

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Konce BAYDAR

**BAZI LİMON ÇEŞİTLERİNİN (*Citrus lemon* (L.) Burm f.) UÇKURUTAN
HASTALIĞI (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik.)' NA KARŞI
DAYANIKLILIK MEKANİZMASININ FENOLİK BİLEŞİKLER
BAZINDA BELİRLENMESİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI LİMON ÇEŞİTLERİNİN (*Citrus lemon* (L.) Burm f.) UÇKURUTAN
HASTALIĞI (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc.et Ghik.)'NA KARŞI
DAYANIKLILIK MEKANİZMASININ FENOLİK BİLEŞİKLER BAZINDA
BELİRLENMESİ**

Konce BAYDAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez .../.../2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. N. Kemal KOÇ Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ Doç. Dr. N. Ebru KAFKAS
Danışman Üye Üye

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: ZF2009YL8

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZ

**BAZI LİMON ÇEŞİTLERİNİN (*Citrus lemon* (L.) Burm F.) UÇKURUTAN
HASTALIĞI (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc.et Ghik.)'NA KARŞI
DAYANIKLILIK MEKANİZMASININ FENOLİK BİLEŞİKLER BAZINDA
BELİRLENMESİ**

Konce BAYDAR

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ
Yıl: 2010, Sayfa:60
Jüri: Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ
Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ
Doç. Dr. N. Ebru KAFKAS

Bu çalışmada Uçkurutan Hastalığı etmeni *Phoma tracheiphila* gelişimine fenolik bileşiklerden hesperidin ve limoninin etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda belirlenen altı limon çeşidine (Meyer, Kütdiken, Enterdonato, Yediveren, Tatlı limon ve Euroka) hastalık etmeni (*P. tracheiphila*) yapay olarak inokule edilmiştir. İnokulasyon sonrasında ve sağlıklı limonların yaprak, dal ve gövdelerinden ayrı ayrı örnekler alınarak ekstratlar hazırlanmış ve HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) tekniği ile hesperidin ve limonin miktarları belirlenmiştir. Alman örneklerde infeksiyon sonrası hesperidin ve limonin miktarlarının arttığı gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda hesaplanan yüzde artış miktarlarına bakıldığı zaman dayanıklı ve orta dayanıklı çeşitlerde (Tatlı limon, Meyer ve Enterdonato) hesperidin ve limoninin ya her ikisinin ya da bir tanesinin duyarlı çeşitlere (Euroka, Yediveren, Kütdiken) oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. *In vitro* çalışmalarda ise hesperidin ve limonin farklı konsantrasyonlarının (1,5,10,25,50,75,100 ppm) *P.tracheiphila* gelişimi üzerine engelleyicilik yüzdeleri araştırılmış ve her iki fenolik bileşiminde konsantrasyonları arttıkça hastalık etmeni fungus gelişimini engellediği belirlenmiştir. Fakat fungus gelişimini limoninin, hesperidinden daha fazla engellediği belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 100 ppm de limoninin engelleyiciliğinin (% 85.29), hesperidinin engelleyiciliğinden (% 58.68) daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: HPLC, *Phoma tracheiphila*, *Citrus lemon*, Hesperidin, Limonin

ABSTRACT

MSc THESIS

**DETERMINATION OF HESPERIDIN AND LIMONIN LEVELS AS
PART OF THE DEFENSE MECHANISM OF SOME LEMON
VARIETIES (*Citrus lemon* (L.) Burm F.) AGAINST MAL SECCO
DISEASE (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc.et Ghik.)**

Konce BAYDAR

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisor: Prof. Dr.Namık Kemal KOÇ

Year: 2010, Pages:60

Jury: Prof. Dr.Namık Kemal KOÇ

Prof. Dr.Ali ERKILIÇ

Assoc. Prof. Dr. N. Ebru KAFKAS

In this study, it was aimed to detect incidence of Mal secco disease which caused by *Phoma tracheiphila* based on phenolic compounds content especially hesperidin and limonin. Among the detected 6 lemon varieties (Meyer, Kütdiken, Enterdonato, Yediveren, Sweet lemon and Euroka) disease caused by *Phoma tracheiphila* was inoculated artificially, before and after inoculation samples were taken from the leaves, branches and stem of the lemon varieties and hesperidin and limonin are detected identically and quantifical using HPLC (High Pressure Liquid Chromotography) technique. The hesperidin and limonin concentration was increased among the experimental samples. According to the calculated values based on the percentages of incensement either hesperidin or limonin or both of them was found to be higher in tolerant and middle tolerant varieties (Sweet lemon, Meyer and Enterdonato). In addition various levels of limonin and hesperidin (1,5,10,25,50,75,100 ppm) too the effects on *P. tracheiphila* incidence or inhibit percentages were detected *in vitro* conditions. As a result, the opposite relection was found to be between phenolic compounds quantity and disease development. Limonin was found to be more effective than the hesperidin in term of the disease incidence in artificial experiment.

Key words: HPLC, *Phoma tracheiphila*, *Citrus lemon*, Hesperidin, Limonin

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ' a teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarım süresince görüşlerine başvurduğum Sayın Doç. Dr. Ebru KAFKAS' a ve Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ 'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım sırasında da maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen ve beni destekleyen babam Dürü BAYDAR, annem Fezile BAYDAR, kardeşim Salih BAYDAR' a ve ailemin tüm fertlerine yürekten teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile bana yardımcı ve destek olan arkadaşlarım Cemile GÖKSAL, Murat GÜNEY, Duygu AYVAZ SÖNMEZ, Çiğdem VURAL, Birgül DERYAOĞLU ve Funda YÜKSE'e teşekkür ederim.

Manevi destekleri ile her zaman yanımda olan arkadaşlarım Aytan YEMİŞCİOĞLU, Cemaliye ÖĞÜTVEREN, Laden GÜVENSOY, Başak PİSKOBULU, Özge SOĞUKPINAR ve Ali CANDEMİR'e teşekkür ederim.

Bunlara ek olarak projenin yürütülmesinde çalışmalarına maddi olanak sağlayan Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi'ne ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	8
3. MATERYAL VE METOD.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.2. Metod.....	15
3.2.1.Patojenin İzolasyonu ve Tanısı.....	15
3.2.2. Limon Fidanlarına <i>P. tracheiphila</i> 'nın Yapay İnokulasyonu.....	16
3.2.3. Limon Çeşitlerinde Bulunan Hesperidin ve Limonin Miktarlarının Belirlenmesi.....	18
3.2.3.1. Bitki Örneklerinin Alınması Sırasında Dikkat Edilen Hususlar ve Örneklerin Hazırlanması.....	18
3.2.3.2.Limon Örneklerinde Hesperidin ve Limonin Miktarlarının Belirlenmesi için HPLC Kalibrasyonu.....	19
3.2.3.3. Hesperidin ve Limonin Miktarlarının HPLC Tekniği ile Belirlenmesi.....	20
3.2.4.Hesperidin ve Limoninin Farklı Konsantrasyonlarının <i>P. tracheiphila</i> 'nın Miseloyal Gelişimi Üzerine Etkilerinin ve Yüzde Engelleyiciliğin Belirlenmesi.....	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	22
4.1. Patojenin İzolasyonu ve Tanısı.....	22
4.2. Limon Çeşitlerinin <i>P. tracheiphila</i> ' ya Karşı Duyarlılıkları.....	22
4.3. <i>P. tracheiphila</i> İle İnfekteli ve Sağlıklı Limon Çeşitlerinde	

Hesperidin ve Limonin Miktarları'nın Belirlenmesi ve	
Yüzde Artışlarının Karşılaştırılması.....	30
4.3.1.Limon Örneklerinde Hesperidin ve Limonin Değerlerinin	
Belirlenmesi için HPLC Kalibrasyon Eğrileri	30
4.3.2 Limon Örneklerinde Belirlenen Hesperidin ve Limonin	
Miktarları ve Bunların Yüzde Artışlarının Karşılaştırılması	32
4.4. Hesperidin ve Limoninin Farklı Konsantrasyonlarının <i>P. tracheiphila</i>	
Gelişimine Etkileri ve Yüzde Engelleyicilikleri.....	42
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
6. KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ	59
EKLER.....	60

Çizelge 3.1. Hesperidin ve limonin miktarlarının belirlenmesi için sağlıklı limon fidanlarından örneklerin alınmasında dikkat edilen hususlar	18
Çizelge 4.1. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen hesperidin miktarları (mg/g)	32
Çizelge 4.2. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen hesperidin miktarlarının karşılaştırılması (%)	34
Çizelge 4.3. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin miktarları (mg/g)	36
Çizelge 4.4. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin artış miktarlarının karşılaştırılması (%).....	37
Çizelge 4.5. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin ve hesperidin artış miktarlarının karşılaştırılması (%)	40
Çizelge 4.6. Hesperidin ve Limoninin farklı konsantrasyonlarının <i>P. tracheiphila</i> gelişimine etkileri	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	Denemede kullanılan limon çeşitlerine ait fidanlardan görüntüler.....	14
Şekil 3.2.	Bitki doklarından izole edilmiş <i>P. tracheiphila</i> 'nın PDA ortamı üzerindeki görünümü.....	16
Şekil 3.3.	<i>P. tracheiphila</i> ile inokule edilip, sera koşullarında muhafaza edilen limon fidanlarından bir görünüm.....	17
Şekil 3.4.	<i>P. tracheiphila</i> ile inokule edilip, +20 °C iklim odasında muhafaza edilen limon fidanlarından bir görünüm.....	17
Şekil 3.5.	Analizler sırasında kullanılan HPLC'den bir görünüm.....	19
Şekil 4.1.	<i>P. tracheiphila</i> ile yapay inokulasyondan bir ay sonra limon fidanı infeksiyon bölgesinde görülen renk değişimlerinden bir görünüm.....	23
Şekil 4.2.	<i>P. tracheiphila</i> ile yapay inokulasyon sonrasında yapraklarda gözlemlenen sınırları belli olmayan sararmalara ait bir görünüm	24
Şekil 4.3.	<i>P. tracheiphila</i> ile yapay inokulasyon sonrasında yaprak sapı dal üzerinde kalacak şekilde yaprakların dökülmesine ait bir görünüm	24
Şekil 4.4.	<i>P. tracheiphila</i> ile yapay inokulasyon sonrasında yaprak saplarındaki sararma ve kurumalara ait bir görünüm.....	25
Şekil 4.5.	<i>P. tracheiphila</i> ile yapay inokulasyon sonrasında sürgün uçlarından başlayan kurumalara ait bir görünüm.....	26
Şekil 4.6.	<i>P. tracheiphila</i> ile yapay inokulasyon sonrasında gövdenin enine kesitinde iletim demetlerinde gözlemlenen turuncumsu renklenmelerine ait bir görünüm.....	27
Şekil 4.7.	<i>P. taracheiphila</i> ile yapay inokulasyon sonrasında limon çeşitleri arasında gözlemlenen semptomlardaki farklılıklar; 1. Tatlı Limon, 2. Meyer, 3. Enterdonato, 4. Euroka, 5. Yediveren, 6. Kütdiken.....	28

Şekil 4.8.	<i>P. tracheiphila</i> yapay inokulasyon sonrasında 1. Tatlı Limon ve 2. Küt diken limon çeşitleri arasındaki simptomolojik farklılıklara ait görünüm.....	29
Şekil 4.9.	Hesperidin standartlarına ait kalibrasyon eğrileri	31
Şekil 4.10.	Limonin standartlarına ait kalibrasyon eğrileri.....	31
Şekil 4.11.	Limon çeşitlerinin enfeksiyon öncesinde ve sonrasında yaprak, dal ve gövde bünyesinde belirlenen hesperidin yüzde artış miktarı.....	34
Şekil 4.12.	Limon çeşitlerinin enfeksiyon öncesinde ve sonrasında yaprak, dal ve gövde bünyesinde belirlenen hesperidin yüzde artış miktarı.....	37
Şekil 4.13.	Limon çeşitlerinde enfeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin ve hesperidin artış miktarlarının yaprak örneklerinde karşılaştırılması (%)	40
Şekil 4.14.	Limon çeşitlerinde enfeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin ve hesperidin artış miktarlarının dal örneklerinde karşılaştırılması (%)	41
Şekil 4.15.	Limon çeşitlerinde enfeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin ve hesperidin artış miktarlarının gövde örneklerinde karşılaştırılması (%)	41
Şekil 4.16.	Farklı hesperidin konsantrasyonlarının <i>P. tracheiphila</i> gelişimi üzerine olan etkilerine ait bir görünüm.....	43
Şekil 4.17.	Farklı limonin konsantrasyonlarının <i>P. tracheiphila</i> gelişimi üzerine olan etkilerine ait bir görünüm.....	44
Şekil 4.18.	Farklı konsantrasyonda hesperidin ve limoninin <i>P. tracheiphila</i> gelişimine yüzde engelleyicilik oranları.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

atm. : Atmosfer

cm : Santimetre

⁰C : Santigrad derece

dk. : Dakika

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

g. : Gram

HPLC : High Pressure Liquid Chromotography (YüksekBasınç Sıvı Kromotografi)

kg : Kilogram

l. : Litre

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm : Milimetre

PDA : Patates Dekstros Agar

pH : Hidrojen iyonu konsantrasyonu

ppm : Parts per million (Milyonda kısım)

% : Yüzde

1. GİRİŞ

Dünyada yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan turunçgil çeşitleri arasında büyük öneme sahip olan limon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), genellikle kuzey ve güney yarımkürede, en düşük sıcaklıkların -4°C 'nin üstünde olduğu yarı kurak ve kurak subtropik iklim kuşağında yapılmaktadır. Limon yetiştiriciliği en yoğun Akdeniz ülkelerinde görülmektedir. FAO 2008 yılı sonuçlarına bakıldığı zaman dünyada 923.883 hektar alanda limon ve laym üretimi yapılmakta ve bu üretim alanından 12.673.077 ton ürün hasat edilmektedir (FAO, 2008). Limon besin içeriği bakımından insan sağlığı açısından büyük öneme sahip olup yüksek miktarlarda C vitamini ve flavonoid bileşikleri içermesinden dolayı da antioksidant ve kanser hastalıklarını önleyici özelliklere sahiptir.

Üretim alanlarında basit yapılı bitkiler gibi karmaşık yapılı bitkilerde birçok farklı fungus, bakteri, virüs ve nematod gibi patojenler tarafından etkilenmektedir. Patojenler bitkilere az veya çok derecede zarar verebileceği gibi, birçok bitki patojenle bulaştıktan sonra bile yaşam savaşı verip büyümeye devam ederek ürün verebilmektedir (Agrios, 2005).

Turunçgiller de diğer bitki türleri gibi birçok hastalık ve zararlı tarafından etkilenmekte ve bunun sonucu olarakta önemli ürün kayıpları ortaya çıkmaktadır. Turunçgillerde görülen hastalıklar arasında yer alan Uçkurutan Hastalığı (*Phoma tracheiphila*) tüm turunçgil tür ve çeşitlerinde görülmekle birlikte hastalık daha çok limon çeşidlerinde, ağaç kavununda ve turunçta yaygın olarak görülmektedir. Aynı zamanda bergamot, bazı mandarin çeşitleri, tanjelo ve tangor çeşitleri, yuvarlak limon çeşidi, Rangpur laym çeşidi, Macrophylla çeşidi hastalığa karşı duyarlı çeşitler arasında yer almaktadır. Bazı Citronlar, Willow Leaf Mandarin çeşidi, Kleopatra Mandarin çeşidi, Kamkat çeşidi, Klamentin Mandarini, Çin turuncu, Tatlı Limon çeşidi ve bazı altıntop çeşitleride farklı seviyelerde dayanıklılık göstermektedir. Uçkurutan Hastalığı bazı altıntop çeşitleri ve tatlı portakal çeşitlerinde yaygın olarak görülmesine rağmen genellikle şiddetli zararlar vermemektedir. Aynı zamanda kaba limon, turunç, troyer ve carizo sitranjları da Uçkurutan Hastalığına karşı duyarlı anaçlardır. Fakat turunç anacı İsrail'de söz konusu hastalığa karşı tolerant iken

diğer ülkelerde duyarlı çeşidler arasında yer almaktadır. (Cutuli ve ark, 1984; Timmer ve ark, 2000;).

Hastalığa karşı yüksek duyarlılığı nedeniyle limonlar, hastalıktan en fazla etkilenen tür olarak kabul edilmektedir. Bazı limon çeşidlerinden Monachello, Enterdonato, Santa Teresa Continella ve Zagara Bianca dayanıklı limon çeşidlerdendir. Fakat bu çeşidler çok fazla tercih edilmemektedir (Catara ve ark, 1976; Granata ve ark, 1977; Grasso ve Perrotta, 1978; Solel ve Spiergel-Roy, 1978; Luisi ve ark, 1979; Spina ve Cutuli, 1983; Cutuli ve ark, 1984). Buna karşın Santa Teresa, Comune, Continella, Inkapukkiato ve Fior d'Arancio çeşitleri de tolerantlı çeşitler arasında yer almaktadır (Granata ve ark. 1977). Yunanistan'da Adamopoulou ve Messara limon çeşitleri; Türkiye'de Antalya Yuvarlak ve Molla Mehmet çeşitleri; Sovyetler Birliği'nde Meyer ve Dioskuoria çeşitleri; İsrail ve Fransa'da da Santra Teresa limon çeşitleri Monachello ve Enterdonato kadar olmasa da Uçkuran Hastalığı'na karşı dayanıklı çeşitlerdendir (Akteke ve Karaca, 1977; Pionnat, 1982; Cutuli ve ark, 1984). Aynı zamanda Türkiye'de Tatlı limon çeşidi dayanıklılık gösteren çeşitlerden olmasına rağmen, Enterdonato limon çeşitidi duyarlı, Euroka ve Kütdiken çeşitleride çok duyarlı çeşitlerdendir (Tuzcu ve ark. 1989). Elde edilen farklı veriler; *P. tracheiphila*'nın zarar oluşturma derecesinin bölgelere göre farklılık gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır.

