



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TURUNÇGİLLERDE EKŞİ ÇÜRÜKLÜK HASTALIĞI ETMENİ
Geotrichum citri-aurantii' YE KARŞI ISOTHIOCYANATE
BİLEŞİKLERİNİN ANTİFUNGAL ETKİLERİ**

Merve KARA

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
HAZİRAN-2015



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TURUNÇGİLLERDE EKŞİ ÇÜRÜKLÜK HASTALIĞI ETMENİ
Geotrichum citri-aurantii' YE KARŞI ISOTHIOCYANATE
BİLEŞİKLERİNİN ANTİFUNGAL ETKİLERİ**

Merve KARA

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
HAZİRAN-2015**


T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


TURUNÇGİLLERDE EKŞİ ÇÜRÜKLÜK HASTALIĞI ETMENİ *Geotrichum citri-aurantii*' YE KARŞI ISOTHIOCYANATE BİLEŞİKLERİNİN ANTİFUNGAL ETKİLERİ

MERVE KARA
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Emine Mine SOYLU danışmanlığında hazırlanan bu tez 16/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Emine Mine SOYLU
Başkan


Prof. Dr. Şener KURT
Üye


Doç. Dr. Elif ÇANDIR
Üye

Kod No:839

Doç. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdür V.

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.
Proje No: 13381

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

16.06.2015

TEZ BİLDİRİMİ

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

Merve KARA

ÖZET

TURUNÇGİLLERDE EKŞİ ÇÜRÜKLÜK HASTALIĞI ETMENİ *Geotrichum citri-aurantii*' YE KARŞI ISOTHIOCYANATE BİLEŞİKLERİNİN ANTİFUNGAL ETKİLERİ

Bu çalışmada, turunçgillerde derim sonrası ekşi çürüklük hastalığı etmeni *Geotrichum citri-aurantii*'ye karşı isothiocyante (ITC) bileşiklerinin antifungal etkileri araştırılmıştır. Çalışma *in vitro* ve yarı *in vivo* şeklinde iki aşamalı olarak yürütülmüştür. *In vitro* çalışmalarında, *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimi ve arthrokonidi çimlenmesi üzerine farklı ITC bileşiklerinin (methyl, allyl, butyl, ethyl, benzyl ve 2-phenylethyl ITC) buhar fazında etkileri incelenmiştir. *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimini benzyl, methyl, allyl ve ethyl ITC sırasıyla 0,06, 0,08, 0,10 ve 0,10 µl/L konsantrasyonlarında %100 oranında engellemiştir. ITC bileşiklerinden methyl, allyl, ethyl ve benzyl ITC'nin misel gelişimini tamamen durduran konsantrasyonlarında fungistatik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. *G. citri-aurantii*'nin arthrokonidi çimlenmesini benzyl, methyl, allyl ve ethyl ITC sırasıyla 0,05, 0,07, 0,07 ve 0,07 µl/L konsantrasyonlarında %100 oranında engellemiştir. Fungus hiflerinde yapılan mikroskopik incelemelerde ITC bileşiklerinin tamamen engellemeyi sağlayan konsantrasyonlarında fungus miselleri üzerinde oldukça şiddetli morfolojik bozulmalara neden olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı hif kalınlığı yaklaşık 7,5-10 µm çapında iken, ITC uygulamasına maruz kalmış hiflerde hif kalınlığının ortalama 5-7 µm çapında olduğu belirlenmiştir. Yarı *in vivo* koşullarda *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün ortalama lezyon alanını ethyl, methyl ve allyl ITC bileşikleri sırasıyla 8,0, 12,0 ve 12,0 µl/L konsantrasyonlarında %100 oranında engellemiştir.

2015, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: Turunçgil, *Geotrichum citri-aurantii*, saf ITC bileşikleri, antifungal etki

ABSTRACT

ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF ISOTHIOCYANATE COMPOUNDS AGAINST *Geotrichum citri-aurantii*, THE CAUSAL AGENT OF CITRUS SOUR ROT

In this study, antifungal effects of isothiocyanate (ITC) compounds were investigated against postharvest citrus sour rot disease agent *Geotrichum citri-aurantii*. The study was conducted as two stages *in vitro* and semi-commercial conditions. *In vitro* studies, the vapor phases of different ITC compounds (methyl, allyl, butyl, ethyl, benzyl and 2-phenylethyl ITC) were examined their effects on arthroconidia germination and mycelial growth of *G. citri-aurantii*. Mycelial growth of *G. citri-aurantii* was inhibited in 100% level by benzyl, methyl, allyl and ethyl ITC at concentrations of 0,06, 0,08, 0,10 and 0,10 $\mu\text{L/L}$, respectively. ITC compounds, methyl, allyl, ethyl and benzyl ITC at the concentrations where complete mycelial growth was observed were determined to have fungistatic effect. Arthroconidia germination of *G. citri-aurantii* was inhibited in 100% level by benzyl, methyl, allyl and ethyl ITC at concentrations of 0,05, 0,07, 0,07 and 0,07 $\mu\text{L/L}$, respectively. Light microscopic observations revealed that the ITC compounds at the completely inhibiting concentrations caused considerable morphological degenerations on the fungal hyphae. While the thickness of healthy hyphae were approximately 7,5-10 μm diameter, the thickness of hyphae in hyphae exposed to ITC application were determined being average 5-7 μm diameter. In semi-commercial conditions, average lesion area of sour rot caused *G. citri-arantii* was inhibited in 100% level by ethyl, methyl and allyl ITC compounds at concentrations of 8,0, 12,0 and 12,0 $\mu\text{L/L}$, respectively.

2015, 54 pages

Keywords: Citrus, *Geotrichum citri-aurantii*, pure ITC compounds, antifungal activity

TEŐEKKÖR

Tez konumun belirlenmesinde, laboratuvar çalıŐmalarımnda ve yazım aŐamasında değerli bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen danıŐman hocam Prof. Dr. E. Mine SOYLU'ya, değerli hocalarım Prof. Dr. Şener KURT'a, Prof. Dr. Soner SOYLU'ya ve Doç. Dr. Elif ÇANDIR'a, tez çalıŐmalarım sırasında tÖm bÖlÖm imkânlarından yararlanmamı sağlayan MKÖ Ziraat FakÖltesi Bitki Koruma BÖlÖm BaŐkanlıęı'na, maddi destek veren MKÖ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teŐekkÖrlerimi sunarım.

Maddi ve manevi olarak yardımlarını esirgemeyen aileme, laboratuvar çalıŐmalarımnda yardımcı olan arkadaŐlarım Zir. YÖk. MÖh. Aysun UYSAL'a, Zir. MÖh. Meral GEDİK'e ve Zir. MÖh. Musa TÖRKMEN'e teŐekkÖrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	8
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1.Materyal.....	23
3.1.1.Meyve.....	23
3.1.2.Çalışmada Kullanılan Isothiocyanate (ITC) Bileşikleri.....	23
3.1.3.Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları.....	24
3.2.Yöntem.....	24
3.2.1. <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin İzolasyonu ve Patojenisitesi.....	24
3.2.2.Meyvelerin Denemeye Hazırlanması.....	26
3.2.1.1.Usare Oranı.....	26
3.2.1.2.Suda Çözünebilir Kuru Madde Miktarı.....	27
3.2.1.3.Titre Edilebilir Asitlik.....	27
3.2.1.4.Solunum Hızı.....	27
3.2.3. <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin Fungal Gelişimi Üzerine ITC Uygulamalarının <i>In Vitro</i> Etkilerinin Belirlenmesi.....	28
3.2.3.1. <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin Misel Gelişimi Üzerine ITC Uygulamalarının Etkilerinin Belirlenmesi.....	28
3.2.3.2. <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin Arthrokonidi Çimlenmesi Üzerine ITC Uygulamalarının Etkilerinin Belirlenmesi.....	29
3.2.3.3.ITC Bileşiklerinin <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin Hiflerinde Meydana Getirdiği Değişikliklerin Belirlenmesi.....	30
3.2.4.Yarı <i>In Vivo</i> Koşullarda <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'ye Karşı ITC Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesi.....	30
3.3.Deneme Deseni ve Veri Analizleri.....	31
4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33

4.1. <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin İzolasyonu ve Patojenisitesi.....	33
4.2.Meyvelerin Denemeye Hazırlanması.....	33
4.3. <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin Fungal Gelişimi Üzerine ITC Uygulamalarının <i>In Vitro</i> Etkilerinin Belirlenmesi.....	34
4.3.1. <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin Misel Gelişimi Üzerine ITC Uygulamalarının Etkileri.....	34
4.3.2. <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin Arthrokonidi Çimlenmesi Üzerine ITC Uygulamalarının Etkileri.....	39
4.3.3.ITC Bileşiklerinin <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin Hiflerinde Meydana Getirdiği Değişiklikler.....	42
4.4.Yarı <i>In Vivo</i> Koşullarda <i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'ye Karşı ITC Bileşiklerinin Etkileri.....	43
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Dünya turunçgil üretiminin tür düzeyinde dağılım oranları (%).....	1
Şekil 1.2.	Türkiye turunçgil üretiminin tür düzeyinde dağılım oranları (%).....	2
Şekil 1.3.	<i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin PDA besi ortamındaki koloni gelişimi (B), hif ve arthrokonidilerin mikroskopik görünümü (B)...	3
Şekil 1.4.	Ekşi çürüklük hastalığının limon (A) ve mandarin (B) meyvesindeki görünümü.....	4
Şekil 3.1.	Steril bir mantar delici yardımıyla mandarin meyvelerinin yaralanması (A) ve yaralı meyvelerin plastik kavanozlardaki görünümü (B).....	26
Şekil 3.2.	Titre edilebilir asitliğin potansiyometrik yöntem ile ölçülmesi (A) ve meyvelerin CO ₂ /O ₂ ölçüm cihazı ile CO ₂ miktarının belirlenmesi (B).....	28
Şekil 3.3.	Meyvelerin plastik kavanozlara yatay olarak yerleştirilerek inkübe edilmesi.....	31
Şekil 4.1.	<i>Geotrichum citri-aurantii</i> 'nin PDA besi yerinde fungal gelişimi (A), hifleri ve arthrosporlarının mikroskopik görünüşü (B).....	33
Şekil 4.2.	<i>G. citri-aurantii</i> hiflerinin sitoplazmalarında gözlenen renk değişimleri (A), koagülasyonlar ve şişme şeklinde gözlenen morfolojik değişiklikler (B).....	43
Şekil 4.3.	Farklı konsantrasyonlarda allyl ITC uygulanan mandarin meyvelerinde <i>G. citri-aurantii</i> 'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün lezyon alanı.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Denemede kullanılan isothiocyante bileşiklerin bazı karakteristik özellikleri ve ortaya çıktığı bitkiler.....	24
Çizelge 4.1.	Owari Satsuma mandarin meyvelerinde derimde incelenen parametreler.....	34
Çizelge 4.2.	Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC bileşiklerinin buhar fazında <i>G. citri-aurantii</i> 'nin misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği.....	35
Çizelge 4.3.	Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC'ların buhar fazında <i>G. citri-aurantii</i> misel gelişiminin engellenmesi (%) üzerine etkinliği.....	37
Çizelge 4.4.	Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC bileşiklerinin buhar fazında <i>G. citri-aurantii</i> 'nin arthrokonidi çimlenmesi üzerine etkinliği...	40
Çizelge 4.5.	Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC'ların buhar fazında <i>G. citri-aurantii</i> spor çimlenmesinin engellenmesi (%) üzerine etkinliği..	41
Çizelge 4.6.	Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC bileşiklerinin mandarin meyvesi üzerinde <i>G. citri-aurantii</i> 'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün ortalama lezyon alanı (mm) üzerine etkisi.....	44
Çizelge 4.7.	Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC bileşiklerinin mandarin meyvesi üzerinde <i>G. citri-aurantii</i> 'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün lezyon alanı oluşumunun engellenmesi (%) üzerine etkisi.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Celsius (derece)
µg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
G	: Gram
µl	: Mikrolitre
L	: Litre
m ³	: Metreküp
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
µmol	: Mikromol
dk	: Dakika
mm	: Milimetre
kg	: Kilogram

KISALTMALAR

TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
PDA	: Patates Dekstroz Agar (Katı Besi Ortamı)
SOPP	: Sodium o-phenylphenate
TBZ	: Thiabendazole
ITC	: Isothiocyanate
KS	: Potassium Sorbate (Potasyum Sorbat)
Wtvol	: Weight volume (Ağırlık hacmi)
LLS	: Likit Lime Sulphur (Sıvı Kireç Kükürt)
IMZ	: Imazalil
EC ₅₀	: Miselyal gelişmeyi veya spor çimlenmeyi %50 oranında azaltan etkili konsantrasyon
EC ₉₀	: Miselyal gelişmeyi veya spor çimlenmeyi %90 oranında azaltan etkili konsantrasyon
EC ₉₅	: Miselyal gelişmeyi veya spor çimlenmeyi %95 oranında azaltan etkili konsantrasyon
EC ₁₀₀	: Miselyal gelişmeyi veya spor çimlenmeyi %100 oranında azaltan etkili konsantrasyon
TS	: Tea Saponin (Çay Saponin)
PHMG	: Polyhexamethylene guanide
PHMB	: Polyhexamethylene biguanide
SPME	: Solid Phase Microextraction (Katı-Faz Mikroekstraksiyon)
AITC	: Allyl isothiocyanate
IM	: Indian Mustard (Hint Hardalı)
2-PE ITC	: 2-phenylethyl isothiocyanate
MCIT	: Reaktif Dereceli Isothiocyanate
LDPE	: Low Density Polyethylene Bag (Düşük Yoğunluklu Polietilen Poşet)

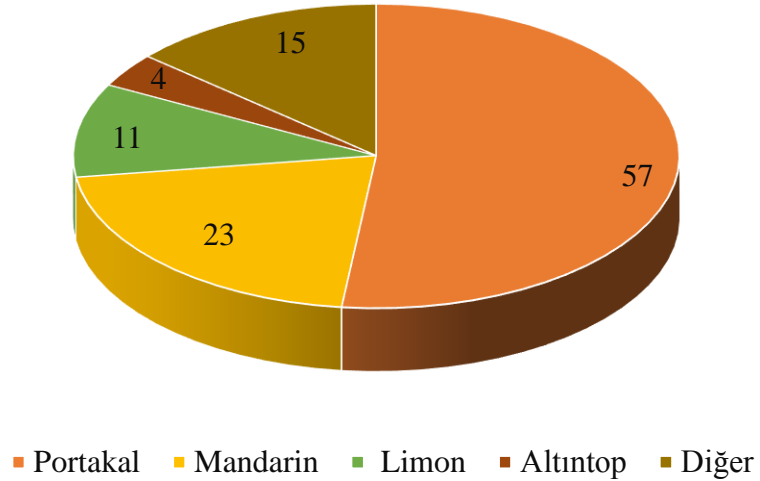
BITC	: Benzyl isothiocyanate
DMI	: Demethylation Inhibitor (Demetilasyon İnhibe Edici)
SA	: Su Agarı
NaOCL	: Sodium Hypochlorite (Sodyum Hipoklorit)
IC	: Inhibiting Concentration (Engelleyici Konsantrasyon)
IC ₅₀	: Miselyal gelişmeyi veya sklerot çimlenmeyi %50 oranında engelleyen konsantrasyon
IC ₉₀	: Miselyal gelişmeyi veya sklerot çimlenmeyi %90 oranında engelleyen konsantrasyon
EITC	: Ethyl isothiocyanate
MITC	: Methyl isothiocyanate
SÇKM	: Suda Çözünebilir Kuru Madde Miktarı
TA	: Titre Edilebilir Asitlik
4-MTBITC	: 4-methylthiobutyl-ITC

1. GİRİŞ

Turunçgiller; portakal, limon, mandarin, altıntop, bergamot ve turunç gibi ekonomik değeri yüksek olan *Citrus* türlerini içine alan bir bitki topluluğudur. Bu bitkilerin meyvelerinin taze olarak tüketiminin yanında; meyve suyu, konsantre, reçel ve marmelat olarak işlenebildiği gibi meyve kabuklarından, yapraklarından veya çiçeklerinden parfümeride koku vermekte kullanılan uçucu yağlar da elde edilmektedir (Anonim, 2006).

Turunçgiller Arap yarımadasının doğusundan, Filipinler'in doğusuna ve Himalayalar ile Hindistan'dan, Avustralya'ya kadar uzanan geniş bir coğrafyada yetiştiriliyor olmasına rağmen, asıl anavatanı Güneydoğu Asya'dır. Bu bölgede Çin kıyıları, Güneydoğu Çin (Tayland, Vietnam, Kamboçya, Malezya) ile Çin'in güney kıyıları ve Sarı Irmak vadisi içleri yer almaktadır (Anonim, 2012).

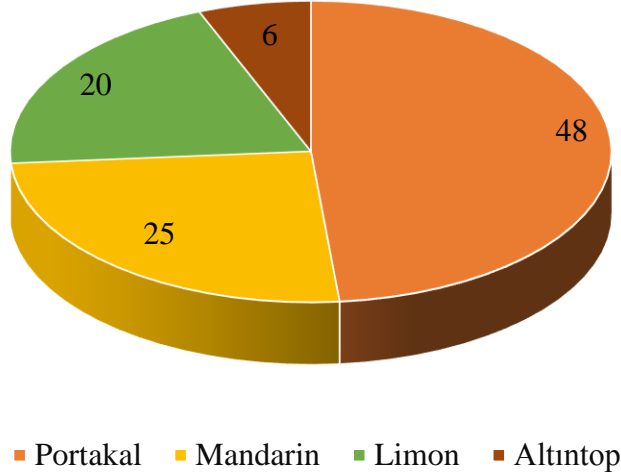
Turunçgiller yaklaşık 100 milyon ton ile dünyada en fazla üretilen meyve grubudur (Anonim, 2010). Dünya üretiminin %57'si portakal, %23'ü mandarin, %11'i limon, %4'ü altıntop ve kalan kısım diğer turunçgillerdir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Dünya turunçgil üretiminin tür düzeyinde dağılım oranları (%).

Ülkemiz yaklaşık 3 milyon ton üretim ile Akdeniz ülkeleri içerisinde önemli bir üretici konumundadır. Bu üretim aynı zamanda dünya turunçgil üretiminin %2,7'sini oluşturmaktadır. Turunçgil üretimimizin %48'i portakal, %25'i mandarin, %20'si limon

ve %6'sı altıntoptur (Şekil 1.2). Ülkemiz turunçgil ihracatı yaklaşık 1 milyon ton olup, bu miktarın %30'u limon, %30'u mandarin, %23'ü portakal ve %16'sı altıntoptur (Anonim, 2013).



Şekil 1.2. Türkiye turunçgil üretiminin tür düzeyinde dağılım oranları (%).

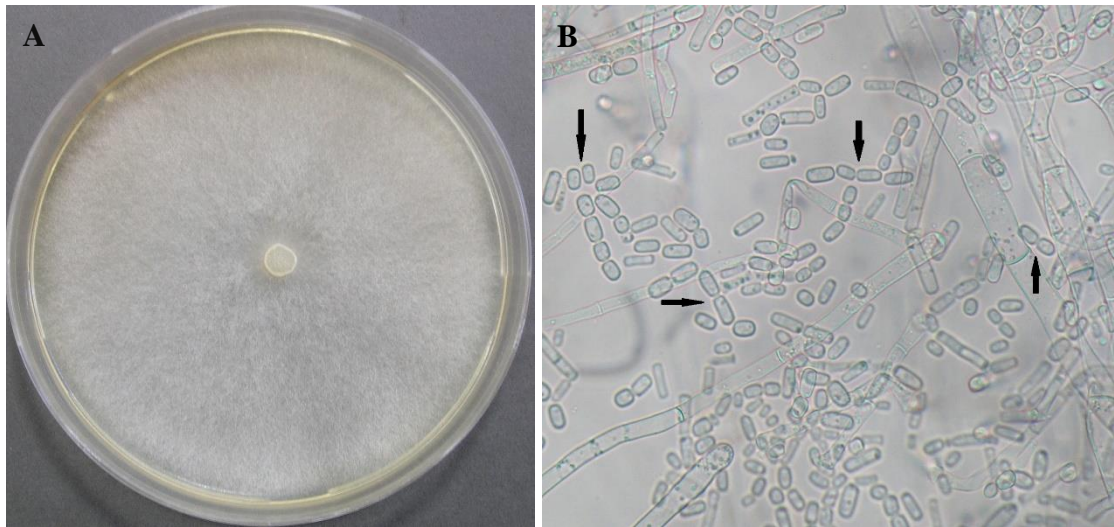
Turunçgiller ülkemizde en fazla Akdeniz, Ege ve kısmen de Doğu Karadeniz bölgelerinde yetiştirilmektedir. Türkiye'deki toplam üretimin %70'i Akdeniz bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Altıntop ve limonun %90'ı, portakal ve mandarinin %60'ı bu bölgede yetiştirilmektedir. Mersin limon üretiminde ilk sırada iken Adana ve Hatay'da en fazla portakal üretimi yapılmaktadır. Adana, altıntop ve mandarin üretiminde birinci sıradadır. Antalya, Türkiye turunçgil üretimindeki %20'lik payı ile ikinci büyük üretim bölgesidir. Antalya'da en çok portakal üretilmekte olup, ülkemiz portakal üretimindeki payı %30'dur. Ege bölgesinde İzmir üretimde öne çıkmakta olup, toplam üretimin %5'ini karşılamaktadır (Anonim, 2006).

