etkinlik sonuçları Çizelge 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Elde edilen minimum engelleme konsantrasyon (MIC) değerlerine bakıldığında en etkili uçucu yağın, 4.0 μ l/petri dozla *T. spicata* ve *O. syriacum* uçucu yağlarının olduğu, bu yağları sırasıyla 6.0 μ l/petri dozla *T. vulgaris*, 8.0 μ l/petri dozla *F. vulgare*, 35.0 ve 40.0 μ l/petri dozlar ile *L. nobilis* ve *E. camaldulensis* uçucu yağları tarafından gösterildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12). Yapılan istatistik analiz sonucunda farklı uçucu yağ konsantrasyonlar arasında farkın önemli olduğutespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *A. niger*'in misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	Tss	Tv	Os	Ln	Ec	Fv
0	59.7f	59.3g	59.3f	69.7h	69.7h	65.3i
1	57.7e	58.3f	54.3e	67.3g	69.3h	55.7h
2	40.3d	50.3e	43.3d	52.7f	40.7g	51.7g
3	29.3c	35.3d	31.3c	38.3e	30.7f	44.3f
4	11.3b	24.3c	19.3b	25.7d	23.3e	41.0e
5	0.0a	15.3b	0.0a	17.3c	19.7d	39.3d
6	Nt	0.0a	0.0a	11.3b	15.0c	33.3c
7	Nt	nt	Nt	0.0a	8.7b	19.3b
8	Nt	nt	Nt	Nt	0.0a	0.0a
EC ₅₀	1.324	1.910	1.410	15.599	14.559	2.144

Ts, Tv ve Os Dozları: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, **4.0, 6.0** µl/petri

Ln ve Ec Dozları: 0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, **35.0, 40.0** µl/petri

Fv Dozları: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, **8.0** µl/petri

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Tukey HSD testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

nt: bu dozda test edilmedi

Çizelge 4.12. Farklı uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmeni *A. niger*'in misel gelişiminin % engellenmesi üzerine olan antifungal etkinliği

Uygulama	Tss	Tv	Os	Ln	Ec	Fv
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	3.4	1.7	8.4	3.3	0.5	14.8
2	32.4	15.2	27.0	24.4	41.6	20.9
3	50.8	40.4	47.2	45.0	56.0	32.1
4	81.0	59.0	67.4	63.1	66.5	37.2
5	100.0*	74.2	100.0	75.1	71.8	39.8
6	Nt	100.0*	100.0*	83.7	78.5	49.0
7	Nt	nt	Nt	100.0**	87.6	70.4
8	Nt	nt	Nt	Nt	100.0**	100.0**

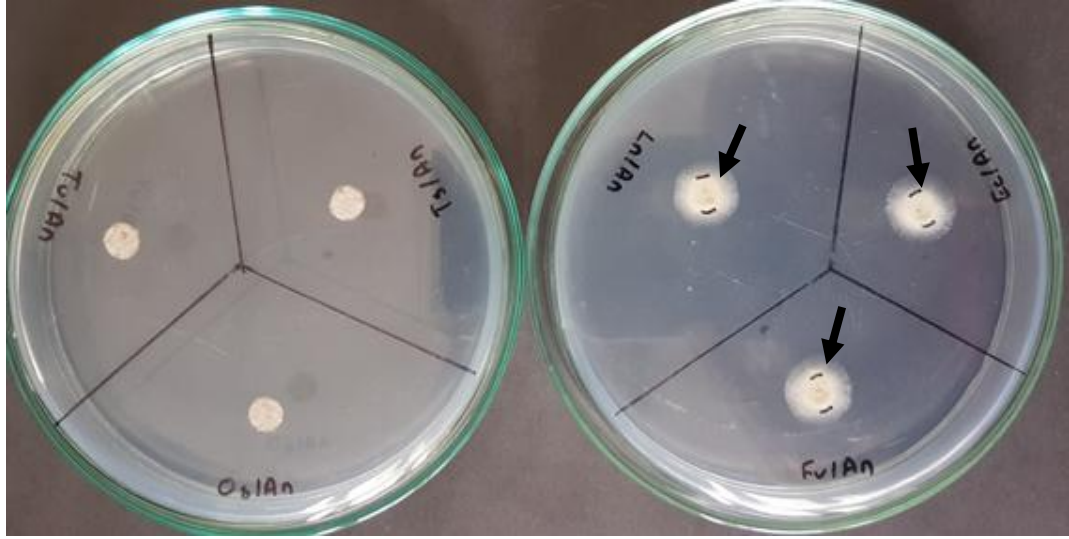
* %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilere alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilere gelişme göstermemesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisidal** olarak belirlenmiştir.

** %100 engellenmenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilere alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilere gelişme göstermesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisitativ** olarak belirlenmiştir.

nt: bu dozda test edilmedi

Probit analiz sonucunda uçucu yağların fungal misel gelişimini %50 oranında engelleyen etkili konsantrasyon (EC₅₀) değerleri, *T. spicata* için 1.324 µl/petri, *O. syriacum* için 1.410 µl/petri, *T. vulgaris* için 1.910 µl/petri, *F. vulgare* için 2.144 µl/petri, *E. camaldulensis* için 14.559 µl/petri olarak hesaplanırken, en yüksek EC₅₀ değeri için *L. nobilis* 15.599 µl/petri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Uçucu yağların misel gelişimlerini engelleyen MIC değerlerinin antifungal etkinliğinin fungisidal/fungistatik özelliğinin belirlendiği çalışmada, *T. spicata*, *T. vulgaris* ve *O. syriacum* uçucu yağlarının göstermiş olduğu antifungal etkinliğinin **fungisidal**, *F. vulgare*, *L. nobilis* *E. camaldulensis* uçucu yağının antifungal etkinliğinin ise **fungistatik** olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Fungal etmen *A. niger*'e karşı minimum engellemenin görüldüğü uçucu yağ konsantrasyonlarının fungisidal/fungistatik etkinliği. Engellemelerin görüldüğü petrilere alınan fungal misel diskleri yeni kondukları PDA besiyerleri üzerinde yeniden gelişme göstermiş (fungistatik, ok) veya göstermemiştir (fungisidal)

Farklı ITC ve uçucu yağların antifungal etkinlikleri tüm fungal etmenlerin misel gelişimini engelleyen MIC (Çizelge 4.13) ve EC₅₀ sonuçları (Çizelge 4.14) açısından değerlendirildiğinde fungal etmenlere karşı en yüksek antifungal etkinlik, ITC bileşikleri arasında MITC tarafından gösterildiği, bunu sırasıyla BITC, AITC'ın takip ettiğini, en düşük etkinliğin ise EITC tarafından gösterildiği belirlenmiştir. Uçucu yağlar açısından değerlendirildiğinde en yüksek etkinliğin 3 farklı kekik türü olan *T. spicata*, *O. syriacum* ve *T. vulgaris* uçucu yağları tarafından gösterildiği, bu yağları sırasıyla *F. vulgare* ve *L. nobilis* uçucu yağlarını takip ettiği, en düşük etkinliğin ise *E. camaldulensis* uçucu yağı tarafından gösterildiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Çalışmalarda kullanılan farklı ITC ve uçucu yağ konsantrasyonlarının fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleyen minimum engelleme konsantrasyonları (MIC)

Uygulamalar	Fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleyen Minimum Engelleme Konsantrasyonları (µl/petri)		
	<i>F. incarnatum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. niger</i>
AITC	0.15*	0.21*	0.12*
BITC	0.12*	0.21*	0.12*
EITC	0.21*	0.18**	0.15*
MITC	0.06*	0.09*	0.09**
<i>Tss</i>	6.0*	2.0*	4.0*
<i>Os</i>	4.0*	4.0*	4.0*
<i>Tv</i>	6.0*	4.0*	6.0*
<i>Fv</i>	20.0*	8.0**	8.0**
<i>Ln</i>	25.0*	16.0**	35.0**
<i>Ec</i>	25.0**	16.0**	40.0**

* %100 engellemenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilere alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilere gelişme göstermemesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisidal** olarak belirlenmiştir.

** %100 engellemenin gözlemlendiği bu konsantrasyonlardaki petrilere alınan diskler yeni PDA besi yerine konuldukları petrilere gelişme göstermesi nedeni ile bu değerlerdeki antifungal etkinlik **fungisitativ** olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Çalışmalarda kullanılan farklı ITC ve uçucu yağ konsantrasyonlarının Probit analizi sonucu belirlenen fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimini %50 engelleyen etkili konsantrasyon değerleri (EC₅₀)

Uygulamalar	Fungal hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleyen etkili konsantrasyon (EC ₅₀) değerleri (µl/petri)		
	<i>F. incarnatum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>A. niger</i>
AITC	0.064	0.148	0.072
BITC	0.050	0.149	0.068
EITC	0.146	0.110	0.086
MITC	0.029	0.038	0.040
<i>Tss</i>	0.408	0.548	1.324
<i>Os</i>	0.613	0.596	1.410
<i>Tv</i>	0.541	0.682	1.910
<i>Fv</i>	3.966	1.305	2.144
<i>Ln</i>	7.881	3.351	15.599
<i>Ec</i>	9.446	3.555	14.559