Uçkurutan Hastalığı'na neden olan fungus Ascomycota şubesi, Deuteromycotina altşubesi, Deuteromycetes sınıfı, Sphaeropsidales takımı, Sphaeropsidaceae familyası, Phoma cinsi, *Phoma tracheiphila* türü olarak (Petri) L.A. Kanchaveli et Ghikashvili tarafından taksonomik olarak sınıflandırılmıştır. Turunçgillerde *P. tracheiphila* hastalık etmeninin neden olduğu Uçkurutan Hastalığı dünyada ilk kez 1894 yılında bir Yunan adası olan Kios'da görülmüştür. Ancak Uçkurutan Hastalığı etmeni olan fungus 1929 yılında Petri tarafından keşfedilmiş ve *Deuterophoma tracheiphila* (Petri) olarak adlandırılmıştır. Söz konusu hastalık İtalya, İspanya, Fransa, Yunanistan, Türkiye, Cezair, Kıbrıs, Ege adaları ve Karadenizin doğusuna yayılmıştır (Cutuli ve ark, 1984; Timmer ve ark, 2000; Anonymous, 2007). *P. tracheiphila*; limon üretim alanlarında üretimi sınırlayan

faktörlerin başında gelmekte ve önemli boyutlarda ürün kayıplarının oluşmasına neden olmaktadır (Cutili, 1982; Cutili ve ark,1984).

Hastalık etmeni *P. tracheiphila*'nın piknidiumları bir yıllık infekteli kurumuş sürgünler üzerinde, epiderminin altında yer almaktadır. Piknidiumlardan çıkan pikniosporlar yağmur ve rüzgârın etkisiyle turunçgil ağaçlarına yaprak, sürgün, dal, gövde ve toprak yüzeyine çıkmış kılcal köklerinden oluşan, yara dokularından ve doğal açıklıklarından bitki dokusu içerisine girmektedir. Hastalık etmeni fungusun bitki bünyesine girdikten sonra ürettiği selülotik ve pektolitik enzimleri; hücreleri birbirine bağlayan orta lamellerin, daha sonra da hücre duvar yapılarının bozulmasına sebep olmaktadır. Aynı zamanda plazmalemma, kloroplast ve sitoplazmanın yapısının ve şeklinin değişmesine ve iletim demetlerinin zamk benzeri bir madde ile tıkmamasına sebep olmaktadır (Pacetto ve Davino, 1976; Bashi ve ark, 1980). *P. tracheiphila*'nın bitki dokularındaki miseliyal gelişimi sırasında Malseccin adı verilen fitotoksik bir glikopeptit ürettiği ve bu toksini iletim demetleri içerisinde su akımı ile bitkinin üst kısımlarına taşıdığı tespit edilmiştir (Nachmias ve ark, 1980).

Hastalığın genellikle hava sıcaklığının düşük olduğu Ekim-Mart aylarında yayıldığı ve en fazla bulaşmanın sonbaharda özellikle Ekim ayında olduğu saptanmıştır. Hastalığın optimum gelişme sıcaklığının ise 18–20 °C olduğu, ayrıca 35 °C de sporların 5 günden sonra çimlenme kabiliyetlerini kaybettikleri ve bu bakımdan da yazın infeksiyon oluşturmadığı bilinmektedir. Fakat yaz aylarında ağaç su stresine girdiği için simptomların gözlemlendiği belirlenmiştir.

Söz konusu etmen bitkinin ksilem iletim demetinde bulunduğu için bitkinin su transfer sistemini bozarak, bitki dallarının kurummasına ve böylece hastalığın ilk belirtileri uç dallarda; yani yıllık sürgünlerdeki yapraklarda lokal renk açılmaları ve sararmalar şeklinde görülmektedir. İnfekteli yaşlı sürgünlerde uçtan geriye doğru renkte açılma, sürgünlerde sararma ve infekteli yapraklarda yaprak sapı bir süre ağaç üzerinde kalacak şekilde dökülmeler ve daha sonra sürgünlerde uçtan geriye doğru kurumalar gözlemlenmektedir. Bu görünüm hastalık için en tipik belirti olup böyle sürgünler kesildiği zaman iletim demetlerinin turuncu, havuç kırmızısı bir renk aldığı görülmektedir. Kuruyan bu sürgünlerde de epidermis altında spor keseleri

(piknidium) oluşmakta, uçtaki taze sürgünler öldükçe geriye doğru ölüm gözlemlenmekte ve sonunda bitki tamamen ölmektedir.

Patojenin tracheomy-cotiv fungusu olması nedeni ile kimyasal mücadelesi beklenen başarıyı göstermemektedir (Solel, 1979; Salerno ve Cutuli, 1977; Luisi ve ark, 1979; Cutuli ve ark., 1984). Sistemik fungusitlerle ve diğer kimyasal bileşiklerle yapılan çalışmalar beklenen kontrolü sağlamamakta, buna karşılık fungal dayanıklılığın gelişmesiyle sonuçlanmaktadır (Salerno ve Somma, 1971; Somma ve Sammarco, 1971; Perrotta ve ark, 1974; Salerno ve Perrotta, 1978; Gimenes Verdu ve Luisi, 1978; Somma ve Laviola, 1982; Dinç ve ark, 1982; Cutuli ve ark, 1984).

Diğer tüm bitkilerde olduğu gibi turunçgiller de kendilerini patojenlere karşı belli başlı iki şekilde savunmaktadırlar. Yapısal karakterleriyle fiziksel bariyer oluşturmakta, böylece patojenlerin bitki içerisine girip yayılması önlenmiş olmaktadır. Bitkiler patojenlerle iletişime girmeden önce bazı yapısal savunma mekanizmaları meydana gelmektedir. Bu yapısal savunma mekanizmaları epidermal hücreleri saran mumsu tabaka, kütikulanın yapısı, tüylülük, epidermal hücre duvarlarının yapısı, büyüklüğü, yeri, stoma ve lentisellerin şekli gibi yapılardır. Yaprak ve meyve üzerinde bulunan mumsu tabaka ve kalın tüyler yüzeyden su oluşumunu uzaklaştırarak enfeksiyon oluşumunu azaltmaktadır. Bitkilerin duvarları dayanıklı olmasına rağmen bazı bitkilerin epidermislerinde ortaya çıkan yaralanmalarla patojenlerin kolaylıkla bitkilerin iç dokularına giriş yapmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte bitkilerin hücre ve dokularında yer alan biyokimyasal reaksiyonlar da patojenlere karşı savunmada önemli rol oynamaktadırlar. Patojenler için bitkiler toksin veya patojenin gelişmesini engelleyici maddeler üretmektedirler. Bu maddeler bitkilerde enfeksiyon öncesinde hazır olarak bulunmakta veya enfeksiyon sonrasında üretilmektedirler. Birçok patojen bitki bünyesine girse bile enfeksiyon oluşturamamaktadır. Bunun nedeni bitki bünyesinde bulunan kimyasallardır (Agrios, 2005). Bitkileri hastalıklara karşı dayanıklı kılan mekanizmalardan biri de bitkilerdeki fenolik bileşiklerin varlığıdır. Bunların enfeksiyon sonrası miktarları ve aktivitelerindeki artışları ile oksidasyon ürünlerinin daha yüksek toksik etkiye sahip olmaları, bunların bitki hastalıklarına karşı dayanıklılıktaki rollerini ön plana çıkarmaktadır. Bir çok konukçu patojen

etkileşiminde hastalığa dayanıklılıkla ilişkili olarak enfeksiyon sonrasında fenolik bileşikler sentezlenmektedir. Enfeksiyon sonrasında görülen dayanıklılıkta hastalığa karşı dayanımı fenoliklerin sentezlenme hızının belirlediği saptanmıştır. Fenolik bileşikler; bitkiler çevreyle etkileşime geçtikleri zaman üretilen ikincil metabolitlerdir. (Beier ve Oertli, 1983; Afek ve ark, 2001; Zaat ve ark, 1987; Laks ve Pruner, 1989; Snyder ve Nicholson, 1990). Bitkilerdeki fenolik bileşikler; flavonoidler, fenolik quinonlar, lignanlar, kantonlar, depsidonlar, ligninler, melaninler, tanenler, glikozidler, fenolik asitlerin şeker esterleri, hidroksisinnamik asitin esterleri ve kumarin türevlerini içermektedir. Harborne (1964) göre bitki fenollerini 14 grup altında toplanmaktadır. Çeşitli bitki dokularında da kumarin, umbelliferon, skopoletin, *p*-hidroksisinnamik asit, klorojenik asit, siringik asit ve sinapik asit gibi fenolikler yaygın olarak gözlemlenmektedir.

Turuncgillerdeki fenolikler flavonoidler (flavanonlar, flavonlar ve flavonoller), antosiyaninler, kumarinler, psorolenler ve diğerlerini kapsamaktadır. Flavonoidler engelleyici (Zaat ve ark, 1987) ve fitoaleksin olarak (Laks ve Pruner, 1989; Snyder ve Nicholson, 1990) rol oynamaktadırlar. Flavonoidler mikroorganizmaların bitki dokusu ile ilişkiye girdikten sonra bitki hücrelerinde birikip düşük- moleküler- ağırlıkta bileşikler olarak sentezlenebilen ve ortaya çıkan savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan bileşikler olarak bilinmektedirler (Dixon, 1986; Laks ve Pruner, 1989). Kumarinler de turuncgillerde patojen ile infekte edildikten sonra tepki olarak üretilen fitoalleksinler olarak görev yapmaktadırlar (Feldman ve Hanks, 2001; Afek ve ark, 2001; Nakatani ve ark, 1987). Isoflavonlar bitkilerin çevreyle olan ilişkilerinde (patojenler, symbiontlar ve parazitler) rol oynamaktadırlar. Isoflavonların anti-mikrobiyal ve/veya anti-fungal ve bazılarının da virostatik etki gösterdikleri belirlenmiştir (Dakora ve Philips, 1996). Isoflavonlar böcek, akar ve yumuşakçalar için engelleyici olup bazı böcek türleri için türe-özgü çekici özelliğe sahiptirler (Wang ve ark. 1998; Harborne 2000).

Limon çeşitlerinde baskın olarak flavanone rutinosidler eriositrin, hesperidin, narirutin, didymin (Berhow ve ark, 1996), çok miktarda eriocitrin, hesperidin ve narirutinin bulunmaktadır (Coffin, 1971; Nishiura ve ark, 1971; Horowitz ve Gentili, 1977; Tomas ve ark, 1978; Kamiya ve ark, 1979; Park ve ark, 1983; Albach ve

Redman, 2001). Aynı zamanda limon çeşitleri arasında yer alan Ponderosa limon çeşidi neo-hesperidin (Horowitz ve Gentili, 1960, Horowitz ve Gentili, 1977; Scora, 1975; Albach ve Redman, 2001), ‘Seedless Lisbon’ limon çeşidi eriocitrin ve diğer limon çeşitleri de baskın olarak flavanonlardan hesperidini, narirutin, naringin ve yüksek miktarda rutin, diosmin (Vandercook ve Tisserat, 1989, Vandercook ve ark, 1990) ile kesretin glikosin içermektedir (Horowitz ve Gentili, 1977).

Hesperidin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone 7-rhamnoglucoside) (Ek 1) portakal (*Citrus sinensis*) ve limon çeşitlerinde (*Citrus limon*) bulunan başlıca flavonoid glikosidlerdendir (Mizrahi ve Baerk, 1970; Fuster, 1997). Hesperidin bitkilerin savunma mekanizmasında önemli bir yere sahip olan ve *in vitro* çalışmalarda antioksidant özelliğe sahip olan fenolik bileşiklerdendir (Hirata ve ark, 2005).

Portakal ve limonda yoğun bir şekilde bulunan diğer bir fenolik bileşik olan limoninler limonoid grubunda yer almaktadır (Ek 2). Limoninler ilk olarak 1938 yılında Washington navel portakalında tespit edilmiştir (Anonymous, 2005). Limonoidler antiviral, antifungal, antibakterial, antineoplast ve antimalarial gibi birçok iyileştirici özelliklere sahiptirler (Roy ve Saraf, 2006).

Uçkurutan Hastalığı ile mücadelede, budamanın sıcak aylarda yapılması (Temmuz-Ağustos), infekteli dalların infekteli bölgenin 20 cm altından kesilmesi, sürgünlerin kışa pişkin girmesi için sulamanın erken kesilmesi, dengeli gübreleme yapılması gibi kültürel önlemler alınarak mücadele edilmesi yoluna gidilmektedir. Aynı zamanda hastalıkla mücadelede bazı kimyasallar kullanılıyorsa da hastalık bir iletim demeti hastalığı olması nedeni ile mücadelede kullanılan kimyasallar etkili olmadığı gibi, çevre ve insan sağlığı için de olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Bunun yanında hastalığın fungusitlere karşı dayanıklılık geliştirmesine de neden olmaktadır. Bu nedenle tüm bitki türlerinde olduğu gibi turuncgillerde de hastalık ve zararlılara karşı en etkili mücadele yöntemi dayanıklı kültür bitkilerinin yetiştiricilikte kullanılmasıdır. Bunun içinde hastalık etmenine karşı dayanıklılık mekanizmasının araştırılması ve bu doğrultuda dayanıklılık mekanizmasının geliştirilmesi teşvik edilmelidir. Bu kapsamda; bu çalışma ile bitki savunma mekanizmasında önemli rol oynayan fenolik bileşiklerden hesperidin ve limonin hastalık etmeni ile

infeksiyonundan sonra gözlemlenen artış miktarları ile farklı çeşitlerin dayanıklılık ve duyarlılık derecelerinin belirlenmesi ve *in vitro* çalışmalarla hesperidin ve limoninin farklı konsantrasyonlarının hastalık etmeni gelişimine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ben-Aziz (1967) tarafından yapılan bir çalışmada Uçkurutan Hastalığı'na karşı dayanıklılığın belirlenmesinde tanjerin mandarin kabuklarından izole edilen bileşiklerin *Deuterophoma tracheiphila*' ya karşı fungistatik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Nobiletinin etkili bir şekilde fungistatik aktivite gösterdiği, tangerinin yeteri kadar aktif olmadığı ve hesperidin de fungal gelişmeyi çok az teşvik ettiğini belirlemiştir. Ayrıca; aynı çalışmalarda Kaba limon fidanlarının nobiletin solisyonuna daldırıldıktan sonra, patojen inokule edildiğinde, hastalık belirtilerini önemli ölçüde engellediğini tespit etmişlerdir.

Afek ve Szejnberg'in (1988), yapmış oldukları çalışmada *Phytophthora citrophthora*' ya karşı dayanıklı ve duyarlı turunçgil çeşitlerin de scoparene düzeylerini araştırmışlardır. Patojenle inokulasyondan sonra, dayanıklı çeşitlerde scoparene seviyesinde çok fazla artış olurken, duyarlı çeşitlerde çok az değişiklik olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda scoparenin *P. citrophthora* misellerinin gelişmesini ve diğer altı fitopatojenik fungusu ait sporların çimlenmesini de engellediği ortaya konulmuştur.

Ortuno ve ark. (1997), yaptıkları çalışma ile *P. parasitica*'ya karşı Tangelo, Nova, Turunç ve Altıntop çeşitlerinin olgun meyvelerinin dayanıklılığının scoparene (6,7-dimetoksikumarin)'nin sentezlenmesi ile ilişkili olduğunu belirlemiştir.

Del Rio ve ark, (1998) yapmış oldukları çalışma sonucunda; Klemantin mandarini ve tatlı portakal çeşitlerinde yağlarında ekstre edilen mevcut polimethoksil flavonların *P. digitatum*'a karşı % 100 engelleyici etki gösterdiği, turunçta ekstrakten elde edilen yapılar ise % 77 engelleyici olduğu belirlenmiştir. *P. citrophthora*' ya karşı ekstre edilen polimethoksil flavonlar etkisine bakıldığı zaman ise turunçun %100, Klemantin mandarin çeşidinin % 72, Tatlı Portakal çeşidinin % 14 engelleyici olduğu belirlenmiştir. *Geotrichum* türlerine karşı turunçun çok hassas (% 57) iken Klementin mandarin çeşidi ve Tatlı Limon çeşitlerinde engelleyicilik oranının sırasıyla % 47 ve %34 olduğu saptanmıştır.

Afek ve ark. tarafından 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada sağlıklı Marsh çekirdeksiz altıntop meyvelerinin (tam olgunlaşmadan 2 ay önce) ve olgun Marsh

çekirdeksiz altıntop meyvelerinin albedolarında belirlenen umbelliferone (7-hydroxycoumarin) miktarının *Penicillium digitatum* ile inokulasyondan 4 gün sonra umbelliferon miktarının arttığını belirlemişlerdir. Buna ek olarak; umbelliferonun *in vitro* koşullarda diğer birçok patojenik fungusun gelişimini engellediği ve olgunlaşmamış altıntoplarda *P. digitatum*'a karşı umbelliferonun savunma mekanizmasında başarılı bir şekilde rol oynadığını belirlemişlerdir.