Ekolojik koşulların uygunluğu ülkemizde birçok meyve ve sebze tür ve çeşidinin ticari olarak yetiştirebilmesine olanak sağlamasına rağmen derim, taşıma, muhafaza ve pazarlama sırasında yapılan bir takım hatalar ve bilgi eksiklikleri nedeniyle üretimimiz önemli kayıplara uğramaktadır. Meyve ve sebzelerde meydana gelen kayıpların evreler itibariyle incelenmesinde, derim sırasında %4-12, taşıma sırasında %2-8, pazara hazırlık evresinde %5-15, depolamada %3-10, tüketici evresinde %1-5 olmak üzere toplam %15-50 olduğu bildirilmiştir. Gelişmiş ülkelerde derim sonrası ürün kayıp oranı %5-25

arasında meydana gelirken, gelişmekte olan ülkelerde bu oran %20-50 arasında değişmektedir (Özdemir ve ark., 2009).

Derim sonrası meyve ve sebzelerde en büyük kayıplar, fungal kaynaklı organizmalar tarafından oluşturulan çürüklüklerle ortaya çıkmaktadır. Bunlar, turunçgillerde önemli zararlar yapan, kaliteyi düşüren ve genellikle raf ömrünü kısaltan hastalık etmenleridir (Yıldız ve ark., 2002). Turunçgillerde derim sonrası bozulmaların ana nedeni olarak görülen çürümeler; yeşil küf *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., mavi küf *Penicillium italicum* (Wehmer) ve ekşi çürüklük *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) E.E. Butler (Telemorf evresi *Galactomyces citri-aurantii* E.E. Butler) fungusları tarafından oluşturulmaktadır.

Ekşi çürüklük hastalığı turunçgil bahçelerinde yaygın bir şekilde bulunan toprak kökenli bir patojen olan *Geotrichum citri-aurantii* tarafından meydana gelmektedir. Ascomycotina takımının Saccharomycetes sınıfına ait olan etmenin arthrokonidileri meyve yüzeylerine rüzgar veya yağmur sıçratmasıyla bulaşarak enfeksiyon oluşturmaktadır (Şekil 1.3). Ayrıca fungus en fazla enfeksiyonu yere yakın bulunan ve yaralı meyvelerde meydana getirmektedir. Yere dökülen meyveler toprakla temas etmesinden dolayı şiddetli enfeksiyon için uygundur. Aynı zamanda bir sonraki yıl için önemli bir inokulum kaynağı oluşturmaktadır. Patojen meyveye böcekler ya da mekanik yollarla açılan yaralardan giriş yapabilmektedir (Brown, 2011).

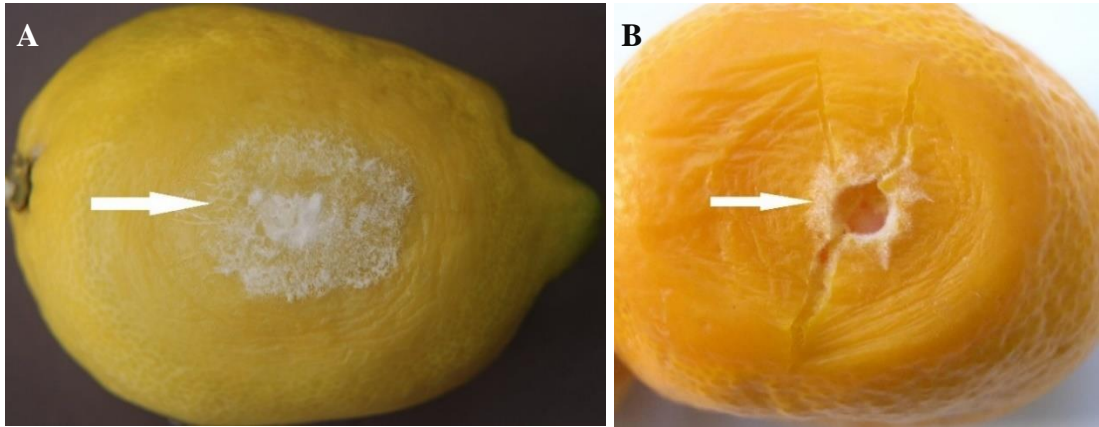


Şekil 1.3. *Geotrichum citri-aurantii*'nin PDA besi ortamındaki koloni gelişimi (A), hif ve arthrokonidilerin mikroskopik görünümü (B).

Meyveler olgunlaştıkça ekşi çürüklüğe karşı daha hassas olurlar. Meyve kabuğunun yüksek miktarda nem içermesi ve sulamadan veya yağışlardan sonra sabahın erken saatlerinde meyve deriminin yapılması hastalığın oluşumunda etkilidir. Hastalık tangerin, tangelo, tangor ve geç sezon altıntop meyvelerinde daha sık bir şekilde görülmektedir. Hastalık sıcak, sisli sonbahar ve kış günlerinde hızlı bir şekilde gelişir (Brown, 2011).

Hastalık etmeniyle bulaşık bahçe toprağı, meyve paletleri, yıkama fırçaları ve paketlenme hattındaki diğer ekipmanlar patojenin sağlıklı meyvelere bulaşmasında etkilidir. Çürümüş ve yumuşak dokularda bulunan miselyum ve arthrokonidiler hastalığın enfekteli meyveden sağlıklı meyvelere bulaşmasını sağlar. Ekşi çürüklüğün en karakteristik özelliğı olan ekşi koku meyve sineklerini çekerek fungusun diğer sağlıklı meyvelere yayılmasına neden olur (Brown, 2011).

Ekşi çürüklüğün ilk belirtileri yeşil ve mavi küf çürüklüklerine benzerdir. Lezyon ilk başta suya batırılmış, açık-koyu sarı ve hafif bir şekilde kabarmış görünümündedir (Şekil 1.4). Kütikula, epidermisten *Penicillium* türleri tarafından oluşturulan lezyonlara göre daha kolay bir şekilde ayrılır. Yüksek nispi nemlerde lezyon bu maya ile kaplanabilir. Fungus meyvenin renginin açılmasına ve sümüksü, sulu bir kitle halinde parçalanmasına neden olur. Ekşi çürüklük sıklıkla yeşil küf ile ilişkilidir ve yeşil küfün varlığı hastalığın gelişimini teşvik eder (Brown, 2011).



Şekil 1.4. Ekşi çürüklük hastalığının limon (A) ve mandarin (B) meyvesindeki görünümü.

Ekşi çürüklük, yaralanmaları en aza indirmek için meyvelerin dikkatli bir şekilde derimlerinin sağlanması ve meyvenin toprakla temasının önlenmesiyle azaltılabilir.

Derimin geciktirilmesi yaralanmayı arttıran kabuk neminin ve meyve şişkinliğinin azalmasına yardımcı olur. Fakat meyvenin aşırı olgun bir aşamaya ulaşmadan deriminin yapılması da önemlidir. Çürümüş meyvenin yıkama fırçalarına ve paketlenme hattındaki diğer ekipmanlara bulaşmasını engellemek için paketlenme evlerine gelen meyvelerin hemen sınıflandırılma işleminin yapılması gerekmektedir. Yıkama fırçaları da dahil olmak üzere paketlenme evleri ve paketlenme hattındaki tüm ekipmanlar, inokulum kaynağını ortadan kaldırmak için günlük olarak dezenfekte edilmelidir. İnokulum birikimini önlemek için yıkama tanklarındaki ve duşlama ünitesindeki sulu solüsyonlar sürekli olarak klorin gibi bir dezenfektan ile muamele edilmelidir. 10°C ve altındaki depolama sıcaklığı ekşi çürüklüğün gelişimini önemli bir şekilde geciktirir. Ancak meyvenin perakende satışı için daha yüksek bir sıcaklığa maruz bırakılması durumunda fungus hızlı bir şekilde gelişmeye devam eder (Brown, 2011).

Günümüzde derim sonrası turunçgil meyvelerinde görülen *Penicillium* çürüklüklerine karşı ruhsatlı olarak kullanılan fungusitlerin ekşi çürüklük hastalığının kontrolünde etkili ve ruhsatlı olmadığı bilinmektedir. Aynı zamanda yeşil ve mavi küf çürüklüklerinin mücadelesinde kullanılan imazalil (IMZ), thiabendazole (TBZ), pyrimethanil veya fludioxonil gibi fungusitlerle etkili bir şekilde kontrol edilememektedir (Eckert, 1978). Ekşi çürüklüğü kontrol altına alabilen tek ticari fungusit olan sodium o-phenylphenate (SOPP), meyvedeki yüksek oleosellozis oluşumu ve kabukta siyahlaşma gibi olumsuz etkilerinden dolayı kullanımını sınırlı düzeydedir (Ladaniya, 2008).

Ekşi çürüklüğe karşı guanidine grubundan olan guazatine kimyasal ruhsatlı olup halen kullanılmaktadır. Buna karşılık, ABD gibi bazı ülkelerde bu fungusit, çok fazla etken madde içerdiği ve uygulama sonrası meyve üzerindeki ilaç kalıntısını analiz edebilmek için yöntem bulunmadığından dolayı uygulamadan kaldırılma aşamasına gelmiştir (McKay ve ark., 2012).

Meyvelerde derim sonrası görülen kayıpları en aza indirmek için uzun süreden beri değişik fungusitler yaygın biçimde kullanılmaktadır. Ancak, bunların insan ve çevre sağlığı üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler ve hastalık etmenlerinin, bazı fungusitler karşısında dayanıklılık kazanmaları nedeni ile kimyasal savaşıma alternatif olabilecek savaşım yöntemleri üzerinde daha yoğun bir biçimde çalışmalara başlanmıştır (Yıldız ve ark., 2002).

Derim sonrası turunçgil ekşi çürüklüğü ile savaşımında sorbik asit ve potasyum sorbat uygulaması (Kitagawa ve Kawada, 1984), uçucu yağ üreten *Muscodor albus* ile biyofumigasyon (Mercier ve Smilanick, 2005), sıcaklık ve fungusitlerle kombinasyon halinde potasyum sorbat uygulaması (Smilanick ve ark., 2008), bitki ekstraktları (Liu ve ark., 2009; Hao ve ark., 2010; Talibi ve ark., 2012) ve biyolojik savaş (Liu ve ark., 2010; Feng ve ark., 2011) uygulamalarıyla hastalık gelişiminin azaltılabildiği ortaya konulmuştur.

Cruciferae familyasında yer alan lahana, brokoli, karnabahar ve turp gibi sebzeler glukozinolatlar (β -tiyoglukozid N-hidroksisülfatlar) adı verilen ve bir β -D-tiyoglukoz grubu, bir sülfonlanmış oksim grubu ve metiyonin, triptofan, fenilalanin veya dallanmış zincirli amino asitlerden türemiş değişken yan zincirleri kapsayan genel bir yapıya sahip bir grup bileşeni içermektedir. Glukozinolat içeren bitkiler parçalandığında mayrosinaz (β -tiyoglukozidgluko-hidrolaz, EC 3.2.3.1) enzimi aktif hale geçmekte ve β -glukozid bağının hidrolizini katalize etmektedir. Glukozinolatlar, bağımsız mayrosin hücrelerinden salgılanan mayrosinaz enzimi veya enterik bakteri veya funguslar tarafından hidrolize edilmekte ve bunun sonucunda glukoz, sülfat ve bir kararsız aglukon ara ürünü oluşmaktadır. Isothiyocyanate (ITC) bileşikleri veya nitriller oluşan kararsız aglukonların temel ürünleridir. ITC bileşikleri, kendilerini oluşturan glukozinolatların aksine lipofilik ve yüksek derecede reaktif, uçucu, kötü kokulu, keskin veya acıdır. Bazıları antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal, allelopatik etkili olup, bazıları ise guatr yapan parçalanma ürünleri oluşturmaktadır (Anonim, 2015). ITC bileşiklerinin; tahıl kök çürüklüğü patojenlerinden *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana* ve *Pythium irregulare* (Sarwar ve ark., 1998), toprak kökenli fungal patojenlerden *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotium cepivorum*, ve *Sclerotinia sclerotiorum* (Smolinska ve Horbowicz, 1999; Kurt ve ark., 2011), depo patojenlerinden *Penicillium expansum* (Mari ve ark., 2002), meyve ve çürüklük etmenlerinden *Alternaria alternata* ve *Monilinia laxa* (Troncoso ve ark., 2005; Troncoso-Rojas ve ark., 2005; Mari ve ark., 2008) ve çeşitli funguslar, oomycetesler ve bakterilerin (Smith ve Kirkegaard, 2002) hastalık gelişimini azaltılabildiği ortaya konmuştur.

Bu çalışmada, turunçgil ekşi çürüklük etmeni *G. citri-aurantii*'nin *in vitro* koşullarda misel gelişimi ve konidi çimlenmesi üzerine saf ITC bileşiklerinin antifungal

zellikleri ve yarı *in vivo* koşullarda mandarin meyvelerinde ekşi rklk oluşumuna etkileri araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

***Geotrichum citri-aurantii*'nin Mücadelesi ile İlgili Çalışmalar**

Kitagawa ve Kawada (1984), turunçgil meyvelerinde görülen ekşi çürüklük hastalığına karşı sorbik asit ve potasyum sorbatın (KS) etkisini araştırmışlardır. *In vitro* koşullarda, ortamın pH'sı ayarlanmadığında sorbik asit, ekşi çürüklüğün mücadelesinde SOPP kadar etki göstermiş, fakat KS'tan daha az etkili olmuştur. Ortamın pH'sı ayarlandığında ise sorbik asit ve KS'in etkisinin aynı olduğu gözlenmiş ve her ikisi de pH 5'in altındayken SOPP'ten daha etkili olmuştur. KS'in patojen inokule edilen limonlarda %2 oranında etkili olduğu saptanmıştır.

Brown (1988), derim sonrası çürümelerin kontrolü için guazatine ve iminoctadine'in etkisini araştırmıştır. İminoctadine'in, *Diplodia natalensis* ve *Phomopsis citri*'nin neden olduğu sap ucu çürüklüğünün, *Penicillium digitatum*'un neden olduğu yeşil küfün ve *Geotrichum citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün kontrolünü değerlendirmek amacıyla yapılan çok sayıdaki denemede etkinin guazatine'e benzer ya da önemli ölçüde daha iyi olduğu belirtilmiştir. İminoctadine, guazatine'in aksine depolama boyunca *P. digitatum*'un sporulasyonunu ve *G. citri-aurantii*'nin yayılmasını kontrol etmiştir. Tüm turunçgil çürüklük patojenlerinin *in vitro* koşullarda test edildiğinde guazatine'e iminoktadin'den daha hassas olduğu gözlenmiştir. Diğer fungusitlerle karşılaştırıldığında ise, bu iki fungusitin sap ucu çürüklüğünün kontrolü için benomyl'den daha az etkili olduğu fakat ekşi çürüklüğün kontrolü için etaconazole ve yeşil küfün kontrolü için IMZ ve TBZ ile kıyaslanabilir seviyede olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, iminoktadin'in *P. digitatum*'un neden olduğu bozulmayı kontrol etmek için IMZ ile kıyaslanabilir olduğu bildirilmiştir.

Smilanick ve Sorenson (2001), turunçgil meyvelerinde derim sonrası çürümenin kontrolü için kalsiyum polisülfidin etkisini araştırmışlardır. *P. digitatum*'un neden olduğu turunçgil yeşil küfünün ortaya çıkması, %0,75 (wt/vol) kalsiyum polisülfid içeren sıcak sıvı kireç-kükürt (LLS) solüsyonuna 1-4 dakika boyunca limonları ve portakalları daldırmayla %80 ya da daha yüksek bir oranda azalmıştır. *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün ortaya çıkması, bu uygulama ile %35-70 oranında azalmıştır. LLS uygulamasının etkisinin derim sonrası çürümeyi kontrol etmek için kullanılan diğer uygulamalardakine benzer olduğu gözlenmiştir. LLS'ün etkisinin portakallardan ziyade

limonlarda daha yüksek olduğu, yeşil limonlarda sarı limonlarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu belirtilmiştir. LLS uygulaması sporulasyonu durdurmamış fakat fungusitler ile birlikte kullanıldığında daha yararlı olduğu ifade edilmiştir. Limonlarda ve Navel portakallarında, 10°C'de 7 hafta boyunca depolamanın ardından 40,6°C'de 3 dakika boyunca LLS uygulamasından sonra enfeksiyon gelişimi gözlenmemiştir.

Mercier ve Smilanick (2005), depolanan limonlarda görülen yeşil küf ve ekşi çürüklüğün kontrolü için uçucu yağ üreten *Muscodor albus* ile biyofumigasyon yöntemini araştırmışlardır. Derim sonrası *in vitro* koşullarda limonlar, gün boyunca *M. albus* uçucu bileşiklerine maruz bırakıldığında yeşil küf ve ekşi çürüklük hastalıkları kontrol edilebilmiştir. Yaralanan limonlara *P. digitatum* inokule edilmiş ve oda sıcaklığında çavdar taneleri bulunan 11 L'lik kapaklı plastik kutulara konulmuştur. *M. albus* ile meyve arasında herhangi bir temas olmamıştır. Uygulamadan sonra 24 saat içerisinde etki gözlenmiş olup 72 saat boyunca yeşil küf önemli ölçüde kontrol altına alınmıştır. Etkinin mevcut *M. albus* miktarı ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. 20°C'de 5 ppm etilen bulunan 11,7 m³'lük bir depo odası içerisinde yürütülen denemelerde, limonlarda yeşil küf oranı 48 saat *M. albus*'a maruz bırakıldıktan sonra ortalama %89,8'den %26,2'ye azaldığı gözlenmiştir. *M. albus* meyve renk gelişiminde herhangi bir etki göstermemiştir. İnokulasyondan hemen sonra küçük kutularda yapılan biyofumigasyon uygulaması ekşi çürüklüğü kontrol etmiş, fakat 24 saat sonra uygulama yapıldığında etki gözlenmemiştir. *P. digitatum*, uçucu bileşiklere *G. citri-aurantii*'den daha hassas olmuştur. *M. albus* ile biyofumigasyon uygulamasının depo odalarındaki ve nakliye paketlerindeki çürümeyi etkili şekilde kontrol edebileceği bildirilmiştir.

Smilanick ve ark. (2008), sıcaklık ve fungusitlerle kombinasyon halinde KS uygulaması ile derim sonrası turunçgillerde görülen yeşil küfün ve ekşi çürüklüğün mücadelesini araştırmışlardır. KS konsantrasyonu ve pH (4-9)'nın *P. digitatum* sporlarının çimlenmesi üzerine etkisi tek başına ve derim sonrası turunçgillerde kullanılan fungusitlerden IMZ, TBZ, pyrimethanil ve fludioxonil ile kombinasyon halinde belirlenmiştir. Spor çimlenmesini engellemede KS'in EC₉₅ konsantrasyonu pH 4-6'dan düşük olmuştur. İnokule edilen meyvelerde yeşil küf kontrol etmek için KS bu fungusitlerle uyumlu olup etkinliklerini arttırmıştır. KS tek başına ve fungusit-KS solüsyonları ısıtılmış halde daha iyi etki göstermiştir. KS ve sodyum bikarbonat kombinasyonu ise biraz daha iyi etki göstermiştir. *P. digitatum*'un IMZ ve TBZ'e

dayanıklı bir izolatatının neden olduğu yeşil küf, ısıtılmış bir IMZ ya da TBZ solüsyonuna KS eklendiğinde etkili şekilde kontrol edilmiştir. Sıcaklık, portakallarda tüm fungusitlerin kalıntılarını arttırmıştır. Ekşi çürüklük oranı, kontrol limonlarında %94,5'ten 25°C'de %1 (wt/vol)'lik KS'a 30 saniye daldırmayla %49,1'e ve sodyum bikarbonata daldırmayla %47,2'ye düştüğü bildirilmiştir. Aynı oranın, 50°C'de KS'a daldırmayla %37'ye ve sodyum bikarbonata daldırmayla %15,7'ye düştüğü bildirilmiştir.