Önceden yapılmış pek çok araştırmalarında farklı uçucu yağ ve ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliklerinin daha çok gram pozitif ve gram negatif insan/hayvan/gıda patojenlerine karşı araştırılmış olup, özellikle mikotoksin oluşturan hasat sonrası bitki

patojenlerine karşı etkinliklerin ise oldukça kısıtlı sayıda çalışmalarda irdelenerek gözardı edilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında doğrudan biber meyvelerinde çürümelere neden olan *A. alternata*, *A. niger* ve *F. incarnatum* hastalık etmenlerine karşı bitki uçucu yağların antifungal etkinliği konusunda yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamış olup, söz konusu fungal etmene karşı bitki uçucu yağların etkinliği ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Farklı ürün gruplarından elde edilen *A. niger* etmenine karşı yapılan önceki çalışmalarda *Cymbopogon citratus* (Sonker ve ark., 2014), *Thymus serpyllum* (Sokolic-Mihalak ve ark., 2012) *Satureja thymbra* (Tsimogiannis ve ark., 2017), *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* ve *Fortunella margarita* (Fitsiou ve ark., 2016), fesleğen, tarçın, okaliptüs, mandarin, origanum, nane, çay ağacı ve kekik (Ghaffar ve ark., 2015; Hossain ve ark., 2016), *Foeniculum vulgare* (Mota ve ark., 2015), *Thymus capitatus*, *Daucus crinitus* ve *Tetraclinis articulate* (Alam ve ark., 2014) uçucu yağlarının yanı sıra *Origanum* spp. (Kocic-Tanackov ve ark., 2012), *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. minutiflorum* ve *T. spicata* (Askun ve ark., 2008) bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda güçlü düzeyde antifungal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Gerek biber, gerekse diğer ürünlerden elde edilen *F. incarnatum* üzerine bitki uçucu yağların etkinliği konusunda bir çalışmaya rastlanılmamış olup, depolanmış farklı ürünlerde mikotoksin oluşturan *Fusarium* spp karşı bitki uçucu yağ ve ekstraktlarının antifungal etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarda ise *Solanum torvum* ekstraktının *Aspergillus flavus* ve *Fusarium verticillioides*'e karşı (Abhishek ve ark., 2015), *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* ve *Schinus molle* uçucu yağlarının *Aspergillus parasiticus* ve *Fusarium moniliforme*'ye karşı (López-Meneses ve ark., 2015), tarçın ve *Rosmarinus officinalis* uçucu yağının fumonisin üreten *Fusarium verticillioides* ve *Fusarium proliferatum*'a karşı (Xing ve ark., 2014; Bomfim ve ark., 2015), *O. vulgare* subsp. *hirtum*, *O. minutiflorum* ve *T. spicata* metanol ekstraktlarının ise (Askun ve ark., 2008) *Fusarium proliferatum*'a karşı antifungal etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Soliman ve Badeaa (2002) 12 farklı bitkiden elde edilen uçucu yağların mikotoksin oluşturan depo patojenlerinden *Aspergillus favus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* ve *Fusarium moniliforme*'ye karşı antifungal etkinliklerin araştırıldığı çalışmalarında, uçucu yağlar arasında kekik (*Thymus vulgaris*) ve tarçın (*Cinnamomum*

zeylanicum) uçucu yağlarının 500 ppm den daha düşük dozlarda etkinlik gösterirken, kadifeçiçeği (*Calendula ofricinalis*) 2000 ppm’de, nane (*Mentha viridis*), *Achillea fragrantissima* ve fesleğen uçu (*Ocimum basilicum*) yağı 3000 ppm’de fungal misel gelişimlerini tamamen engellediğini, uçucu yağlar arasında kekik, tarçın, anason ve nane yağlarının en etkili yağlar olduğu, fungusların misel gelişimi ve mikotoksin oluşumunun kullanılan uçucu yağın konsantrasyonuna bağlı olarak azalış gösterdiğini belirlemişlerdir.

A. alternata’ya karşı antifungal etkinliği araştırılan uçucu yağlar arasında ise defne yağının (*L. nobilis*) 800 µg/ml dozunun misel gelişimini tamamen engellediği, fungus spor çimlenmesinin 200 µg/ml dozunda durdurulduğu, 500 µg/ml *in vivo* dozunun ise hastalık etmeninin domates meyvelerinde çürümeleri engellediği bildirilmiştir (Xu ve ark., 2014).

Uçucu yağların yanısıra ITC’lerin antifungal etkinliğinin söz konusu hastalık etmenlerine karşı araştırıldığı çalışmalara oldukça kısıtlı sayıda rastlanılmıştır. Farklı bitki türlerinde sorun olan mikotoksijenik fungal türlerden olan *Aspergillus* spp. (Hontanaya ve ark., 2015), *Penicillium* spp. (Tunç ve ark., 2007) ve *Fusarium* spp. (Nazareth ve ark., 2016) karşı hardal bitkisinin önemli bileşenlerinden olan AITC güçlü antifungal etkinlikler gösterdiğini bildirmişlerdir. Alifatik bir bileşik olan AITC, kara lahana (*Brassica nigra*) ve kahverengi hardal (*Brassica juncea*) bitki uçucu yağlarının ana bileşeni olup, sitoplazmasının içerisinde yer alan thiocyanate ($-N=C=S$) ve sülfürden ($-SH$) dolayı yüksek düzeyde uçuculuğa ve güçlü bir antifungal etkinliğe sahip olduğu çeşitli gıda ve depolanmış ürünlerde sorun olan hastalık etmenlerine karşı önceden yapılmış çalışmalarla bildirilmiştir (Isshiki ve ark., 1992; Delaquis ve ark., 1999; Nadarajah ve ark., 2005; Shin ve ark., 2010; Kara, 2015).

Tracz ve ark. (2017), ITC bileşenlerden allyl isothiocyanate’nın (AITC) depolanmış mısır danelerinde *Aspergillus parasticus*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium verticillioides*, *Alternaria alternata* ve *Gibberela zeae* tarafından neden olunan çürümelere ve toksin oluşumu üzerine etkinliğinin araştırıldığı çalışmada mikotoksin oluşumunun kontrol grubunda gözlemlendiği, AITC uygulamalarında ise 12 mikotoksinin oluşumunun LC-MS/MS ile belirlenemeyecek düzeyde tutulduğunu bildirmişlerdir.

Otoni ve ark (2014) allyl isothiocyanate’nın (AITC) içeren ped şeklinde keselerin yer aldığı saklama kutularında yerfistığında *A. flavus* bulaşıklığını kontrol uygulamasına

göre 10 kat azalttığını, AITC uygulamasının ürün üzerinde hiçbir şekilde olumsuz etkide ve kalıntı bırakmadığını, bu yüzden AITC'ın depolanmış ürünlerde güvenle ve etkili bir şekilde kullanılabilir ürün olduğunu belirlemişlerdir. Nitekim AITC kimyasal yapı bakımından FDA tarafından onaylanmış “Kanserojenik Olmayan Güvenilir Kimyasal” sınıfından bir bileşik olduğu bildirilmiştir (Tracz ve ark., 2017). Santos ve ark. (2010) hermetik koşullarda mısır danelerinde toksin oluşturan mikroorganizmalara karşı 300 µl/kg dozunda mısır danelerinde toksin oluşumu ve fungal kontaminasyonun önemli düzeyde engellendiğini bildirmişlerdir.

Troncoso-Rojas ve ark. (2005) Benzyl isothiocyanate (BITC) in domates meyvelerinde sorun olan *A. alternata*'ya karşı *in vitro* ve *in vivo* antifungal etkinliğini araştırdığı çalışmada BITC'in fungal etmenin misel gelişimini engelleyen MIC'unun 0.1 mg/ml olduğunu, paketlenmiş domates meyvelerinde *A. alternata* tarafından neden olunan çürümeleri 0.56 mg/ml dozunda başarılı bir şekilde engellediğini bildirmişlerdir.

Troncoso ve ark. (2005) lahana bitkisinden elde ettikleri ekstraktların kimyasal analizleri sonucunda allyl, benzyl, 2-phenylethyl ve phenyl isothiocyanates bileşiklerinin 1:3.5:5.3:9.6 oranında bulunduğu, bu bileşenlerin sentetik saf haldeki bileşiklerinin aynı oranda karıştırıldıklarında biber meyvesinde *A. alternata*'ya karşı *in vitro* antifungal etkinliğinin 0.3 mg/ml dozunda %100 misel gelişimini engellediğini, paketlenmiş biber meyvelerinde *A. alternata* tarafından neden olunan çürümeleri 0.56 mg/ml dozunda ticari fungusite oranla daha başarılı bir şekilde engellediğini, uygulamanın biber meyvelerinin kalitesinde herhangi bir olumsuz etkinlikte bulunmadığını bildirmiştir.

4.3. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Antagonist Bakteri İzolatlarının *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Sağlıklı kurutulmuş (ADP olarak kodlanmış) ve aynı bölgelerden temin edilen taze biber (AFP olarak kodlanmış) meyvelerinin içsel dokularından bitki örneklerini ve izole edildiği petriyi temsil edecek şekilde farklı morfolojik görünümlü 25 adet bakteri izolatı elde edilmiştir (Şekil 3.4). Testlemeler öncesinde yapılan tütün HR ve patates yumuşak çürüklük testi sonucunda 4 izolat pozitif reaksiyon vermiş olduğundan denemelere alınmamıştır. Geri kalan 21 izolatın MALDI TOF analiz sonucunda ise 5

izolatın potansiyel insan/hayvan/gıda patojeni (*Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp.,*Escherichia coli*) olması nedeni ile denemeye alınmamış, geri kalan toplam 16 izolatın fungal etmen *F. incarnatum*, *A. alternata* ve *A. niger*'in misel gelişimini engellemesi üzerine olan antagonistik potansiyelleri ikili kültür testleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.13). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 15 ve Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.15 Farklı endofit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi (tanı indeksi)	Misel gelişimi (mm)		
		<i>Fi</i>	<i>Aa</i>	<i>An</i>
ADP2	<i>Enterobacter ludwigii</i> (2.376)	41.7i	34.7e	31.7e
ADP3	<i>Bacillus mojavensis</i> (1.85)	16.3bcd	20.7d	11.7a
ADP5	<i>Bacillus subtilis ssp spizizenii</i> (1.79)	17.3cd	15.7bc	15.7bc
ADP6	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (1.44)	41.7i	20.7d	35.7f
ADP9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1.78)	18.7de	21.0d	12.3ab
ADP10	<i>Bacillus subtilis ssp spizizenii</i> (1.97)	19.0de	18.3cd	23.0d
ADP12	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i> (1.57)	13.0ab	19.7d	12.3ab
AFP1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1.63)	11.7a	13.0ab	16.3c
AFP2	<i>Bacillus atrophaeus</i> (1.467)	19.0de	10.7a	12.3ab
AFP3	<i>Bacillus vallismortis</i> (1.76)	21.7e	20.7d	22.3d
AFP5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1.68)	20.3de	12.7ab	12.7ab
AFP17	<i>Bacillus subtilis ssp spizizenii</i> (1.77)	36.3gh	33.7e	24.3d
AFP18	<i>Enterobacter cloacae</i> (2.30)	29.0f	34.7e	25.3d
AFP20	<i>Bacillus vallismortis</i> (1.724)	17.7	12.3a	12.7ab
AFP24	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (1.43)	14.0abc	20.3d	10.0a
AFP28	<i>Enterobacter cloacae</i> (2.485)	34.7g	34.7e	30.3e
KONTROL		40.0hi	40.7f	40.7g

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Tukey HSD testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

Fi: *Fusarium incarnatum*; **Aa:** *Alternaria alternata*; **An:** *Aspergillus niger*