Del Ri'o ve ark. (2000), yapmış oldukları çalışmada zeytin çeşitlerinde fenolik bileşiklerin analizinde tyrosol, kateşin, *p*-kumarik asit, rutin, luteolin ve oleuropein bulunduğunu ve bu bileşiklerin turunçgil çeşitlerinde de temel bileşikler oldukları belirlenmiştir. Belirlenen fenolik bileşiklerin her iki cinste de antifungal etmen olarak hareket ettiği ve fitopatojenik fungusların büyümesini engellemeye yetenekli olduğu ortaya çıkartılmıştır. Nova mandarin çeşidinin *in vivo* çalışmalarında *P. citrophthora*ya karşı çok fazla dayanıklılık gösterdiği ve meyve yüzeyinde polifenolik bileşiklerin oluşmasından sonra savunmanın ilk aşamasının sağlandığı ortaya çıkartılmıştır.

Afek ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada *P. citrophthora* ile inokule edilen turunçgil ağaç gövdesi, dal ve meyve kabuklarından 6,7-Dimethoxycoumarin izole etmişlerdir. Araştırmacılar bu bileşiğin *in vitro* koşullarda *P. citrophthora*, *Verticillium dahliae*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diplodia natalensis* ve *Hendersonula toruloidea*'nun gelişmesini engellediği tespit edilmiştir.

Feldman ve Hanks (2001), sağlıklı ve bir nematod türü olan *Radopholus similis* ile infekteli üç dayanıklı ve üç duyarlı turunçgil çeşidinin kök ve yapraklarında 41 fenolik bileşik belirlemişlerdir. *R. similis* ile infekteli bitkilerden dayanıklı olanların köklerinde bulunan 11 bağlı fenolik miktarının duyarlı olanlara oranla fark edilir miktarlarda arttığını gözlemlemişlerdir. İnfekteli dayanıklı çeşitlerin köklerinde bulunan bağlı fenoliklerin % 27-300 arttığını, duyarlı çeşitlerdeki bağlı fenolik miktarının ise % 16-34 azaldığını belirlemişlerdir. Dayanıklı ve duyarlı çeşitlerde yapraklardaki toplam bağlı fenoliklerin infeksiyondan sonra önemli miktarlarda artmadığını tespit etmişlerdir. İnfeksiyondan sonra duyarlı çeşitlerde yapraklardaki serbest fenoliklerin miktarları aynı kalırken

dayanıklı çeşidlerde bulunan serbest fenoliklerin toplam fenolik içinde %2 den %7'ye kadar artış olduğunu belirlemişlerdir.

Mısırlı ve ark. (2001), tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudomonas amygdali*'ye karşı badem ağaçlarının yapay olarak infekte edilip sağlıklı genç yaprakların toplanarak dayanıklılıkta fenolik bileşik içeriklerini analiz etmişlerdir. Sonuç olarak orta düzeyde tannin içerenlerin orta dayanıklı ve daha fazla içerenleri dayanıklı gruplar olarak belirlemişlerdir. Fenolik bileşikleri ince tabaka kromatografi kullanılarak araştırdıklarında bazı noktaları sadece dayanıklı ve duyarlı hibritlerde tespit etmişlerdir. HPLC ile fenolikleri analizlediklerinde dayanıklı çeşitlerde klorojenik asidin daha yüksek olduğu belirlemişlerdir.

Ortunõo ve ark. (2002), Tanjelo, Nova çeşidlerinin meyvelerinde *P. citrophthora*'ya karşı ikincil metabolitlerin savunma mekanizmasında engeleyicilik etkileri ile ilgili yapılan çalışmada nobiletinin en fazla fungal gelişime etkisi olan bileşik olduğunu belirlenmiştir. Bunu takibinde sinensetin, heptamethoxyflavone ve tangeritin olduğu bildirilmiştir.

Del Ri'õ ve ark. (2003), tarafından yapılan bir çalışmada farklı zeytin organ ve dokularında esas fenolik bileşiklerin tyrosol, kateşin, oleuropein olduğunu tespit etmişlerdir. *Phytophthora sp.* karşı bu bileşiklerin antifungal etkilerine bakıldığı zaman ise *in vitro* çalışmalar sonucunda tyrosolun en aktif etkiyi gösterdiğini belirlemişlerdir. Bunu takiben de kateşin ve oleuropeinin büyük fungitoksin ekiye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Petkovsek ve ark. (2003), tarafından yapılan bir çalışmada elma Kara Leke Hastalığı'na karşı dayanıklı üç elma çeşidinde (Topaz, Gold Rush, Goldstar) ve duyarlı iki elma çeşidinde (Golden Delicious Weinsberg, Golden Delicious B) belirlenen klorojenik asit içeriklerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu doğrultuda elma Kara Leke Hastalığı'na karşı dayanıklı türlerden 'Goldrush', elma Kara Lekeye Hastalığına duyarlı olanlara oranla daha çok miktarda klorojenik asit içerdiği belirlenmiştir. Usenik ve ark. (2004) tarafından aynı çeşitlerde yapılan benzer çalışmada flavonollerden rutin, kuersetin ve 'fenol 173' analiz edilmiştir. Dayanıklı ve duyarlı kültürlerin büyüme sezonu boyunca dayanıklı çeşitlerde yüksek miktarlarda olan 'Fenol 173' içerikleri arasındaki istatistikî farklılıklarını tespit

etmişlerdir. Rutin ve kuersetin içeriğindeki farklılıkların önemli düzeyde olmadığını belirlemişlerdir.

Del Ri'o ve ark. (2004), tarafından yapılan çalışmada Portakal (Valencia portakalı) çeşidi meyvelerinde *P. citrophthora* ile infeksiyonlarda flavanonlardan hesperidin ve isonaringin, polymethoksiflavonlardan sinensetin, nobiletin, tangeretin ve heptamethoxyflavone seviyelerinin etkilerinde çalışılmıştır. İnfeksiyondan sonra flavonoid seviyesinin değiştiği belirlenmiştir. Hesperidin ve isonaringin içeriklerinin sırasıyla % 13 ve 67 oranlarında olduğu fungusun hidrolizik etkisinin belirgin olarak artırdığı belirlenmiştir. Heptametoksiflavon, nobiletin, sinensetin ve tangeretin seviyeleri de sırasıyla % 48, 28, 26 ve 24 oranlarında arttığını tespit etmişlerdir. *In vitro* çalışmalarda bu bileşiklerin antifungal etmen olarak aktivite gösterdiği ortaya çıkartılmıştır. En fazla aktiviteyi aglykonların (naringenin ve hesperidin) başlattığı ve bunu takibinde polymetoksiflavon ve flavanon glikozid aktif olduğu belirlenmiştir.

Fourie (2004)'nin yaptığı bir çalışmada *Phytophthora nicotianae*'ye karşı dayanıklı ve duyarlı turunçgil anaçlarında patojenle inokule edildikten sonra toplam çözülebilen fenoliklerin seviyesini araştırıldığı zaman *P. nicotianae* ile inokulasyondan 21 gün sonra *Phytophthora* karşı dayanıklı Swingle, Macrophylla, Troyer ve Turunç çeşidi anaçlarının köklerin de fenolik konsantrasyonlarının en fazla olduğu, duyarlı Kaba limon ve Volkamariana limon çeşidi anaçlarında çok az artma olduğu, iki orta duyarlı anaçtan Carrizo'nun orta düzeyde fakat C35' in düşük düzeyde fenolik ürettiğini belirlemiştir. En yüksek fenolik konsantrasyonu inokulasyondan 21 gün sonra Troyer ve Kaba limonda benzer sonuçlar kaydedilmiştir. Toplam fenoliğin anaç dayanıklılığında önemli rol oynadığı ve *P. nicotianae* karşı dayanıklılarıyla ilişkili olduğunu belirlemiştir. Ayrıca *P. nicotianae* inokulasyonundan sonra dayanıklı anaçlarda toplam fenolik miktarının 2.2 kat, duyarlı anaçlarda da 1.6 kat arttığını bildirmiştir.

Ortunõo ve ark. (2005), yaptıkları bir çalışmada, bazı altıntop ve portakal çeşidlerinin meyve kabuklarında flavanone glikozid ve polimetoksiflavon içeriklerini analiz etmişlerdir. Bu doğrultuda belirlenen çeşidlerin naringin, hesperidin, polymethoxyflavon, nobiletin, heptamethoxyflavone ve tangeretin içerdiklerini belirlemişlerdir. *In vitro* çalışmalarda ise bu bileşiklerin *P. digitatuma* karşı

antifungal etmenler olarak ortaya çıkan bileşikler olduklarını kaydetmişlerdir. Bu bakımdan flavanonlarda aktif olan polymethoxyflavonler bulunduğu ve bu fenolik bileşiklerin *P. digitatum*'a karşı turuncgillerin savunma mekanizmasında rol oynadıklarını belirlemişlerdir.

Baidez ve ark. (2007),'nın yaptıkları çalışmada *in vitro* koşullarda fenolik bileşik içeren zeytin çeşidlerini *Phytophthora megasperma* ve *Cylindrocarpon destructans* ile infekte etmiş ve bunların kök ve gövdelerinin, fenolik bileşik miktarının infekte edilmeyenlere göre daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Her iki fungusu karşı bu bileşiklerin antifungal aktiviteleri *in vitro* da çalışıldığı zaman en aktifinin kersetin ve luteolin aglikonlar olduğunu, bunları da rutin, oleuropein, *p*-kumarik asit, luteolin-7- glikosit, tyrosol ve kateşinin izlediğini belirlemişlerdir. Fenolik bileşiklerin, fungusların yapılarına, morfolojilerine ve büyümelerine olan etkilerini mikroskobik çalışmalarla gözlemlemişlerdir. Bu bulgularla zeytin yapraklarında tespit edilen fenolik bileşiklerin patojen saldırılarına karşı koruyucu rol oynadıklarını rapor etmişlerdir.

Haars A. ve ark, (2007) tarafından yapılan bir çalışmada sıvı ortam içerisinde *Fomes annosus* gelişimi sırasında aktif olan fenoliklerde çalışılmıştır. Bu doğrultuda fungus tarafında üretilen okside edilmiş ve/veya laktoz aktivitelerin fenolik bileşikler tarafından engellendiği ve test edilen bazı fenoliklerin etkisinin gövdeye uygulandığı zaman farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Hydroquinonen uygulanmasının ince dallarda *Fomes annosus* saldırısına karşı koruyucu etki sağladığı tespit edilmiştir.

Chutia ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada mandarin çeşidinin olgun meyvelerinin kabuklarından izole edilen yağdan 37 farklı bileşik tespit etmişlerdir. Bu bileşiklerin yağın yaklaşık olarak \geq %99'unu oluşturduğunu bildirmişlerdir. Teşhis edilen en önemli bileşiklerin limonin (% 46.7), geranial (% 19.0), neral (% 14.5), geranyl asetat (% 3.9), geraniol (% 3.5), β -caryophyllene (% 2.6), nerol (% 2.3), neryl asetat (% 1.1) olduğunu saptamışlardır. *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* ve *Helminthosporium oryzae* gibi 5 farklı bitki patojen fungusuna karşı antifungal aktiviteleri teslemişlerdir. Sonuçta *A. alternata*, *R. solani*, *C. lunata* için en düşük engelleyici konsantrasyonun 0.2 ml/100 ml iken *F. oxysporum* ve *H. oryzae* için $>$ 0.2 ml/100ml

olduğu belirlenmiştir. *H. oryzae* ve *C. lunata* dışındakilerde fungus sporlarının 2ml/100ml yağda tamamen engellendiği. *H. oryzae* ve *C. lunata* içinde sırasıyla % 5 ve % 0.25 de tamamen kontrol edildiği tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

2008–2009 tarihleri arasında yürütülen çalışma da Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi seralarında üretilen hastalık ve zararlılardan arındırılmış 6 limon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) çeşidi bitki materyali olarak kullanılmıştır. Bu çeşitler; Meyer, Kütdiken, Enterdonato, Yediveren, Tatlı limon ve Euroka olup söz konusu çeşitler Şekil 3.1. de verilmiştir.

Çalışmalar kapsamında kurulan denemelerde kullanılmak amacı Uçkurutan Hastalığı ile infekteli ağaçlardan alınan bitki materyallerinden izole edilen *Phoma tracheiphila* Kanc. et Ghik. hastalık etmeni olarak kullanılmıştır.

Çalışmalar, Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi, Biyoteknoloji Laboratuvarı ve seraları ile Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Mikoloji laboratuvarı ve iklim odasında yürütülmüştür.



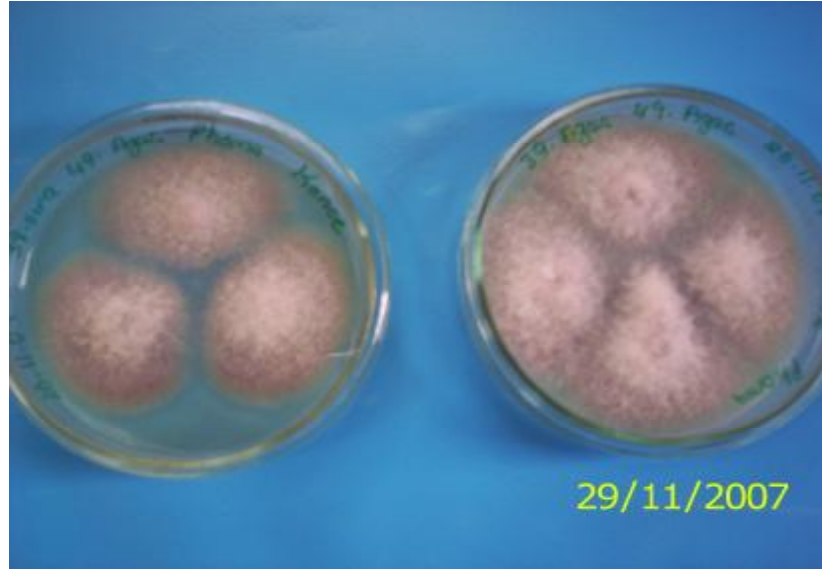
Şekil 3.1. Denemede kullanılan limon çeşitlerine ait fidanlardan görüntüler

3.2. Metod

3.2.1. Patojenin İzolasyonu ve Tanısı

T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bahçe Kültürü Araştırma Enstitüsünde (Alata-Mersinde) yapılan gözlemler sonucunda Uçkurutan Hastalığı ile bulaşık olduğu belirlenen Kütdiken limon çeşitlerinden infekteli 1 yaşlı sürgünler alınmış ve alınan bu örnekler Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratvarlarına getirilip, izolasyon işlemi yapılmaya kadar soğuk hava deposunda (+4 °C) muhafaza edilmiştir.

Hastalık etmeni fungusun izolasyonu için gerekli olan kültür ortamı Patates Dekstroz Agar (PDA) (Sigma) 39 g/lt oranında hazırlanıp 121°C, 1 atm. basınçta 20 dk. süresince otoklav edildikten sonra steril kabin içinde seril petrilere (9 cm) her petriye 20 ml PDA ortamı gelecek şekilde dökülmüştür. İnfekteli dallardan alınan örneklerin kabukları soyulduktan sonra küçük parçalara ayrılıp steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyona tabi tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonu için % 96'lık alkol ve % 2'lik sodyum hipoklorit+Tween 20 kullanılmıştır. Bitki örnekleri önce %96'lık alkol içerisinde 1-2 dk. tutulmuş daha sonra saf steril su ile yıkanıp % 2'lik sodyum hipoklorit+Tween 20 içerisinde 10 dk. bekletilmiştir. Bu süre sonunda tekrar saf steril su ile üç kez yıkanıp filtre kağıtları üzerinde iyice kurutulmuştur. Kuruyan bitki örnekleri ortadan uzun bir şekilde ikiye kesilip, iç kısımları PDA ortamına gelecek şekilde yerleştirilmiş ve petri kutularının etrafı parafilm ile sarılmıştır. Hazırlanan örnekler + 20 °C ye ayarlanmış inkübatör içerisinde kültüre alınmıştır. PDA ortamı üzerinde gelişen *P. tracheiphila* bir mantar delici (5 mm çapında) ve öze yardımı ile saflaştırmak üzere tekrar PDA ortamında alt kültüre alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bitki doklarından izole edilmiş *P. tracheiphila*'nın PDA ortamı üzerindeki görünümü

3.2.2. Limon Fidanlarının *P. tracheiphila* ile İnokulasyonu

Petri kutularında alt kültüre alınarak saflaştırılan ve daha sonra çoğaltılan *P. tracheiphila*; turunç anacı üzerine bir yıl önce aşılana altı limon çeşidine yapay olarak inokule edilmiştir. Fidanların aşı yerinin üzerinden kabuk aşı bıçağı ile kesilip kaldırılmış ve PDA ortamında geliştirilen *P. tracheiphila* kültüründen mantar delici ve öze yardımı ile alınan 5mm'lik fungal kültür her bir fidana 2 disk olmak üzere kabuk altına yerleştirilmiştir. Daha sonra aşılana bölge ıslak pamuk ile kapatılıp aşı bandı ile sarılmıştır. Fidanlar sera koşullarında 3 tekerrürlü olarak kültüre alınmış (Şekil 3.3) ve her gün sera sıcaklıkları kaydedilmiştir.