Horuz ve Kınay (2009), Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde bulunan çeşitli paketleme evlerinden 32 adet *G. citri-aurantii* izolatu elde edilmiş ve fungusitlere karşı testlenmişlerdir. Derim sonrası kullanılan eski fungusitlerden IMZ, TBZ, prochloraz ve guazatine ile yeni nesil fungusitlerden pyrimethanil, azoxystrobin ve fludioxonil *in vitro* ve *in vivo* koşullarda farklı dozlarda etmene karşı denemeye alınmıştır. Ayrıca, *in vitro* koşullarda patojen izolatatların fungusitlere olan duyarlılıkları da testlenmiştir. İzolatların tümü yüksek dozlarına rağmen IMZ, TBZ ve prochloraz'a dayanıklı bulunmuştur. İzolatların %28'i duyarlı ve %72'si guazatine'e dayanıklı bulunmuştur. Hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda azoxystrobin etkisiz görülmüştür. *In vitro* koşullarda fludioxonil etkisiz bulunurken, *in vivo* koşullarda yüksek dozunda çok az bir etkililik gözlenmiştir. Patojen gelişimi ve çürüklük kontrolünde tek etkili fungusit olarak guazatine görülmüştür. Satsuma mandarinlerde gerçekleştirilen alternatif uygulamalarda, sodyum bikarbonat (%2) ve guazatine (900 µg/ml) kombinasyonunun hastalık gelişim kontrolünde en etkili uygulama olduğu bildirilmiştir.

Liu ve ark. (2009), kekik yağının *in vitro* koşullarda *G. citri-aurantii*'nin arthrokonidi çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğuna antifungal etkisini, fungus hifleri ve arthrokonidilerinin morfolojik yapısındaki etkilerini ve *in vivo* koşullarda hastalığı baskılamada biyokontrol potansiyelini araştırmışlardır. Kekik yağı *G. citri-aurantii* gelişimini etkili şekilde kontrol etmiş ve patates dekstroz broth'da arthrokonidilerin çimlenmesi ve çimlenme tüpü uzunluğunu büyük ölçüde engellemiştir. 600 µl/L konsantrasyonda arthrokonidilerin yaklaşık %94'ünün çimlenmesini engellediği halde çim tüpü $4,32 \pm 0,28$ µm kadar uzamıştır. Işık, SEM ve TEM elektron mikroskoplarıyla yapılan gözlemler; kekik yağının neden olduğu deforme olmuş hifler ve arthrokonidiler, plazma membranının bozulması ve mitokondriyal düzensizlik gibi ultrayapısal değişiklikleri ortaya çıkarmıştır. *G. citri-aurantii* inokule edilmiş Satsuma mandarinlerine uygulanan kekik yağı, ekşi çürüklüğü 26°C'de 5 günden sonra %78,1'den

%14'e düşürmüştür. Sağlıklı meyvelere uygulanan kekik yağı 20°C'de 30 günden sonra çürümeyi %76'dan %35'e azaltmıştır. Kekik yağı uygulaması, uygulamadan hemen sonra ve 20°C'de 30 gün depolamadan sonra incelendiğinde, Satsuma mandarinine herhangi bir zarar vermemiştir. Kekik yağının turunçgil meyvelerinde derim sonrası ekşi çürüklüğün kontrolünde alternatif bir yöntem olabileceği saptanmıştır. Bu gibi esansiyel yağların kullanımının sentetik fungusitlere önemli bir alternatif oluşturarak ticari üretimde kullanılabileceği bildirilmiştir.

Hao ve ark. (2010), derim sonrası turunçgillerde yeşil küf, mavi küf ve ekşi çürüklüğün kontrolünde IMZ ve prochloraz ile kombinasyon halinde çay saponin (TS) uygulamasının etkisini araştırmışlardır. Genel olarak güvenli kabul edilen bir bileşik olan TS; *Penicillium italicum*, *P. digitatum* ve *G. citri-aurantii*'nin miselyal gelişimini ve spor çimlenmesini engellemiştir. Sonuçlar, *P. italicum*, *P. digitatum* ve *G. citri-aurantii*'yi kontrol etmek için TS'in düşük oranlı bir prochloraz veya IMZ ile kombinasyonunda en iyi oranın 8:2 olduğunu göstermiştir. TS'in tek başına ve sentetik fungusitlerle kombinasyonunun Shatang mandarini meyvesine inokule edilen mavi küfü, yeşil küfü ya da ekşi çürüklüğü kontrol etmede etkinliklerini arttırmıştır. Kombinasyon halinde meyvede TS rezidülerinin kalıcılığını uzatmıştır. Sinerjistik kombinasyonlarla sağlanan hastalık kontrol durumu, denemeye alınan bu fungusitlerin tek başına uygulamalarından daha yüksek olmuştur. Prochloraz, *P. italicum* ve *P. digitatum*'un miselyal gelişimi ve spor çimlenmesine karşı en düşük EC₅₀ değerini gösterirken TS, *G. citri-aurantii* üzerinde sırasıyla 38,5 ve 89,5 µg/ml olan en düşük EC₅₀ değerleri ile en yüksek engelleyici etkiyi göstermiştir. TS'nin tek başına ve düşük oranlı bir prochloraz ya da imazalil ile kombinasyon halinde, diğer meyve kalite parametrelerini olumsuz yönde etkilemeden Shatang mandarini meyvesinde derim sonrası çürümeyi önemli şekilde azalttığı bildirilmiştir.

Liu ve ark. (2010), turunçgillerde *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu derim sonrası ekşi çürüklük üzerine iki antagonistik mayanın antifungal etkisini ve mekanizmalarını araştırmışlardır. *Cryptococcus laurentii* (10⁸-10⁹ hücre/ml) hücre süspansiyonu uygulaması, 26°C'de 5 gün inkübasyondan sonra ekşi çürüklüğün ortaya çıkmasını %55,6'dan %29,9-20,7'ye düşürmüştür. *C. laurentii*'nin hücresiz kültür filtratı uygulaması ekşi çürüklüğün azalmasında etkili olmuş, fakat etki hücre süspansiyonunkinden (1×10⁸ hücre/ml) daha düşük olmuştur. Ayrıca, *C. laurentii*

26°C’de *Rhodosporidium paludigenum*’dan daha hızlı şekilde gelişme göstermiştir. İki maya inokule edilen meyvelerde peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitesindeki değişimler saptanmıştır. *C. laurentii*’nin antifungal etkisi yer ve besin rekabetine, savunma tepkisine ve antibiyotik bileşiklerin durumuna bağlanmıştır. Bu gibi antagonistlerin kullanımının turunçgillerde derim sonrası ekşi çürüklüğün kontrolü için sentetik fungusitlere karşı önemli bir alternatif oluşturabileceği bildirilmiştir.

Feng ve ark. (2011), *in vitro* ve *in vivo* koşullarda turunçgillerde ekşi çürüklük patojeni *G. citri-aurantii*’ye karşı geniş spektrumlu antibakteriyel faktörlerden polyhexamethylene guanide (PHMG) ve polyhexamethylene biguanide (PHMB)’in antifungal etkisini araştırmışlardır. PHMG ve PHMB uygulamaları *in vitro* koşullarda *G. citri-aurantii*’nin arthrokonidi çimlenmesi ve miselyal gelişimini önemli ölçüde engellemiştir. PHMG 5 mg/L’de *G. citri-aurantii*’nin arthrokonidi çimlenmesini %97,8 oranında ve PHMB ise %95,8 oranında engellemiştir. Işık, SEM ve TEM mikroskoplarıyla yapılan gözlemler; PHMG veya PHMB uygulamalarının neden olduğu ultrayapısal değişimleri hiflerde bozukluk, deformasyon ve konkav çöküş de dahil olmak üzere hiflerde ve arthrokonidilerde plazma membranının bozulmasını ve arthrokonidilerde hücre duvarı hasarını daha iyi göstermiştir. PHMG ve PHMB kullanımı, enfekteli Shatang mandarini meyvesinde ekşi çürüklüğün gelişimini önemli ölçüde ($P<0.05$) azaltmıştır. PHMG ve PHMB’in, derim sonrası turunçgil ekşi çürüklüğünün kontrolü için alternatif bir yol olabileceği bildirilmiştir.

Hao ve ark. (2011), TS ile *Bacillus amyloliquefaciens*’in kombinasyon halinde uygulamasının turunçgillerde ekşi çürüklüğün, yeşil ve mavi küfün birleştirilmiş kontrolünü araştırmışlardır. Turunçgil meyve yüzeylerinden izole edilen *B. amyloliquefaciens* HF-01 irkinin *in vitro* koşullarda *P. digitatum*’a karşı antagonizmi gözlenmiştir. Bu ırk 16S rDNA sekanslarının filogenetik analizlerine dayanarak tanımlanmıştır. İzolat tek başına ve enfekteli Wuzishatangju mandarin meyvesinde TS ile kombinasyon halinde daha ileri düzeyde değerlendirilmiştir. Sonuçlar, izolatların ekşi çürüklüğün, yeşil ve mavi küfün ortaya çıkmasını azaltmada önemli ölçüde yüksek etki gösterdiğini ortaya çıkarmış, fungusit uygulaması kadar etkili olmadığını göstermiştir. *B. amyloliquefaciens* HF-01’in biyokontrol etkisi, bakteriyel bir biyofilm oluşumunu etkileyebilen ve yaralarda antagonist popülasyonu teşvik edebilen TS kombinasyonu ile önemli ölçüde iyileştirilmiştir. 50 µg/ml TS ile kombinasyon halindeki HF-01

uygulamasının ekşi çürüklüğün, yeşil ve mavi küfün %90'dan daha yüksek bir oranda kontrolünü sağlayan fungusit uygulaması kadar etkili olduğu saptanmıştır. *B. amyloliquefaciens* HF-01 tek başına ve düşük dozlu bir TS ile kombinasyon halinde diğer meyve kalite parametrelerinin olumsuz yönde etkilemeden derim sonrası çürümeyi önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir.

McKay ve ark. (2012), turunçgil meyvelerinde ekşi çürüklüğün ve yeşil küfün kontrolü için yeni bir derim sonrası fungusit olarak propiconazole'ün etkisini ve uygulama stratejilerini araştırmışlardır. *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu turunçgil ekşi çürüklüğünün kontrolü için derim sonrası bazı uygulamaların mevcut olduğu ve genellikle çok etkili olmadığı ifade edilmiştir. Demetilasyon-engelleyici (DMI) triazole grubu fungusitlerden propiconazole ve cyproconazole'ün derim sonrası turunçgil ekşi çürüklüğünü azaltmada, metconazole ve tebuconazole gibi diğer DMI'lerden daha etkili olduğu gözlenmiştir. Laboratuvar çalışmalarında, propiconazole uygulamaları inokulasyondan sonra 8-24 saat (limon) ve 18-42 saat (altıntop) geciktirildiğinde çürümenin ortaya çıkması azalmıştır. Fungisit etkili oranları 64-512 µg/ml olarak belirlenmiş ve ekşi çürüklük patojeninin inokulum konsantrasyonuna ve turunçgil meyvesi türüne bağlı olarak değişiklik gösterdiği ifade edilmiştir. Propiconazole'ün limonda çürümenin kontrolü için 100 µg/ml sodyum hipoklorit ile ve %1-3 oranında sodyum bikarbonat ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. 80 µg/ml hidrojen peroksit/peroksiasetik asit eklenmesi propiconazole'ün etkisini azaltmıştır. Isıtılmış (48°C) propiconazole solüsyonları, 22°C'deki solüsyonlarla karşılaştırıldığında etkinliği önemli ölçüde iyileştirmiştir. Paketleme evi çalışmalarında, ısıtılmış propiconazole tek başına duşlama ünitesinde ya da meyve kaplamalarında fungusit uygulamalarının ardından uygulandığında ekşi çürüklüğün %0-1,2 oranında azalmasında etkili olmuştur. Fungisit meyvelerin kaplanması sırasında uygulandığında, çürümenin ortaya çıkması %49,1-57,1 oranında azalmıştır. Fludioxonil ve azoxystrobin gibi turunçgil derim sonrası fungusitleri ile propiconazole karışımlarının, yeşil küf ve ekşi çürüklüğü azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir.

Talibi ve ark. (2012), derim sonrası turunçgillerde ekşi çürüklüğe neden olan *G. citri-aurantii*'ye karşı Fas'ta yetişen bazı bitkilerin antifungal etkisini araştırmışlardır. Fas'ın güneyindeki farklı bölgelerden toplanan 43 bitki türünün öğütülmüş formlarının ve sulu ekstraktlarının antifungal etkisi *in vitro* ve *in vivo* koşullarda gözlenmiştir.

Denemeye alınan 43 bitkiden *Rubus ulmifolius*, *Ceratonia siliqua*, *Cistus monspeliensis* ve *Halimium umbellatum* bitkilerinin öğütülmüş formlarının fungusun miselyal gelişimini tamamen engellediği belirlenmiştir. Ayrıca, *Cistus villosus*, *Pistacia atlantica*, *Halimium antiatlanticum*, *Inula viscosa*, *Ighermia pinifolia* ve *Hammada scoparia* bitkilerinin öğütülmüş formları %80'den daha yüksek bir oranda *G. citri-aurantii*'nin miselyal gelişmesini engellemiştir. *H. antiatlanticum* ve *C. villosus* bitkilerinin sulu ekstraktları en yüksek etkiyi göstermiştir. *H. antiatlanticum* spor çimlenmesini 2,5 ve 5 mg/ml'de, *C. villosus* ise 5 mg/ml'de tamamen engellemiştir. Mandarin meyvelerine *C. villosus* ve *H. antiatlanticum*'un sulu ekstraktları uygulandığında ekşi çürüklüğün ortaya çıkmasını %44,4-46,3 oranında azaltmıştır.

Regnier ve ark. (2014), *G. citri-aurantii* ve diğer derim sonrası turunçgil patojenlerinin kontrolü için çoklu fungusitlere alternatif olarak uçucu yağların uygulanmasını araştırmışlardır. Ticari olarak mevcut 59 adet uçucu yağ ve bazı önemli bileşenlerinden, dokuzu 1000 µl/L'de patojenin miselyal gelişimini tamamen engellemiştir. Seçilen uçucu yağların (*Thymus vulgaris*, *Citrus aurantium* var. *amara*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Origanum vulgare*, *Geranium graveolens roseum* Bourbon) buhar fazlarında patojene karşı fungitoksikten daha çok fungistatik etkili olduğu anlaşılmıştır. En ümit verici olarak seçilen uçucu yağlar, *G. citri-aurantii* inokule edilen Valencia portakallarına uygulanmıştır. *C. citratus*, *C. martinii*, *O. vulgare* ve *G. graveolens roseum* Bourbon'un uçucu yağları (1000 µl/L) kaplamayla birleştirilmiş ya da tedavi edici bir daldırma olarak uygulanmıştır. *C. citratus* (limon), *G. citri-aurantii*'nin kontrolü için en düşük maliyetli tercih olarak seçilmiştir. Önceki ticari denemeler, *P. digitatum*'a karşı *Mentha spicata* uçucu yağlarının koruyucu özelliklerini ortaya koymuştur. *G. citri-aurantii*, *P. digitatum* ve *P. italicum*'a karşı etkili bir koruma ürünü geliştirmek için, *C. citratus*'un uçucu yağı, *M. spicata*'nın uçucu yağı ile birleştirilmiştir. Her iki uçucu yağın her birinden 750 µl/L içeren toksik bir ortam üç patojenin gelişimlerini tamamen kontrol etmiştir.

Diaz ve ark. (2015), *in vitro* koşullarda *G. citri-aurantii*'nin spor canlılığı üzerine SOPP ile karşılaştırıldığında çeşitli dezenfektanların etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada test edilen dezenfektanlar; 200 ppm sodyum hipoklorit, pH 6 ve 6,5'da 100 ppm stabilize edilmiş klorin dioksit, 5000 ppm N-chloro tosylamide (sodyum tuzu), 1600 ppm didecyl dimethyl amonyum klorit/alkil amido propil klorit dimethyl benzyl

amonyum klorit, 120 ppm didecyl dimethyl amonyum klorür ve 20 000 ppm SOPP'tir. Her bir uygulama 1, 2 ve 4 dakika boyunca 1×10^6 spor/ml'lik süspansiyonlarda yapılmıştır. En etkili uygulamalar; 3 defa uygulandığında sporların %100'ünü öldüren pH'sı 6 olan klorin dioksit bileşiği ve kuaterner amonyum türevleridir. Sodyum hipoklorit 2 dakika uygulandığında sporların %97'si ve 4 dakikada ise %100'ü eradike edilmiştir. pH'sı 6 olan klorin dioksit 2 dakika uygulandığında ise sporların %99,8'i ve 4 dakikada ise %100'ü eradike edilmiştir. SOPP'in, bu koşullar altında kullanıldığında tatmin edici bir kontrol sağlamadığı bildirilmiştir.

Isothiocyanate (ITC) Bileşiklerinin Fungal Patojenlere Karşı Etkinlikleri ile İlgili Çalışmalar

Drobnica ve ark. (1967a), mononükleer aromatik ITC bileşiklerinin ve ilişkili bileşiklerin antifungal etkisini araştırmışlardır. ITC türevlerinin (57 adet) saprofitik ve parazitik fungusların yanı sıra *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* ve *P. cyclopium* üzerindeki antifungal etkisi belirlenmiştir. İncelenen bileşiklerin çoğu, bu üç fungustan *R. oryzae*'ye karşı karakteristik düşük etkileri ile doğal benzyl ITC (BITC) ve β -phenylethyl ITC'in analoglarının aksine benzer etki göstermiştir. NCS grubu, alifatik radikal, methyl grubu ve daha uzun bir alifatik zincirle dolaylı olarak aromatik parçaya bağlanan bileşiklerle karşılaştırıldığında doğrudan aromatik parçaya bağlı olan bileşiklerin etki tipinde farklılıklar oluşturmuştur. Elde edilen sonuçlar, tüm ITC moleküllerinin yüksek kararsızlığını ortaya koyan, -NCS grubunun reaktivitesinde önemli bir artışa neden olan bileşenlerin yanında aromatik parçadaki iyonize edilmiş bileşenlerin yani COOH, -CH₂-COOH ve -SO₃H gruplarının olumsuz etkisini desteklemiştir.

Drobnica ve ark. (1967b), doğal olarak meydana gelen ITC bileşiklerinin ve benzeri bileşiklerin antifungal etkisini araştırmışlardır. 13 adet saprofitik ve parazitik fungusun yanında *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* ve *P. cyclopium*'da 11 adet doğal ITC bileşiğinin ve 27 adet sentezlenmiş analogunun antifungal etkisine dair bilgi mevcuttur. Benzyl ITC ve β -phenylethyl ITC'in bazı analoglarında dikkate değer bir antifungal etki gözlenmiştir. BITC grubunda, *A. niger* ve *R. oryzae* için EC₁₀₀ değerleri ve bileşiklerin sudaki eş molar çözünürlükleri arasında orantısal bir bağlantı olduğu gözlenmiştir. Bunun

aksine, incelenen türevlerin antifungal etkisi ve kimyasal reaktivitesi arasında hiçbir ilişki olmadığı bildirilmiştir.