Çizelge 4.16 Farklı endofit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimini % engelleme potansiyelleri

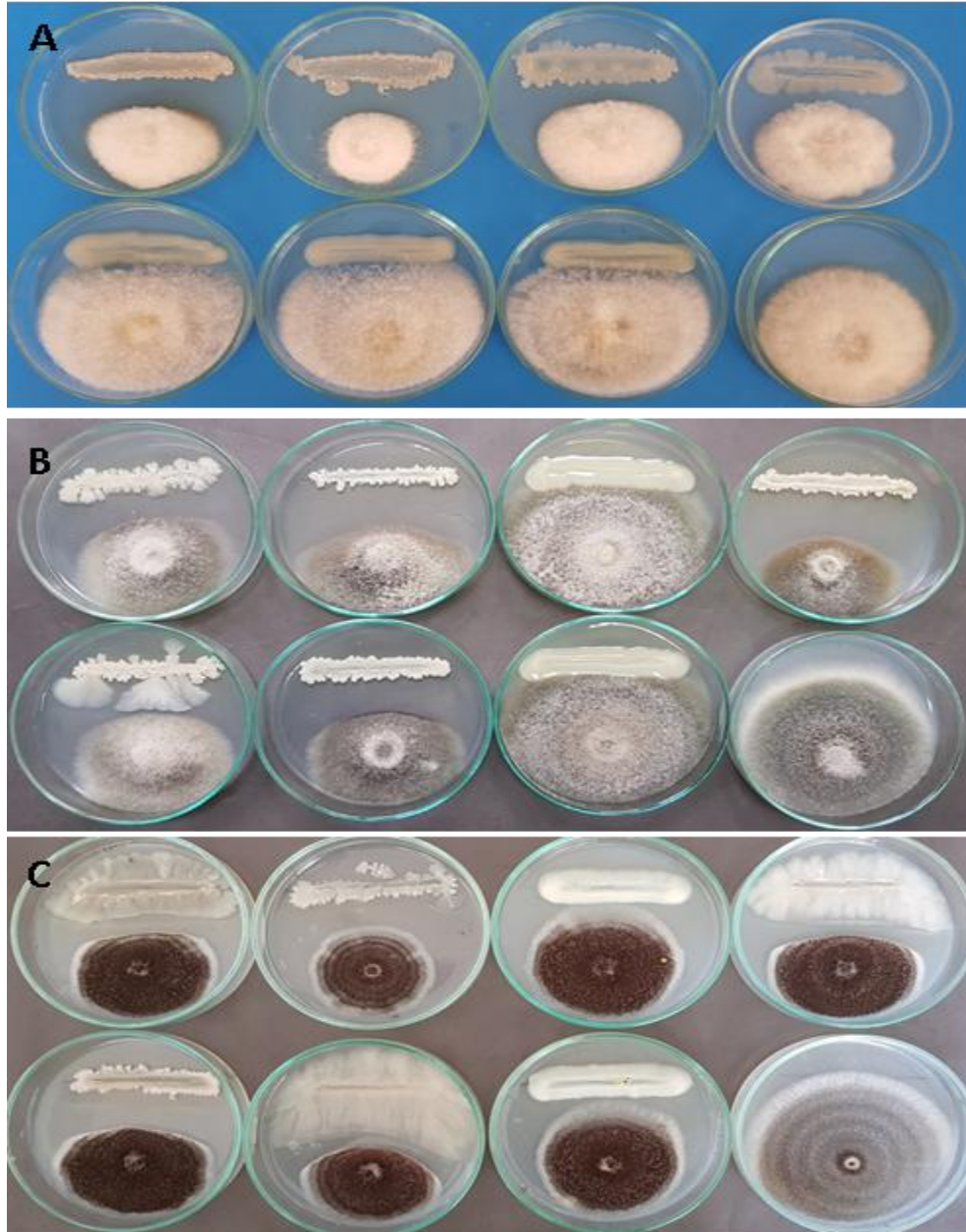
İzolat No. Bakteri Tür İsmi	Misel gelişimini % engelleme potansiyelleri		
	<i>Fi</i>	<i>Aa</i>	<i>An</i>
ADP2 <i>Enterobacter ludwigii</i>	0.0	14.8	22.2
ADP3 <i>Bacillus mojavensis</i>	59.2	49.2	71.3
ADP5 <i>Bacillus subtilis ssp spizizenii</i>	56.7	61.5	61.5
ADP6 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.0	49.2	12.4
ADP9 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	53.3	48.4	69.7
ADP10 <i>Bacillus subtilis ssp spizizenii</i>	52.5	55.0	43.5
ADP12 <i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	67.5	51.7	69.7
AFP1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70.8	68.1	59.9
AFP2 <i>Bacillus atrophaeus</i>	52.5	73.8	69.7
AFP3 <i>Bacillus vallismortis</i>	45.8	49.2	45.1
AFP5 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49.2	68.9	68.9
AFP17 <i>Bacillus subtilis ssp spizizenii</i>	9.2	17.3	40.2
AFP18 <i>Enterobacter cloacae</i>	27.5	14.8	37.8
AFP20 <i>Bacillus vallismortis</i>	55.8	69.7	68.9
AFP24 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	65.0	50.0	75.4
AFP28 <i>Enterobacter cloacae</i>	13.3	14.8	25.5
KONTROL	0.0	0.0	0.0

Fi: *Fusarium incarnatum*; *Aa*:*Alternaria alternata*; *An*: *Aspergillus niger*

Elde edilen bakterilerin cins düzeyinde dağılımı incelendiğinde en fazla antagonistik etki gösteren izolatların 11 adet ile gram pozitif *Bacillus* cinsine bağlı olduğu, bunu sırası ile 3 izolatla gram negatif *Enterobacter*, 1'er izolatla gram negatif *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* cinsleri takip etmiştir. MALDI-TOF analiz sonuçlarına göre elde edilen Gram-pozitif bakterilerin türlere göre dağılımı karşılaştırıldığında en fazla elde edilen türün 4 izolatla *Bacillus subtilis* olduğu, bunu 3 izolatla *Bacillus amyloliquefaciens*, 2 izolatla *Bacillus vallismortis*, 1'er izolatlar *Bacillus mojavensis* ve *Bacillus atrophaeus* olduğu belirlenmiştir.

Bitkilerin endosphere olarak bilinen içsel doku bölgesi birçok faydalı veya zararlı mikroorganizmalara konukçuluk eder. Bu bölgelerde farklı türlere ait pek çok fungal ve bakteriyel antagonist mikroorganizma türlerinin yaşamını sürdürdüğü, bu türlerin α , β ve γ Proteobacteria şubesinin yanı sıra Firmicutes ve Actinobakteri cinslerinedahil türler olduğu bildirilmiştir. Bu şubeler içerisinde *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea* ve *Microbacterium* spp. en fazla bildirilen bakteri cinsleridir (Sun ve ark., 2010; Romero ve ark., 2014; Hallmann ve ark.,

1997; Sturz ve ark., 2000; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Marquez-Santacruz ve ark., 2010; Shi ve ark., 2014). Endofit bakteri izolatlarının bulunduğu bu cinsler aynı zamanda rizosferde epifit olarak bulunan bakteri izolatların yer aldığı cinslerdir. Bu nedenle endofit bakterilerin bir şekilde rizosfer kökenli bakterilerin alt popülasyon grubu olabileceği değerlendirilmektedir (Marquez-Santacruz ve ark., 2010).



Şekil 4.13. Biberlerden izole edilmiş farklı türlerdeki antagonist bakteri izolatlarının ikili kültür testlemelerinde fungal etmen (A) *F. incarnatum*, (B) *A. alternata* ve (C) *A. niger*'in misel gelişimini engelleme etkinlikleri

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 16 bakteri izolatının fungal etmen *Fusarium incarnatum*'un misel gelişimlerini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 4 izolatın (%25.0) misel gelişimini %0.0-24.99 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 3 bakteri izolatı (%18.75) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyde**, %56.25 gibi büyük bir oranının (9 izolat) ise >%50 oranlarda **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda izolatlar arasında önemli farklılıkların olduğu, genel anlamda *Bacillus subtilisspizezenii* dışında Gram pozitif antagonistizolatların (*Bacillus* spp.) gram negatif *Pseudomonas stutzeri*, *Enterobacter ludwigii* ve *Enterobacter cloaceae* izolatlarınakıyasla hastalık etmeninin misel gelişimini etkili bir şekilde engellediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Hastalık etmeninin misel gelişimini en güçlü düzeyde engelleyen izolatın %70.8 engelleme oranı ile *Bacillus amyloliquefaciens* AFP1 olduğu, bu izolatı sırasıyla %68.75 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis subtilis* ADP12 ve *Acinetobacter calcoaceticus* AFP24 izolatları takip etmiştir. İzolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.10). Gram negatif *Enterobacter ludwigii* ADP2 ve *Pseudomonas stutzeri* ADP6 %0-9.2 engelleme oranları ile hastalık etmenini en düşük düzeyde engelleyen izolatlar olarak kayıt edilmiştir (Çizelge 4.15, Şekil 4.13A).

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 16 bakteri izolatının fungal etmen *Alternaria alternata*'nın misel gelişimlerini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 4 izolatın (%25.0) misel gelişimini %0.0-24.99 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 4 izolat (%25.0) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyde**, %50.0 gibi büyük bir oranının (8 izolat) ise >%50 oranlarda **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir. *F. incarnatum* örneğinde olduğu gibi izolatlar arasında önemli istatistiksel farklılıkların olduğu, genel anlamda *Bacillus subtilisspizezenii* dışında Gram pozitif antagonistizolatların (*Bacillus* spp.) gram negatif *Enterobacter ludwigii* ve *Enterobacter cloaceae* izolatlarınakıyasla hastalık etmeninin misel gelişimini etkili bir şekilde engellediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Hastalık etmeninin misel gelişimini en güçlü düzeyde engelleyen antagonist bakteri izolatın %73.8 engelleme oranı ile *Bacillus atrophaeus* AFP2 olduğu, bu izolatı sırasıyla %69.7 engelleme oranı ile *Bacillus vallismortis* AFP20 ve %68.9 engelleme

oranı ile *Bacillus amyloliquefaciens* AFP25 izolatları takip etmiştir. İzolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.13B, Çizelge 4.15). Hastalık etmenini en düşük düzeyde engelleyen izolatlar %14.8 engelleme oranı ile gram negatif bakterilerden *Enterobacter ludwigii* ADP2, *Enterobacter cloaceae* AFP18 ve AFP28 izolatları olmuştur (Çizelge 4.15, Şekil 4.13B).