Şekil 3.3. *P. tracheiphila* ile inokule edilip, sera koşullarında muhafaza edilen limon fidanlarından bir görünüm

Birinci inokulasyonların ardından yaklaşık iki ay sonra aynı işlemler her fidanda ikişer dala tekrar uygulanmıştır. Sera koşullarında hava sıcaklığının artması nedeni ile *P. tracheiphila* gelişimi yavaşlayacağı için her çeşitten üçer fidan iklim odasında alınıp, sıcaklık *P. tracheiphila* gelişimi için optimum sıcaklık olan + 20 °C'ye ayarlanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *P. tracheiphila* ile inokule edilip, +20 °C iklim odasında muhafaza edilen limon fidanlarından bir görünüm

3.2.3. Limon Çeşitlerinde Bulunan Hesperidin ve Limonin Miktarlarının Belirlenmesi

3.2.3.1. Bitki Örneklerinin Alınması Sırasında Dikkat Edilen Hususlar ve Örneklerinin Hazırlanması

Yapay inokulasyon işlemi sonrasında limon çeşitlerinin görülmesi ile örnekler alınmaya başlanmıştır. Örnekler fidanların yaprak, dal ve gövde olmak üzere üç farklı kısımdan alınmıştır. İnfekteli fidanlardan örneklerin aldığı zaman sağlıklı fidanlarda da örnekler alınmıştır. Sağlıklı ve *P. tracheiphila* ile yapay olarak inokule edilen limon fidanlardan örneklerin alınması sırasında Çizelge 3.1 de belirtilen hususlara dikkat edilmiştir.

Çizelge 3.1. Hesperidin ve limonin miktarlarının belirlenmesi için sağlıklı limon fidanlarından örneklerin alınmasında dikkat edilen hususlar

	Sağlıklı fidanlardan	<i>P. tracheiphila</i> ile infekteli fidanlardan
Yaprak	<ul style="list-style-type: none"> • Orta yaşlı • Üzerinde herhangi bir hastalık veya zararlı simptomsu gözlemlenmemiş, sağlıklı yapraklar 	<ul style="list-style-type: none"> • Orta yaşlı • Simptomların görüldüğü • Kurumamış
Dal	<ul style="list-style-type: none"> • 4 – 5 mm çapında • Üzerinde herhangi bir hastalık veya zararlı simptomsu gözlemlenmemiş, sağlıklı 	<ul style="list-style-type: none"> • 4 – 5 mm çapında • Simptomların görüldüğü • Tamamen kurumamış
Gövde	<ul style="list-style-type: none"> • 8 – 9 mm çapında • Aşı yerinin üzerinden • Üzerinde herhangi bir hastalık veya zararlı simptomsu gözlemlenmemiş, sağlıklı 	<ul style="list-style-type: none"> • 8 – 9 mm çapında • Simptomların görüldüğü • Tamamen kurumamış • İnokulasyon noktasının üzerinden

Sağlıklı ve *P. tracheiphila* ile infekteli limon fidanlarından alınan örnekler laboratuvar koşullarında bistürü yardımı ile küçük parçalara (yaklaşık 0.5-1 mm) kesilerek analiz için hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler analiz yapılmaya

kadar muhafaza edilmek için 50 ml'lik tüpler içerisine alınmış ve ekstraksiyon işlemleri yapıncaya kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. Limon Örneklerinde Hesperidin ve Limonin Miktarlarının Belirlenmesi için HPLC Kalibrasyonu

Sağlıklı ve *P. tracheiphila* ile infekteli limon bitkilerinin bünyesinde bulunan hesperidin (Sigma) ve limonin (Sigma) miktarlarının belirlenmesi öncesinde her iki fenolik bileşik içinde kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi gerekmektedir. Bu nedenle her ikisinde asetonitril de çözündürülüp kalibrasyon için farklı konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan standartlar SB C-18 (10 cm, 4.6 mm x 50 mm) kolonu ve 15:2:2:1 oranlarında karıştırılan Ultra safsu: Methanol: Asetonitril: Asetik asit içeren solvent kullanılarak Şekil 3.5.de de görüleceği gibi HPLC'de analiz edilmiştir. Hesperidin analizleri sırasında dalga boyu 280 nm, kolon sıcaklığı da 40°C 'ye ayarlanmış ve 15 dk. süresince analiz edilmiştir. Limonin analizleri sırasında ise dalga boyu 207 nm'ye, kolon sıcaklığı da 30°C 'ye ayarlanıp yine 15 dk. süresince analiz edilmiştir ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.



Şekil 3.5. Analizler sırasında kullanılan HPLC'den bir görünüm

3.2.3.3. Hesperidin ve Limonin Miktarlarının HPLC Tekniği ile Belirlenmesi

Sağlıklı ve *P. tracheiphila* ile infekteli limon çeşitlerinden alınan örneklerde hesperidin ve limonin miktarlarının belirlenmesi sırasında ekstrelerin hazırlanması için 3.2.3.1. de belirtildiği Şekilde yaparak, dal ve gövde örnekleri alınmıştır. Alınan her bir örnekten 0.5 g. tartılıp üzerine 2 ml Dimethoxy Sulfoxide (DMSO) eklenmiştir. Bu Şekilde hazırlanan örnekler 2 saat boyunca 225 rpm’de çalkalayıcıda çalkalanarak ekstre edilmiş ve bu süre sonunda süspansiyon filtreden (0.22 m) geçirilerek HPLC ŐiŐelerine (1.5 ml) aktarılmıŐtır. Analiz için hazır hale gelen örnekler 3.2.3.2. de belirtilen solvent ve kolon kullanılarak analizler yapılmıştır. Aynı zamanda hesperidin ve limonin miktarlarının belirlenmesi sırasından her biri için gerekli olan dalga boyu, kolon sıcaklığı ve süre de 3.2.3.2. de belirtildiği Şekilde ayarlanmış ve analizler yapılmıştır (Del Rio ve ark, 2003). Analiz sonucunda elde edilen değerler varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve uygulamalar arasındaki fark % 5 önem düzeyinde LSD oklu testi ile belirlenmiştir. İstatistiki analizler COSTAT paket programı ile yapılmıştır.

3.2.4. Hesperidin ve Limoninin Farklı Konsantrasyonlarının *P. tracheiphila*’nın Miseliyal Gelişimi zerine Etkileri ve Yüzde Engelleyicilik Miktarları

Farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 ppm) hesperidin ve limoninin içeren ortamlardaki *P. tracheiphila* misellerinin gelişiminin belirlenmesi sırasında her konsantrasyon için 3 tekerrür ve kontrolden oluşan deneme kurulmuŐtur. Denemenin kurulması sırasında;

- a. Hazırlana PDA ortamı tüpler içine konulmuŐ ve 121⁰C de 1 atm. basınçta 20 dk. süresince otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.
- b. Otoklav işlemi sonrasında hazırlanan tüpler içerinde bulunan PDA ortamının donmasını önlemek için su banyosu 52 ⁰C’ye ayarlanıp tüpler su banyosuna yerleştirilmiştir.

- c. Soğuk sterilizasyon işlemine tabi tutulan hesperidin ve limonin stokları steril kabinde, istenilen konsantrasyonları sağlayacak miktarlarda PDA ortamlarına eklenmiştir.
- d. Farklı miktarlarda hesperidin ve limonin içeren PDA ortamlarının homejen karışımını sağlamak amacı ile 1-2 dk. süresince 1800 devirde worteks'de karıştırılmıştır ve 5 cm çapındaki petrilere dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır.
- e. Soğuyan PDA ortamı içerisine 10 günlük *P. tracheiphila* kültürlerini içeren 3 mm çapında diskler yerleştirilmiş ve 20 °C de kültüre alınmıştır.

Kurulan denemede kontrol petrilerinde *P. tracheiphila* tüm petriyi kapladığı zaman farklı konsantrasyonlardaki *P. tracheiphila* gelişimi ölçülmüş ve yüzde etki belirlenmiştir. Yüzde etkinin belirlenmesinde A bolt formülü kullanılmış ve farklı konsantrasyonların karşılaştırılması bu doğrultuda yapılmıştır. (Fourie, 2004)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Patojenin İzolasyonu ve Tanısı

P. tracheiphila ile infekteli 1 yaşlı sürgünlerden alınan Kütdiken limon çeşitleri PDA ortamında izole edilmiş, saflaştırılmıştır ve bu örneklerden alınan preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiştir. Örneklerin incelenmesi sırasında piknidyumların sertliğine, piknidiosporların çıkışına, şekline büyüklüğüne bakılmıştır. Aynı zamanda fiolitler ucunda oluşan fioloconidilerin varlığı gibi özelliklerde incelenmiştir (Barnett ve Hunter, 1972). Böylece alınan örneklerin *P. tracheiphila* olup olmadığı doğrulanmıştır. Saflaştırılan bu kültürlerden diskler alınarak belirlenen limon çeşitleri hastalık etmeni ile yapay olarak inokule edilmiştir. inokulasyon sonrasında bitki dokularında gelişerek limon çeşitlerde belirtilerin oluşmasına neden olmuştur. Belirtiler görüldükten sonra 1 yaşlı dallardan örnekler alınarak re-izolasyon yapılmıştır ve hastalık etmeni saflaştırılmıştır. Böylece elde edilen kültürler *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

4.2. Limon Çeşitlerinin *P. tracheiphila*' ya Karşı Duyarlılıkları

Yediveren, Euroka, Enterdonato, Tatlı limon, Kütdiken, Meyer limon çeşitlerine hastalık etmeni *P. tracheiphila* yapay olarak inokule edilmiştir. Gövdeden yapılan ilk inokulasyonların ardından iki ay sonra her fidanda ikişey dala ikinci inokulasyonlar yapılmıştır. İlk belirtiler ilk inokulasyon 78 gün (2.5 ay) sonra gözlemlenmiştir.

İlk belirtiler öncelikle duyarlı çeşitler arasında yer alan Kütdiken limon çeşidinde görülmeye başlanmıştır. Belirtiler tamamen gözlemleninceye kadar sürekli kontrollere devam edilmiştir. İnokulasyondan 1 ay sonra enfeksiyon bölgesinde pamuk üzerinde renk değişiklikleri görülmeye başlamıştır (Şekil 4.1.). İnokulasyon bölgesinde gelişmeye başlayan fungus; bir iletim demeti hastalığı olması nedeniyle ksilem dokularını tıkamıştır. Bunun sonunda da bitki üst kısımlarından başlayarak yapraklarda sınırları belli olmayan sararmalar

gözlemlenmiş (Şekil 4.2.) ve ilerleyen aşamalarda bu yapraklar yaprak sapı dal üzerinde kalacak şekilde dökülmeler şeklinde hastalık kendini göstermiştir (Şekil 4.3.). Hastalığın daha fazla ilerlemesi ile yaprak sapsarı sararıp kurumuş ve dökülmüşlerdir (Şekil 4.4.). Hastalığın ilerleyen aşamalarında ise uçtan başlayarak sürgünlerin kuruduğu ve bitkinin öldüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). İnfekteli dallar ortadan kesildiği zaman iletim demetlerinin turuncumsu bir renk aldığıda belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. (Şekil 4.6.)



Şekil 4.1. *P. tracheiphila* ile yapay inokulasyondan bir ay sonra limon fidanı infeksiyon bölgesinde görülen renk değişimlerinden bir görünüm



Şekil 4.2. *P. tracheiphila* ile yapay inokulasyon sonrasında yapraklarda gözlemlenen sınırları belli olmayan sararmalara ait bir görünüm



Şekil 4.3. *P. tracheiphila* ile yapay inokulasyon sonrasında yaprak sapı dal üzerinde kalacak şekilde yaprakların dökülmesine ait bir görünüm



Şekil 4.4. *P. tracheiphila* ile yapay inokulasyon sonrasında yaprak saplarındaki sararma ve kurumalara ait bir görünüm



Şekil 4.5. *P. tracheiphila* ile yapay inokulasyon sonrasında sũrgũn uçlarından başlayan kurumalara ait bir gũrũnũm



Şekil 4.6. *P. tracheiphila* ile yapay inokulasyon sonrasında övdenin enine kesitinde iletim demetlerinde gözlemlenen turuncumsu renklenmelerine ait bir görünüm

Yapılan çalışmada çeşitler arasında belirtilerinin görülme zamanları ve hastalıktan etkilenme dereceleri arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda yapay inokulasyon sonrasında hastalık yoğunluğunun; + 20 °C iklim odasında kültüre alınan çeşitlerden; Kütdiken limon çeşidinde belirtilerinin daha erken ve daha yoğun olduğu, Yediveren ve Euroka limon çeşitlerinde Kütdiken limon çeşidine oranla daha az belirtilerinin görüldüğü belirlenmiştir. Buna rağmen

Enterdonato ve Meyer limon çeşitlerinde simptomların daha geç ve daha az olduğu, Tatlı limon çeşitinde ise yok denecek kadar az simptomların görüldüğü belirlenmiştir.

Bu doğrultuda dayanıklı ve duyarlı çeşitler arasındaki farklılıklar Şekil 4.7’de belirgin olarak görülmektedir. Aynı şekilde Şekil 4.8 de dayanıklı bir çeşit olan Tatlı limon ile duyarlı bir çeşit olan Kütdiken arasında görülen simptom farklılıklar çeşitler arasındaki farkları belirgin olarak ortaya koymaktadır.



Şekil 4.7. *P. taracheiphila* ile yapay inokulasyon sonrasında limon çeşitleri arasında gözlemlenen simptomlardaki farklılıklar; **1.** Tatlı Limon, **2.** Meyer, **3.** Enterdonato, **4.** Euroka, **5.** Yediveren, **6.** Kütdiken



Şekil 4.8. *P. tracheiphila* yapay inokulasyon sonrasında **1.** Tatlı Limon ve **2.** Küt diken limon çeşitleri arasındaki simptomolojik farklılıklara ait görünüm

Pionnat (1982) ve Cutuli ve ark. (1984)'nın yaptıkları çalışmalarda Sovyetler Birliğinde Meyer limon çeşidinin; İsrail ve Fransa'da ise Enterdonato limon çeşidlerinin Uçkuran Hastalığı'na karşı dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise Meyer limon çeşidinin Tatlı limon kadar olmasa da dayanıklı olduğu fakat Entordanato limon çeşidinin ise Meyer limon çeşidinden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan benzer bir çalışmada Tatlı limon çeşidinin dayanıklı olduğunu belirlenmiştir (Tuzcu ve ark, 1989). Bu çalışmada ise Tuzcu ve ark.'nın belirlediği gibi Tatlı limon çeşidinin Uçkurutan Hastalığı'na karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Tuzcu ve ark, yaptıkları aynı çalışmada Enterdonato limon çeşidinin duyarlı, Euroka ve Küt diken çeşidlerinin ise çok duyarlı oldukları belirlenmiştir. Tuzcu ve ark.'nın yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri sonuçların bu çalışma ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Farklı bölgelerde yapılan aynı çalışmalar sonucunda çeşitlerin farklı tepkiler göstermesi *P. tracheiphila*'nın zarar oluşturma derecesinin bölgelere göre farklılık gösterdiğini de açıkca ortaya koymaktadır.

Yapılan bu çalışmada yapay inokulasyon sonrasında sera koşullarında kültüre alınan limon çeşitlerinde sıcaklığın 30 °C üzerine çıkmasıyla; hastalık gelişiminin çok yavaşladığı ve simptomların sadece ilk belirtilerinin Kütüden ve Yediveren çeşitlerinde görüldüğü belirlenmiştir. Diğer çeşitlerde ise simptomların düşük oranlarda ve daha geç dönemlerde ortaya çıktığı kaydedilmiştir.

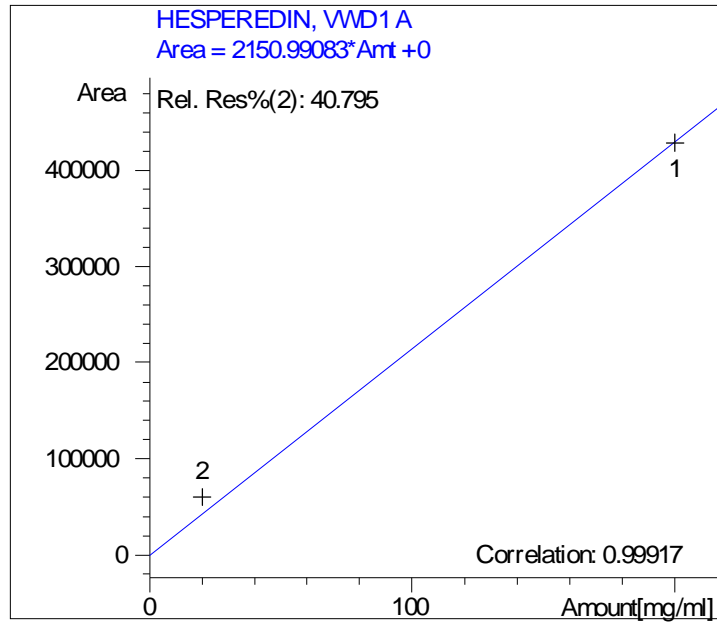
Fakat yapay inokulasyon sonrasında + 20 °C'deki iklim odasına alınan fidanlarda hastalık gelişimi için optimum sıcaklığın sağlanması nedeni ile *P. tracheiphila* gelişimi tüm çeşitlerde gözlemlenmiştir. Fakat yukarıda da belirtildiği gibi ilk simptomların gözlemlenme zamanları ve çeşitlerin hastalıktan etkilenme dereceleri arasında farklılıklar olduğu kaydedilmiştir.