Sarwar ve ark. (1998), *in vitro* koşullarda tahıl kök çürüklüğü patojenleri *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Pythium irregulare*'ın miselyal gelişimine ITC bileşiklerinden dört alkenil alifatik ITC (methyl, propenyl, butenyl ve petenyl ITC) ve iki aromatik ITC'in (benzyl ve 2-phenylethyl ITC) toksisitesini araştırmışlardır. Aromatik ITC'ların uçuculukları düşük olduğundan gelişme ortamına aktarıldığında alifatik ITC'lardan daha düşük, agarda çözündüğünde ise alifatik ITC'lardan daha yüksek toksik etki göstermiştir. Her iki yöntemde de methyl ITC (MITC) ve propenyl ITC arasında az fark olmasına rağmen, diğer alifatik ITC'ların toksisitesi yan zincir uzunluğunun artması ile azalmıştır. Funguslar ITC'lara hassasiyet bakımından farklılık göstermiştir. *Gaeumannomyces* en hassas iken *Rhizoctonia* ve *Fusarium* orta ve *Bipolaris* ve *Pythium*'un hassasiyetleri düşük olmuştur. *Pythium*'un, agarda çözündürülen ITC'lara diğer funguslardan 2-16 kat daha dayanıklı olduğu ve diğer fungusların aksine alifatik ITC'lara daha hassas olduğu gözlenmiştir. *Brassicaceae* dokularında bulunan glukozinolatların hidroliz ürünlerinden propenyl ve 2-phenylethyl ITC (2-PE ITC) ile bazı fungusların baskılanması, *Brassicaceae* türlerinin hastalık baskılama potansiyelinde önemli bir rol oynayan sentetik fumigant MITC'in etkisinden daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Charron ve Sams (1999), *Brassicaceae* türlerinin parçalanmış yapraklarıyla *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani*'nin engellenmesini araştırmışlardır. Premium Crop brokoli (*B. oleracea* L. (Botrytis Grubu)), Charmant lahana (*B. oleracea* L. (Capitata Grubu)), Michihili Jade Pagoda Çin lahanası (*B. rapa* L. (Pekinensis Grubu)), Blue Scotch Curled kıvırcık lahana (*B. oleracea* L. (Acephala Grubu)), Hint hardalı (*B. juncea* (L.) Czerniak) ve Florida Broadleaf hardalının (*B. juncea* (L.) Czerniak) ıslatılarak yumuşatılmış yaprakları 500 ml'lik cam kavanozlara konulmuştur. Patates dekstroz agarda *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani* diskleri bulunan petri kapları kavanozların ağızları üzerine konulmuştur. Her iki fungusun radyal gelişimi en çok Hint hardalıyla baskılanmıştır. Uçucu bileşikler, katı-faz mikroekstraksiyon (SPME) yöntemi ile toplanarak gaz kromatografi-mass spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Diğer türlerden salınan başlıca bileşik (Z)-3-hexenyl asetat iken Florida Broadleaf hardalından elde edilen uçucu bileşiklerin %90'ından fazlasını allyl ITC (AITC) oluşturmuştur. Glukozinolatlar

tüm türlerin dondurularak-kurutulmuş yapraklarında bulunmasına rağmen Premium Crop brokoli ve Blue Scotch Curled kıvrıkcık lahanadan elde edilen ITC'lar SPME ile belirlenmiştir. AITC uygulamaları ile *P. ultimum* gelişimi 1,1 µmol/L ile kısmen baskılanmış ve 2,2 µmol/L ile tamamen baskılanmıştır. *R. solani* ise 1,1, 2,2 ve 3,3 µmol/L AITC ile kısmen baskılanmıştır.

Smolinska ve Horbowicz (1999), bazı lahanagil bitkilerinden elde edilen uçucu bileşiklerin toprak kökenli fungal patojenlerin inokulum yoğunluğuna karşı fungitoksik etkisini araştırmışlardır. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotium cepivorum* ve *Sclerotinia sclerotiorum*'un toprakta bulunan inokulum yoğunluğuna karşı bazı lahanagil bitkilerinin dokularından elde edilen uçucu bileşiklerin etkisi incelenmiştir. Lahanagil bitkileri, bitki hücrelerinde bulunan glukozinolatların enzimatik parçalanması sırasında üretilen biyosidal bileşiklerden başlıca önemli ITC bileşiklerini salgılamaktadır. İncelenen bitkiler arasında en yüksek fungitoksik etkinin ve aynı zamanda en yüksek ITC konsantrasyonunun *Brassica juncea*'da olduğu saptanmıştır. Denemeye alınan fungusların toprakta kalan sürgünlerinin, bitki dokularından salınan uçucu bileşiklere karşı hassasiyetlerinde önemli ölçüde farklılık gösterdikleri bildirilmiştir.

Harvey ve ark. (2002), Hint hardalı (*Brassica juncea* (L) Czerniak) bitkisinin zarar görmüş dokularından elde edilen baskın bileşik olan AITC'ın *Sclerotium rolfii*'yi engellemesini araştırmışlardır. Bu çalışma ile yaygın görülen toprak kökenli bir patojen olan *Sclerotium rolfii* Saccardo'nun miselyal gelişimini ve sklerot çimlenmesini baskılamaya yardımcı olan AITC bileşiği incelenmiştir. 0, 0,1, 0,2, 0,6, 1,0, 2,0, 4,1, 5,1, 10,2, 20,4, 40,8, 81,6 ve 163,3 g/L Hint hardalı (IM) uygulamaları, miselyal gelişimi baskılama için değerlendirilmiştir. Uygulamanın etkisi, misellerin radyal gelişimini ölçmeyle değerlendirilmiştir. Sklerotlar, 18 g otoklav edilmiş toprak ve 5 g toprak kaplaması içeren kültür tüplerine konulmuştur. AITC farklı konsantrasyonlarda (0, 4,0, 16,0, 64,0, 256,0, 1024,0 ve 4096,0 µmol/L) tüplere enjekte edilmiştir. Uygulama yapılan sklerotlar tüplerden uzaklaştırılmış ve canlılıklarını belirlemek için patates dekstroza agarda çimlenmeye bırakılmıştır. Miselyal gelişim, IM uygulamalarıyla ($P<0.01$) engellenmiştir. %50-90 oranında miselyal gelişmeyi engelleme için IM'nın engelleyici konsantrasyonları (IC) 0,7 ve 1,0 g/L olarak gözlenmiştir. Sklerot çimlenmesinin AITC konsantrasyonları ile ters orantılı ($r:0.96$; $P<0.01$) olduğu ifade edilmiştir. AITC'ın IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri 42 saatte sırasıyla 249,0 ve 528 µmol/L'dir. Sklerotların letal

konsantrasyonuna ulaşılmamış, ancak en yüksek uygulama konsantrasyonlarında baskılama meydana gelmiştir. *Sclerotium rolfsii* misellerinin IM'nın uçucu bileşiklerine hassas olduğu ve düşük konsantrasyonlarda baskılandığı saptanmıştır. Sklerotların, misellerden daha dayanıklı olduğu ve çimlenmeyi baskılamak için daha yüksek AITC konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir.

Mari ve ark. (2002), armutlarda mavi küfe neden olan *P. expansum*'a karşı AITC'nin antifungal buhar-faz etkisini ve fungitoksitesini incelemişlerdir. Mavi küfün en iyi kontrolünü, inokulum yoğunluğuna bağlı olarak meyveleri 5 mg/L AITC-bakımından zenginleştirilmiş bir atmosferde 24 saat maruz bırakmayla elde etmişlerdir. Lezyon çapının AITC konsantrasyonu ile ters orantılı olduğu saptanmıştır. Uygulama yapılan meyvelerde, etkinin 1×10^3 konidi/ml konsantrasyonda %20'den 1×10^6 konidi/ml'de %80'e kadar artış gösterdiği gözlenmiştir. AITC uygulamalarının Conference armut çeşidi için inokulasyondan sonra 24 saate kadar ve Kaiser armut çeşidi için ise 48 saate kadar etkili olduğu gözlenmiştir. AITC uygulamaları aynı zamanda *P. expansum*'un TBZ'e dayanıklı bir ırkını kontrol etmiştir. Her iki durumda da mavi küfün ortaya çıkmasını %90 oranında azaltmıştır. AITC kullanımının *P. expansum*'a karşı sentetik fungusitlere alternatif ve ekonomik olarak uygulanabileceğini bildirmişlerdir.

Smith ve Kirkegaard (2002), *in vitro* koşullarda 2-PE ITC ile toprak mikroorganizmalarının engellenmesini araştırmışlardır. Kanola bitkisinin köklerinden salgılanan 2-PE ITC'nin *in vitro* koşullarda çeşitli funguslar, oomycetesler ve bakteriler üzerine etkisini incelemişlerdir. Bakteriler 2-PE ITC'a ökaryotik patojenlerden genellikle daha toleranslı iken her iki grup da tepki olarak önemli bir değişkenlik göstermiştir. Tür içi değişkenlik düşükken, türler arası değişkenlik bir cins içinde yüksek olmuştur. *Aphanomyces*, *Gaeumannomyces*, *Phytophthora* ve *Thielaviopsis* de dahil diğer cinsler çok hassasken, ökaryotlar arasında *Trichoderma* spp. 2-PE ITC'a en toleranslı durumda bulunmuştur.

Smolinska ve ark. (2003), *Fusarium oxysporum* inhibitörü olarak *Brassicaceae* türlerinden üretilen ITC bileşiklerini araştırmışlardır. *F. oxysporum*'un dört izolatu ile 0,3 µl 2-propenyl, ethyl, butyl, phenylethyl, benzyl ve phenyl ITC'nin buharlaşmasına izin verilmeden kapaklı kaplar kullanarak, ön denemeler yürütülmüştür. Propenyl ve ethyl ITC'nin (EITC) denemeye alınan bileşikler içerisinde en yüksek fungistatik etki gösterdiği gözlenmiştir. EITC ve propenyl ITC'nin miselyal gelişmeyi tamamen engelleyen

konsantrasyonları, tüm izolatların konidial ve klamidospore çimlenmesini baskılamıştır. EITC, BITC, phenylethyl ITC ve diğer ITC bileşikleri de, *F. oxysporum*'un konidi ve klamidosporelerine fungitoksik etki göstermiştir. Sonuç olarak, fidanlık topraklarını istila eden patojenik *F. oxysporum* izolatlarının, propenyl ITC'ın yüksek konsantrasyonlarını salan glukozinolatları içeren *Brassica carinata*, *B. nigra* ve *B. juncea* gibi bitki türleriyle baskılanabileceği bildirilmiştir.

Troncoso ve ark. (2005), biberlerde *Alternaria* çürüklüğünü kontrol etmek için lahana yaprak ekstraktlarında bulunan ITC bileşiklerinin analizlerini ve potansiyel uygulamalarını araştırmışlardır. *A. alternata* inokule edilmiş biber meyveleri düşük yoğunluklu polietilen poşetlerde (LDPE) paketlenerek ve yapılmadan 0,28 ve 0,56 mg/ml konsantrasyonlarda MITC uygulaması yapılmış ve pozitif kontrol olarak ticari bir fungusit kullanılmıştır. *In vitro* koşullarda 0,03 mg/ml konsantrasyondaki MITC uygulaması *Alternaria* gelişimini %100 oranında engellemiştir. LDPE'ler ile 0,56 mg/ml konsantrasyondaki MCIT (reaktif dereceli isothiocyanate karışımı) uygulamasının, biberde meyve kalitesi üzerine olumsuz etkileri olmadan çürüklüğü kontrol etmede ticari fungusitlerden daha etkili olduğu saptanmıştır.

Troncoso-Rojas ve ark. (2005), *in vitro* ve *in vivo* koşullarda domates meyvelerinde *Alternaria alternata*'nın enfeksiyon gelişimi üzerine BITC'ın etkisini araştırmışlardır. *In vitro* koşullarda BITC'ın patates dekstrozu agarda *A. alternata* gelişimi üzerine etkisi değerlendirilmiş ve 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 ve 0,4 mg/ml ITC'a maruz bırakılmıştır. *In vivo* koşullarda LDPE'lerde paketlenen *A. alternata* inokule edilen domates meyvelerine 8 saat 0,28 mg/ml'lik ve 36 saat 0,56 mg/ml'lik BITC uygulanarak etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca, 20°C'de depolama boyunca domates meyvesinin derim sonrası fizyolojisi ve kalitesi üzerine BITC'ın etkisi günlük olarak solunum ve etilen üretim hızının izlenmesiyle değerlendirilmiştir. Toplam suda çözünebilir kuru madde miktarı, pH, titre edilebilir asitlik ve ağırlık kaybı üç gün aralıklarla ölçülmüştür. Sonuç olarak, *in vitro*'da BITC'ın minimum engelleme konsantrasyonu 0,1 mg/ml olarak tespit edilmiştir. 0,56 mg/ml BITC'ın LDPE'ler ile 18 saat boyunca kombinasyon halinde kullanımının paketlenmiş domates meyvelerindeki *Alternaria* çürüklüğünü kontrol etmek için en uygun yöntem olduğunu belirlemişlerdir. BITC'ın solunum hızı, etilen üretim hızı, toplam suda çözünebilir kuru madde miktarı, pH, ağırlık kaybı ve titre edilebilir asitlik üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını saptamışlardır. BITC'ın domateslerde derim

sonrası meyve kalitesi üzerine olumsuz etkileri olmadan *Alternaria* çürüklüğünü kontrol etmek için alternatif bir uygulama olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir.

Mari ve ark. (2008), sentetik ve glukozinolat türevi ITC bileşiklerinin sert çekirdekli meyvelerde görülen kahverengi çürüklüğe karşı etkisini araştırmışlardır. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda *Monilinia laxa*'yı kontrol etmek için ITC bileşiklerinin (allyl, butenyl, benzyl, 2-phenylethyl ve 4-methylthiobutyl ITC) spor çimlenmesi ve miselyum gelişimi üzerine etkisini denemişlerdir. 4-methylthiobutyl ITC'nin *M. laxa*'nın kontrolünde diğer ITC bileşiklerinden daha etkili olduğu gözlenmiş, konidi çimlenmesi için 0,04 mg/L EC₅₀ ve 0,10 mg/L EC₉₅, miselyum gelişimi için ise 0,30 mg/L EC₅₀ ve 0,52 mg/L EC₉₅ değerlerini gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, ITC bileşiklerinin buhar fazlarına 90 dakika maruz bırakıldıktan sonra konidi çimlenmesinde önemli bir azalma görülmüştür. *In vivo* denemelerde, enfekteli nektarinler ve şeftaliler 3-6 saat ITC bakımından zenginleştirilmiş bir atmosfere maruz bırakılmıştır. *In vitro* denemelerine göre patojen kontrolünde önemli bir fark olduğu belirlenmiştir. Denemeye alınan ITC bileşiklerinden sadece AITC ve butenyl ITC 20°C'de 3-4 günlük meyve inkübasyonundan sonra %85'den daha yüksek oranda kahverengi çürüklüğü azaltmış fakat butenyl ITC uygulamasında bazı toksik etkilerin olduğu gözlenmiştir. Benzer sonuçlar, *in situ*'da *Brassica carinata* ve *Brassica rapa*'dan elde edilen sırasıyla AITC ve butenyl ITC'nin buhar fazları ile yapılan denemelerde de alınmıştır. Bu çalışma, nektarin ve şeftali meyvelerinde görülen derim sonrası kahverengi çürüklüğü kontrol etmek için ITC bileşiklerinden özellikle AITC'a dayanan biyofumigasyon kullanımını desteklemiştir.

Rahmanpour ve ark. (2009), *Brassicaceae* türlerinden elde edilen ITC bileşiklerine ve toksik uçucu bileşiklere karşı kolzada (*Brassica napus*) kök çürüklüğüne neden olan *Sclerotinia sclerotiorum*'un uyarılmış toleransını araştırmışlardır. Miselyal diskler, kolza çeşitlerinin ve ilişkili türler olan siyah hardal (*Brassica nigra*) ve beyaz hardalın (*Sinapis alba*) enfekteli yapraklarına yerleştirilmiştir. Miselyal kolonilerin gelişimi kontrollerle karşılaştırıldığında %87'den daha yüksek oranda engellenmiştir. Fungal kolonilerin gelişimi engellenmesine rağmen, fungus enfekteli dokuda gelişmeye devam etmiştir. Fungusun hardal bitkisinin sulu öğütülmüş formuna (hem glukozinolat hem de mayrosinaz içeren) ve sentetik ITC bileşiklerine maruz bırakılması, *S. sclerotiorum*'un enfeksiyon gelişimi esnasında uçucu bileşiklere adapte olma becerisine sahip olduğunu

ortaya koyan, 2-3 günden sonra başlangıç seviyelerden %80 kadar ulaşan oranlarda gelişmeyi engellemesiyle sonuçlanmıştır. Bu adaptasyon, *S. sclerotiorum* genomunu tanımlayan glutathione S-transferase gibi genlerin uyarılmasının incelenmesiyle saptanmıştır.

Kurt ve ark. (2011), nekrotrofik bitki patojeni *Sclerotinia sclerotiorum*'a karşı glukozinolat türevi ITC bileşiklerinin antifungal etkilerini araştırmışlardır. *Brassicaceae* familyasına bağlı türlerde bulunan ITC bileşiklerinin, fungal patojenleri kontrol etmede potansiyel olarak yararlı olduğu ifade edilmiştir. *In vitro* koşullarda, saf ITC bileşiklerinin her birinin *Sclerotinia sclerotiorum*'un farklı fungal gelişim parametrelerine zehirlilik düzeyi, bu bileşikler petri kapları içinde bulunan cam filtreler (Whatman GF/C 25 mm) ekleyerek ve fungusu gelişme ortamında çözerek araştırılmıştır. Dört alifatik (methyl, allyl, butyl ve ethyl ITC) ve 3 aromatik ITC bileşiği (benzyl, 2-phenylethyl ve phenyl ITC) denemeye alınmıştır. Elde edilen sonuçlar, 7 ITC bileşiğinin *S. sclerotiorum*'un farklı gelişme dönemlerinde antifungal etkilerini doğrulamıştır. *S. sclerotiorum*'un Ss31 izolatu ile biyoetkinlik denemeleri, ITC'ın farklı konsantrasyonlarının buharlaşmasına izin verilmediği parafilm ile sarılmış PDA petri kapları kullanılarak yürütülmüştür. Denemeye alınan bileşikler arasında en fazla toksik etkili olanlar, AITC ve BITC bileşikleridir. Uçucu fazda miselyal gelişim, AITC, MITC ve butyl ITC bileşikler tarafından tamamen engellenmiştir. Aromatik ITC bileşikler, uçucu özelliklerinin düşük olmasından dolayı petri kaplarında daha düşük toksik etki, ancak agar içerisinde çözüldüğünde alifatik ITC bileşiklerinden daha yüksek toksik etki göstermiştir. BITC, sklerot çimlenmesi üzerinde 0,0095 EC₅₀ değeri ile en yüksek engelleyici etkiyi göstermiştir. ITC'ların *S. sclerotiorum*'un apotesyum oluşumu üzerine etkileri, yükselen konsantrasyonlara bağlı olarak artmıştır. Toprakta bulunan patojen fungus *S. sclerotiorum*'un, büyük olasılıkla yüksek konsantrasyonda AITC ve BITC bileşiklerini çıkararak glukozinolatları içeren *Brassica juncea*, *B. carinata*, *B. nigra* ve *Sinapis spp.* gibi bitki türleri tarafından yüksek oranda baskılanabileceğini bildirmişlerdir.

Wu ve ark. (2011), elmalarda *Botrytis cinerea* ve *P. expansum* enfeksiyonuna karşı bir AITC ve EITC kombinasyonunun antifungal buhar-faz etkisini araştırmışlardır. AITC ve EITC'ın tek başına ve kombinasyon halindeki potansiyel kullanımı, bir fumigant olarak kullanıldığında elmalarda *P. expansum* Link ve *B. cinerea* Persl. enfeksiyonu üzerindeki etkileri *in vitro* ve *in vivo* denemelerle test edilmiştir. 3:1 oranlı AITC:EITC

uygulamasý, *in vitro* koşullarda *P. expansum*'un ve *B. cinerea*'nin spor çimlenmesini azaltmada tek başlarına AITC ve EITC bileşiklerinden daha etkili olduğu gözlenmiştir. Optimize edilmiş kombinasyon, *P. expansum*'un konidi çimlenmesi için 0,08 µg/ml'de ve miselyal gelişimi için 0,14 µg/ml'de en düşük EC₅₀ değerlerini göstermiştir. *B. cinerea*'nin konidi çimlenmesi için 0,07 µg/ml'de ve miselyal gelişimi için 0,12 µg/ml'de en düşük EC₅₀ değerlerini göstermiştir. *In vivo* denemelerde, suni olarak enfektelenen elmalar, 4 gün boyunca ITC bakımından zenginleştirilmiş bir atmosfere maruz bırakılmıştır. Test edilen ITC bileşikleri arasından AITC, EITC ve kombinasyonları, 20°C'de 3-4 günlük elma inkübasyonundan sonra %85'den daha yüksek bir oranla hastalığın ortaya çıkmasını azaltmıştır. Bu çalışma ile ITC bileşikleriyle fumigasyon uygulamasının ve elma meyvesinde derim sonrası çürümelerin kontrolü için özellikle 3:1'lik AITC ve EITC kombinasyonu uygulamasının önemli olduğu bildirilmiştir.