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 16 bakteri izolatının bir diğer fungal etmen *Aspergillus niger*'in misel gelişimlerini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 2 izolatın (%12.5) misel gelişimini %0.0-24.99 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 5 izolat (%31.25) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyde**, 9 izolat (%56.25) ise >%50 oranlarda **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir. *F. incarnatum* ve *A. alternata* örneklerinde olduğu gibi izolatlar arasında önemli istatistiksel farklılıkların olduğu, genel anlamda Gram pozitif antagonist izolatların (*Bacillus* spp) gram negatif *Pseudomonas stutzeri*, *Enterobacter ludwigii* ve *Enterobacter cloaceae* izolatları ile hastalık etmeninin misel gelişimini etkili şekilde engellediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.15, Şekil 4.13C).

Hastalık etmeninin misel gelişimini en güçlü düzeyde engelleyen antagonist bakteri izolatın %75.4 engelleme oranı ile *Acinetobacter calcoaceticus* AFP24 olduğu, bu izolatı sırasıyla %71.3 engelleme oranı ile *Bacillus mojavensis* ADP3 ve %69.7 engelleme oranı ile *Bacillus amyloliquefaciens* ADP9, *Bacillus subtilis subtilis* ADP12 ile *Bacillus atrophaeus* AFP2 izolatları takip etmiştir. İzolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.13C, Çizelge 4.16). Hastalık etmenini en düşük düzeyde engelleyen izolatlar %12.4 engelleme oranı ile gram negatif bakterilerden *Pseudomonas stutzeri* ADP6, *Enterobacter ludwigii* ADP2, *Enterobacter cloaceae* AFP28 izolatları olmuştur (Çizelge 4.16, Şekil 4.13C).

4.4. Fungal Etmenlerin Misel Gelişimi Üzerine Antagonist Bakteri İzolatlarının Uçucu Bileşenlerinin *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Çalışmalarda kullanılan antagonist bakteriler ile fungal etmenlerin karşılıklı olarak aynı besi yeri üzerindeki etkileşimlerinin belirlendiği ikili kültür testlerinde petri içerisinde test edildikleri etmenlerin üçüncüde etkili olarak belirlenen farklı türlere ait bakteriler (*Bacillus mojavensis* ADP3, *Bacillus subtilis ssp spizizenii* ADP5, *Bacillus*

amyloliquefaciens ADP9, *Bacillus subtilis ssp subtilis* ADP12, *Bacillus amyloliquefaciens* AF1, *Bacillus atrophaeus* AFP2, *Bacillus vallismortis* AFP20 ve *Acinetobacter calcoaceticus* AFP24) tarafından üretilmek suretiyle ortaya çıkan uçucu bileşenlerin fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine olan etkinliğin araştırıldığı bir diğer çalışmada bakterilerin üretmiş olduğu uçucu bileşenlerin fungal etmenlerin misel gelişimini ikili kültür testlerinden elde edilen etkinlikleri (Çizelge 4.17) ile karşılaştırıldığında bakterilerin çoğunluğunun daha yüksek düzeyde engelleme gösterirken (Çizelge 4.18), bazı izolatların ise etkinliğinin düştüğü tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17 Farklı endofit antagonist bakteri izolatların uçucu bileşenlerinin *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği.

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi (teşhis indeksi)	Misel gelişimi (mm)		
		<i>Fi</i>	<i>Aa</i>	<i>An</i>
ADP3	<i>Bacillus mojavensis</i> (1.85)	25.0a	16.0a	23.7ab
ADP5	<i>Bacillus subtilis ssp spizizenii</i> (1.79)	39.7c	16.0a	44.3c
ADP9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1.78)	48.3d	27.0d	26.3b
ADP12	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i> (1.57)	51.7d	21.0c	24.3ab
AFP1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1.63)	30.3b	20.7bc	25.3ab
AFP2	<i>Bacillus atrophaeus</i> (1.467)	33.3b	16.3ab	31.3c
AFP20	<i>Bacillus vallismortis</i> (1.724)	35.0bc	16.7abc	21.7a
AFP24	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (1.43)	35.0bc	34.0e	25.7b
KONTROL		85.0e	56.7f	89.3d

Sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak Tukey HSD testine göre önemli olduğunu gösterir (P<0.05).

Fi: *Fusarium incarnatum*; *Aa*: *Alternaria alternata*; *An*: *Aspergillus niger*

Çizelge 4.18 Farklı endofit antagonist bakteri izolatların uçucu bileşenlerinin *in vitro* ikili kültür testlerinde fungal etmenlerin misel gelişimini % engelleme potansiyelleri.

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi (teşhis indeksi)	Misel gelişimi (mm)		
		<i>Fi</i>	<i>Aa</i>	<i>An</i>
ADP3	<i>Bacillus mojavensis</i> (1.85)	70.6↑	71.8↑	73.5↑
ADP5	<i>Bacillus subtilis ssp spizizenii</i> (1.79)	53.3↓	71.8↑	50.4↓
ADP9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1.78)	43.1↓	52.3↑	70.5↑
ADP12	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i> (1.57)	39.2↓	62.9↑	72.8↑
AFP1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1.63)	64.3↓	63.5↓	71.6↑
AFP2	<i>Bacillus atrophaeus</i> (1.467)	60.8↑	71.2↑	64.9↓
AFP20	<i>Bacillus vallismortis</i> (1.724)	58.8↑	70.6↑	75.7↑
AFP24	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (1.43)	58.8↓	40.0↓	71.3↓
KONTROL		0	0	0

↑: Engelleme etkinliğinin ikili kültür testlemesine göre daha yüksek olduğunu

↓: Engelleme etkinliğinin ikili kültür testlemesine göre daha düşük olduğunu

Fi: *Fusarium incarnatum*; *Aa*: *Alternaria alternata*; *An*: *Aspergillus niger*

Çalışmamız kapsamında sağlıklı taze ve kurutulmuş biber meyvelerinden elde edilen ve tanısı yapılan izolatlar göz önüne alındığında, önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Bacillus* spp. ait izolatlar izolasyonlarda en sık karşılaşılan bakteriler olmuştur (Aktan, 2018).

Biyolojik mücadele çalışmalarında sıklıkla izole edilen *Bacillus* spp ait izolatların 70'den fazla antimikrobiyal etkiye sahip metabolit/bileşik/antibiyotik ürettiği ve bu bileşiklerin farklı konukçu bitkilerde yaprak, meyve, çiçek, gövde, köklerde hastalık oluşturan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı en fazla çalışılan ve etkinliği ortaya konulmuş türler olduğu görülmüştür (Tekin, 2002; Aktan, 2018). *Bacillus* spp. arasında *B. subtilis* türüne ait izolatların çok farklı türde antimikrobiyal etkiye sahip bileşikleri sentezleme yetisinde olması nedeni ile üzerinde en fazla çalışılan bakteri türü olmuştur (Stein, 2005). Söz konusu bileşikler arasında *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'in iturin, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*'in surfactin veya yakın türevleri olan lichenysin'i (Huszcza ve Burczyk, 2006) üretirken, fengycin *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'in yanısıra *B. cereus* (Tsuge ve ark., 1999) ve *B. thuringiensis* (Kim ve ark., 2004) tarafından üretilir.

Bacillus spp. (özellikle *Bacillus subtilis*) farklı moleküler yapıya sahip antimikrobiyal etkinliğe sahip bileşikler üretmeleri, üretilen bileşiklere karşı patojenlerin kolayca dayanıklılık geliştirememesi, olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı endospor oluşturmaları gibi üstün biyolojik özellikten dolayı hastalıklara karşı etkili biyopestisitlerin üretilmesinde en uygun adaydır. Nitekim *Agrobacterium*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinslerine bağlı türler küresel pazarda biyopreparatı yapılmış olan önemli mikroorganizmalar olduğu bilinmektedir (Fravel, 2005). Dünya pazarında yer alan biyolojik preparatların yarıdan fazlasını *Bacillus* spp ait biyopreparatlar oluşturur. Bu preparatlar arasında en fazla pazar payını (>%70) ise böceklerle mücadelede kullanılan *B. thuringiensis* preparatı almaktadır. Biyopreparatı yapılmış pazarda önemli yere gelmiş diğer türler olarak *Bacillus subtilis* strain GBO3, *B. subtilis* strain QST 713, *B. subtilis* MBI 600, *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* strain FZB24, *B. licheniformis* strain SB3086 ve *B. pumilus* GB 34 nolu izolatlar gösterilebilir.

Çalışmada elde edilen izolatlar tür düzeylerinde incelendiğinde endospor üretme kabiliyetinde olan *Bacillus* spp (özellikle *Bacillus subtilis*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* ssp *spizizenii*)'in test edilen fungal

etmenlerin yanısıra farklı konukçu bitkilerde diğer toprak ve yaprak kökenli hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeylerde antagonistik etkinlikler gösterdiği, antagonistik etkinliklerin genelde antimikrobiyal bileşiklerin (siderofor, proteaz, amonyak gibi) yanısıra, biyosüpfektant, antibiyotik peptidler, mikolotik enzimlerden chitinaz, β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanase gibi enzimlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Huang ve Chen, 2004; Araujo ve ark. 2005; Gupta ve ark., 2006; Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiharn ve ark., 2008; Xiao ve ark., 2009; Senthilkumar ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2012; Aktan, 2018).

Yapmış olduğumuz literatür araştırmasında söz konusu biyolojik mücadele etmenlerinin biberden izole edilmiş ve çalışmalarımızda kullanılmış olan mikotoksijenik fungal izolatlara karşı olan biyolojik etkinlik çalışmalarına rastlanılmamıştır. Denemede kullanılan fakat başka bitkilerden izole edilen benzer etmenlere ise oldukça kısıtlı sayıda olduğu görülmüştür.