Bu nedenle çalışmanın esas amacı olan infeksiyon sonrasında bitki bünyesinde bulunan hesperidin ve limonin miktarlarının değişiminin belirlenmesi ile ilgili yapılacak çalışmalarda ihtiyaç duyulan bitki örnekleri + 20 °C deki iklim odasında bulunan fidanlardan sağlanmıştır.

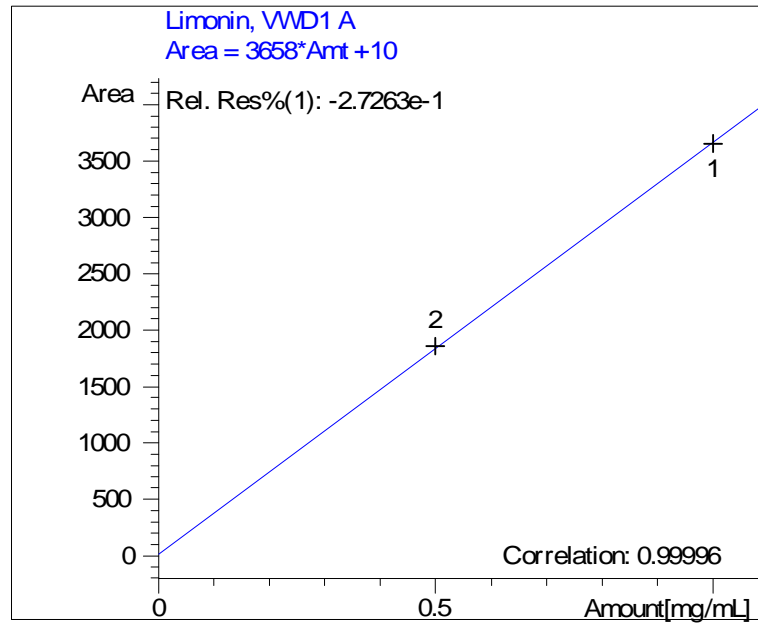
4.3. *P. tracheiphila* İle İnfekteli ve Sağlıklı Limon Çeşitlerinde Hesperidin ve Limonin Miktarları'nın Belirlenmesi ve Yüzde Artışlarının Karşılaştırılması

4.3.1. Limon Örneklerinde Hesperidin ve Limonin Değerlerinin Belirlenmesi için HPLC Kalibrasyon Eğrileri

Limon çeşitlerinden *P. tracheiphila* ile infekteli ve sağlıklı bitkilerden örnekler alınarak hazırlanan ekstratlar HPLC'de analiz edilmiştir. Fakat analiz öncesinde hesperidin ve limonin için Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 da verildiği şekilde kalibrasyonları oluşturulmuş ve kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.



Şekil 4.9. Hesperidin standartlarına ait kalibrasyon eğrileri



Şekil 4.10. Limonin standartlarına ait kalibrasyon eğrileri

4.3.2. Limon Örneklerinde Belirlenen Hesperidin ve Limonin Miktarları ve Bunların Yüzde Artışlarının Karşılaştırılması

Yapay inokulasyon tekniği kullanılarak *P. tracheiphila* ile infekte edilen Yediveren, Enterdonato, Euroka, Tatlı limon, Meyer ve Kütdiken çeşitlerinden ve bu çeşitlerin sağlıklı fidanlarından yaprak, dal ve gövde örnekleri alınarak HPLC’de hesperidin ve limonin miktarları belirlenmiştir.

Yapılan analizler sonucunda sağlıklı ve hasta fidanlardan elde edilen hesperidin miktarları Çizelge 4.1. de verilmiştir. Söz konusu çizelge incelendiği zaman sağlıklı ve hasta örneklerin yaprak, dal ve gövdelerinde belirlenen toplam hesperidin miktarının sırasıyla dal örneklerinde en yüksek değerlerde olduğu, yaprak örneklerinde ise toplam hesperidin miktarının çeşitlere göre değişmekle birlikte daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen hesperidin miktarları (mg/g)

ÇEŞİTLER	YAPRAK		DAL		GÖVDE	
	Sağlıklı	Hasta	Sağlıklı	Hasta	Sağlıklı	Hasta
Yediveren	0.85 b*	2.00 a	5.02 a	7.25 b	0.48 b	0.64 c
Euroka	1.00 a	1.50 b	3.13 b	6.62 c	1.77 a	2.40 a
Enterdonato	0.19 e	0.69 c	1.26 d	4.66 d	0.19 d	1.01 c
Tatlı Limon	0.29 de	1.48 b	1.13 e	7.67 a	0.38 c	2.37 a
Meyer	0.35 cd	0.95 c	2.57 c	7.40 ab	0.34 c	1.76 b
Kütdiken	0.47 c	0.70 c	1.17 e	2.37 e	0.51 b	0.56 c

*LSD: 0.05

Örnek alınan tüm çeşitlerde her üç kısmında da (yaprak, dal ve gövde) infeksiyon sonrasında hesperidin değerlerinde artış olduğu ve bu artış miktarlarının

ise çeşitler arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.2 de de görüleceği gibi inokulasyon sonrasında bitki bünyesinde gözlenen artışlar doğrultusunda, hesaplanan yüzde miktarının dayanıklı, orta dayanıklı, duyarlı ve çok duyarlı çeşitlerde artış olmasına rağmen dayanıklı çeşitlerde en yüksek değerlerde artış olduğu belirlenmiştir.

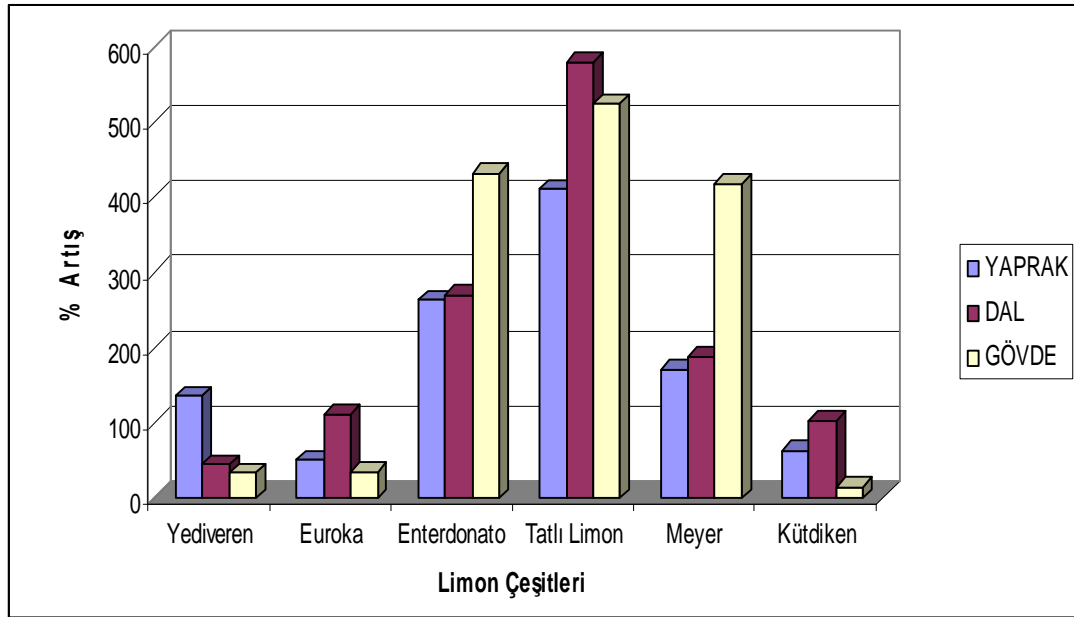
Bu doğrultuda infeksiyon sonrasında yapraklarda hesperidin miktarlarında yüksek oranlarda artış olduğu Çizelge 4.2 ve Şekil 4.11. de belirgin bir şekilde görülmektedir. Buna göre; Tatlı limon çeşidinde % 410.3 artış olduğu, Enterdonato, Meyer ve Yediveren çeşitlerinde sırasıyla % 263.2, % 171.4 ve % 135.3 oranlarında artış olduğu belirlenmiştir. Kütdiken ve Euroka çeşitlerine bakıldığı zaman ise yüzde artış miktarlarının diğerlerine oranla düştüğü ve sırasıyla % 63.8 ve % 50.0 oranlarında olduğu belirlenmiştir.

P. taracheiphila ile infeksiyon sonrasında dallarda görülen hesperidin yüzde artış miktarları yine Çizelge 4.2 ve Şekil 4.11 de verildiği şekildedir. Söz konusu çizelge ve grafik incelendiği zaman çeşitler arasındaki farklılıklar yine açıkça ortaya çıkmaktadır. Tatlı limon çeşidinde % 578.8 artış olurken sırasıyla Enterdonato, Meyer ve Euroka çeşitlerinde %269.8, % 187.9 ve % 111.5 oranlarında artış olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında duyarlı çeşitler arasında yer alan Kütdiken ve Yediveren çeşitlerinde ise sırasıyla, % 102.6 ve % 44.4 oranlarında artış gözlemlenmesine rağmen dayanıklı çeşitler kadar artış gözlemlenmemiştir.

İnfeksiyon sonrasında gözlemlenen artışlara bakıldığı zaman ise çeşitler arasında yine belirgin farkların olduğu görülmektedir. Tatlı limon çeşitlerinde hesperidin yüzde artış miktarlarının % 523.7 gibi yüksek miktarlarda belirlenmesine rağmen Enterdonato ve Meyer çeşitlerinde sırasıyla % 431.6 ve % 417.6 oranında bir artış olduğu bunu takibinde Euroka, Yediveren ve Kütdiken çeşitlerinde de sırasıyla %35.6, % 33.3 ve % 15.7 oranlarında artış olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen hesperidin miktarlarının karşılaştırılması (%)

ÇEŞİTLER	YAPRAK	DAL	GÖVDE
Yediveren	135.3	44.4	33.3
Euroka	50.0	111.5	35.6
Enterdonato	263.2	269.8	431.6
Tatlı Limon	410.3	578.8	523.7
Meyer	171.4	187.9	417.6
Küt diken	63.8	102.6	15.7



Şekil 4.11. Limon çeşitlerinin infeksiyon öncesinde ve sonrasında yaprak, dal ve gövde bünyesinde belirlenen hesperidin yüzde artış miktarı

Yediveren, Enterdonato, Euroka Tatlı Limon, Meyer ve Küt diken limon çeşitlerinde infeksiyon öncesi ve infeksiyon sonrasında yaprak, dal ve gövdeden alınan bitki örnekleri ile belirlenen hesperidin miktarları ve bunların yüzde artışları,

infeksiyon sonrasında hesperidinin bitki bünyesinde aktif olarak harekete geçtiğini ve bitkinin savunma mekanizmasında görev aldığını ortaya koymaktadır. Bunun sonucunda yüksek miktarlarda hesperidin sentezlenen çeşitlerin dayanıklı ve orta dayanıklı çeşitler arasında yer aldığı ve infeksiyon sonrasında çok fazla belirtilerin görülmediği çeşitler oldukları; düşük oranlarda sentezlenen yani yüzde artış miktarının daha az olduğu kaydedilen çeşitlerin ise duyarlı veya çok duyarlı çeşitlerin olduğu kaydedilmiştir. Yüzde artış oranlarının daha az olduğu çeşitlerde ise inokulasyon sonrasında hastalık belirtilerinin belirgin olarak gözlemlendiği kaydedilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen sonuçların Ben-Aziz (1967)'in Tanjerin kabuklarında *P. tracheiphila*'ya karşı hesperidinin fungustatif etkisinin belirlenmesinde elde edilen sonuçlar ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Aynı şekilde Del Ri'ó ve ark. (2004)'nın turunçgil kabuklarında yapmış oldukları benzer bir çalışmada hesperidinin bu çalışmada elde edilen sonuçlar gibi, farklı bir hastalık etmeni olsa bile, *Phytophthora citrophthora* ile infeksiyon sonrasında artış gösterdiği belirlenmişlerdir. Ortun'ó ve ark., 2005'de farklı turunçgil çeşitlerinin kabuklarında yaptığı benzer bir çalışmada hesperidinin *Penicillium digitatum* karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynadığı ve infeksiyondan sonra artış gösterdiği belirlenmiştir.

Daha önce de yapılan birçok çalışmada da portakal ve limon çeşitlerinde yoğun bir şekilde limonin bulunduğunu belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında Çizelge 4.3 de verilen sonuçlara bakıldığı zaman hem sağlıklı hem de *P. tracheiphila* ile infekteli Yediveren, Enterdonato, Euroka, Tatlı limon, Meyer ve Kütdiken limon çeşitlerinin yaprak, dal ve gövdelerinde yüksek miktarlarda limonin bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin miktarları (mg/g)

ÇEŞİTLER	YAPRAK		DAL		GÖVDE	
	Sağlıklı	Hasta	Sağlıklı	Hasta	Sağlıklı	Hasta
Yediveren	0.29 e*	0.59 e	15.70 a	30.80 b	0.72 e	1.36 e
Euroka	0.77 b	1.50 c	2.86 e	5.32 e	1.14 d	2.19 d
Enterdonato	0.59 c	2.17 b	15.60 a	36.00 a	3.01 a	6.63 b
Tatlı Limon	0.50 d	2.15 b	7.83 b	19.80 c	1.89 b	10.00 a
Meyer	0.28 e	1.19 d	3.83 c	8.13 d	1.29 c	5.01 c
Kütdiken	1.42 a	3.01 a	3.25 d	4.52 f	1.16 d	2.16 d

*LSD: 0.05

Alınan örneklerle yapılan analizler sonucunda belirlenen yüzde artış miktarları Çizelge 4.4 de ve Şekil 4.12 de verildiği şekildedir. Buna göre; Yediveren; Enterdonato, Euroka, Tatlı Limon, Meyer ve Kütdiken çeşitlerinin yaprak analizleri sonuçlarına baktığımız zaman sağlıklı ve hastalıklı çeşitler arasında yüzde artış miktarlarının en fazla sırasıyla % 330 ve % 325 artışla Tatlı Limon ve Meyer çeşidinde olduğu, bunu takiben sırasıyla Enterdonato, Kütdiken, Yediveren ve Euroka çeşitlerinde % 267.8, % 111.9, % 103.5 ve % 94.8 oranlarında artış olduğu ortaya çıkartmıştır.

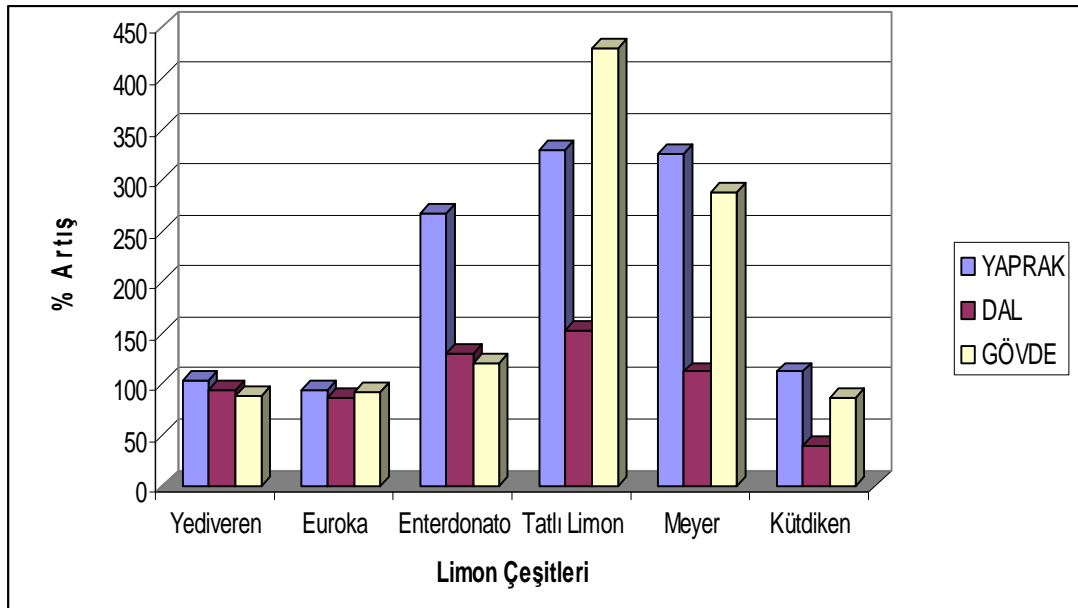
Söz konusu Çizelge ve Şekilde de görüleceği gibi dal örneklerinden alınan sonuçlarda, çeşitler arasında en fazla yüzde artışının % 152.2 oranla Tatlı Limonda olduğu, bunu sırasıyla % 130.3 oranla Enterdonatanın, % 112.3 oranla Meyer, % 94.9 oranla Yediveren, % 86.0 Eurokanın ve % 39.1 oranla Kütdiken çeşitlerinin izlediği belirlenmiştir.