Ugolini ve ark. (2014), glukozinolat türevi AITC uygulamalarıyla çileklerde derim sonrası kurşuni küfün (*Botrytis cinerea* Per.:Fr) kontrolünü araştırmışlardır. AITC'in buhar fazý, önemli bir çilek patojeni olan *Botrytis cinerea*'ya karşı *in vitro* ve *in vivo* denemelerle değerlendirilmiştir. *In vitro* denemelerde, AITC'in fungusun konidi çimlenmesi ve miselyal gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Miselyumun, AITC'a konididen daha az hassas olduğu gözlenmiştir (EC₅₀ değerleri sırasıyla 1,35 ve 0,62 mg L⁻¹). Ayrıca her iki parametre için EC₅₀ değerleri, AITC uzaklaştırdıktan sonra %30 civarında arttığından dolayı, patojenin AITC'a karşı fungistatik bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. *In vivo* denemelerde, organik üretimle elde edilen ve *B. cinerea* ile doğal olarak enfekteli olan Tecla ve Monterey çilekleri 4 saat boyunca saf AITC ile zenginleştirilmiş bir atmosfere maruz bırakılmıştır. Meyveler 0°C'de 2 günden ve 20°C'de ise 3-4 günden sonra, kurşuni küf enfeksiyonu için değerlendirilmiştir. AITC uygulamasý, kontrol meyvelerinden önemli ölçüde farklılık göstererek patojenin neden olduğu çürümeyi %47,4 oranından %91,5'e kadar azaltmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma, iki aşamalı olarak laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, *Geotrichum citri-aurantii*'nin izolasyonu, patojenisitesi, meyvelerin denemeye hazırlıkları tamamlanmış ve *G. citri-aurantii*'ye karşı isothiocyante bileşiklerinin bir seri konsantrasyonları ile *in vitro* uygulamalar yapılmıştır. İkinci aşamada, laboratuvar koşullarında yarı *in vivo* meyve uygulaması ile etkinlik ortaya konmuştur. Bu yaklaşıma bağlı olarak yöntemin ana hatları aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Meyve

Bu çalışmada deneme materyali olarak, Hatay ili Erzin ilçesinde ticari olarak yetiştiricilik yapılan üretici bahçesinden, ekşi çürüklük hastalığına duyarlı ve derim sonrası ömrü kısa olan Owari Satsuma mandarin meyveleri kullanılmıştır. Meyvelerin derim zamanı, yapılan ön analizler sonucu (suda çözünebilir kuru madde miktarı, usare oranı ve titre edilebilir asitlik) belirlenmiştir. Mandarin meyveleri, şekil, renk ve büyüklük bakımından homojen olacak şekilde seçilerek, lekeli, yaralı veya hastalıklı meyve deneme dışı tutulmuştur.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Isothiocyanate (ITC) Bileşikleri

Denemenin tüm aşamalarında, saf kimyasal isothiocyante bileşikleri kullanılmıştır. Bu grupta olan alifatik bileşiklerden methyl, 2-propenyl (allyl), 2-butyl, ethyl ve aromatik bileşiklerden benzyl ve 2-phenylethyl ITC'lar, Sigma-Aldrich Kimya firmasından sağlanmıştır. Denemede kullanılan bu ITC'lara ait özellikler (Sarwar ve ark., 1998), Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan isothiocyanate bileşiklerin bazı karakteristik özellikleri ve ortaya çıktığı bitkiler

ITC bileşikleri	Bileşik grubu	Glukozinolat'ın yaygın adı	Molekül Ağırlığı	Ortaya çıktığı bitkiler
Methyl	Alifatik	Glucocapparin	73,11	Capparales, Metham sodium (sentetik fumigant)
2-Propenyl (Allyl)	Alifatik	Sinigrin	99,15	<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern (Hint hardalı), <i>B. carinata</i> A. Braun (Etyopya hardalı), <i>B. nigra</i> L. (Kanola)
2-Butyl	Alifatik	Gluconapin	113,18	<i>B. napus</i> L. (Kanola), <i>B. campestris</i> L. (Syn. <i>Brassica rapa</i>) Şalgam
Ethyl	Alifatik	Glucobrassinapin	127,20	<i>B.napus</i> , <i>B.campestris</i>
Benzyl	Aromatik	Glucotropaeolin	149,20	<i>Sinapis</i> spp. (Hardal)
2-Phenylethyl	Aromatik	Gluconasturtiin	163,23	<i>Brassica</i> spp. kökleri

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları

Laboratuvarda yürütülmüş olan denemelerde patates dekstroz agar (PDA, 200 g patates, 20 g dekstroz, 15 g agar) ve su agarı (SA, 20 g agar, 1 litre su) besi yerleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Geotrichum citri-aurantii*'nin İzolasyonu ve Patojenisitesi

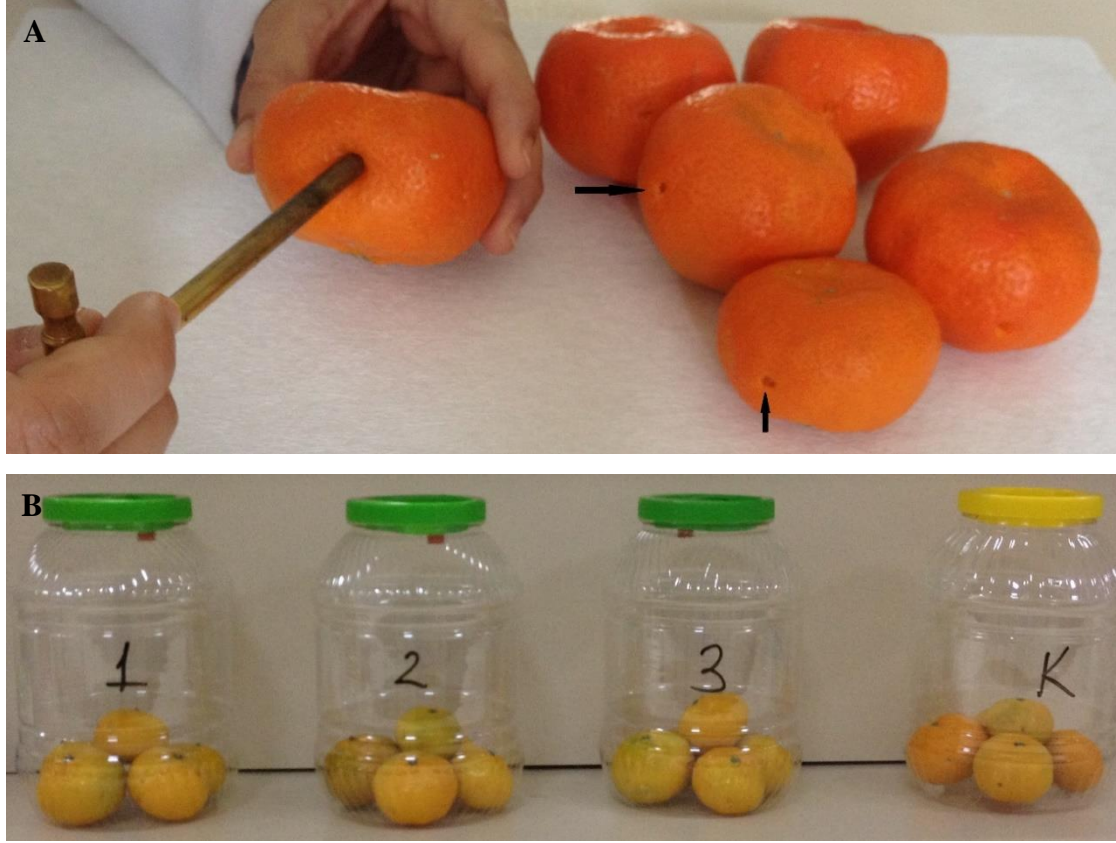
Fungal etmenin elde edilmesi için, derim sonrası bahçeden depoya veya paketleme tesisine getirilen ve hastalıklı olduğu düşünülen mandarin meyvelerinden izolasyon işlemi yapılmıştır. Bu amaçla, meyvelerin yarı hastalıklı ve yarı sağlam kabuk dokularından bistüri yardımıyla küçük parçalar kesilmiştir. Kesilen parçalar, %2'lik sodyum hipoklorit (NaOCL) solüsyonunda 2 dakika yüzey sterilizasyonu yapıp steril saf su ile durulanmıştır. Steril edilen meyve parçaları steril kurutma kağıdına alınarak

kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra kurumuş olan meyve parçaları petri kaplarındaki PDA üzerine pens yardımıyla yerleştirilmiştir. Bu işlem bittikten sonra 25°C’de 5-7 gün süre ile inkübe edilmiştir. PDA içeren petrilerde gelişen fungal kolonilerin tanısı morfolojik ve mikroskopik olarak gerçekleştirilmiştir. Fungus, tek spor izolasyon tekniği ile saflaştırılmıştır. Elde edilen tek spor izolatu, eğik tüp içerisinde PDA besi yerine alınmış ve +4°C’de saklanmıştır.

Patojenisite denemeleri için, Owari Satsuma mandarin meyveleri kullanılmıştır. İlk aşamada, fungusun PDA ortamında 5-7 gün boyunca 25°C’de inkübe edilen kültürleri kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan konidi süspansiyonunu hazırlamak için, fungal kültürü içeren petri kabına steril saf su eklenerek ve miselyum yüzeyinden kaşık yardımı ile kazıma yapılarak konidilerin suya geçmesi sağlanmıştır. Konidial süspansiyon, sporları miselyal parçalardan ayırmak için 2 katlı tülbent yardımı ile süzölmüştür. Elde edilen konidi süspansiyonu, hemositometre yardımı ile hesaplanarak 1×10^6 konidi/ml konsantrasyona ayarlanmıştır. Fungal sporların süspansiyon içerisinde homojen bir şekilde dağılımını sağlamak için süspansiyona, 1-2 damla Tween-80 eklenmiştir. Denemelerde daldırma inokulasyon yöntemi kullanılmıştır (Gür, 2015). Denemede kullanılacak olan mandarin meyveleri uygulama yapılmadan önce, çeşme suyu ile yıkanıp %2’lik NaOCl çözeltisi ile 2 dakika yüzeyde steril edilmiş, steril saf su ile 2 kez durulanmış ve yaralanmadan önce meyveler kurutma kağıdı üzerinde fan altında kurutulmuştur (Liu ve ark., 2009). Daha sonra yıkanıp kurutulan bu meyvelere, ekvatorial bölgede meyve kabuğu üzerinde eşit açılarla üç farklı noktadan 2 mm derinliğinde 5 mm çapında bir yara oluşturmak için steril bir mantar delici yardımı ile yaralar açılmıştır.

Yaralanmış meyveler, 1×10^6 konidi/ml konsantrasyonunda hazırlanmış olan 500 ml hacmindeki spor süspansiyonu içerisinde 1-2 dakika tutularak inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak, sadece steril saf su ile muamele edilmiş meyveler kullanılmıştır. Kontrol ve inokule edilen meyveler, yüksek göreceli nemliliği ($\pm\%85$ RH) sağlamak için içi yüzeyden dezenfekte edilmiş 5 L’lik plastik kavanozlar içerisine yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Meyveler, ağzı kapaklı kavanozlarda laboratuvar koşullarında 21°C’de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Denemede her bir uygulama 3 tekerrür ve her bir tekerrürde 5 meyve olacak şekilde toplam 15 meyve kullanılmıştır. Uygulamanın etkileri, inokulasyondan 5 gün sonra değerlendirilmiş ve veriler uygulamadaki ekşi çürüklüğün neden olduğu ortalama hastalık oranı (%), ortalama

yumuşama gelişim alanı (mm) ve ortalama miselyal gelişim alanı (mm) şeklinde kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. Steril bir mantar delici yardımıyla mandarin meyvelerinin yaranması (A) ve yaralı meyvelerin plastik kavanozlardaki görünümü (B).

3.2.2. Meyvelerin Denemeye Hazırlanması

Meyvelerin derim zamanı yapılan ön analizler ile belirlenmiştir. Deneme, her bir tekerrürde 5 meyve olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Bu analiz sonuçlarına göre Satsuma mandarinleri toplam suda çözünebilir kuru madde / titre edilebilir asitlik (SÇKM/TA) oranı 6,5/1'e ve usare oranı %30-35'e ulaştığında (UNECE, 2010; Özdemir ve ark., 2010) derim zamanına karar verilmiştir.

3.2.2.1. Usare Oranı

Meyve örneklerinin narenciye sıkacağı ile meyve suları sıkılıp, posa ağırlığı bulunduktan sonra başlangıçtaki ağırlıktan posa ağırlığı çıkarılarak, usare oranı tüm meyve ağırlığının yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Usare oranı (\%)} = \frac{\text{Toplam meyve ağırlığı-Posa ağırlığı}}{\text{Toplam meyve ağırlığı}} \times 100$$

3.2.2.2. Suda Çözünebilir Kuru Madde Miktarı

Meyve suyunda suda çözünebilir kuru madde miktarı (SÇKM) Atago ATC-1E Model (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japonya) el refraktometresi ile % olarak ölçülmüştür.

3.2.2.3. Titre Edilebilir Asitlik

Titre edilebilir asitlik (TA), potansiyometrik yöntem ile ölçülmüş olup, 5 ml meyve suyuna 95 ml saf su eklenerek, pH metrede 8,1 değeri okunana kadar 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiş (Şekil 3.2) ve sonuçlar sitrik asit cinsinden % olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Asitlik (\%)} = \frac{\text{NaOH Faktörü} \times \text{Harcanan NaOH Miktarı (ml)} \times \text{Sitrik Asit Sabiti (0,0064)}}{\text{Alınan meyve suyu örneği (5 ml)}} \times 100$$

3.2.2.4. Solunum Hızı

Ayrıca patojenisite denemeleri sırasında meyvelerin bekletildiği 5 L'lik plastik kavanoz hacminin meyvelerin aerobik solunumu için yeterli olup olmadığı belirlenmiştir. Uygulamalara ait her yineleme için 5 adet meyve tartılarak, yaklaşık 5 L hacimli, gaz örneği almak için üzerinde septum bulunan ve gaz sızdırmaz kapakla kapatılmış solunum kavanozuna konulmuştur. Meyveler 20°C'de 1 saat bekletildikten sonra CO₂ miktarı CheckPoint model CO₂/O₂ ölçüm cihazı (PBI-Dansensor America Inc., NJ, ABD) ile belirlenmiştir (Şekil 3.2). Meyvelerin CO₂ miktarı 5 gün boyunca her gün aynı saatte belirlenmiştir. Deneme, her bir tekerrürde 5 meyve olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Ayrıca steril bir mantar delici ile yaralanan meyvenin CO₂ miktarı da 5 gün boyunca belirlenmiştir. Solunum hızı aşağıdaki formüle göre hesaplanmış ve ml CO₂ kg⁻¹ saat⁻¹ olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Solunum hızı (ml CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ saat}^{-1}) = \frac{(C_2 - C_1) \times (V_2 - V_1)}{W \times T}$$

C₁: Başlangıç CO₂ konsantrasyonu (%)

C₂: Final CO₂ konsantrasyonu (%)

V₂: Kavanoz hacmi (ml)

V₁: Meyve hacmi (ml)

W: Kavanozdaki meyve ağırlığı (kg)

T: Zaman (saat)



Şekil 3.2. Titre edilebilir asitliğin potansiyometrik yöntem ile ölçülmesi (A) ve meyvelerin CO₂/O₂ ölçüm cihazı ile CO₂ miktarının belirlenmesi (B).

3.2.3. *Geotrichum citri-aurantii*'nin Fungal Gelişimi Üzerine ITC Uygulamalarının *In Vitro* Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. *Geotrichum citri-aurantii*'nin Misel Gelişimi Üzerine ITC Uygulamalarının Etkilerinin Belirlenmesi

Fungal gelişim üzerine ITC'ların buhar etkisini belirlemek için denemeye alınan bileşiklerin bir seri konsantrasyonları (0-100 µl/L) kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar çok düşük miktarlarda oldukları için etanolde seyreltilip, 1 ml'lik stok solüsyon hazırlanmıştır. PDA üzerinde 5-7 gün süreyle *G. citri-aurantii*'nin aktif olarak gelişmiş olan kolonilerinden 5 mm çapında miselyal diskler, mantar delici yardımı ile alınmış ve yaklaşık 10 ml PDA içeren petri kaplarının (17×90 mm) orta kısmına miselyal kısım alta gelecek şekilde aktarılmıştır. Her bir petri kapağının iç kısmına ITC'ların farklı konsantrasyonları (0,0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13 ve 0,14 µl/L) mikro pipet yardımıyla eklenmiştir. Kapaklar hızlı bir şekilde kapatıldıktan sonra iki kat parafilm ile sarılmış ve ters çevrilmiş halde 24-25°C'de 5-7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca günlük ortalama koloni çapları ölçülmüş

ve radyal koloni gelişimi hesaplanmıştır. Her bir ITC bileşiğinin farklı konsantrasyonlarında engelleme oranı, % Abbott formülüne göre hesaplanmıştır.

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

FG_K = Kontrol petrilerdeki fungal gelişim çapı (mm)

FG_U = Uygulama yapılmış petrilerdeki fungal gelişim çapı (mm)

ITC bileşiklerinin fungistatik veya fungitoksik etkilerini belirlemek için, 5 günlük inkübasyondan sonra gelişim gözlenmeyen petrilerin kapakları ITC uygulanmamış başka steril kapaklar ile değiştirilerek tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.2. *Geotrichum citri-aurantii*'nin Arthrokonidi Çimlenmesi Üzerine ITC Uygulamalarının Etkilerinin Belirlenmesi

ITC bileşiklerinin *G. citri-aurantii*'nin arthrokonidi çimlenmesi üzerine etkilerini belirlemek için bir seri laboratuvar denemeleri gerçekleştirilmiştir. *G. citri-aurantii*, PDA besi yerinde 25°C'de 5-7 gün süre ile geliştirilmiştir. *G. citri-aurantii*'nin arthrokonidi süspansiyonunu hazırlamak için petri kabı içerisindeki fungal kültürün üzerine steril saf su eklenmiş ve kaşık yardımı ile sporların suya geçmesi sağlanmıştır. Konidial süspansiyon, sporları miselyal parçalardan ayırmak için 2 katlı tülbent yardımı ile süzülmüştür. Hazırlanan bu süspansiyona, 1-2 damla Tween-80 eklenerek sporlar, sıvı içerisinde homojen hale getirilmiştir. Spor süspansiyonu, hemositometre (Bright-line, HauserScientific, Horskam, PA, USA) yardımı ile hesaplanarak 1×10^6 konidi/ml konsantrasyona ayarlanmıştır.

Her biri 5 ml hacmindeki su agarı (SA) besi yeri içeren petri kaplarına (15×50 mm) 100 µl arthrokonidi süspansiyonu, mikro pipet yardımı ile eklenmiş ve süspansiyonun besi yerine steril baget ile yayılması sağlanmıştır. Konidi çimlenmesi üzerine ITC'ların buhar etkisini belirlemek için denemeye alınan bileşiklerin bir seri konsantrasyonları (0,0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10 ve 0,11 µl/L) kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar çok düşük miktarlarda oldukları için etanolde seyreltilip, 1 ml'lik stok solüsyon hazırlanmıştır. Her bir petri kapağının iç kısmına ITC'ların ayrı ayrı konsantrasyonları mikro pipet yardımıyla eklenmiştir. Tüm denemeler, ayrı petri kaplarında her bir konsantrasyon için 3 tekrür olacak şekilde yapılmıştır. Ayrıca kontrol olarak kimyasal uygulanmamış 3 tekrür kullanılmıştır. Kontrol ve uygulama yapılan petri kapları iki kat parafilm ile sarılarak 25°C'de 8 saat süre boyunca inkübe edilmiştir.