Sid ve ark. (2003) biber bitkisinin kök ve yapraklarından elde ettikleri 500 den fazla bakteri izolatını biberlerde kök çürüklüğü ve yaprak leke hastalığı etmenleri olan *Phytophthora capsici* ve *Alternaria alternata*'ya karşı test ettikleri çalışmada, 60 izolatın test edildikleri etmenlere karşı değişen oranda engelleme gösterdiğini, 10 izolatın her iki etmenede etkinlik gösterdiğini, engellemelerin gözlemlendiği noktalarda fungus miselleri üzerinde engelleme yapan bakteri izolatlarının hifler üzerinde pıhtılaşma, erime, vakolleşme, sitoplazmik bozulmalar şeklinde görülen morfolojik bozukluklara neden olduğunu, seçilen ve *Bacillus* spp (*B. subtilis*, *B. licheniformis* vb) olarak teşhis edilen 4 izolat ile yapılan *in vivo* denemelerde izolatların *Phytophthora capsici*'ye karşı %49-80, *Alternaria alternata*'ya karşı ise %53-74 oranında etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde farklı kültür bitkilerinde yaprak leke hastalığına neden olan *A. alternata* etmenine karşı *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. (Pastor ve ark., 2012; Pane ve ark., 2015; Li ve ark., 2015; Kurniawan ve ark., 2018) ait izolatların biyolojik mücadele çalışmalarının yapıldığı ve izolatların gerek *in vitro* gerekse *in vivo* çalışmalarda hastalık çıkışını etkili bir şekilde baskılayabildiği bildirilmiştir.

Benzer şekilde Song ve ark. (2014) Kore'de ginseng köklerinde çürümelere neden olan *Fusarium cf. incarnatum*'a karşı biyolojik mücadele etmenlerinin etkinliklerinin araştırıldığı çalışmada, 392 izolat içinde antagonist *Bacillus* spp. B2-5 izolatının fungusun *in vitro* misel gelişimini yüksek düzeyde engellediğini, hifler

üzerinde morfolojik anormalliklere neden olduğunu söz konusu izolatın hastalık etmeni ile mücadelede kullanılabilecek iyi bir alternatif mücadele yöntemi olduğunu bildirmişlerdir.

Raut ve ark. (2014) mikotoksijenik *A. niger* etmenine karşı 3 *Bacillus* spp (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*) , 3 *Pseudomonas* spp (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) ve 1 *Trichoderma* sp. izolatının biyokontrol etkinliğini araştırdıkları çalışmada, aday bakteri izolatlarından sadece *B. amyloliquefaciens* 1014 izolatın yüksek antifungal etkinlik gösteren metabolitler üretmek suretiyle etkinlik gösterdiğini, üretilen antimikrobiyal metabolitin ısıya dayanıklı yapıda olduğunu bildirmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Hatay ili, Antakya ilçesindeki aktarlarında ve pazar yerlerinde satılan gerek bölge halkı gerekse çevre illerde yoğun talebi olan ve tüketilen kurutulmuş kırmızı biber (baş biber) meyvelerinde bozulma ve küflenmeye neden olmak suretiyle muhtemelen mikotoksin üreten fungal hastalık etmenlerinin belirlenmesi, en sık karşılaşılan türlere karşı kimyasallara alternatif yeni mücadele yöntemlerinin etkinliği *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Yapılan sörveyler sonucunda meyvelerin dış kabuklarında renk değişikliği, kararma, çürüme belirtileri gösteren meyvelerden yapılan izolasyonlarda 40 farklı fungal izolat elde edilmiştir. İzolatların rastlanma sıklıklarına bakıldığında en sık karşılaşılan türlerin *Aspergillus* spp olduğu, bu türler içinde *A. niger* %20 rastlanma sıklığı ile en fazla karşılaşılan tür olduğu, bu türü sırasıyla %15 ile *Fusarium incarnatum* ve %12.5 rastlanma sıklığı ile *A. alternata* etmenleri izlemiştir. Söz konusu fungal türlerin yapılan patojenite testi sonucunda yapay olarak enfekte edilen sağlıklı meyvelerde pazarda görülen belirtilere benzer belirtilere sebep olmuştur. Söz konusu hastalık etmenlerin *A. niger* ve *A. alternata*'nın ülkemizde varlığı bilinmekle birlikte, *F. incarnatum*'un biber meyvelerinde çürümelere neden olmak suretiyle hastalık etmeni olduğu ülkemiz için ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. *A. alternata* ve *A. niger*'in depolanmış meyve ve sebzelerde sorun olduğu ülkemizde yapılan önceki çalışmalarda bildirilmiştir.

Söz konusu 3 hastalık etmeninin yapılan önceki çalışmalara göre mikotoksin üretme potansiyeline sahip olduğu bilinmesi nedeni ile bu çalışmada izole edilen ve tanılanan etmenlerin mikotoksin üreten potansiyelleri yeniden araştırılmamıştır. Mikotoksinlerin özellikle fungal etmenlerden *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* spp. tarafından üretilen toksik sekonder kimyasal bileşikler olup, fungal etmenler tarafından tarlada başlayan enfeksiyonlarla ürünlerde bozulmalara neden olduğu ürünlerde birikimleri ise tarladan başlar, depolanma süresince tüketilinceye kadar ürün üzerinde devam eder (Reedy ve ark., 2010). Ürünlerde biriken ve çoğunluğunun kanserojenik etkiye sahip olduğu bildirilen mikotoksinler bu ürünleri tüketen insan ve hayvanlarda ciddi hastalıklara neden olur. Mikotoksin üreten fungal hastalık etmenlerinin kimyasal mücadelesi oldukça zor olmasının yansısı, bu etmenlere hali hazırda ruhsatlı fungusitlerin bulunmaması, kayıt dışı kullanılan kimyasalların ise

çevreye, insana ve hedef dışı yararlı mikroorganizmalara olan olumsuz etkileri, sık ve yüksek dozda kullanılmaları nedeni ile hastalık etmenlerinin dayanıklılık geliştirmelerigibi nedenlerden dolayı bu tür hastalıklarla mücadelede çevre dostu, kimyasallara alternatif yeni mücadele yöntemlerinin test edilmesinin gerekliliği yapılan birçok çalışma ile vurgulanmıştır (Soliman ve Badea, 2002; Irkin ve Korukluoglu, 2007). Hastalıklara maruz kalan bitkiler aynı zamanda içerdikleri farklı kimyasal yapıdaki antimikrobiyal özelliğe sahip bileşikler ve uçucu özelliğe sahip yağlara sahiptir. Bu uçucu özellikteki antimikrobiyal bileşikler ve uçucu yağlar birçok fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerine karşı etkiye sahip olduğu, kullanıldıkları yerlerde bitkiye ve tüketen kişiye, ve çevresine zarar vermediği, patojenlerin dayanıklılık geliştirememeleri, kalıntılara neden olmamaları gibi takdir edilen nedenlerden dolayı geçmişten günümüze sürekli olarak araştırılan doğal kaynaklardır (Burt, 2004; Bakkali ve ark., 2008).

Hastalıklarla kimyasallara alternatif çevre dostu, güvenilir bir diğer yaygın mücadele yöntemi doğada saprofit olarak bitkide hastalığa neden olmayan mikroorganizmaların biyolojik mücadele etmeni olarak kullanıldığı yöntemidir. Sağlıklı bitkilerin rizosfer (kök ve toprak bölgesi), filosfer (toprak üstü aksamı (gövde, yaprak, çiçek, meyve vb) ve endosfer (bitki doku içi) kısımlarından izole edilen yararlı mikrobiomların (fungal, bakteriyel, viral mikroorganizmalara verilen genel ad) değişik formülasyon ve uygulama şekillerinde kullanıldığı “Biyolojik Mücadele” hastalıklar tarafından neden olunan zararı en düşük düzeye indirme strateji olarak tarif edilir (Tjamos ve ark.,2010; Wang ve ark., 2010; Nega, 2014). Hastalıklarla biyolojik mücadele yöntemlerinin araştırıldığı çalışmalara olan ilgiye son yıllarda artış eğilimi göstermektedir (Sülü ve ark., 2016).

Bu çalışmada mikotoksin üretme potansiyeli olan *A. niger*, *F. incarnatum* ve *A. alternata* etmenlerine karşı doğal bitkisel kökenli antimikrobiyal etkinliği bilinen farklı kimyasal yapıdaki isothiocyanate’lar (allyl, benzyl, ethyl ve methyl isothiocyanate) ile farklı tıbbi-aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağların yanısıra sağlıklı biber meyvelerinden elde edilen endofit antagonist bakteriyel izolatların fungusların misel gelişimini engelleme potansiyelleri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan ITC ve bitki uçucu yağların tamamı test edilen fungal etmenler *A. alternata*, *A. niger* ve *F. incarnatum*’a karşı dozların artışına bağlı olarak

artan oranda antifungal etkinlik göstermiştir. Uçucu yağlar arasında Lamiaceae famiyasına dahil kekik türleri (*T. spicata*, *T. vulgaris* ve *O. syriacum*) denemede kullanılan rezene, defne ve okaliptüs uçucu yağlarına göre daha düşük dozlarda ve güçlü düzeyde antifungal etkinlik göstermiş olup, gösterilen etkinliğin tespit edilen MIC değerlerinde fungusidal olduğu belirlenmiştir. Farklı ITC bileşiklerin antifungal etkinlikleri tüm fungal etmenlerin misel gelişimini engeleyen MIC (Çizelge 4.13) ve EC₅₀ sonuçları (Çizelge 4.14) açısından değerlendirildiğinde fungal etmenlere karşı en yüksek antifungal etkinlik, ITC bileşikleri arasında MITC tarafından gösterildiği, bunu sırasıyla BITC, AITC'nin takip ettiğini, en düşük etkinliğin ise EITC tarafından gösterildiği belirlenmiştir.