Analiz sonuçlarında gövdeden elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman ise en fazla limonin artış miktarının yine % 429.1 oranla Tatlı Limon çeşidinde, bunu takiben yüzde artış oranlarının Meyer de % 288.4 ve Enterdonata da % 120.3

oranlarında olduğu belirlenmiştir. Euroka, Yediveren ve Kütdiken çeşitlerine bakıldığı zaman ise sırasıyla %92.1, % 88.9 ve % 86.2 oranlarında artış olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin artış miktarlarının karşılaştırılması (%)

ÇEŞİTLER	YAPRAK	DAL	GÖVDE
Yediveren	103.5	94.9	88.9
Euroka	94.8	86.0	92.1
Enterdonato	267.8	130.3	120.3
Tatlı Limon	330.0	152.2	429.1
Meyer	325.0	112.3	288.4
Kütdiken	111.9	39.1	86.2



Şekil 4.12. Limon çeşitlerinin infeksiyon öncesinde ve sonrasında yaprak, dal ve gövde bünyesinde belirlenen hesperidin yüzde artış miktarı

P. tracheiphila ile infekteli ve sağlıklı limon çeşitlerinde belirlenen limonin değerleri sonucunda hesaplanan yüzde artış miktarlarına bakıldığı zaman artış oranlarının yüksek olduğu ve enfeksiyon sonrasında limonin aktif rol oynadığı açıkça ortaya çıkmaktadır.

Roy ve Sarat (2006) ve Chutia ve ark. (2009) tarafından yapılan benzer çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman ise bu çalışma ile benzerlik gösterdiğini ve limonin benzer şekilde antifungal özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan analizler sonucunda hesperidin ve limonin değerleri karşılaştırıldığı zaman Yediveren limon çeşidinden alınan sağlıklı ve hastalıklı yaprak örneklerinde hesperidin miktarlarının ve yüzde artış miktarlarının daha yüksek olduğu, dal ve gövde örneklerinde ise sağlıklı ve hastalıklı fidanlarda limonin miktarlarının ve yüzde artış değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Euroka limon çeşitlerinde belirlenen hesperidin ve limonin sonuçlarına bakıldığı zaman ise yaprak örneklerinde sağlıklı fidanlardan alınan örneklerde hesperidin miktarının daha yüksek olduğu, fakat yüzde artış miktarının limoninde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Dal örneklerine bakıldığı zaman ise hem sağlıklı ve hastalıklı örneklerde belirlenen miktarların, hem de enfeksiyon sonrasında gözlemlenen yüzde artış miktarlarına bakıldığı zaman hesperidin miktarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Gövde örneklerinde ise sağlıklı ve hastalıklı fidanlarda alınan örneklerde belirlenen hesperidinin miktarının daha yüksek olmasına rağmen, yüzde artış miktarının limoninde daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Enterdonata limon çeşitinde sağlıklı ve hastalıklı fidanlarda alınan yaprak örneklerinde belirlenen hesperidin ve limonin miktarlarına bakıldığı zaman, örneklerde limonin daha fazla olduğu, aynı zamanda yüzde artış miktarının da limoninde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda dal ve gövde örneklerinde belirlenen sonuçlara bakıldığı zaman ise sağlıklı ve hastalıklı örneklerde limonin miktarının daha yüksek olduğunun belirlenmesine rağmen yüzde artış miktarının hesperidinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tatlı limon çeşidinde yaprak, dal ve gövde örneklerinde yapılan analizler sonucunda limonin değerlerinin daha yüksek olduğu, fakat buna rağmen yaprak, dal

ve gövde örneklerindeki yüzde artış miktarının hesperidinde daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Meyer çeşitinden alınan örneklerde yapılan analiz sonuçlarında ise sağlıklı fidanlardan alınan yapraklarda hesperidin miktarının daha yüksek olmasına rağmen hastalıklı fidanlardan alınan yaprak örneklerinde limonin miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiş, fakat yüzde artış miktarlarına bakıldığı zaman limoninin yüzde artış miktarının hesperidinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Dal ve gövde örneklerine bakıldığı zaman ise bitki bünyesinde limonin miktarlarının daha yüksek olmasına rağmen yüzde artış miktarlarının hesperidinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

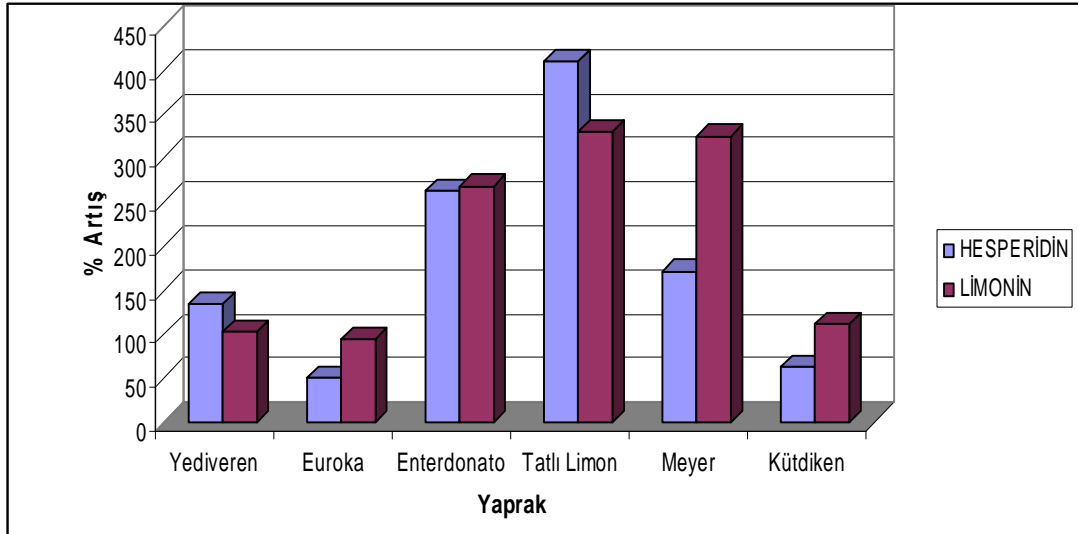
Kütdiken çeşidinden sağlıklı ve hastalıklı fidanlardan alınan yaprak, dal ve gövde örneklerinde limonin miktarının, hesperidin miktarından yüksek olduğu, aynı zamanda yaprak ve gövde örneklerinin yüzde artış miktarının da limoninde daha fazla olduğu fakat dal örneklerinde yüzde artış miktarının hesperidinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bu doğrultuda her iki fenolik bileşimde de diğer çeşitlerle karşılaştırıldığı zaman en fazla yüzde artışın Tatlı Limon çeşidinde olduğu belirlenmiştir. Söz konusu çeşidin hesperidin ve limonin artış değerleri karşılaştırıldığı zaman ise hesperidin değerlerinde limoninden daha fazla olduğu belirlenmiştir.

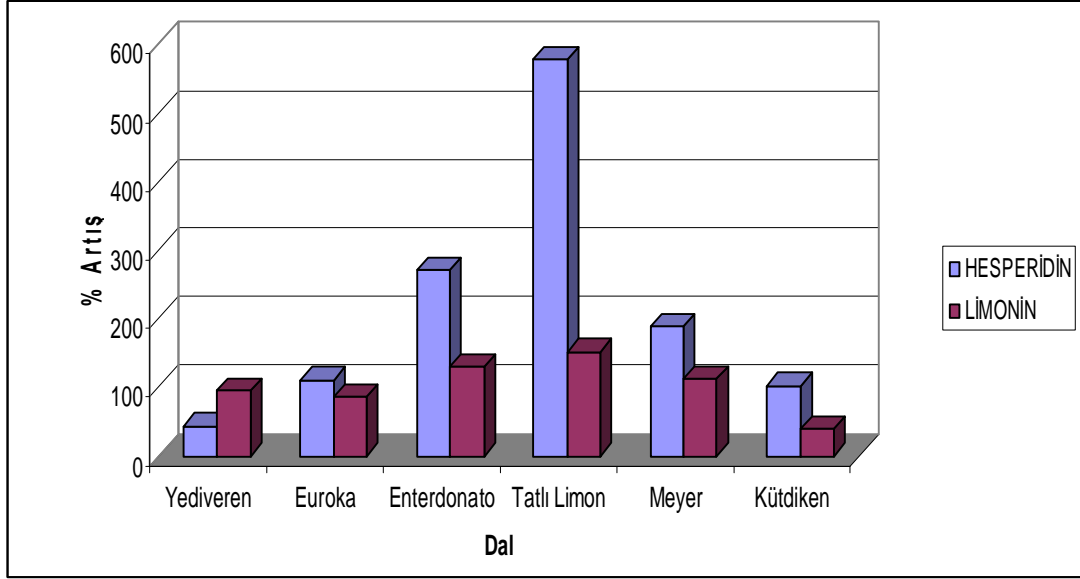
Çizelge 4.5de de görüleceği gibi her iki fenolik bileşimde infeksiyon sonrasında artış gösterdiği belirlenmiştir. Fakat artış oranlarında farklılıklar olduğu, bazı çeşitlerde hesperin daha yüksek oranlarda olurken bazı çeşitlerde limonin daha yüzde artış gösterdiği belirlenmiştir. Diğer çeşitler arasında ve bu çeşitlerin yaprak, dal ve gövde örnekleri arasındaki farklılıklar Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 da belirgin olarak görülmektedir.

Çizelge 4.5. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin ve hesperidin artış miktarlarının karşılaştırılması (%)

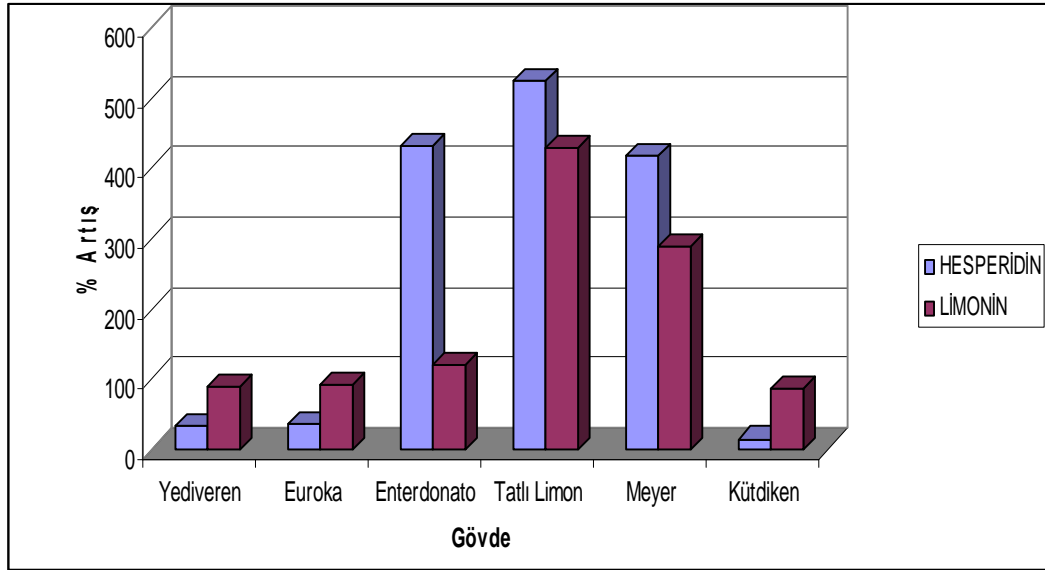
ÇEŞİTLER	YAPRAK		DAL		GÖVDE	
	HESPERİDİN	LİMONİN	HESPERİDİN	LİMONİN	HESPERİDİN	LİMONİN
Yediveren	135.3	103.5	44.4	94.9	33.3	88.9
Euroka	50.0	94.8	111.5	86.0	35.6	92.1
Enterdonato	263.2	267.8	269.8	130.3	431.6	120.3
Tatlı Limon	410.3	330.0	578.8	152.2	523.7	429.1
Meyer	171.4	325.0	187.9	112.3	417.6	288.4
Kütdiken	63.8	111.9	102.6	39.1	15.7	86.2



Şekil 4.13. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin ve hesperidin artış miktarlarının yaprak örneklerinde karşılaştırılması (%)



Şekil 4.14. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin ve hesperidin artış miktarlarının dal örneklerinde karşılaştırılması (%)



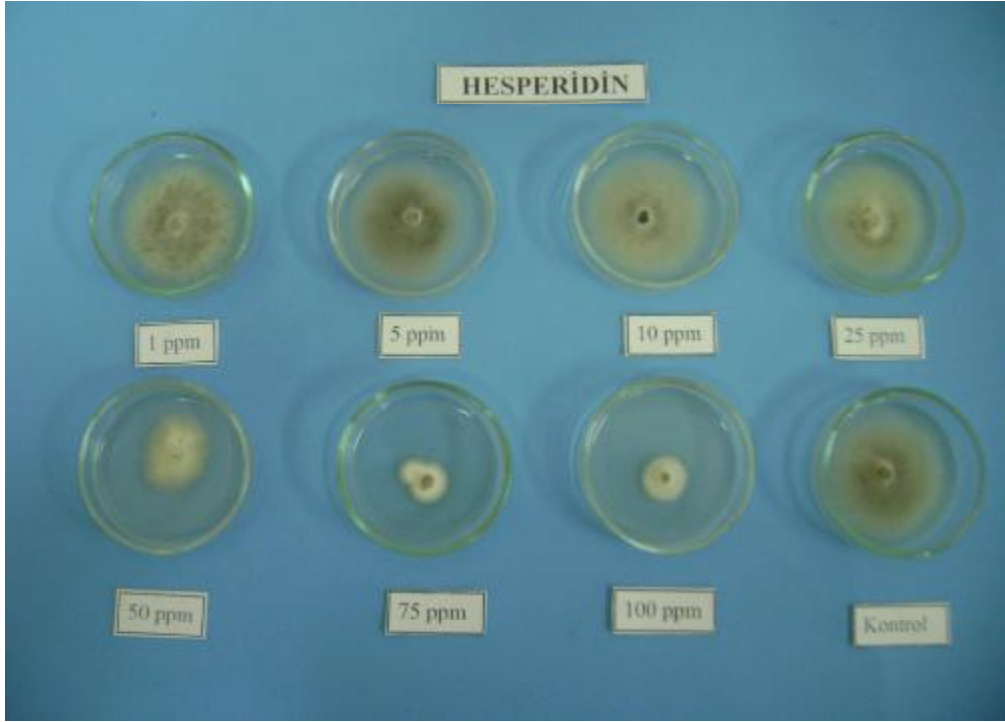
Şekil 4.15. Limon çeşitlerinde infeksiyon öncesinde ve sonrasında belirlenen limonin ve hesperidin artış miktarlarının gövde örneklerinde karşılaştırılması (%)

4.4. Hesperidin ve Limoninin Farklı Konsantrasyonlarının *P. tracheiphila* Gelişimine Etkileri ve Yüzde Engelleyicilikleri

Farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 ppm) hesperidin ve limonin içeren PDA ortamlarında *P. tracheiphila*'nın gelişim miktarları ve yüzde etki değerleri belirlenmiş.

Kurulan denemede kontrol petripleri içinde bulunan *Phoma* tüm petriyi kapladığı zaman ölçümler yapılmış ve farklı konsantrasyonlardaki hesperidin ve limoninlerde gelişim yarı çapları mm cinsinden ölçülüp Çizelge 4.6 da verildiği şekilde belirlenmiştir. Ortamda bulunan hesperidin ve limonin konsantrasyonlarının artması ile *P. tracheiphila* gelişiminin azaldığı gözlemlenmiştir. Hesperidin ve limoninin farklı konsantrasyonları karşılaştırıldığı zaman ise aralarında farklılıklar olduğu limoninde *Phoma* gelişimin daha az olduğu belirlenmiştir. Hesperidin de 1 ppm konsantrasyonunda 21,4 mm yarıçapında gelişen *Phoma*, 5 ppm konsantrasyonunda 21,3 ve 10 ppm konsantrasyonda da 20,5 mm yarıçapında gelişme olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığı zaman 1, 5 ve 10 ppm konsantrasyonlarda, kontrol gelişim yarıçapı ile karşılaştırıldığı zaman hesperidin hastalık gelişimine çok fazla etkisi olmadığı belirlenmiştir. Fakat 25, 50, 75 ve 100 ppm gibi yüksek konsantrasyonlarda gelişime bakıldığı zaman ise hastalık gelişimine olan etkiler belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. 25 ppmde 18 mm yarıçapında gelişme olurken 50 ppm de 13.95 mm, 75 ppmde 11.25 mm ve 100 ppmde de 9.25 mm yarıçapında gelişme olmuştur.