Bu süre sonunda ışık mikroskobu altında çimlenmiş ve çimlenmemiş konidilerin sayımları gerçekleştirilmiştir. Çim tübü uzunluğu, arthrokonidi çapının 1,5 katı olduğunda spor çimlenmiş olarak kabul edilmiştir. Çimlenme oranı için her bir konsantrasyondaki her bir tekrar için 100 arthrokonidi, mikroskobik olarak sayılmıştır (Qin ve ark., 2003).

3.2.3.3. ITC Bileşiklerinin *Geotrichum citri-aurantii*'nin Hiflerinde Meydana Getirdiği Değişikliklerin Belirlenmesi

ITC bileşiklerinin etkili olduğu belirlenen konsantrasyonlarının fungusun miselleri ve çim boruları üzerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler faz kontrast optiklerle donatılmış Olympus B×51 mikroskobu altında incelenmiştir. Fungus kültürlerinden alınan diskler PDA içeren petrilere aktarıldıktan sonra misel gelişimi için 2 gün 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Fungus misellerinin diskten itibaren yaklaşık 2 cm gelişmesiyle bileşiklerin farklı konsantrasyonları yukarıda belirtildiği şekilde kapaklara damlatılarak, petrilere parafilmle sarılıp tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Muamele gören fungal yapılar ışık mikroskobunda petrilere alınan çok ince agar bloklarının preparatları hazırlanarak incelenmiştir.

3.2.4. Yarı *In Vivo* Koşullarda *Geotrichum citri-aurantii*'ye Karşı ITC Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki ITC bileşiklerinin ekşi çürüklüğe etkisi, laboratuvar koşullarında araştırılmıştır. Denemede kullanılmış olan mandarin meyveleri uygulama yapılmadan önce çeşme suyu ile yıkanıp, %2'lik NaOCL çözeltisinde 2 dakika bekletildikten sonra steril saf su ile durulanmıştır. Dezenfekte edilen bu meyveler, kurutma kağıdı üzerinde fan yardımı ile kurutulmuştur (Liu ve ark., 2009). Daha sonra kuruyan mandarin meyvelerinin ekvatorial bölgesinde eşit aralıklarla 3 adet olacak şekilde mantar delici ile yaklaşık 2 mm derinliğinde ve 5 mm genişliğinde üniform şekilde yaralar açılmıştır.

ITC bileşiklerinin tedavi edici etkilerini belirlemek için mandarin meyveleri, içine %1 oranında yüzey gerilimini azaltıcı yayıcı-yapıştırıcı (Tween-80) eklenmiş 7 günlük *G. citri-aurantii* kültürünün 1x10⁶ konidi/ml konsantrasyonda ve 2000 ml hacmindeki fungal arthrokonidi süspansiyonuna 1-2 dakika daldırılarak inokulasyonlar

gerçekleştirilmiştir. İnokulasyon işleminden sonra meyveler, patojenin nüfuz etmesi için 1-2 saat bekletilmiştir. *In vitro* koşullarda misel ve konidi çimlenmesi denemeleri sonucunda patojene karşı en yüksek etki gösteren ITC bileşikleri (methyl, allyl ve ethyl ITC) kullanılmıştır. Daha sonra mandarin meyveleri her bir kavanoza (5 L) 5 meyve olacak şekilde yerleştirilerek, yüksek göreceli nemliliği sağlamak için kavanozların kapaklarına kurutma kağıdı yapıştırılmış ve 1000 µl saf su uygulanmıştır. Daha sonra *in vitro* denemelerle belirlenen uygun konsantrasyonların 20 katı ITC (0,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 ve 12,0 µl/L) uygulanıp, kavanozların ağzı sıkıca kapatılıp iki kat parafilm ile sarılarak 5 gün süre ile muhafaza edilmiştir. Meyvelerin birbiriyle temas etmesini önlemek için kavanozlar yatay olarak yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Bu süre sonunda meyveler kavanozlardan çıkartılıp değerlendirilerek ortalama lezyon alanları (mm) bulunmuştur. Deneme, 3 tekrarlı olarak kurulmuştur. Pozitif kontrol olarak spor süspansiyonu uygulanmış meyveler, negatif kontrol olarak ise sadece steril saf su uygulanmış meyveler kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Meyvelerin plastik kavanozlara yatay olarak yerleştirilerek inkübe edilmesi.

3.3. Deneme Deseni ve Veri Analizleri

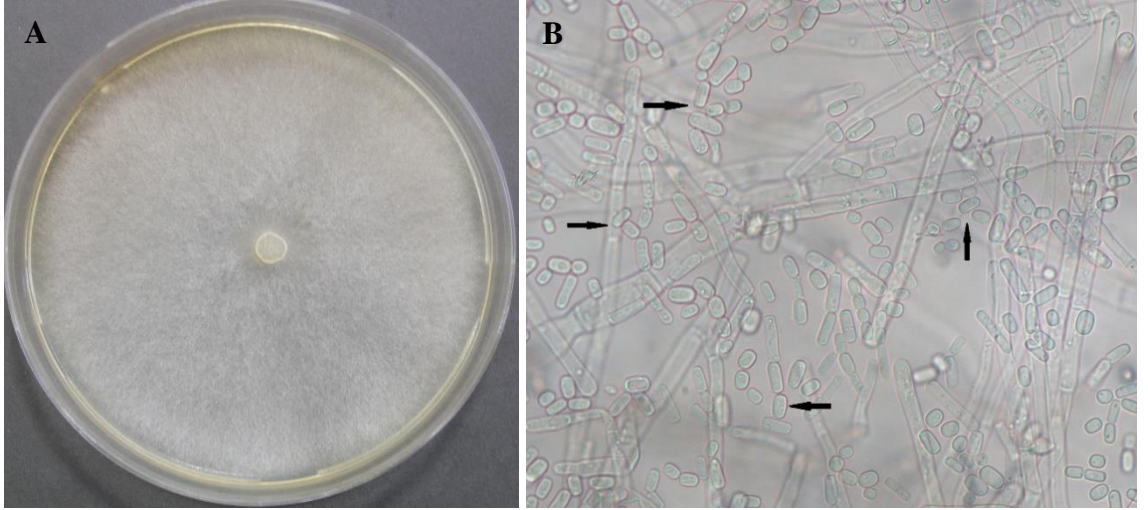
Laboratuvar koşullarında yürütülen *in vitro* denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre her bir uygulama için 3 tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Yarı *in vivo* denemelerde ise, tesadüf parselleri deneme deseninde verilerin % etkileri belirlenmiş ve elde edilen tüm veriler, SPSS istatistik yazılım programını kullanarak çift yönlü ANOVA ile varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi uygulanan ortalama değerler,

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile %5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. ITC bileşiklerinin misel gelişimini ve arthrokonidi çimlenmesini (sırasıyla %50 ve %90 düzeyinde) engelleyen etki konsantrasyonları (EC₅₀ ve EC₉₀) her bir ITC bileşiği için farklı konsantrasyonlarda elde edilen değerleri kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *Geotrichum citri-aurantii*'nin İzolasyonu ve Patojenisitesi

Fungal etmenin izolasyonu için, derim sonrası bahçeden depoya veya paketleme tesisine getirilen ve hastalıklı olduğu düşünülen mandarin meyvelerinden izolasyon işlemi yapılmıştır. Hastalıklı dokular patates dekstroz agar (PDA) içeren petrilere 25°C'de 5-7 gün inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerden yapılan mikroskopik incelemeler sonucu besi yerinde beyaz, dairesel olarak ve hızlı gelişen, göreceli olarak seyrek koloniler incelenmiştir (Şekil 4.1). Etmenin, hifsel ve konidiyal yapı gibi morfolojik ve taksonomik karakterlere dayanarak *Geotrichum citri-aurantii* türü olduğu tanımlanmıştır (Hernandez-Montiel ve ark., 2010).



Şekil 4.1. *Geotrichum citri-aurantii*'nin PDA besi yerinde fungal gelişimi (A), hifleri ve arthrosporlarının mikroskopik görünüşü (B).

Elde edilen bulgulara göre Satsuma mandarinlerinde, ekşi çürüklüğün neden olduğu ortalama hastalık oranı %96, ortalama yumuşama gelişim alanının 30,83 mm, ortalama miselyal gelişim alanının ise 18,23 mm olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Meyvelerin Denemeye Hazırlanması

Meyvelerin derim zamanına karar vermek için yapılan ön analiz sonuçlarına göre Satsuma mandarinlerinde Eylül ayının 3. haftasında usare oranının 47,3, SÇKM'nin %8,4, TA'in %1,3 ve SÇKM/TA'in 6,5/1 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu

parametreler Satsuma mandarinleri için önerilen minimum olgunluk kriterlerini (SÇKM/TA 6,5/1 ve usare oranı %30-35) sağladığından (UNECE,2010) meyvelerin derimine karar verilmiştir. Özdemir ve ark. (2010) Dörtüol koşullarında yetiştirilen Satsuma mandarinleri için benzer kriterler (SÇKM/TA 6,5/1 ve usare oranı %30-35) önermişlerdir.

Çizelge 4.1.Owari Satsuma mandarin meyvelerinde derimde incelenen parametreler.

İncelenen Parametreler	%
Usare	47,3
SÇKM	8,4
TA	1,3
SÇKM/TA	6,5/1

Ayrıca patojenisite denemeleri sırasında meyvelerin bekletildiği 5 L'lik plastik kavanoz hacminin meyvelerin aerobik solunumu için yeterli olup olmadığını belirlemek için solunum hızı ölçülmüştür. Elde edilen bulgulara göre sağlıklı Satsuma mandarin meyvelerinde ortalama solunum hızının 8,3 ml CO₂ kg⁻¹ saat⁻¹, yaralı meyvelerde ise 10,6 ml CO₂ kg⁻¹ saat⁻¹ olduğu tespit edilmiştir. Arpaia ve Kader (2013), mandarin meyvelerinin 20°C'de solunum hızının 10⁻¹⁵ ml CO₂ kg⁻¹ saat⁻¹ olduğunu bildirmiştir. Bulgularımız önceki çalışmalarla uyumlu olup, meyvelerin 5 L'lik plastik kavanozlarda aerobik solunum yaptığını göstermiştir.

4.3. *Geotrichum citri-aurantii*'nin Fungal Gelişimi Üzerine ITC Uygulamalarının *In Vitro* Etkilerinin Belirlenmesi

4.3.1. *Geotrichum citri-aurantii*'nin Misel Gelişimi Üzerine ITC Uygulamalarının Etkileri

G. citri-aurantii'nin misel gelişimi üzerine ITC bileşiklerinin buhar etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelgede de görüleceği gibi methyl, allyl, butyl, ethyl, benzyl ve 2-phenylethyl ITC bileşikleri 0,0-0,14 µl/L konsantrasyon aralığında değişen oranlarda antifungal etki göstermiştir. En güçlü antifungal etkinlik benzyl, methyl, allyl ve ethyl ITC bileşikleri tarafından gösterilmiş olup, bu bileşikleri sırasıyla butyl ve 2-phenylethyl ITC bileşikleri izlemiştir. Fungusun misel gelişimini tamamen engelleyen konsantrasyonları incelendiğinde, methyl ITC *G. citri-aurantii* patojenini 0,08 µl/L, allyl ITC 0,10 µl/L,

butyl ITC 0,13 µl/L, ethyl ITC 0,10 µl/L, benzyl ITC 0,06 µl/L ve 2-phenylethyl ITC 0,14 µl/L konsantrasyonlarında tamamen engellemiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC bileşiklerinin buhar fazında *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği^a

Kons. (µl/L)	Kullanılan farklı ITC'ların misel gelişimi (mm) üzerine etkileri					
	Methyl ITC	Allyl ITC	Butyl ITC	Ethyl ITC	Benzyl ITC	2-PE ITC
0,0	85,3h	83,0j	83,3k	83,7j	84,0g	82,0m
0,01	53,0gC	53,3iC	43,0jAB	41,7iAB	38,3fA	44,3lB
0,02	42,7fC	47,7hD	34,0iB	28,3hA	33,3eB	37,3kB
0,03	40,7fC	39,0gC	30,7hB	26,0gA	26,0dA	33,7jB
0,04	28,3eBCD	31,0fCD	26,0gBC	24,3gAB	19,7cA	32,3ijD
0,05	21,3dB	26,0eC	22,0fB	21,7fB	13,7bA	29,7hiD
0,06	13,0cB	22,7deD	21,0efCD	18,0eC	0,0aA	27,3ghE
0,07	6,0bB	19,7dD	18,0deD	13,3dC	0,0aA	26,0fgE
0,08	0,0aA	12,7cC	15,0dD	10,3cB	0,0aA	24,0fE
0,09	0,0aA	7,0bB	11,7cC	7,7bB	0,0aA	20,7eD
0,10	0,0aA	0,0aA	9,0cB	0,0aA	0,0aA	12,7dC
0,11	0,0aA	0,0aA	5,3bB	0,0aA	0,0aA	10,6dC
0,12	0,0aA	0,0aA	2,3abB	0,0aA	0,0aA	7,3cC
0,13	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	3,3bB
0,14	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
EC₅₀^b	0,020	0,023	0,016	0,014	0,014	0,019
EC₉₀^c	0,061	0,084	0,101	0,072	0,044	0,170

^a Elde edilen değerler 3 farklı petride gelişen fungus koloni çap (mm) değerlerinin ortalamasıdır. Aynı satır içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler veya sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer büyük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, $P \leq 0.05$).

^b ITC bileşiklerinin misel gelişimini %50 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyonları (EC₅₀) her bir ITC bileşiği için farklı konsantrasyonlarda elde edilen misel çaplarının değerleri kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

^c ITC bileşiklerinin misel gelişimini %90 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyonları (EC₉₀) her bir ITC bileşiği için farklı konsantrasyonlarda elde edilen misel çaplarının değerleri kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

ITC bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının fungusun misel gelişimini engelleme oranlarına dayanılarak yapılan Probit analiz sonucunda her bir ITC bileşiğinin misel gelişimini %50 ve %90 oranlarında engelleyen etkili konsantrasyonları (sırasıyla EC₅₀ ve EC₉₀) belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlara göre en güçlü antifungal

etkinlik gösteren benzyl, ethyl ve butyl ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla 0,014, 0,014, 0,016, 0,019, 0,020 ve 0,020 µl/L olarak belirlenmiştir. Bu bileşikleri sırasıyla 0,019, 0,020 ve 0,020 µl/L EC₅₀ değerleri ile 2-phenylethyl, methyl ve allyl ITC bileşikleri izlemiştir. Benzyl, ethyl, butyl, 2-phenylethyl, methyl ve allyl ITC bileşiklerinin EC₉₀ değerleri ise sırasıyla 0,044, 0,061, 0,072, 0,084, 0,101 ve 0,170 µl/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

ITC bileşiklerinin buhar fazında *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimine etkileri (%) değerlendirildiğinde (Çizelge 4.3), 0,01 µl/L konsantrasyonda en yüksek etkiye benzyl ITC (%54,4) sahip olurken, en düşük etkiyi allyl ITC (%35,8) göstermiştir. Patojen üzerine %100 etkinin görüldüğü 0,06 µl/L konsantrasyonda benzyl ITC ilk sırayı alırken bunu, %84,8, %78,5 ve %74,8 ile sırasıyla methyl, ethyl ve butyl ITC bileşikleri izlemiştir. Konsantrasyon 8 kat arttırıldığında (0,08 µl/L) methyl ITC patojenin misel gelişimini %100 oranında engellerken, 10 kat arttırıldığında ise (0,10 µl/L), allyl ve ethyl ITC bileşikleri patojenin misel gelişimini %100 oranında engellemiştir. Denemede kullanılan en yüksek konsantrasyonda (0,14 µl/L) 2-phenylethyl ITC, patojenin misel gelişimini tamamen durdurmuştur.

ITC bileşiklerinin fungistatik veya fungitoksik etkilerini belirlemek için yapılan denemede benzyl ITC'nin 0,06 µl/L, methyl ITC'nin 0,08 µl/L, allyl ve ethyl ITC'nin 0,10 µl/L konsantrasyonlarında fungistatik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC'ların buhar fazında *G. citri-aurantii* misel gelişiminin engellenmesi (%) üzerine etkinliği.

Kullanılan farklı ITC'ların misel gelişiminin engellenmesi (%) üzerine etkisi						
Kons. (µl/L)	Methyl ITC	Allyl ITC	Butyl ITC	Ethyl ITC	Benzyl ITC	2-PE ITC
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,01	37,9	35,8	48,4	50,2	54,4	45,9
0,02	49,9	42,6	59,2	66,1	60,3	54,5
0,03	52,4	53,1	63,2	68,9	69,0	58,9
0,04	66,9	62,7	68,8	70,9	76,6	60,6
0,05	75,0	68,7	73,6	74,1	83,7	63,8
0,06	84,8	72,7	74,8	78,5	100,0	66,7
0,07	93,0	76,3	78,4	84,1	100,0	68,3
0,08	100,0	84,7	82,0	87,6	100,0	70,7
0,09	100,0	91,6	86,0	90,8	100,0	74,8
0,10	100,0	100,0	89,2	100,0	100,0	82,5
0,11	100,0	100,0	93,7	100,0	100,0	87,4
0,12	100,0	100,0	97,5	100,0	100,0	91,1
0,13	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	95,9
0,14	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

In vitro koşullarda ITC'ların buhar fazında *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimine etkileri incelendiğinde, en düşük konsantrasyonda benzyl ITC (0,06 µl/L), patojenin misel gelişimini engellemede en yüksek aktiviteye sahip olmuştur. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak benzyl ITC ile birlikte methyl ITC (0,08 µl/L), allyl ve ethyl ITC (0,10 µl/L), fungal koloninin radyal gelişimini kontrole oranla yüksek düzeyde engellemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, BITC'ın *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* ve *Rhizopus oryzae*'ye karşı en etkili ITC'lardan biri olduğunu bildiren Drobnica ve ark. (1967a)'nın bulguları ile uyum içerisindedir. Benzer bir çalışmada, 0,05 mg/ml konsantrasyondaki BITC'ın domates meyvesinden izole edilen *Alternaria alternata*'nın misel gelişimini %80 oranında, 0,1 mg/ml konsantrasyonda ise %100 oranında engellediği bildirilmiştir (Troncosa-Rojas ve ark., 2005). *In vitro* koşullarda, biberlerden izole edilen *Alternaria alternata*'nın misel gelişimini tamamen engellemek için, AITC'ın 0,04 mg/ml, phenyl ITC'ın 0,05 mg/ml ve BITC'ın 0,08 mg/ml konsantrasyonları gerekirken, etkili MCIT konsantrasyonunun 0,03 mg/ml olduğu bildirilmiştir (Troncoso ve ark., 2005). En düşük antifungal etki phenylethyl ITC uygulamasında gözlenmiştir. Phenylethyl ITC'ın en yüksek konsantrasyonunda (0,1 mg/ml) bile %50 oranında

engelleme olduğu kaydedilmiştir. Kurt ve ark. (2011), uçucu ITC bileşiklerinin (methyl, allyl, butyl, ethyl, phenyl, benzyl ve 2-phenylethyl ITC) *Sclerotinia sclerotiorum*'un misel gelişimini engellemede oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. MITC, 732, 1024 ve 1460 µmol/L konsantrasyonlarında misel gelişimini %100 oranında engellemiştir. 2-PE ITC dışındaki tüm ITC'lar, patojen üzerinde fungistatik bir etki göstermiştir. MITC, AITC, BITC ve 2-PE ITC'nin misel gelişimi üzerinde fungitoksik etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu veriler, *in vitro* koşullarda ITC'ların (allyl, butenyl, benzyl, 2-phenylethyl ve 4-methylthiobutyl-ITC) buhar fazında *Monilinia laxa*'nın konidi çimlenmesini ve misel gelişimini önemli ölçüde engellediğini bildiren Mari ve ark. (2008) tarafından da desteklenmektedir.