Biyolojik mücadele özellikle toprak kökenli hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif mücadele yolları arasında en önemlilerinden biridir (Tjamos ve ark., 2010). Yapılan literatür araştırması sonucunda denemede kullanılan fakat başka kültür bitkilerinden izole edilen *A.niger*, *A. Alternata* ve *F.incarnatum* etmenlerine karşı yapılmış sınırlı sayıda biyolojik mücadele çalışmaları bulunmakla birlikte, biber meyvelerinde bozulmalara neden olan mikotoksijenik *A.niger*, *A. Alternata* ve *F.incarnatum*'a karşı yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu bağlamda, çalışma biberden izole edilen mikotoksijenik fungal etmenlerine karşı biyolojik mücadele olanaklarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

Sağlıklı bitkilerin dış yüzeyleri ile içsel dokular birçok faydalı mikroorganizmalara konukçuluk eder. Bu bölgelerden izole edilen saprofit kökenli bitkilerde hastalık oluşturma yetisinde olmayan mikroorganizmalar ekonomik öneme sahip bitkilerde sorun olan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılır. Çalışmamızda farklı bölgelerde yetişen sağlıklı taze ve kurutulmuş biber meyvelerin içsel dokularından yapılan izolasyonlar sonucunda insan ve bitki patojeni olmayan 26 izolat arasında 16 izolatın fungal etmenlerin misel gelişimini engellemesi üzerine olan antagonistik etkinliğinin araştırıldığı çalışmamızda önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Bacillus* spp. ait (*Bacillus subtilis* ssp *subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus amyloliquefaciens*) izolatlar izolasyonlarda en fazla karşılaşılan bakteriler olmuştur. *Bacillus* türleri arasında özellikle *Bacillus subtilis*

subtilis ve *B. mojavensis* izolatları test edilen tüm fungal türler göz önünde tutulduğunda yüksek düzeyde hif gelişimini engelleme başarısı göstermiştir. Bakteriler tarafından gösterilen antagonisitlik etkinliğin bu bölgelerden alınan misel diskleri taze PDA besisi yerine aktarıldığında bu hiflerin yeniden gelişemediği, yine aynı zamanda engelleme bölgesine yerleştirilen sağlıklı misel disklerin çimlenmemesi antagonist bakteriler tarafından gösterilen engellemelerin fungusidal etkisinden kaynaklandığını göstermiştir.

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde aynı türe ait bakteri izolatları arasında fungus misellerinin engellenmesi arasındaki farklılıklar gözlenmiştir. Bu durumun antagonist bakteri izolatlarının izole edildikleri bitki örneğinin yetiştiği ortamdaki çevre koşullarının izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer durum önceden yapılmış birçok çalışmada bildirilmiştir (Bernal ve ark., 2002; Araujo ve ark., 2005).

Sonuç olarak, bitkisel kökenli ITC bileşikler, uçucu yağlar ve antagonist bakteri türleri biber meyvelerinde çürümelere neden olan fungal hastalık etmenlerine karşı *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Güçlü antifungal etkinlik gösteren bakteri izolatları (özellikle *Bacillus* spp. ait izolatlar) ile bitkisel kökenli bileşenlerin (MITC ile özellikle farklı kekik türlerinden elde edilen yağlar) uçucu etkinliği göz önüne alındığında teksele veya karışımlarının hastalık etmenlerine karşı pestisitlere alternatif olabilecek çevre dostu biyopreparat olarak hastalık yönetiminde kullanılabilecek mücadele araçları olarak değerlendirilmiştir. Gerek antagonist bakterilerin gerekse bitkisel kökenli bileşiklerin sahip olduğu farklı etki mekanizmaları sayesinde antifungal etkinlik göstermesi, söz konusu mücadele şekline karşı hastalık etmenlerinin direnç geliştirmesinin oldukça zordur.

Fungal etmenlere karşı güçlü *in vitro* antifungal etkinliğe sahip olan bakteriyel izolatlar ile bitkisel orijinli bileşiklerin/uçucu yağların teksele ve/veya karışım halinde preparatları yapılarak depolanmış ürünlerde sorun hastalık etmenlerine karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda denenmesi önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Wahhab, M.A., Hasan A.M., Aly, S.E. and Mahrous, K.F., 2005. Adsorption of sterigmatocystin by montmorillonite and inhibition of its genotoxicity in the Nile Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). **Mutation Research**, 582, 20-27.
- Abhishek, R.U., Thippeswamy, S., Manjunath, K. and Mohana, D.C., 2015. Antifungal and antimycotoxigenic potency of *Solanum torvum* Swartz. leaf extract: isolation and identification of compound active against mycotoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Journal of Applied Microbiology**, 119, 1624-1636.
- Ahmed, A.S., Perez-Sanches, C., Egea, C. and Candela, M.E., 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot by *Phytophthora capsici* in pepper plants. **Plant Pathology**, 48, 58-65.
- Aktan, Z.C., 2018. Badem ağaçlarında kurumaya neden olan bazı fungal hastalık etmenleri ile mücadelede endofit bakterilerin kullanım olanaklarının araştırılması üzerine bir araştırma. **Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kamal Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı**.
- Alam, S.B., Benyelles, N.G., Dib, M.E.A., Djabou, N., Tabti, L., Paolini, J., Muselli, A. and Costa, J., 2014. Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western Algeria against five fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, 87, 56-61.
- Anonim, 2016. TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim Tarihi 02.01.2019)
- Anonymous, 2016. FAOSTAT, Word Production data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim Tarihi 02.01.2019)
- Anonymous, 2017. FAOSTAT, Word Production data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim Tarihi 02.01.2019)
- Anonymous, 2018. <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=29>.
- Araujo, F.F., Henning, A.A. and Hungria, M., 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21, 1639-1645.
- Askun, T., Tumen, G., Satil F. and Kilic, T., 2008. Effects of some Lamiaceae species methanol extracts on potential mycotoxin producer fungi. **Pharmaceutical Biology**, 46, 688–694.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Waomar, M., 2008. Biological effects of essential oils-A review. **Food Chem. Toxicol.**, 46, 446-475.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B., 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. **APS Press**, St. Paul, Minnesota. pp. 218.
- Bernal G., Illanes, A. and Ciampi, L., 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, 5, no. 1.
- Bisht, D., Pal, A., Chantotiya C.S., Mishra D. and Pandey, K.N., 2011. Terpenoid composition and antifungal activity of three commercially important essential oils against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. **Natural Product Research**, 25, 1993-1998.

- Bokhari, F.M. 2007. Spices mycobiota and mycotoxins available in Saudi Arabia and their abilities to inhibit growth of some toxigenic fungi. **Mycobiology** 35: 47–53.
- Bomfim, N.S., Nakassugi, L.P., Oliveira, J.F.P., Kohiyama, C.Y., Mossini, S.A.G., Grespan, R., Nerilo, S.B., Mallmann, C.A., Filho, B.A.A. and Junior, M.M., 2015. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.). **Nirenberg Food Chemistry**, 166, 330–336.
- Booth, C., 1971. The Genus *Fusarium*. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, Surrey, England, pp. 237.
- Burt, S., 2004. Essential oils, their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **International Journal of Food Microbiology**, 94, 223–253.
- Cabral, L.C., Pinto, V.F., and Patriarca A., 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, 166, 1–14.
- Carbone, I., Kohn, L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** 91, 553–556.
- Catello, P. and Massimo, Z., 2015. Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato. **Biological Control**, 84, 11–18.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Kozo, A. and Lumyong, S., 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. **KMITL Sci Tech J.**, 8, 18–23.
- Chen, H., Davidson, P. M., and Zhong, Q., 2014. Impacts of sample preparation methods on solubility and antilisterial characteristics of essential oil components in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, 80, 907–916.
- Chung, S.H., Kong, H.S., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D. and Roberts, D.P., 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 80, 115–123.
- Císarová, M., Tančinová, D., Medo J. and Kačániová, M., 2016. The *in vitro* effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. **Journal of Environmental Science and Health**, 51, 668–674.
- da Silva, F.C., Chalfoun, S.M., de Siqueira, V.M., Botelho, D.M.S., Lima, N., and Batista, L.R. 2012. Evaluation of antifungal activity of essential oils against potentially mycotoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 22, 1002–1010.
- de Lima, C.B., Rentschler, L.L.A., Bueno, J.T. ve Boaventura, A.C. 2016. Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci* and on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). **Ciencia Rural**, 46, 764–770.
- Delaquis, P.J, Ward, S.M., Holley, R.A., Cliff, M.C. and Mazza, G., 1999. Microbiological, chemical and sensory properties of pre-cooked roast beef preserved with horseradish essential oil. **Journal of Food Science**, 64, 519–524.
- Dix, N.J. and J. Webster., 1995. Fungal Ecology. **Chapman and Hall**, London.

- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson T.H., 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol. 1. **Academic Press**, New York. pp. 859.
- Drobnica, L., Zemanova, M., Nemec, P., Antos, K., Kristian, P., Stullerova, A., Knoppova, V. and Nemec, P., 1967. Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds. I. Naturally Occurring Isothiocyanates and Their Analogues. **Appl. Microbiol.**, 15, 701-709.
- Dugan, F.M., 2006. The Identification of Fungi, An Illustrated Introduction With Keys Glossary and Guide to Literature. APS. Press, St. Paul. Minnesota, USA. pp. 176.
- Duman, A.D., 2010. Storage of red pepper under hermetically sealed or vacuum conditions for preservation of its quality and prevention of mycotoxin occurrence. **J. Stored Prod. Res.** 46, 155–160.
- Dvegowda, G., Raju, M.V.L.N., and Swamy, H.V.L.N., 1998. Mycotoxins, Novel solutions for their counteraction. **Feedstuffs**, 70, 12–13.
- Dwivedy, A.K., Kumar, M., Upadhyay, N., Prakash, B. and Dubey, N.K., 2016. Plant essential oils against food borne fungi and mycotoxins. **Current Opinion in Food Science**, 11, 16–21.
- Ellis, B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, Surrey, England. pp. 608.
- Elshafie, A.E., Al-Rashdi, T.A., Ai-Bahry, S.N. and Bakheit, C.S., 2002. Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. **Mycopathologia**, 155, 155-160.
- Erdogan, A. 2004. The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey. **Chemosphere** 56: 321–325.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K., 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. **American Phytopathological Society**, St. Paul, MN.
- Farah, H., Peter, F., Vu, K.D., Mehdi, H., Salmieri, Stephane, S. and Monique, L., 2016. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. **Food Microbiology**, 53, 24-30.
- Fatima, N., Batool, H., Sultana, V., Ara, J., and Ehteshamul-Haque, S., 2009. Prevalence of post-harvest rot of vegetables and fruits in Karachi, Pakistan. **Pak. J. Bot.**, 41, 3185-3190.
- Feng, W. and Zheng, X., 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. **Food Control**, 18, 1126-1130.
- Fiddman, P.J. and Rossall, S., 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. **J. Appl. Bacteriol.**, 74, 119–126.
- Fitsiou, E., Mitropoulou, G., Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Vamvakias, M., Bardouki, H., Panayiotidis, M.I., Galanis, A., Kourkoutas, Y., Chlichlia, K. and Pappa, A., 2016. Phytochemical profile and evaluation of the biological activities of essential oils derived from the Greek aromatic plant species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. **Molecules**, 21, Num. 1069.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 43, 337-359.
- Geiser, D.M., Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kulda, G.A. and O'Donnell, K., 2004. Fusarium-ID v. 1.0, a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, 110, 473–479.