Hesperidin farklı konsantrasyonlarında gözlemlenen *P. tracheiphila* gelişimi konsantrasyonlar arasındaki farkı belirgin olarak ortaya koymaktadır. (Şekil 4.16)



Şekil 4.16. Farklı hesperidin konsantrasyonlarının *P. tracheiphila* gelişimi üzerine olan etkilerine ait bir görünüm

Hesperidinde olduğu gibi limoninin farklı konsantrasyonlarında *P. tracheiphila* gelişimi üzerine farklı etkiler göstermiştir. Konsantrasyonlar arttıkça *Phoma* gelişim yarıçapının azaldığı belirlenmiştir. Bu doğrultuda 1 ppm de 21.83 mm yarıçapında olan *Phoma* gelişimi 5 ppm de 18.67 mm yarıçapına ulaşmıştır. 10 ppm ve 25 ppm de ise gelişim miktarlarının sırası ile 15.67 mm ve 15.58 mm olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığı zaman ise 10 ppm ve 25 ppm arasında büyük farklar olmadığı ortaya çıkmıştır. 50 ppm, 75 ppm ve 100 ppm de ise limoninin *Phoma* gelişimine büyük etkileri olduğu ve sırasıyla 9.92 mm, 6.08 mm ve 3.28 mm yarıçaplarda gelişim olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6.). Bu sonuçlara da bakıldığı zaman farklı limonin konsantrasyonlarında *Phoma* gelişiminde farklılıklar olduğu Şekil 4.17 de belirgin bir şekilde görülmüştür.



Şekil 4.17. Farklı limonin konsantrasyonlarının *P. tracheiphila* gelişimi üzerine olan etkilerine ait bir görünüm

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hesperidin ve limonin bileşiklerinin *P. tracheiphila* gelişimine olan yüzde engelleyicilik miktarları hesaplanmıştır. Bu doğrultuda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6 de ve Şekil 4.18. de verildiği şekildedir. Buna göre; hesperidin 1 ppm ve 5 ppm konsantrasyonlarında yüzde engelleyicilik miktarının %3.16 ve %3.61 olduğu yani 1 ve 5 ppm'in engelleyicilik oranlarının birbirine çok yakın olduğu, 10 ppm'de ise % 7,24 oranla daha yüksek engelleyicilik gösterdiği belirlenmiştir. 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm ve 100 ppm de hesperidin yüzde engelleyicilik miktarlarına bakıldığı zaman ise oranların daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sırasıyla %18.55, %36.87, %49.09, %58.68 oranlarında engelleyicilik sağlamıştır.

Limonin sonuçlarına bakıldığı zaman ise yüzde engelleyicilik oranlarının hesperidinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda limonin 1 ppm de % 1.22 gibi çok düşük oranlarda engelliyicilik sağlanmasına rağmen 5 ppm de ise bu oranın % 15.52'ye yükseldiği, 10 ppm ve 25 ppm'de ise engelleyicilik oranlarının sırasıyla % 29.09 ve %29.5' e arttığı fakat çok yakın oranlarda olduğu tespit

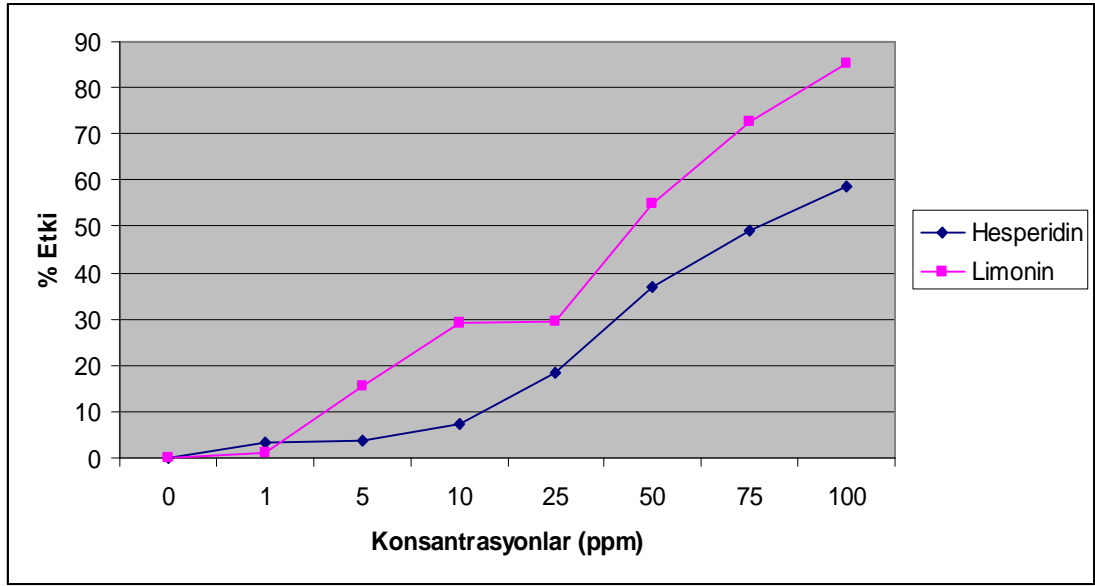
edilmiştir. Fakat 50 ppm ve 75 ppm de ise büyük farklar olduğu ve hastalık gelişimini yüksek oranlarda etkilediği belirlenmiş ve sırasıyla % 55.11 ve % 72.48 oranlarda engelleyicilik etkisi olmuştur. 100 ppm limonin konsantrasyonunda ise en yüksek düzeyde etki gözlemlendiği ve % 85.29 oranında engelleyicilik olduğu gözlemlenmiştir.

Limonin ve hesperidinin yüzde engelleyicilik miktarları karşılaştırıldığı zaman limonin yüzde etki değerlerinin yüksek oranlarda hesperidinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyonların artması ile hesperidin ve limonin arasındaki yüzde etki değerleri arasındaki farkın arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle en yüksek konsantrasyon olan 100 ppmde limonin ve hesperidin arasındaki yüzde etki değerinin en yüksek miktarda olduğu belirgin bir şekilde görülmektedir.

Fourie (2004)'ün *Phytophthora nicotianae* karşı yaptıkları benzer bir çalışmada elde edilen sonuçların bu çalışma ile benzerlik gösterdiği ve *in vitro* çalışmalarda scoparone konsantrasyonlarının artması ile engelleyicilik yüzdesinin arttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Hesperidin ve limoninin farklı konsantrasyonlarının *P. tracheiphila* gelişimine etkileri

Konsantrasyonlar (ppm)	HESPERİDİN		LİMONİN	
	Koloni Çapı	% Etki	Koloni Çapı	% Etki
0	22.10	---	22.10	---
1	21.40	3.16	21.83	1.22
5	21.30	3.61	18.67	15.52
10	20.50	7.24	15.67	29.09
25	18.00	18.55	15.58	29.50
50	13.95	36.87	9.92	55.11
75	11.25	49.09	6.08	72.48
100	9.13	58.68	3.25	85.29



Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda hesperidin ve limoninin *P. tracheiphila* gelişimine yüzde engelleyicilik oranları

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Birçok ülkede olduğu gibi çalışmanın yürütüldüğü Türkiyede de turunçgil çeşitleri arasında önemli bir yere sahip olan limon; yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir. Fakat üretim alanlarında birçok hastalık ve zararlının saldırısına maruz kalmaktadır. Bu da çoğu kez ciddi ekonomik kayıpların oluşmasına neden olmaktadır. Tüm Akdeniz ülkelerinde limon yetiştiriciliği yapılan birçok alan Uçkurutan Hastalığı (*P. tracheiphila*) ile karşı karşıya kalmaktadır. Uçkurutan hastalığı ile mücadelede uygulanan kültürel yöntemler yanında kullanılan kimyasallar da hastalık etmeni olan *P. tracheiphila*'nın yayılmasını engellemede çok etkili olmamaktadır. Bu da hastalık etmeninin önemini daha da artırmaktadır. Özellikle birçok bölgede yaygın bir şekilde görülüp limon ağaçlarının ölümüne sebebiyet vermekte ve bu durum ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Limon yetiştiriciliği yapılan alanlarda öncelikle hastalık etmeni olan *P. tracheiphila*'nın yayılmasını önlemek amacıyla bir takım kültürel önlemler dikkate alınmalıdır. Bu bağlamda öncelikle hastalık etmenin buluşmasına yol açabilecek yara dokularının oluşmamasına dikkat edilmeli ve yapılacak işlemler sırasında kullanılacak alet, ekipmanlar sterilizasyon işlemine tabi tutulmalıdır. Fakat hastalık etmeni bitki bünyesine yara dokuları ile girebileceği gibi bitki üzerinde bulunan stoma gibi doğal açıklıklardan da girebilmektedir. Bu nedenle ağaçlar sürekli kontrol edilmeli ve gözlemlere dayanılarak yapılan simptomalojik tanıların ardından mutlaka laboratvarda yapılacak çalışmalarla kesin teşhisler konulmalıdır. Hastalık etmenin teşhisinin yapılmasının ardından yayılmasını engellemek amacıyla önlemler alınmalı ve etkili bir mücadele yöntemi uygulanmalıdır.

Bu amaca yönelik olarak 2008-2009 yılları arasında yapılan bu çalışmalar kapsamında Uçkurutan Hastalığı ile infekteli bükilerden alınan örneklerden izole edilen *P. tracheiphila* belirlenen altı limon (Yediveren, Enterdonato, Euroka, Meyer, Kütdiken ve Tatlı Limon) çeşidine yapay olarak inokule edilmiş ve bitki savunma sisteminde aktif olarak rol oynayan fenolik bileşiklerden hesperidin ve limoninin *P. tracheiphila* gelişimine olan etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda HPLC teknikleri kullanılarak enfeksiyon öncesinde ve sonrasında limon çeşitleri bünyesinde bulunan

hesperidin ve limonin miktarları ve bunların infeksiyon sonrasındaki yüzde artışları belirlenmiştir. Aynı zamanda hesperidin ve limoninin farklı konsantrasyonlarının *P. tracheiphila* gelişimine olan etkileri de *in vitro* çalışmalarla belirlenmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

1. Arazi çıkışları sonucunda Uçkurutan Hastalığı belirtileri görülen Kütdiken limon çeşitlerinden örnekler alınmış ve hastalık etmeni *P. tracheiphila* izole edilmiş, saflaştırılmış ve altı limon çeşidine yapay olarak inokule edilmiştir. Yapay inokulasyon sonucunda sera koşullarında kültüre alınan fidanlarda hastalık gelişimi çok ağır seyrederken, iklim odasında (+20 °C) kültüre alınan limon fidanlarında belirtiler belirgin bir şekilde görülmüştür. Yapılan tespitler sonucunda belirtilerin Kütdiken limon çeşidinde yoğun olarak görüldüğü, Yediveren ve Euroka limon çeşitlerinde belirtilerin görüldüğü fakat Kütdiken limon çeşidi kadar yoğun olmadığı belirlenmiştir. Enterdonato limon çeşidinde ise hastalık belirtilerinin çok yoğun görülmemesine rağmen hastalığın ilk belirtilerinin, Meyer ve Tatlı Limon çeşidinde ise çok düşük oranlarda belirtilerin görüldüğü gözlemlenmiştir.

2. Yapay inokulasyon sonrasında +20 C⁰ de kültüre alınan altı limon çeşidinde belirtilerin görülmesinden sonra, sağlıklı limon fidanlarının yaprak, dal ve gövdelerinden örnekler alınıp HPLCde analizleri yapılmış ve bu analizler sonucunda yüzde artış miktarları belirlenmiştir. Buna göre; hesperidin yüzde artış miktarlarına bakıldığı zaman yapraktan alınan örneklerde Tatlı limonda %410.34, Enterdonatoda %263.15, Meyerde %171.42, Yediverende %135.29 Kütkikende %63.83 ve Eurokada %50 artış olmuştur. Dal örneklerinden alınan sonuçlara bakıldığı zaman ise Tatlı limonda %578.76, Enterdonatoda %269.84, Meyer de %187.94 Eurokada %111.5, Kütkikende %102.56 ve Yediverende %44.42 artış olurken, gövde örneklerinde Tatlı limonda %523.68, Enterdonatoda %431.57, Meyer de %417.64, Eurokada %35.59, Yediverende %33.33 ve Kütkikende %15.68 artış olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda en yüksek oranlarda artışın Tatlı Limon çeşidinde olduğu belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

Limoninin yüzde artış miktarlarına bakıldığı zaman ise yapraktan alınan örneklerde Tatlı limonda %330, Meyer de %325, Enterdonatoda %267.79,

Kütükikende %111.97, Yediverende %103.45 ve Eurokada %94.8 artış olduğu tespit edilmiştir. Dal örneklerinden alınan sonuçlara bakıldığı zaman ise Tatlı limonda %152.23, Enterdonatoda %130.28, Meyer de %112.27, Yediverende %94.86, Eurokada %86.01 ve Kütükikende %39.08 artış olurken, gövde örneklerinde Tatlı limonda %429.1, Meyer de %288.37, Enterdonatoda %120.26, Eurokada %92.1, Yediverende %88.88 ve Kütükikende %86.21 artış olduğu belirlenmiştir. Hesperidinden elde edilen sonuçlar gibi limoninden elde edilen sonuçlardada en yüksek artışların her üç bitki kısmındada Tatlı Limon çeşidinde olduğu belirlenmiştir.

Hesperidin ve limonin değerleri karşılaştırıldığı zaman ise en fazla artışın Tatlı Limon çeşidinde olduğu belirlenmiştir. Söz konusu çeşidin hesperidin ve limonin artışları karşılaştırıldığı zaman ise hesperidin değerlerinde limoninden daha fazla olduğu belirlenmiştir.

3. Yapay inokulasyon sonucunda elde edilen infekteli limon çeşitlerinden örnekler alınıp *in vitro* koşullarda hastalık etmeni *P. tracheiphila* kültüre alınmış ve saflaştırılmıştır. Elde edilen izolatlar hesperidin ve limonin 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 ppm konsantrasyonlarında hazırlanan ortamlara ekilip bu konsantrasyonlarda gelişiminin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Hesperidin sonuçlarına bakıldığı zaman 1 ppm de 21.3 mm yarıçap da gelişen *P. taracheiphila* 5 ppmde 18.67 mm gelişmiştir. 10 ppm ve 25 ppm de ise gelişim miktarlarının sırası ile 15.67 mm ve 15.58 mm olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığı zaman 10 ppm ve 25 ppm arasında büyük farklar olmadığı ortaya çıkmaktadır. 50 ppm, 75 ppm ve 100 ppm de ise limoninin *Phoma* gelişimine büyük etkileri olduğu ve sırasıyla 9.92 mm, 6.08 mm ve 3.28 mm yarıçaplarda gelişim olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda hesperidinin *P. tracheiphila* gelişimi üzerine engelleyicilik yüzdeleri de hesaplanmıştır. Buna göre; hesperidinin 1 ppm ve 5 ppm lik konsantrasyonlarda %3.16 ve %3.61 oranlarında engelleyicilik gösterdiği yani 1 ve 5 ppm'in engelleyicilik oranlarının birbirine çok yakın olduğu, 10 ppm de ise %7.24 oranla engelleyicilik miktarının arttığı, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm ve 100 ppm konsantrasyonlarında ise engelleyicilik yüzde

miktarlarının artış gösterdiği ve sırasıyla %18.55, %36.87, %49.09, %58.68 oranlarında engelleyicilik sağladığı belirlenmiştir.

Limonin sonuçlarına bakıldığı zaman ise 1 ppm de 21.83 mm yarıçapında gelişme olurken, 5 ppm de 18.67 mm ye düştüğü belirlenmiştir. 10 ppm ve 25 ppm de ise gelişim miktarlarının sırası ile 15.67 mm ve 15.58 mm olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığı zaman 10 ppm ve 25 ppm arasında büyük farklar olmadığı görülmüştür. 50 ppm, 75 ppm ve 100 ppm de ise limoninin *P. tracheiphila* gelişimine büyük etkileri olduğu ve sırasıyla 9.92 mm, 6.08 mm ve 3.28 mm yarıçaplarında gelişimin olduğu belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda yapılan ölçümlerden alınan sonuçlar doğrultusunda limonin *P. tracheiphila* üzerine yüzde engelleyicilik oranları belirlenmiştir. Buna göre; limonin 1 ppm de % 1.22 gibi çok düşük oranlarda engelliyicilik sağlanmasına rağmen 5 ppm de ise bu oranın % 15.52'ye arttığı, 10 ppm ve 25 ppm de ise engelleyicilik oranlarının sırasıyla % 29.09 ve %29.5' e arttığı fakat çok yakın oranlarda olduğu tespit edilmiştir. Fakat 50 ppm ve 75 ppm konsantrasyonlarına bakıldığı zaman büyük farklar olduğu ve hastalık gelişimini ciddi anlamda etkilediği belirlenmiştir. Sırasıyla % 55.11 ve % 72.48 oranlarda engelleyicilik etkisi olmuştur. 100 ppm limonin konsantrasyonunda ise en yüksek düzeyde etki gözlemlendiği ve % 85.29 oranında engelleyicilik olduğu belirlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda hesperidin ve limonin engelleyicilik yüzdelerine bakıldığı zaman ise ikisi arasındaki fark konsantrasyonların artması ile aralarındaki fark daha fazla artmakta ve 100 ppm de en yüksek seviye ulaşmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada yapay inokulasyon sonucunda *P. tracheiphila* inokulasyonu sonrasında hesperidin ve limonin aktiviteleri araştırılmış ve dayanıklı ve duyarlı çeşitler arasında belirgin sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda Uçkurutan Hatalığına karşı dayanıklılık mekanizmasının geliştirilmesinde hesperidin ve limonin kullanılması söz konusu olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- AFEK, U. and SZTEJNBERG, A., 1988. Accumulation of Scoparone, a Phytoalexin Associated with Resistance of Citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology* 78: 1678-1682.
- _____, ORENSTEIN, J., CARMELI, S., RODOV, V. and JOSEPH, M.B., 2000. Umbelliferone a Phytoalexin Associated with Resistance of Immature Marsh Grapefruit to *Penicillium digitatum* *Phytochemistry* 50 (1999) 1129-1132.
- _____, SZTEJNBERG, A. and CARMELY, S., 2001. 6,7-Dimethoxycoumarin, a Citrus Phytoalexin Conferring Resistance Against *Phytophthora gummosis*. *Phytochemistry* 25:1855–1856.
- AGRIOS, G.N., 2005. *Plant Pathology*, Fifth Edition, Elsevier Academic Pres.
- AKTEKE, Ş.A. and KARACA I., 1977. Studies on the survey and biology of Mal secco disease [*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanchaveli et Ghikashvili] of lemon trees. *J. Turkish Phytopath.*, 6, 91-102.
- ALBACH, R.F. and REDMAN, G.H., 2001. Composition and Inheritance of Flavanones in Citrus Fruit. *Phytochemistry* 8:127–143.
- ANONYMOUS, 2005. <http://webtutor.tamu.edu/students/vikram/project/limonoid>
- _____, 2007. *Bitki Koruma, Çiftçi Eğitim ve Yayın Şubesi Müdürlüğü Yayınları* Yayın No:2007-10, İkinci Baskı, s: 75-76.
- BAIDEZ, A.G., GOMEZ, P., DEL RI'O , J. A. and ORTUNO, A., 2007. Antifungal Capacity of Major Phenolic Compounds of *Olea europaea L.* against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69: 224-229.
- BARNETT H. L. and HUNTER BARRY B., 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company. pp:166.
- BASHI E., MAGNANO DI SAN LIO, G. and PERROTTA, G., 1980. Morphological Observation on the Host-Parasite Relations in Sour Orange Leaves Infected With *Phoma tracheiphila*. *Phytopath. Z.* 98: 320-330.