ITC bileşiklerinin fungusun misel gelişimini engelleme oranlarına dayanılarak yapılan analiz sonucunda en güçlü antifungal etkinlik gösteren benzyl, ethyl ve butyl ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla 0,014, 0,014 ve 0,016 µl/L olarak belirlenmiştir. Benzyl, ethyl ve butyl ITC bileşiklerinin EC₉₀ değerleri ise sırasıyla 0,044, 0,061 ve 0,072 µl/L olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, allyl ve ethyl ITC kombinasyonunun *P. expansum*'un ve *Botrytis cinerea*'nın spor çimlenmesi ve misel gelişimine karşı fungitoksik etki gösterdiğini bildiren Wu ve ark. (2011)'nin bulguları ile uyum içerisindedir. Optimize edilmiş kombinasyon, *P. expansum*'un konidi çimlenmesi ve misel gelişimi için sırasıyla 0,08 ve 0,14 µg/ml havada en düşük EC₅₀ değerlerini göstermiştir. *B. cinerea*'nın konidi çimlenmesi ve misel gelişimi için sırasıyla 0,07 ve 0,12 µg/ml havada en düşük EC₅₀ değerlerini göstermiştir. Her iki fungal türün misel gelişimi, konidi çimlenmesinden daha yüksek ITC konsantrasyonlarıyla engellenmiştir. Benzer bir çalışmada, 4-methylthiobutyl-ITC (4-MTBITC) *Monilinia laxa*'nın kontrolünde diğer ITC bileşiklerinden (allyl, butenyl, benzyl, 2-phenylethyl ve 4-methylthiobutyl-ITC) daha etkili olduğu bildirilmiştir (Mari ve ark., 2008). 4-MTBITC, konidi çimlenmesi için sırasıyla 0,04 ve 0,10 mg/L EC₅₀ ve EC₉₅ değerlerini, misel gelişimi için ise sırasıyla 0,30 ve 0,52 mg/L EC₅₀ ve EC₉₅ değerlerini göstermiştir. Misel gelişimi, konidi çimlenmesinden daha yüksek ITC konsantrasyonlarıyla engellenmiştir.

Denemeye alınan bileşiklerin gelişimi engelleme durumu ele alındığında BITC (0,06 µl/L) ile birlikte MITC (0,08 µl/L), AITC ve EITC (0,10 µl/L) bileşikleri, *G. citri-aurantii* üzerinde fungistatik etki göstermiştir. Elde edilen bu sonuçlar, ITC bileşiklerinin *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Sacc.) Arx & DL Olivies, *Rhizoctonia solani* JG

Kühn, *Gibberella zae* (Schwein) Petch (Syn. *Fusarium graminearum*), *Cochliobolus sativus* (S Ito & Kurib) Dreschler ex Dastur (syn. *Bipolaris sorokiniana*), *Pythium irregulare* Buisman gibi çeşitli toprak kökenli bitki patojenlerine (Motisi ve ark., 2009; Sarwar ve ark., 1998; Angus ve ark., 1994; Dhingra ve ark., 2004) ve sklerot oluşturan funguslara (Smolinska ve Horbowicz, 1999; Rahmanpour ve ark., 2009) karşı fungistatik ve fungitoksik etki oluşturduğu bildirilen çalışmalarla uyum içerisinde. ITC bileşikleri, alifatik (methyl, allyl, butyl ve ethyl ITC) ve aromatik (benzyl ve 2-phenylethyl ITC) bileşikler olarak *G. citri-aurantii* üzerinde zehirlilik seviyesi yönünden benzerlik göstermiştir. Bu veriler, *Monilinia laxa*'nın kontrolünde alifatik ITC bileşikleri (allyl, butyl ve 4-methylthiobutyl ITC) ve aromatik ITC bileşikleri (benzyl ve phenylethyl ITC) arasında herhangi bir fark bulunmadığını bildiren Stahmann ve ark. (1943) tarafından da desteklenmektedir.

4.3.2. *Geotrichum citri-aurantii*'nin Arthrokonidi Çimlenmesi Üzerine ITC Uygulamalarının Etkileri

Bu aşamada, farklı ITC bileşiklerinin *G. citri-aurantii*'nin arthrokonidi çimlenmesine etkileri araştırılmıştır. Misel denemesinde en etkili görülen konsantrasyonların konidi çimlenmesi denemelerinde de 25°C'de 8 saatlik inkübasyon süresi sonunda ışık mikroskobu altında çimlenmiş ve çimlenmemiş arthrokonidi sayımları gerçekleştirilmiştir. *G.citri-aurantii*'nin arthrospor olarak bilinen aseksüel sporlarının (konidi) çimlenmesi üzerine ITC bileşiklerinin buhar etkilerinin araştırıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 incelendiğinde ITC bileşiklerinin misel gelişimini engelleyen konsantrasyonların (Çizelge 4.2) daha altında bir konsantrasyonda fungusun konidi çimlenmesinin engellendiği görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre konsantrasyonların artmasıyla fungusun konidi çimlenme oranları azalmıştır. Fungusun konidi çimlenmesinin engellenmesinde en yüksek etkinliği misel gelişimindeki etkinlikte olduğu gibi sırasıyla benzyl, methyl, allyl, ethyl, butyl ve 2-phenylethyl ITC bileşiklerinin gösterdiği belirlenmiştir. ITC bileşikleri tarafından konidi çimlenmesinin engellenmesi, benzyl ITC'nin 0,05 µl/L konsantrasyonunda, methyl, allyl ve ethyl ITC'nin 0,07 µl/L konsantrasyonunda ve 2-phenylethyl ITC'nin ise 0,10 µl/L konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Yapılan istatistik analizlere göre ITC bileşiklerinin konidi çimlenmesi

üzerine antifungal etkinlikleri konsantrasyonlara bağlı olarak önemli düzeyde artmış olup, konsantrasyonlar arasındaki fark $P \leq 0.05$ önem seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC bileşiklerinin buhar fazında *G. citri-aurantii*'nin arthrokonidi çimlenmesi üzerine etkinliği^a

Kullanılan farklı ITC'lerin konidi çimlenmesi üzerine etkisi						
Kons. (µl/L)	Methyl ITC	Allyl ITC	Butyl ITC	Ethyl ITC	Benzyl ITC	2-PE ITC
0,0	87,3h	88,0h	86,7j	85,0g	82,3g	85,0k
0,005	65,0g	78,7g	71,0i	83,0g	66,0f	72,0j
0,01	55,7f	62,0f	58,3h	72,7f	51,3e	63,7i
0,02	41,3e	43,3e	40,3g	56,3e	35,7d	51,0h
0,03	35,0d	38,0d	35,0f	42,3d	22,7c	40,7g
0,04	23,3c	22,7c	29,0e	22,3c	6,3b	33,3f
0,05	12,7b	10,7b	24,7d	14,7b	0,0a	26,3e
0,06	4,0a	2,7a	11,0c	3,3a	0,0a	21,3d
0,07	0,0a	0,0a	5,0b	0,0a	0,0a	15,3c
0,08	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	9,3b
0,09	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	2,3a
0,10	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
0,11	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
EC₅₀^b	0,015	0,018	0,018	0,024	0,013	0,023
EC₉₀^c	0,052	0,05	0,064	0,053	0,036	0,089

^a Elde edilen değerler 3 farklı petride çimlenen fungus konidi sayılarının ortalamasıdır. Aynı satır içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler veya sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer büyük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, $P \leq 0.05$).

^b ITC bileşiklerinin konidi çimlenmesini %50 düzeyinde engelleyen etkili dozları (EC₅₀) her bir ITC bileşiği için farklı konsantrasyonlarda gözlenen çimlenen konidi sayıları kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir

^c ITC bileşiklerinin konidi çimlenmesini %90 düzeyinde engelleyen etkili dozları (EC₉₀) her bir ITC bileşiği için farklı konsantrasyonlarda gözlenen çimlenen konidi sayıları kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

ITC bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının konidi çimlenmesini engelleme oranlarına dayanılarak yapılan Probit analiz sonucunda her bir ITC bileşiğinin konidi çimlenmesini %50 ve %90 oranlarında engelleyen etkili konsantrasyonları (sırasıyla EC₅₀ ve EC₉₀) belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Elde edilen sonuçlara göre en güçlü antifungal

etkinlik gösteren benzyl, methyl, allyl, butyl, 2-phenylethyl ve ethyl ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla 0,013, 0,015, 0,018, 0,018, 0,023 ve 0,024 µl/L olarak belirlenmiştir. Benzyl, allyl, methyl, ethyl, butyl ve 2-phenylethyl ITC bileşiklerinin EC₉₀ değerleri ise sırasıyla 0,036, 0,050, 0,052, 0,053, 0,064 ve 0,089 µl/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

ITC bileşiklerinin buhar fazında *G. citri-aurantii*'nin konidi çimlenmesine etkileri (%) değerlendirildiğinde (Çizelge 4.5), kullanılan en düşük konsantrasyonda (0,005 µl/L) en yüksek etkiye methyl ITC (%25,6) sahip olurken, en düşük etkiyi ethyl ITC (%2,3) göstermiştir. Patojen üzerine %100 etkinin görüldüğü 0,05 µl/L konsantrasyonda benzyl ITC ilk sırayı alırken bunu, %87,9, %85,5 ve %82,7 ile sırasıyla allyl, methyl ve ethyl ITC bileşikleri izlemiştir. Konsantrasyon 7 kat arttırıldığında ise (0,07 µl/L), methyl, allyl ve ethyl ITC bileşikleri patojenin misel gelişimini %100 oranında engellemiştir. 2-phenylethyl ITC ise 0,10 µl/L konsantrasyonda patojenin misel gelişimini %100 oranında engellemiştir.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC'ların buhar fazında *G. citri-aurantii* spor çimlenmesinin engellenmesi (%) üzerine etkinliği.

Kullanılan farklı ITC'ların konidi çimlenmesi üzerine etkisi						
Kons. (µl/L)	Methyl ITC	Allyl ITC	Butyl ITC	Ethyl ITC	Benzyl ITC	2-PE ITC
0,0	-	-	-	-	-	-
0,005	25,6	10,6	18,1	2,3	19,8	15,3
0,01	36,3	29,5	32,7	14,5	37,6	25,1
0,02	52,7	50,8	53,5	33,7	56,7	40,0
0,03	60,0	56,8	59,6	50,2	72,5	52,2
0,04	73,3	74,2	66,5	73,7	92,3	60,8
0,05	85,5	87,9	71,5	82,7	100,0	69,1
0,06	95,4	97,0	87,3	96,1	100,0	75,0
0,07	100,0	100,0	94,2	100,0	100,0	82,0
0,08	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	89,0
0,09	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	97,2
0,10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,11	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Elde edilen bu sonuçlar, tek başına 5 µg/ml AITC'ın elmalarda bir fumigant olarak uygulandığında, 10⁴ konidi/ml konsantrasyonda inokule edilen *P. expansum*'un spor çimlenmesini tamamen engellediğini bildiren Mari ve ark. (2002)'nin bulguları ile uyum

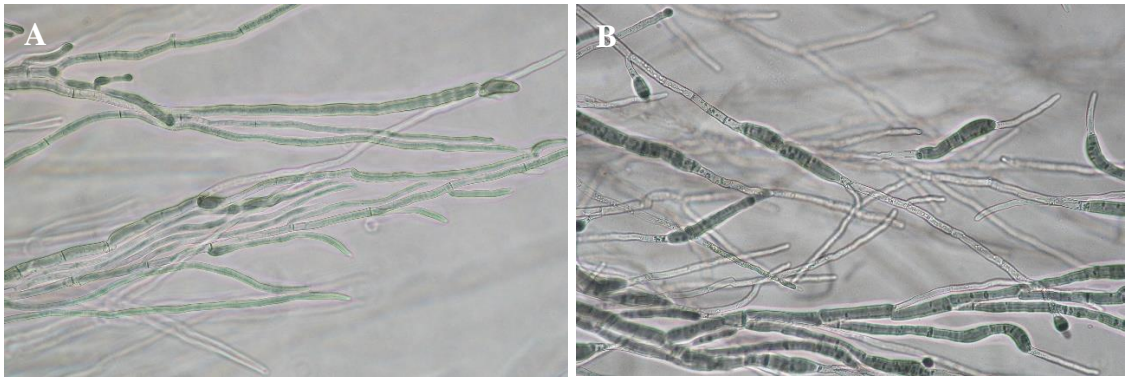
içerisindedir. AITC, EITC ve kombinasyonlarının, *P. expansum* ve *Botrytis cinerea*'nın spor çimlenmesinin kontrolünde misel gelişiminden daha etkili olduğu bildirilmiştir. Kurt ve ark. (2011), uçucu ITC bileşiklerinin (methyl, allyl, butyl, ethyl, phenyl, benzyl ve 2-phenylethyl ITC) *Sclerotinia sclerotiorum*'un sklerot canlılığını engellemede oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Butyl, ethyl, phenyl ve 2-phenylethyl ITC'in farklı konsantrasyonlarında fungitoksik etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu veriler, 1,5 µg/ml AITC buhar faz konsantrasyonunun, 10³ konidi/ml konsantrasyonda inokule edilen *P. expansum*'un spor çimlenmesini tamamen engellediğini bildiren Wu ve ark. (2011) tarafından da desteklenmektedir.

ITC bileşiklerinin konidi çimlenmesini engelleme oranlarına dayanılarak yapılan analiz sonucunda 0,013 µl/L EC₅₀ değeriyle en güçlü antifungal etkinliğin benzyl ITC bileşiğinde görülmüş olması, BITC'in *Sclerotinia sclerotiorum*'un sklerot çimlenmesini 75,1 µmol/L EC₅₀ değeri ile en yüksek engelleyici etkiyi gösterdiğini bildiren Kurt ve ark. (2011)'nin bulguları ile uyum içerisindedir. Ugolini ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, *in vitro* koşullarda AITC'in *Botrytis cinerea*'nın konidi çimlenmesi ve misel gelişimi üzerine etkisini araştırmışlar ve miselyumun, AITC'a konididen daha hassas olduğunu belirlemişlerdir (EC₅₀ değerleri sırasıyla 1,35 ve 0,62 mg/L). Ancak çalışmamızdan elde edilen bulgularda bu sonuca rastlanmamıştır.

4.3.3. ITC Bileşiklerinin *Geotrichum citri-aurantii*'nin Hiflerinde Meydana Getirdiği Değişiklikler

ITC bileşiklerinin etkili olduğu belirlenen konsantrasyonlarının fungusun miselleri ve çim boruları üzerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler faz kontrast optiklerle donatılmış Olympus B×51 mikroskobu altında incelenmiştir. Yapılan gözlemlerde ITC bileşiklerinin tamamen engellemeyi sağlayan konsantrasyonlarında fungus miselleri üzerinde oldukça şiddetli morfolojik bozulmalara neden olduğu gözlenmiştir. ITC uygulamaları sitoplazmik pıhtılaşmaya, hif yapısında artan şiddetlerde sitoplazmik içeriğin kararak hifin dışına boşalmasına neden olmuş, ilerleyen zamanlarda sitoplazması boşalmış miseller tamamen koyulaşp, deforme olarak nekrotik bir misel haline dönüşmüştür (Şekil 4.2). Sağlıklı hif kalınlığı yaklaşık 7,5-10 µm çapında iken, ITC uygulamasına maruz kalan hiflerde hif kalınlığı yaklaşık %20-33 oranında incelenerek ortalama 5-7 µm çapında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, AITC

ile fumigasyon uygulamasının bakteri hücrelerinde metabolit sızıntılara neden olduğunu bildiren Lin ve ark. (2000)'nin bulguları ile uyum içerisindedir. Ayrıca, lipofilik bir bileşik olan phenylethyl ITC'ın plazma membranında bulunan enzimlerle tepkimeye girebileceğini, böylece hücre ölümüyle gelişimi engelleyebileceğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar aynı zamanda, ITC'ların sülfidril grupları, disülfid bağları, proteinlerin amino grupları ve amino asit kalıntıları ile spesifik olmayan ve geri dönüştürülemeyen etkileşimlerinin meydana geldiğini bildiren Kojima ve Oawa (1971) ve Banks ve ark. (1986) tarafından da desteklenmektedir.



Şekil 4.2. *G. citri-aurantii* hiflerinin sitoplazmalarında gözlenen renk değişimleri (A), koagülasyonlar ve şişme şeklinde gözlenen morfolojik değişiklikler (B).

4.4. Yarı *In Vivo* Koşullarda *Geotrichum citri-aurantii*'ye Karşı ITC Bileşiklerinin Etkileri

Farklı konsantrasyonlardaki ITC bileşiklerinin *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün ortalama lezyon alanı üzerine etkisinin yarı *in vivo* koşullarında araştırıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. *In vitro* koşullarda misel ve konidi çimlenmesi denemeleri sonucunda patojene karşı en yüksek etki gösteren ITC bileşikleri (methyl, allyl ve ethyl ITC) kullanılmıştır. Benzyl ITC, yarı *in vivo* koşullarda yapılan ön denemelerde etkili bulunmadığı için meyvelere uygulanmamıştır.

Çizelge 4.6'da görüleceği gibi methyl, allyl ve ethyl ITC bileşikleri 0,0-0,12 µl/L konsantrasyon aralığında değişen oranlarda antifungal etki göstermiştir. En güçlü antifungal etkinlik ethyl ITC bileşiği tarafından gösterilmiş olup, bu bileşiği sırasıyla methyl ve allyl ITC bileşikleri izlemiştir. Fungusun ortalama lezyon alanını tamamen

engelleyen konsantrasyonları incelendiğinde, ethyl ITC *G. citri-aurantii* patojenini 8,0 µl/L, methyl ve allyl ITC 10,0 µl/L konsantrasyonlarında tamamen engellemiştir (Şekil 4.3). Methyl, allyl ve ethyl ITC'nin 16 µl/L konsantrasyonda ise meyvelerde fitotoksositeye neden olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC bileşiklerinin mandarin meyvesi üzerinde *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün ortalama lezyon alanı (mm) üzerine etkisi^a

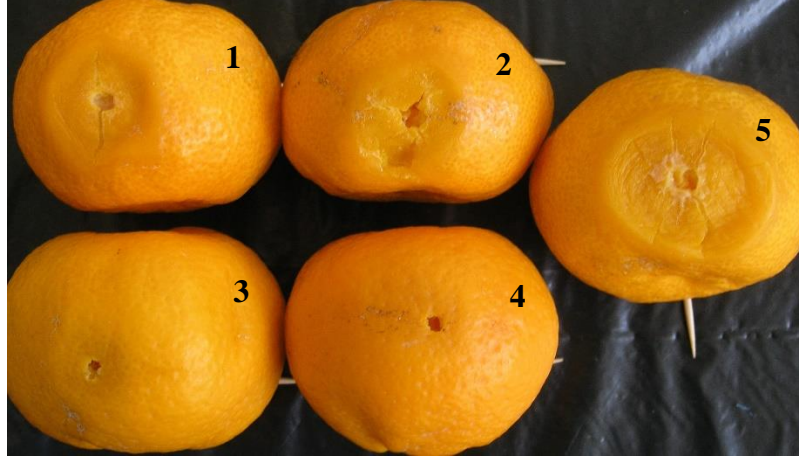
Kons. (µl/L)	Kullanılan ITC'lar		
	Methyl ITC	Allyl ITC	Ethyl ITC
0,0	25,7e	25,7e	25,7d
4,0	24,1eA	24,0deA	20,8cA
6,0	19,5dB	22,4dC	12,2bA
8,0	16,5cB	18,5cC	0,0aA
10,0	10,9bB	11,3bB	0,0aA
12,0	0,0a	0,0a	0,0a
EC₅₀^b	8,139	8,582	5,331
EC₉₀^c	13,269	13,416	7,386

^a Elde edilen değerler 3 farklı mandarin meyvesinde gelişen hastalığın lezyon alanı (mm) değerlerinin ortalamasıdır. Aynı satır içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler veya sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer büyük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, $P \leq 0.05$).