- Ghaffar, A., Yameen, M., Kiran, S., Kamal, S., Jalal, F., Munir, B., Saleem, S., Rafiq, N., Ahmad, A., Saba, I. and Jabbar, A., 2015. Chemical Composition and *in vitro* evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils extracted from seven *Eucalyptus* Species. **Molecules**, 20, 20487-20498.
- Gupta, C.P., Kumar, B., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2006. Chitinase mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **BioControl**, 51, 821–835.
- Halfonmeiri, A. and Rylski, I., 1983. Internal mold caused in sweet pepper by *Alternaria alternata* fungal ingress. **Phytopathology**, 73, 67-70.
- Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43, 895-914.
- Ham, H., Kim, S., Kim, M-H., Lee, S., Hong, S.K., Ryu, J-G. and Lee, T., 2016. Mycobiota of ground red pepper and their aflatoxigenic potential. **Journal of Microbiology**, 54, 832–837.
- Hammami, W., Fiori, S., Al Thani, R., Kali, N.A., Balmas, V., Migheli, Q. and Jaoua, S., 2014. Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. **Food**, 37, 177-181.
- Hardenburg, R.E., Watada, A., and Wang, C.Y., 1990. The commercial storage of fruits, vegetables, Xorist and nurse stocks. Washington, DC, US Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. 66, 23–25.
- Heperkan, D., 2003. Gıdalarda Mikotoksinler ve Ülkemiz Açısından Önemi. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu. İstanbul.
- Hontanaya, C., Meca, G., Luciano, F.B., Manes, J. and Font, G., 2015. Inhibition of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 production by *Aspergillus parasiticus* in nuts using yellow and oriental mustard flours. **Food Control**, 47, 154-160.
- Hossain, F., Follett, P. Vu, K.D., Harich, M., Salmieri, S. and Lacroix, M., 2016. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. **Food Microbiology**, 53, 24-30.
- Hu, Y., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G., and Yang, M., 2017. Mechanisms of antifungal and anti aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food Chemistry**, 220, 1–8.
- Huang, C.J. and Chen, C.Y., 2004. Gene cloning and biochemical characterization of chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. **Annals of Microbiology**, 54, 289-297.
- Hussein, H.S., and Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, 167, 101-134.
- Huszczka, E. and Burczyk, B., 2006. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61(9-10), 727-733.
- Iqbal, S. Z., Paterson, R. R. M., Bhatti, I.A., Asi, M. R., Sheikh, M.A. and Bhatti, H. N., 2010. Aflatoxin B1 in chillies from the Punjab region, Pakistan. **Mycotoxin Res.**, 26, 205–209.
- Irkin, R. and Korukluoglu, M., 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. **African Journal of Biotechnology**, 6, 384-387.
- Isshiki, K., Tokuoka, K., Mori, R. and Chiba, S., 1992. Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 56, 1476–1477.

- Jeswal, P. and Kumar, D. 2015. Mycobiota and natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A, and citrinin in Indian spices confirmed by LC-MS/MS. **Int. J. Microbiol.** 15: 1–8.
- Kabak, B. and Dobson, A.D.W., 2017. Mycotoxins in spices and herbs-An update. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57, 18-34.
- Kara, M., 2015. Turunçgillerde ekşi çürüklük Hastalığı etmeni *Geotrichum citri-aurantii*' ye karşı isothiocynate bileşiklerinin antifungal etkileri üzerine bir araştırma. **Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı.**
- Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y. and Chi, Y.T., 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, 97, 942-949.
- Ko, H.J. Choi, J.H., Kim, D.S., Yoo, Y.J. and Kyung, K.H., 2004. Mycology of red pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits discolored due to mold growth during sun-drying. **Food Science and Biotechnology**, 13, 627-631.
- Koç, F. and Kara, S., 2014. Environmental factors affecting efficacy of some essential oils and potassium sorbate to control growth of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* on wheat and maize grains. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 16, 1325-1334.
- Kocic-Tanackov, S., Dimic, G., Tanackov, I., Pejin, D., Mojovic, L. and Pejin, J., 2012. The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. **LWT-Food Science and Technology**, 49, 14-20.
- Kritzing, Q., Aveling, T.A.S. and Marasas, W.F.O., 2002. Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. **Seed Science and Technology**, 30, 609-619.
- Kumar, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiol. Res.**, 167, 493–499.
- Kumari, P., Khanna, V. and Kumar, P., 2017. Multifaceted rhizobacteria-mediated growth augmentation in chickpea. **Agric. Res.**, 6, 368–377.
- Kurniawan, O., Wilson, K. Mohamed, R. and Avis, T.J., 2018. *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit. **Biological Control**, 126, 136-141.
- Kurt, S., Gunes, U., and Soylu E.M., 2011. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of synthetic pure isothiocyanates against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pest Management Science**, 67, 869-875.
- Kurtzman C.P., Horn B.W., and Hesseltine C.W, 1987. *Aspergillus nomius* a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 53, 147-158.
- Landa, B.B., Hervas, A., Bettiol, W. and Jimenez-Diaz, R.M., 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. **Phytoparasitica**, 25, 305-318.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece, Editor). In: *Methods in Plant Pathology*, **Blackwell Scientific Publications**. Pp, 2, 176-177, Oxford.
- Lema, A.A., Mudansiru A., Alexander, B.A., and Sakinatu, M.J. 2018. Evaluation of fungal species isolated from three different varieties of pepper (*Capsicum*

- chinense*, *C. frutescens* and *C. annum* L.) in Dutsin-ma, Katsina State. **Annals of Biological Sciences** 6(1):13-17
- Li, Z., Guo, B.K., Wan, K., Cong, M., Huang, H. and Ge, Y.Y., 2015. Effects of bacteria-free filtrate from *Bacillus megaterium* strain L2 on the mycelium growth and spore germination of *Alternaria alternata*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 29, 1062-1068.
- Line, J.E., and Brackett R.E., 1995. Factors affecting Aflatoxin B1 removal by *Flavobacterium aurantiacum*. **J. Food Prot.**, 58, 91-94.
- López-Meneses, A.K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi-Mendoza, J., Rosas-Burgos, E.C., Luque-Alcaraz, A.G., and Cortez-Rocha, M.O., 2015. Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*. **Food Sci. Technol, Campinas**, 35, 664-671.
- Mandeel, Q.A. 2005. Fungal contamination of some imported spices. **Mycopathologia** 159: 291–298.
- Mari, M., Leoni, O., Iori, R. and Cembali, T., 2002. Antifungal vapour-phase activity of allyl isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. **Plant Pathology**, 51, 231–236.
- Marquez-Santacruz, H.A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M.C., Velazquez-Sepulveda, I. and Santoyo, G., 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Genetics and Molecular Research**, 9, 2372-2380.
- McKee L.H. 1995. Microbial Contamination of Spices and Herbs, A Review. **Lebensm. Wiss. U. Technol.**, 28, 1-11.
- Miller, W.R, Spalding, D.H., Risse, L.A. and Chew, V., 1984. The effect of an imazalil-impregnated Wlm with chlorine and imazalil to control decay of bell pepper. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, 97, 108–111.
- Mota, A.S., Martins, M.R., Arantes, S., Lopes, V.R., Bettencourt, E., Pombal, S., Gomes, A.C. and Silva, L.A., 2015. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese *Foeniculum vulgare* Fruits. **Natural Product**, 10, 673-676.
- Nadarajah, D., Han, J.H. and Holley. R.A., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157,H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. **International Journal of Food Microbiology**, 99, 269–279.
- Nazareth, T.M., Bordin, K., Manyes, L., Meca, G., Manes, J., and Luciano, F.B., 2016. Gaseous allyl isothiocyanate to inhibit the production of aflatoxins, beauvericin, and enniatins by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium poae* in wheat flour. **Food Control**, 62, 317-321.
- Nazareth, T.M., Corrêa, J.A.F., Pinto, A.C.S.M., Palma, J.B., Meca, G., Bordin, K. And Luciano, F.B., 2018. Evaluation of gaseous allyl isothiocyanate against the growth of mycotoxigenic fungi and mycotoxin production in corn stored for 6 months. **Journal Science Food Agric.**, 98, 5235-5241.
- Nega, A., 2014. Review on concepts in biological control of plant pathogens. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, 4, 33-54.
- Nelson, P.E., Tousson, T.A. and Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. **The Pennsylvania State University Press**, University Park and London, Pp.193.
- Nguefacka, J., Tamguea, O., Dongmoa, J.B.L., Dakolea, C.D., Lethb, V., Vismerec, H.F., Zolloa, P.H.A., and Nkengfackd, A.E., 2012. Synergistic action between

- fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, 23, 377-383.
- Okano, K., Ose, A., Takai, M., Kaneko, M., Nishioka, C., Ohzu, Y., Odano, M., Sekiyama, Y., Mizukami, Y., Nakamura, N. and Ichinoe, M., 2015. Inhibition of Aflatoxin production and fungal growth on stored corn by allyl isothiocyanate vapor. **Food Hygiene and Safety Science**, 56, 1-7.
- Öksüztepe, G., and Erkan, S., 2016. Mycotoxins and their importance in terms of public health. **Harran Üniv. Vet. Fak. Derg.**, 5, 190-195.
- Oniel, K., Karly, W., Rowida, M. and Avis-Tyler, J., 2018. *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and Alternaria rot on blueberry fruit. **Biological Control**, 126, 136-141.
- Otoni, B.C.G., Soares, N.F.F., da Silva, W.A., Medeiros, E.A.A. and Junior, J.C.B., 2014. Use of allyl isothiocyanate-containing sachets to reduce *Aspergillus flavus* sporulation in peanuts. **Packag. Technol. Sci.**, 27, 549-558.
- Pane, C. and Zaccardelli, M., 2015. Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of Alternaria early blight of tomato. **Biological Control**, 84, 11-18.
- Pastor, N., Carlier, E., Andres, J., Rosas, S.B. and Rovera, M., 2012. Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. **Journal of Environmental Management**, 95, 332-337.
- Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A.N., Sing, A., Busch, U. and Huber, I., 2012. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. **FEMS Microbiol. Lett.** 328, 46-53.
- Pitt, J.I., 2000. Toxigenic fungi, Which are important. **Med. Mycol.**, 38, 17-22.
- Ramdlal, H., De Abreu, K. and Rampersad, S.N., 2017. Fungicide sensitivity among isolates of *Colletotrichum truncatum* and *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex infecting bell pepper in Trinidad. **Plant Pathol. J.**, 33, 118-124.
- Raut, I., Calin, M., Lazoroaie, M.M., Roseanu, A., Badea-Doni, M., Oancea, F. and Jecu, L., 2014. Inhibition of toxigenic *Aspergillus niger* by microbial metabolites. **Revista de Chimie (Bucharest)**, 65, 779-783.
- Ravikiran, D., Narayana, K.J.P., and Vijayalakshmi, M., 2009. Mold-associated biochemical changes and Aflatoxin B-1 production in cold-stored chillies (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Processing and Preservation**, 33, 203-213.
- Reddy, K.R.N., Salleh, B., Saad, B., Abbas H.K, Abel C.A. and Shier, W.T., 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. **Toxin Rev.**, 29, 3-26.
- Romero, F.M., Marina, M. and Pieckenstain, F.L., 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, 351, 187-194.
- Rosenbluet, M. and Martinez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, 19, 827-837.
- Santos, S.B., Martins, M.A., Faroni, L.R.D., Rodrigues Junior, V. and Dhingra, O.D., 2010. Quality of maize grains treated with allyl isothiocyanate stored in hermetic bags. **Journal of Stored Products Research**, 46, 111-117.