- BEIER, R.C. and OERTLI, E.H., 1983. Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry* 22:2595–2597.
- BEN-AZÍZ, B., 1967. Nobiletin Is Main Fungistat in Tangerines Resistant to Mal Secco, *Science*, 155 (3765): 1026-1027.
- BERHOW, M., TISSERAT, B., KANES, K., and VANDERCOOK, C., 1996. Survey of Phenolic Compounds Produced in Citrus. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Technical Bulletin No. 1856.
- CATARA, A., PERROTTA, G., CARTIA, G. and GRANATA, G., 1976. Problemi fitopatologici connessi con l'impiego di portinesti dall'arancio amaro in Sicilia. Incontro frutticolo sui portinesti degli alberi da frutto, p.249-258. Societa Orticola Italiana, Frutticoltura, Pisa.
- CHUTIA, M., BHUYAN DEKA, P., PATHAK, M.G., SARMA, T.C. and BORUAH, 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*, Volume 42, Issue 3, Pages 777-780
- COFFIN, D.E., 1971. A Method for the Isolation and Identification of the Flavanone Glycosides of Citrus Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19:513–516.
- CUTULI, G., 1982. Il Limone in Coltura Sotto Rete: Afetti Sul Microclima e Sullo Stato Fitosanitario dello Pianta Con Particolare Riguardo al Mal Secco. *Inf. Agr.* 38:2145-2149.
- _____, LAVIOLA, C., PERROTTA, G., SALERNO, M. and SPINA, P., 1984. Mal Secco Disease of Citrus. Basic relation for the International Seminar, Famiglia Piccolo di Calanovella Foundation, Capo d'Orlando, Messina, Italia, 131-135p.
- DAKORA, F.D. and PHILIPS, D.A., 1996. Diverse Functions of Isoflavonoids in Legumes Transcend Anti-Microbial Definitions of Phytoalexins. *Physiol Mol Plant Pathol* 49: 1-20.
- DEL RI'Ó, J.A., ARCAS, M.C., BENAVENTE-GARCIA, O. and ORTUN'Ó, A., 1998. Citrus Polymethoxylated Flavones Can Confer Resistance against

- Phytophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum* Species. J. Agric. Food Chem., 46 (10), pp 4423–4428
- _____, ARCAS, M.C., BOTIA, J.M., BAIDEZ, A.G., FUSTER., M.D., ORTUNO, A.M. and PANDALAI, S.G. 2000. Involvement of Phenolic Compounds in the Antifungal Defense Mechanisms of *Olea europaea L.* and *Citrus sp.*, Agricultural and Food Chemistry, 4: 331-331.
- _____, BAIDEZ A.G., BOTIA, J.M. and ORTUNO, A., 2003. Enhancement of Phenolic Compounds in Olive Plants (*Olea europaea L.*) and Their Influence on Resistance Against *Phytophthora sp.*, Food Chemistry, 83: 75-78.
- _____, GOMEZ, P., BAIDEZ, A.G., ARCAS, M.C., BOTIA, J.M. and ORTUNO, A., 2004. Changes in the Levels of Polymethoxyflavones and Flavanones as Part of the Defense Mechanism of *Citrus sinensis* (Cv. Valencia Late) Fruits against *Phytophthora citrophthora*, J. Agric. Food Chem., 52 (7), pp 1913–1917
- DIXON, R.A. 1986. The Phytoalexin Response: Elicitation, Signaling and Control of Host Gene Expression. Biological Review 61:239–291.
- DİNÇ, N., TURAN, K. ve SALİH, H., 1982. Akdeniz bölgesi limonlarında görülen Uçkurutan hastalığı [*Deuterophoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik.] nin savaş yöntemleri üzerine araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 21, 89-99.
- FAO, 2008. FAO web page.(<http://www.fao.org>).
- FOURIE, A., 2004. Biochemical Mechanisms for Tolerance of Citrus Rootstocks Against *Phytophthora nicotianae*, Submitted to the Faculty of Natural and Agricultural Sciences, Department of Microbiology and Plant Pathology, University of Pretoria.
- FELDMAN, A.W. and HANKS, R.W., 2001. Phenolic Content in the Roots and Leaves of Tolerant and Susceptible Citrus Cultivars Attacked by *Radopholus similis* Phytochemistry 7:5–12.
- FUSTER, M.D., 1997. *Citrus* Flavonoids. Distribution, modulation by phyto regulators and their possible physiological function. PhD. University of Murcia. Spain.

- GIMENES VERDU, I. and LUISI, N., 1978. Tolleranza al Benomyl del *Phoma tracheiphila*. Atti Giornate Fitopatologiche, 1,157-164.
- GRANATA, G., PERROTTA, G., TIRRO, A. and GRASSO, S., 1977. Comportamento di selezioni clonali di limone nei confronti di infezioni naturali di *Phoma tracheiphila*, Tecnica Agricola, 29, 337-334.
- GRASSO, S. and PERROTTA, G., 1978. Production of pycnidia in trees of the Rutaceae family affect by *Phoma tracheiphila*. Riv. Plat. Veg., 14, 41-45.
- HAARS, A., CHET, I. and HUTTERMANN, A., 2007. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus* European Journal of Forest Pathology 11 (1-2) : 67 - 76
- HARBORNE, J.B., 1964. Biochemistry of phenolic compounds, Academic Press, New York, 618.
- _____, 2000. Advances in Flavonoid Research Since 1992. Phytochemistry 55: 481-504.
- HIRATA, A., MURAKAMI, Y., SHOJI, M., KADOMA, Y. and FUJISAWA, S., 2005. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. Anticancer Res. 25 (5): 3367–74.
- HOROWITZ, R.M. and GENTILI, B., 1960. Flavonoids of the Ponderosa Lemon. Nature 185:319–320.
- _____ and GENTILI, B., 1977. Flavonoid Constituents of *Citrus*. In S. Nagy, P.E. Shaw, and M.K. Veldhuis, eds., Citrus Science and Technology, vol. 1, s:397–426. Avi Publishers, Westport, CT.
- KAMIYA, S., ESAKI, S. and KONISHI, F., 1979. Flavonoids in Citrus Hybrids. Agricultural and Biological Chemistry 43:1529–1536.
- LAKS, P.E., and PRUNER, M.S, 1989. Flavonoid Biocides: Structure/Activity Relations of Flavonoid Phytoalexin Analogues. Phytochemistry 28:87–91.
- LUISI, N., DE COCCO, V., CUTULI, G. and SALERNO, M., 1979. Analisi Della Patogenicita di *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik. sula Alcune Specie Cultivar di Agrumi. Phytopathologia Mediterranea. 28:162-165.

- MISIRLI, A., KÜDEN, A., DEMİR, G. and GÜLCAN, R., 2001. Determination of Phenolic Compounds in Some Almond Hybrids Varying in Resistance to *Pseudomonas amygdali*.
- MIZRAHI, S. and BAERK, Z., 1970. Physico-chemical characteristic of orange juice cloud. *J. Agric. Food Chem.*, 21: 250-253.
- NACHMIAS, A., BARASH, I., SOLEL, Z. and STROBEL, G.A., 1980. Effect of Mal secco Toxin on Lemon Leaf Cells. *Phytoparasitica*. 51-60
- NAKATANI, N., YAMADA, Y. and FUWA, H., 1987. 7-Geranyloxycoumarin From Juice Oil of Hassaku (*Citrus hassaku*) and Antimicrobial Effects of Related Coumarins. *Agricultural and Biological Chemistry* 51:419–423.
- NISHIURA, M., KAMIYA, S., ESAKI, S. and ITO, F., 1971. Flavonoids in Citrus and Related Genera. Part II. Isolation and Identification of Isonaringin and Neoriorcitrin from Citrus. *Agricultural and Biological Chemistry* 35:1683–1690.
- ORTUN˜O, A., BOTIA, J.M., FUSTER, M.D., PORRAS, I., GARCIA-LIDON, A. and DEL RI˜O, J.A., 1997. Effect of Scoparone (6,7-Dimethoxycoumarin) Biosynthesis on the Resistance of Tangelo Nova, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* Fruits against *Phytophthora parasitica*, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (7), pp 2740–2743
- _____, ARCAS, M.C., BOTIA, J.M., FUSTER, M.D. and DEL RIO, J.A., 2002. Increasing Resistance against *Phytophthora citrophthora* in Tangelo Nova Fruits by Modulating Polymethoxyflavones Levels. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (10), pp 2836–2839.
- _____, BAIDEZ, A., COMEZ, P., ARCAS, M. C., PORRAS, I., GARCIA-LIDON, A. and DEL RI˜O, J.A., 2005. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* Flavonoids: Their Influence in the Defence Mechanism Against *Penicillium digitatum*, *Food Chemistry* 98:351-358
- PACETTO, M. and DAVINO, M., 1976. Pectinmethylesterase and Cellulolytic Activity in citrus plants infected by *Phoma tracheiphila*. *Riv. Patol. Veg.* IV: 137-144

- PARK, G.L., AVERY, S.M., BYERS, J.L. and NELSON, D.B., 1983. Identification of Bioflavonoids from Citrus. *Food Technology* 37:98–105.
- PERROTTA, G., TIRRO, A. and GRANATA, G., 1974. Prove di lotta control il Mal secco delgi agrumi con fungicidi sistemici. 1. Assorbimento e persistenza dei fungicidi applicati per irrorazione alla chioma. *Tecnica Agricola*, 26, 1001-1013.
- _____ and GRANITI, A., 1988. *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanchaveli & Gikashvili. In: Smith IM, Dunez J, Lelliott RA, Phillips DH, Archer SA, eds. *European Handbook of Plant Diseases*.
- PETKOVSEK, M.M., USENIK, V. and STAMPAR, F., 2003. The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Verturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh), *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.* 81-2, 233-242.
- PIONNAT, J.C., 1982. Le Mal secco [*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik.]. Perspectives sur la lutte chimique et les variétés résistantes. *Fruit*, 37 (4), 237-248.
- ROY, A. and SARAF, S., 2006. Limonoids: Overview of Significant Biactive Triterpenes Distributed in Plant Kingdom. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29 (2): 191-201.
- SALERNO, M. and SOMMA, V., 1971. Osservazioni sulla sistemicita del benomyl in semenzali di arancio amaro e risultati di lotta control il Mal secco delgi agrumi: *Phytopathologia Mediterranea*, 10, 99-106.
- _____ and CUTULI, G., 1977. Control of Citrus Mal Secco in Italy Today. *Proc. Int. Soc. Citriculture-1977* 3.1001-1003
- _____ and PERROTTA, G., 1978. Lo stato della lotta chimica control il Mal seccodegli agrumi. *Tecnica Agricola*, 30, 307-316.
- SCORA, R.W., 1975. Volatile Oil Compound in *Citrus* Taxonomy. *International Flavoring and Food Additives* 6:342-346.
- SNYDER, B.A. and NICHOLSON, R.L., 1990. Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science* 248:1637–1639.

- SOLEL, Z., PINKAS Y. and SHABI, E., 1976. Internal Therapy of Mal Secco of Lemon by Pressure Infection of Fungicides. *Neth. J. Plant Path.* 83 (1): 383-391.
- _____ and SPIEGEL-ROY, P., 1978. Methodology of selection of lemon clones for tolerance to Mal secco. *Phytoparasitica*, 6, 129-134.
- _____, 1979. Epidemiology of Mal Secco Disease of Lemons. *Phytopath. Z.*, 85:90-92.
- SOMMA, V. and LAVIOLA, C., 1982. Un quadriennic di prove di campo sull'efficacia del Benomyl e del metiltiofanate control il Mal secco degli agrumi. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 197-204.
- _____ and SAMMARCO, G., 1971. Inefficacia di due antibiotici control il Mal secco degli agrumi e primi risultati sull'attivita di due nuovi fungicidi sistemici. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1: 241-245.
- SPINA, P. and CUTULI, G., 1983. Orientations des recherches réalisées en Italie su ele Mal secco des agrumes. *Fruits*, 37 (4), 237-248.
- TIMMER, L.W., GARNSEY, S.M. and GRAHAM J.H., 2000. *Compendium of Citrus*, Second Edition, The American Phytopathological Society.
- TOMAS, F., CARPENA ARTES, O., PASTOR, R. and MATAIX BENEYETO, J.J., 1978. Flavonoids in flowers of *Citrus limon* cv. Eureka. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1:74–76.
- TUZCU, Ö., ÇINAR, A., KAPLANKIRAN, M., ERKILIÇ, A. and YEŞİLOĞLU, T., 1989. Resistance of some Citrus species and hybrids to Mal secco (*Phoma tracheiphila* KANC. et GHIK.) disease. *Fruits*, vol. 44, n:3.
- USENIK, V., STAMPAR, F., SOLAR, A. and MIKULIC-PETKOVSEK, M., 2004. Flavonol of Leaves in Relation to Apple Scab Resistance, Chair for Fruit Growing, Department of Agronomy, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana
- VANDERCOOK, C.E. and TISSERAT, B., 1989. Flavonoid Changes in Developing Lemons Grown *In Vivo* and *In Vitro*. *Phytochemistry* 28:799–803.
- _____, TISSERAT, B. and BERHOW, M.A., 1990. Influence of External Factors on Quality and Composition of Citrus. *Food Technology* 44:142–148.

- ZAAT, S.A.J., VAN. BRUSSEL, A.A.N and TAK T., 1987. Flavonoids Induce *Rhizobium leguminosarum* to Produce NodDABC Gene-Related Factors that Cause Thick, Short Roots and Root Hair Responses on Common Vetch. *Journal of Bacteriology* 169:3388–3391
- WANG, S.F., RIDSDILL-SMITH, T.J and GHISALBERTI, E.L., 1998. Role of Isoflavonoids in Resistance of Subterranean Clover Trifoliate to the Redlegged Earty Mite *Halotydeus destructor*. *J Chem Ecol* 24: 2089-2100.

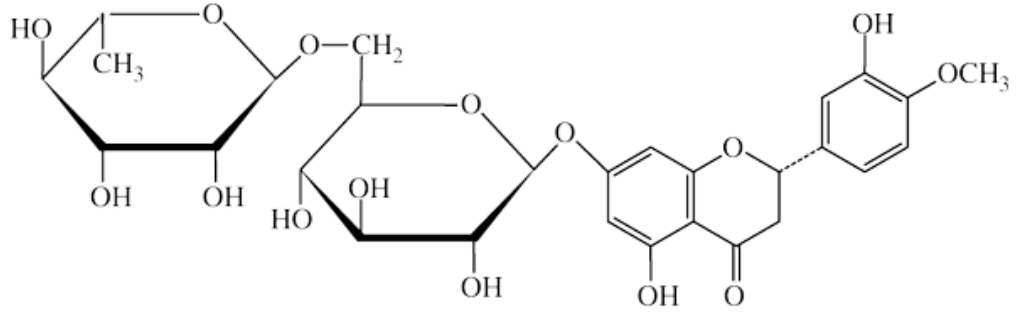
ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti' nin Güzelyurt ilçesine bağlı Bostancı köyünde doğdu. İlkokul ve Ortaokul öğrenimimi KKTC'nin Güzelyurt ilçesinde, Lise öğrenimimi ise Lefkoşa da 20 Temmuz Fen Lisesi'nde tamamladı. 2006 yılında Lefke Avrupa Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bahçe Bitkileri Üretimi ve Pazarlaması Bölümünden Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimine başladı.

EKLER

EK 1

Hesperidin'in kimyasal yapısı



HESPERIDIN

EK 2

Limonin'in kimyasal yapısı