^b ITC bileşiklerinin hastalığın lezyon alanını %50 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyonları (EC₅₀) her bir ITC bileşiği için farklı konsantrasyonlarda elde edilen lezyon alanı değerleri kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

^c ITC bileşiklerinin hastalığın lezyon alanını %90 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyonları (EC₉₀) her bir ITC bileşiği için farklı konsantrasyonlarda elde edilen lezyon alanı değerleri kullanılarak SPSS istatistik programı (Versiyon 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

ITC bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının fungusun ortalama lezyon alanını engelleme oranlarına dayanılarak yapılan Probit analiz sonucunda her bir ITC bileşiğinin misel gelişimini %50 ve %90 oranlarında engelleyen etkili konsantrasyonları (sırasıyla EC₅₀ ve EC₉₀) belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Elde edilen sonuçlara göre güçlü antifungal etkinlik gösteren ethyl, methyl ve allyl ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla 5,331, 8,139 ve 8,582 µl/L olarak belirlenmiştir. Ethyl, methyl ve allyl ITC bileşiklerinin EC₉₀ değerleri ise sırasıyla 7,386, 13,269 ve 13,416 µl/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda allyl ITC uygulanan mandarin meyvelerinde *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün lezyon alanı. 1 (4 µl/L), 2 (6 µl/L), 3 (12 µl/L), 4 (16 µl/L) ve K (kontrol).

ITC bileşiklerinin *G. citri-aurantii*'nin ortalama lezyon alanına etkileri (%) değerlendirildiğinde (Çizelge 4.7), 4,0 µl/L konsantrasyonda en yüksek etkiye ethyl ITC (%18,9) sahip olurken, en düşük etkiyi methyl ITC (%6,3) göstermiştir. Patojen üzerine %100 etkinin gözlemlendiği 8,0 µl/L konsantrasyonda ethyl ITC ilk sırayı alırken bunu, %36,0, ve %28,3 ile sırasıyla methyl ve allyl ITC bileşikleri izlemiştir. Konsantrasyon 3 kat artırıldığında ise (12,0 µl/L), methyl ve allyl ITC bileşikleri patojenin misel gelişimini %100 oranında engellemiştir.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki saf ITC bileşiklerinin mandarin meyvesi üzerinde *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün lezyon alanı oluşumunun engellenmesi (%) üzerine etkisi.

Kons. (µl/L)	Kullanılan ITC'lar		
	Methyl ITC	Allyl ITC	Ethyl ITC
0,0	-	-	-
4,0	6,3	6,7	18,9
6,0	24,0	13,0	52,8
8,0	36,0	28,3	100,0
10,0	57,8	56,3	100,0
12,0	100,0	100,0	100,0

Yarı *in vivo* koşullarda en düşük konsantrasyonda ethyl ITC (8 µl/L), *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün ortalama lezyon alanını engellemede en

yüksek aktiviteye sahip olmuştur. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak bu bileşiği sırasıyla methyl ve allyl ITC (12 µl/L) bileşikleri izlemiştir. *In vitro* koşullarda kullanılan konsantrasyonların en etkili olanları 20 katı arttırıldığında yarı *in vivo* koşullarda yapılan denemelerde olumlu sonuç vermiştir. Bulgularımız armutlarda *P. expansum*'a karşı AITC'ın biyofumigasyonunun, derim sonrası endüstriyel uygulamalar için biyofumigasyonun kullanım olanağını bildiren Mari ve ark. (2002) tarafından desteklenmektedir. Mavi küf inokule edilen Conference ve Kaiser çeşidi armutlar, 28 saat boyunca AITC bakımından zenginleştirilmiş bir atmosfere maruz bırakılarak hastalık kontrol edilmiş ve *in vivo* koşullarda elde edilen sonuçlar *in vitro*'dakileri desteklemiştir. 5 mg/L AITC, 10⁴ konidi/ml *P. expansum* inokule edilen armutlarda fitotoksik etkiye neden olmadan yüksek bir fungitoksik etki göstermiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, turuğillerde derim sonrası önemli kayıplara neden olan toprak kökenli fungal bitki patojenlerinden *G. citri-aurantii*'nin mücadelesinde saf ITC'ların etkileri *in vitro* ve yarı *in vivo* koşullarda araştırılmıştır.

Paketleme tesislerinden elde edilen ve hastalıklı olduğu düşünülen mandarin meyvelerinden PDA ortamında izolasyonu yapılarak koloni gelişimi ve mikroskopik incelemelerden sonra *G. citri-aurantii* olarak tanımlanmıştır. PDA ortamında geliştirilen 5-7 günlük kültürden 10^6 konidi/ml konsantrasyonundaki spor süspansiyonu ile mandarin meyvelerine daldırma inokulasyon yöntemi uygulanmıştır. Patojenisite sonucunda, depolardaki mandarinlerde görülen meyve ekşi çürüklük hastalığına benzer lezyonlar gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan Owari Satsuma mandarin meyvelerinin suda çözünabilir kuru madde miktarı, usare oranı ve titre edilebilir asitliği belirlenerek meyveler uygun döneme ulaştığında derilmiştir. Yarı *in vivo* koşullarda meyvelerin bekletildiği 5 L'lik plastik kavanoz hacminin kapasitesinin aerobik solunum için yeterli olduğu meyvelerdeki solunum hızı ölçülerek belirlenmiştir.

In vitro koşullarda ITC'ların buhar fazında *G. citri-aurantii*'nin misel gelişimine etkileri incelendiğinde, en düşük konsantrasyonda benzyl ITC (0,06 µl/L), patojenin misel gelişimini engellemede en yüksek aktiviteye sahip olmuştur. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak benzyl ITC ile birlikte methyl ITC (0,08 µl/L), allyl ve ethyl ITC (0,10 µl/L), fungal koloninin radyal gelişimini kontrole oranla yüksek düzeyde engellemiştir. ITC bileşiklerinin fungusun misel gelişimini engelleme oranlarına dayanılarak yapılan analiz sonucunda en güçlü antifungal etkinlik gösteren benzyl, ethyl ve butyl ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla 0,014, 0,014 ve 0,016 µl/L olarak belirlenmiştir. Benzyl, ethyl ve butyl ITC bileşiklerinin EC₉₀ değerleri ise sırasıyla 0,044, 0,061 ve 0,072 µl/L olarak belirlenmiştir. ITC bileşiklerinden methyl, allyl, ethyl ve benzyl ITC'nin fungistatik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. ITC'lar, alifatik (methyl, allyl, butyl ve ethyl ITC) ve aromatik (benzyl ve 2-PE ITC) bileşikler olarak *G. citri-aurantii* üzerinde zehirlilik seviyesi yönünden benzerlik göstermiştir.

In vitro koşullarda ITC'ların buhar fazında *G. citri-aurantii*'nin arthrokonidi çimlenmesi üzerine antifungal etkileri incelendiğinde, en düşük konsantrasyonda benzyl

ITC (0,05 µl/L), patojenin arthrokonidi çimlenmesini engellemede en yüksek aktiviteye sahip olmuştur. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak benzyl ITC ile birlikte methyl, allyl ve ethyl ITC (0,07 µl/L), fungal koloninin arthrokonidi çimlenmesini kontrole oranla yüksek düzeyde engellemiştir. ITC bileşiklerinin konidi çimlenmesini engelleme oranlarına dayanılarak yapılan analiz sonucunda en güçlü antifungal etkinlik gösteren benzyl, methyl ve allyl ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla 0,013, 0,015 ve 0,018 µl/L olarak belirlenmiştir. Benzyl, allyl ve methyl ITC bileşiklerinin EC₉₀ değerleri ise sırasıyla 0,036, 0,050 ve 0,052 µl/L olarak belirlenmiştir.

ITC bileşiklerinin *G. citri-aurantii*'nin hiflerinde meydana getirdiği değişiklikler incelendiğinde, ITC bileşiklerinin tamamen engellemeyi sağlayan konsantrasyonlarında fungus miselleri üzerinde oldukça şiddetli morfolojik bozulmalara neden olduğu gözlenmiştir. Farklı ITC bileşiklerinin *G. citri-aurantii* üzerinde hücre membranı ve sitoplazmik içerik düzeyinde oluşturduğu bu zararlanmanın muhtemelen ITC bileşiklerinin fungus membranını yıkarak sitotoksik etkiye neden olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yarı *in vivo* koşullarda en düşük konsantrasyonda ethyl ITC (8 µl/L), *G. citri-aurantii*'nin neden olduğu ekşi çürüklüğün ortalama lezyon alanını engellemede en yüksek aktiviteye sahip olmuştur. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak bu bileşiği sırasıyla methyl ve allyl ITC (12 µl/L) bileşikleri izlemiştir. ITC bileşiklerinin fungusun ortalama lezyon alanını engelleme oranlarına dayanılarak yapılan analiz sonucunda güçlü antifungal etkinlik gösteren ethyl, methyl ve allyl ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri sırasıyla 5,331, 8,139 ve 8,582 µl/L olarak belirlenmiştir. Ethyl, methyl ve allyl ITC bileşiklerinin EC₉₀ değerleri ise sırasıyla 7,386, 13,269 ve 13,416 µl/L olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, denemede kullanılan farklı ITC bileşiklerinin buhar fazında turunçgillerde derim sonrası ekşi çürüklük hastalığına neden olan fungal etmen *G. citri-aurantii*'ye karşı yüksek düzeyde antifungal etkinliğe sahip olduğu açıkça görülmektedir.

Derim sonrası meydana gelen bu patojenlere karşı kullanılan ruhsatlı kimyasalların sayıca az olmaları ve uzun süre kullanımlarından dolayı fungusitlerin yeni ırklarının direnç kazanmalarına neden olmaktadır. Farklı ITC bileşikleri ile patojene karşı doğrudan toksik etkide bulunması, söz konusu bu tip doğal bileşiklere karşı direnç geliştirmesinin önüne geçilebileceği belirtilebilir. Bu uygulamaların insan ve çevre sağlığına güvenilirliği

açısından turunçgil meyvelerinde ekşi çürüklük hastalığına karşı derim sonrasında kullanımı konusunda ümit verici sonuçlar alınmıştır.

ITC bileşikleri, genel bir biyosidal özelliğe sahip olduğu için günümüzde biyofumigasyon sonucu kontrol edilebilen organizmalar hedef alınarak, hem depo hem de farklı toprak kökenli patojen funguslara karşı denenmelidir. Bu amaçla, denenecek olan fungusun enfeksiyon döngüsünde önemli bir yere sahip olan gelişme dönemleri ayrı ayrı ele alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Angus, J.F., Gardner, P.A., Kirkegaard, J.A. and Desmarchelier, J.M., 1994. Biofumigation: Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus. **Plant and Soil**, 162, 107-112.
- Arpaia, M.L. and Kader, A.A., 2013. Mandarin: Recommendations for maintaining postharvest quality. <http://postharvest.ucdavis.edu/PFFruits/MandTangerine/>. Erişim tarihi: 17.06.2015.
- Anonim, 2006. Turunçgiller Sektör Profili. **Dış Ticaret şubesi Uygulama Servisi.**, p.2.
- Anonim, 2010. FAO Corporate Document Repository. <http://www.faostat.org.tr>. Erişim tarihi: 15.04.2015.
- Anonim, 2012. Turunçgil Yetiřtiricilięi. **Alata Bahçe Kùltùrleri Araştırma İstasyonu**, p.1-2
- Anonim, 2013. TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr>. Erişim tarihi: 15.04.2015.
- Anonim, 2015. <http://www.gidamo.org.tr>. Erişim tarihi: 20.04.2015.
- Banks, J.G., Board, R.G. and Sparks, N.H.C., 1986. Natural antimicrobial system and their potential in food preservation of the future. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 8, 103-107.
- Brown, G.E., 1988. Efficacy of guazatine and iminoctadine for control of postharvest decays of oranges. **Plant Disease**, 72, 906-908.
- Brown, G.E., 2011. Sour Rot, casual organism and disease cycle. **Institute of Food and Agricultural Sciences**, University of Florida p.137.
- Charron, C.S. and Sams, C.E., 1999. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of *Brassica* species. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 124, 462-467.
- Dhingra, O.D., Costa, M.L.N. and Silva, G.J. Jr., 2004. Potential of allyl isothiocyanate to control *Rhizoctonia solani* seedling damping off and seedling blight in transplant production. **J. Phytopathol.**, 152, 352-357.
- Diaz, L.E., Campo, R.M. del. and Mara, H., 2015. In vitro effectiveness of disinfectants on *Geotrichum citri-aurantii* spore viability. **International Society for Horticultural Science**, 1571-1575.
- Drobnica, L., Zemanova, M., Nemeč, P., Antos, K., Kristian, P., Stullerova, A., Knoppova, V. and Nemeč, P., 1967(a). Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds. I. Naturally Occurring Isothiocyanates and Their Analogues. **Appl. Microbiol.**, 15, 701-709.
- Drobnica, L., Zemanova, M., Nemeč, P., Antos, K., Kristian, P., Martvon, A. and Zavodska, E., 1967(b). Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds. II. Mononuclear Aromatic Isothiocyanates. **Applied Microbiology**, p.582-587.

- Eckert, J.W., 1978. Postharvest disease of citrus fruit. **Outlook Agricultural**, 9, 225–259.
- Feng, L., Wu, F., Li, J., Jiang, Y. and Duan, X., 2011. Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Postharvest Biology and Technology**, 61, 160–164.
- Gür, H., 2015. Turunçgilde derim sonrası ekşi çürüklük hastalığı etmeni *Geotrichum citri-aurantii*'ye karşı bor ürünlerinin antifungal etkileri. **M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi, 82 sayfa.
- Hao, W., Zhong, G., Hu, M., Luo, J., Weng, Q. and Rizwan-ul-Haq, M., 2010. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. **Postharvest Biology and Technology**, 56, 39–43.
- Hao, W., Li, H., Hu, M., Yang, L. and Rizwan-ul-Haq, M., 2011. Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin. **Postharvest Biology and Technology**, p.316-323.
- Harvey, S.G., Nannahan, H.N. and Sams, C.E., 2002. Indian mustard and allyl isothiocyanate inhibit *Sclerotium rolfsii*. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 127, 27-31.
- Hernandez-Montiel, L.G., Holguin-Pena, R.J. and Latisnere-Barragan, H., 2010. First report of sour rot caused by *Geotrichum citri-aurantii* on Key Lime (*Citrus aurantifolia*) in Colima State, Mexico. **Plant Disease**, 94, 4.
- Horuz, S. ve Kınay, P., 2009. The effect of some new postharvest fungicides and combination of hot water and sodium bicarbonate on *Geotrichum citri-aurantii* on citrus. **6th International Postharvest Symposium**, 8-12 April, Antalya, p.256.
- Kitagawa, H. and Kawada, K., 1984. Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, 97, 133-135.
- Kojima, M. and Oawa, K., 1971. Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. (I). Effects of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeast. **J. Ferment. Technol.**, 49, 740-746.
- Kurt, Ş., Güneş, U. ve Soylu E.M., 2011. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of synthetic pure isothiocyanates against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pest Manag. Sci.**, 67, 869-875.
- Ladaniya, M.S., 2008. Postharvest diseases and their management. In: Ladaniya, M.S. (Ed.), Citrus Fruit Biology, Technology and Evaluation. **Academic Press**, San Diego, p.424–425.
- Lin, C., Preston, J. and Wei, C., 2000. Antibacterial mechanism of allyl-isothiocyanate. **J. Food Prot.**, 63, 727-734.
- Liu, X., Wang, L.P., Li, Y.C., Li, H.Y., Yu, T. and Zheng, X.D., 2009. Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **J. Appl. Microbiology**, 107, 1450–1456.
- Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B. and Zheng, X., 2010. Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. **Lett. Appl. Microbiology**, 51, 30–35.

- Mari, M., Leoni, O., Iori, R. and Cembali, T., 2002. Antifungal vapour-phase activity of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. **Plant Pathology**, 51, 231–236.
- Mari, M., Leoni, O., Bernardi, R., Neri, F. and Palmeri, S., 2008. Control of brown rot on stone fruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates. **Postharvest Biology and Technology**, 47, 61–67.
- McKay, A.H., Förster, H. and Adaskaveg, J.E., 2012. Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. **Plant Disease**, 96, 235-242.
- Mercier, J. and Smilanick, J.L., 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. **Biological Control**, 32, 401–407.
- Motisi, N., Montfort, F., Dore, T., Romillac, N. and Lucas, P., 2009. Duration of control of two soilborne pathogens following incorporation of above- and below-ground residues of *Brassica juncea* into soil. **Plant Pathol.**, 58, 470-478.
- Qin, G., Tian, S., Xu, Y. and Wan, Y., 2003. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. **Physiol. Mol. Plant Pathology**, 62, 147–154.
- Özdemir, A. E., Çandır, E., Dündar, Ö. ve Dilbaz, R., 2009. Üreticiden tüketiciye ulaşıncaya kadar geçen süreçte elmalardaki kayıplar ve önleme yolları. **Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi**, 2(1), 165-168.
- Özdemir, A.E., Ertürk Çandır, E., Kaplankıran, M., Demirkeser, T.H., Toplu, C. ve Yıldız, E., 2010. “Quality parameters changes during fruit development and their relationship with optimum harvest maturity for Satsuma mandarin cultivar grown in Dortyol and Samandag Regions”, Proc. **6th International Postharvest Symposium**, Antalya, Turkey, Acta Hort. 877, 723-729.
- Rahmanpour, S., Backhouse, D. and Nonhebel, H.M., 2009. Induced tolerance of *Sclerotinia sclerotiorum* to isothiocyanates and toxic volatiles from *Brassica* species. **Plant Pathology**, 58, 479-486.
- Regnier, T., Combrinck, S., Veldman, W. and Plooy, W. Du, 2014. Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, 61, 151–159.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W. and Desmarchelier, J.M., 1998. Biofumigation potential of brassicas. III. *In vitro* toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. **Plant and Soil**, 210, 103-112.
- Smilanick, J.L., and Sorenson, D. 2001. Control of postharvest decay of citrus fruit with calcium polysulfide. **Postharvest Biological. Technology**, 21, 157-168.
- Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Gabler, F.M. and Sorenson, D., 2008. Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. **Postharvest Biology and Technology**, 47, 226–238.
- Smith, B.J. and Kirkegaard, J.A., 2002. *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. **Plant Pathology**, 51, 585–593.

- Smolinska, U. and Horbowicz, M., 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. **J. Phytopathology**, 147, 119-124.
- Smolinska, U., Mora, M.J., Knudsen, G.R. and James, R.L., 2003. Isothiocyanates produced by *Brassicaceae* species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. **Plant Disease**, 87, 407-412.
- Stahmann, M.A., Link, K.P. and Walker, J.C., 1943. Mustard oils in cruciferous and their relation to resistance to clubroot. **J. Agric. Res.**, 67, 49-63.
- Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B. and Aoumar, Ait Ben A., 2012. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. **Crop Protection**, 35, 41-46.
- Troncoso, R., Espinoza, C., Sánchez-Estrada, A., Tiznado, M.E. and García, H.S., 2005. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. **Food Research International**, 38, 701-708.
- Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., Ruelas, C., García, H.S. and Tiznado-Hernández, M.E., 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85, 1427-1434.
- Wu, Hua., Zhang, Xing., Zhang, Guo-An., Zeng, Shui-Yun. and Lin, Kai-Chun., 2011. Antifungal vapour-phase activity of a combination of allyl isothiocyanate and ethyl isothiocyanate against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* infection on apples. **Journal Phytopathology**, 159, 450-455.
- Ugolini, Luisa., Martini, Camilla., Lazzeri, Luca., D'Avino, Lorenzo. and Mari, Marta., 2014. Control of postharvest grey mould (*Botrytis cinerea* Per.: Fr.) on strawberries by glucosinolate-derived allyl-isothiocyanate treatments. **Postharvest Biology and Technology**, 90, 34-39.
- UNECE, 2010. Unece standard FFV-14 citrus fruit.
<http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trade/agr/standard/fresh/FFV>. Erişim tarihi: 06.05.2015.
- Yıldız, F., Yıldız, M., Kınay, P. ve Delen, N., 2002. Altıntoplarda hasat sonrası *Penicillium* çürüklerinin biyolojik ve kimyasal kontrolü üzerinde incelemeler. **II. Bahçe Ürünlerinde Pazarlama ve Muhafaza Sempozyumu**, 24-27 Eylül 2002, Çanakkale, p.278-284.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1990 yılında Amasya'da doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Amasya ilinde tamamladı. 2008 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Mühendisliği Bölümü'nü kazandı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi'nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yılın Eylül ayında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2013 yılının Kasım ayında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2014 yılının Ocak ayında Mustafa Kemal Üniversitesi'ne yatay geçiş yaparak Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine devam etti.