- Santos, L., Marin, S., Mateo, E.M., Gil-Serna, J., Valle-Algarra, F.M., Patino, B., and Ramos, A.J. 2011. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in Capsicum powder. **Int. J. Food Microbiol.** 151: 270–276.
- Senthilkumar, M., Swarnlakshmi, K., Govindasamy, V., Lee, Y.K. and Annapurna, K., 2009. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus *Rhizoctonia bataticola*. **Curr. Microbiol.**, 58, 288-293.
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J. and Lou, K., 2014. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98, 6375-6385.
- Shin, J., Harte, B., Ryser, E. and Selke, S., 2010. Active packaging of fresh chicken breast, with allyl isothiocyanate (AITC) in combination with modified atmosphere packaging (MAP) to control the growth of pathogens. **Journal of Food Science**, 75, 65–71.
- Sid, A., Ezziyyani, M., Egea-Gilabert, C. and Candela, M.E., 2003. Selecting bacterial strains for use in the biocontrol of diseases caused by *Phytophthora capsici* and *Alternaria alternata* in sweet pepper plants. **Biologia Plantarum**, 47, 569-574.
- Singh N., Pandey, P., Dubey, R.C. and Maheshwari D.K., 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. **World J. Microbiol Biotechnol.**, 24, 1669-1679.
- Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M.,P. and Catalan, C., 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. **Food Control**, 17, 745-752.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S. and Mishra, P.K., 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 1734–1740.
- Smith, B.J. and Kirkegaard, J.A., 2002. *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology*, 51, 585–593.
- Smith, J.E., 2001. Mycotoxins, In, Food Chemical Safety, Watson, D.H., (Ed.), **CRC Press**, pp.234-255.
- Snowdon, A.L. 1991. A colour atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables. In Vegetables (Vol. II), London, **CRC Press**.
- Sokolic-Mihalak, D., Frece, J., Slavica, A., Delas, F., Pavlovic, H. and Markov, K., 2012. The effects of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oil components against ochratoxin-producing *Aspergilli*. **Arh. Hig. Rada. Toksikol**, 63, 457-462.
- Soliman, K.M. and Badeaa, R.I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, 40, 1669–1675.
- Song, M., Yun, H.Y. and Kim, Y.H., 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. **Journal of Ginseng Research**, 38,136-145.
- Sonker, N., Pandey, A.K., Singh, P., and Tripathi, N.N., 2014. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oil as herbal preservatives based on

- antifungal, antiaflatoxin, and antiochratoxin activities and *in vivo* efficacy during storage. **Journal of Food Science**, 79, Nr. 4
- Soylu, E.M., Kurt, S., and Soylu, S., 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **Int. J. Food Microbiol.**, 143, 183-189.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics, structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, 56, 845-857.
- Sturz, A.V., Christie, B.R. and Nowak, J., 2000. Bacterial endophytes, potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 19, 1-30.
- Sun, L. N., Zhang, Y. F., He, L. Y., Chen, Z. J., Wang, Q. Y., Qian, M. and Sheng, X. F., 2010. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. **Bioresource Technology**, 101, 501-509.
- Sülü, S.M., Bozkurt, İ.A. and Soylu, S., 2016. Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 21, 103-111.
- Szczerbanik, M., Jobling, J., Morris, S. and Holford, P., 2007. Essential oil vapours control some common postharvest fungal pathogens. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 47, 103-109.
- Tekin, Ş., 2002. Farklı biber ekim alanlarında yetiştirilen bitkilerin rizosferlerinden izole edilen antagonist bakterilerin bazı fungal patojenlerin gelişimi üzerine etkinlikleri üzerine bir araştırma. **Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kamal Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı**.
- Tjamos, E.C., Tjamos, S.E. and Antoniou, P.P., 2010. Biological management of plant diseases, highlights on research and application. **Journal of Plant Pathology**, S17-S21.
- Tracz, B.L., Bordin, K., Nazareth, T.M., Costa, L.B., Macedo, R.E.F., Meca, G. and Luciano, F.B. 2017. Assessment of allyl isothiocyanate as a fumigant to avoid mycotoxin production during corn storage. **LWT- Food Science and Technology**, 75, 692-696.
- Troncoso, R., Espinoza, C., Sánchez-Estrada, A., Tiznado, M.E. and García, H.S., 2005. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. **Food Research International**, 38, 701–708.
- Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., Ruelas, C., García, H.S. and Tiznado Hernández, M.E., 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85, 1427–1434.
- Troncoso-Rojas, R., Corral-Acosta, Y., Sanchez-Estrada, A., Garcia-Estrada, R., Aguilar-Valenzuela, A., Ojeda-Contreras, J. and Tiznado-Hernandez, M.E., 2009. Postharvest treatment of isothiocyanates to control *Alternaria* rot in netted melon. **Phytoparasitica**, 37, 445-451.
- Tsimogiannis, D., Choulitoudi, E., Bimpilas, A., Mitropoulou, G., Kourkoutas, Y. and Oreopoulou, V., 2017. Exploitation of the biological potential of *Satureja thymbra* essential oil and distillation by products. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, 4, 12-20.

- Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., and Shoda, M., 1999. The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8* (sfp) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43, 2183-2192.
- Tunç, S., Chollet, E., Chalier, P., Preziosi-Belloy, L. and Gontard, N., 2007. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. **International Journal of Food Microbiology**, 113, 263-270.
- Tyagi, A.K. and Malik, A., 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globules* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, 126, 228-235.
- UNIDO/FAO, 2006. United Nations Industrial Development Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations. Herbs, Spices and Essential Oils, Post-Harvest Operations in Developing Countries, Austria, 61 pp.
- Uylaşer, V., Karaman, B., ve Kazancı, Y.T., 2005. Mikotoksinler ve insan sağlığına etkileri. **Hasad**, 21, 43-48.
- Vilela, G.R., Almeida, G.S., D'Arce, M.A.B.R., Moraes, M.H.D., Brito, J.O., da Silva, M.F.G.F., Silva, S.C., Piedade, S.M.S., Calori-Domingues, M.A. and Gloria, E.M., 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, 45, 108-111.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, J., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez, J.A., 2007. Antifungal activities of Thyme, Clove, and Oregano essential oils. **Journal of Food Safety**, 27, 91-101.
- Wall, M.M. and Biles, C.L., 1993. Alternaria fruit rot of ripening chile peppers. **Phytopathology**, 83, 324-328.
- Wang, Y., Zeng, Q. and Zhang, Z., 2010. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium H-6. **African Journal of Biotechnology**, 9, 6140-6145.
- Weidenbörner, M. 2014. Mycotoxins in Foodstuffs. **Springer Science & Business Media**, 739 pp.
- Xiao, L., Xie, C.C., Cai, J., Lin, Z.J. and Cheun, Y.H., 2009. Identification and characterization of a chitinase producing *Bacillus* showing significant antifungal activity. **Current Microbiology**, 58, 528.
- Xing, F.G., Hua, H.J., Selvaraj, J.N., Yuan, Y. Zhao, Y.J., Zhou, L. and Liu, Y., 2014. Degradation of fumonisin B-1 by cinnamon essential oil. **Food Control**, 38, 37-40.
- Xu, S.X., Yan, F.J., Ni, Z.D., Chen, Q.R., Zhang, H. and 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.
- Yiannikouris, A. and Jouany, J.P., 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals, A review. **Anim Res.**, 51, 81-99.
- Zhang, J. X., Xue, A.G., and Tambong, J.T., 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. **Plant Dis.**, 93, 1317-1323.
- Zhu, L., Bokai, G., Ke, W., Ming. C., Hui. H. and Yongyi, G., 2015. Effects of bacteria-free filtrate from *Bacillus megaterium* strain L2 on the mycelium growth and

spore germination of *Alternaria alternata*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 29,1062-1068.

Zorlugenç, B. 2009. Çeşitli gıda maddelerinden *Flavobacterium aurantiacum* ile aflatoksin B1 üzerine bir araştırma. **Doktora Tezi, Çukurova Üniv. Fen Bilimleri Enst. Gıda Mühendisliği Ana Bilimdalı**. 141sayfa.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Ceylanpınar'da tamamladı. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nü kazandı. Mustafa Kemal Üniversitesi'nden 2016 yılında "Bölüm Birincisi" olarak mezun oldu. Aynı yılın Eylül ayında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Yazar, 2019 yılının Nisan ayında Adıyaman Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı.

EK-1 Bakteri ve Fungusların geliştirilmesinde kullanılan besi yerleri

Nutrient (NA) Agar (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:105450)

Pepton	5 g/L
Meat Extract	3 g/L
Agar-Agar	12 g/L

King's MediumB (KB) Agar (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:110989)

Peptone from caseinpepton	10 g/L
Peptone from meat	10 g/L
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	1.5 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g/L
Glyserol	10 ml/L
Agar-Agar	12 g/L

Luria Bertani (LB) Broth (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:110285)

Pepton from casein	10 g/L
Yeast Extract	5 g/L
NaCl	10 g/L

Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:105458)

Pancreatic Digest of Casein	15 g/L
Papaic Digest of Soya Bean	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar-Agar	15 g/L

Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:110130)

Potato infusion	4 g/L (infusion 200 gr potato)
D(+)glucose	20 g/l
Agar-Agar	15 g/l