



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**NEKROTROFİK BİTKİ PATOJENİ *Sclerotinia sclerotiorum*'A
KARŞI GLUKOZİNOLAT TÜREVİ ISOTHIOCYANATE'LARIN
ANTİFUNGAL ETKİLERİ**

UFUK GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

TEMMUZ- 2009

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEKROTROFİK BİTKİ PATOJENİ *Sclerotinia sclerotiorum*'A KARŞI
GLUKOZİNOLAT TÜREVİ ISOTHIOCYANATE'LARIN ANTİFUNGAL
ETKİLERİ

UFUK GÜNEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Doç.Dr. Şener KURT danışmanlığında hazırlanan bu tez 03/07/2009 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç Dr Şener KURT
Başkan

Prof Dr Ali ERKİLİÇ
Üye

Doç Dr Emine Mine SOYLU
Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Bünyamin YILDIZ
Enstitü Müdür V.

Bu çalışma, MKÜ BAP Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

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

İÇİNDEKİLER

ÖZET	III
ABSTRACT	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Fungal etmen <i>S. sclerotiorum</i> 'un izolasyonu ve patojenisitesi	16
3.2. Glucosinolate'in parçalanma ürünü olan isothiocyanate'lar (ITC'lar).....	17
3.3. <i>In vitro</i> koşullarda ITC bileşiklerinin <i>S. sclerotiorum</i> 'a karşı fungistatik ve fungisidal etkileri	18
3.3.1. ITC'ların patojenin miselyal gelişimi üzerine etkileri.....	18
3.3.2. ITC bileşiklerinin patojenin sklerot çimlenmesi üzerine etkileri	19
3.3.3. ITC bileşiklerinin apotesyum oluşumuna etkileri	19
3.3.4. Veri analizleri	20
3.4. <i>In vivo</i> koşullarda ITC bileşiklerinin <i>S. sclerotiorum</i> ' un hastalık oluşturması üzerine etkileri	20
4. ARAŞTIRMABULGULARIVE TARTIŞMA	22
4.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> izolatlarının toplanması, izolasyonu ve patojenisitesi .	22
4.2. <i>In vitro</i> koşullarda ITC bileşiklerinin <i>S. sclerotiorum</i> 'a karşı fungistatik ve fungisidal etkileri.....	24
4.2.1. ITC'ların Patojenin miselyal gelişimi üzerine etkileri	24
4.2.2. ITC bileşiklerinin patojenin sklerot çimlenmesi üzerine etkileri	32
4.2.3. ITC bileşiklerinin apotesyum oluşumuna etkileri	37
4.3. <i>In vivo</i> koşullarda ITC bileşiklerinin <i>S. sclerotiorum</i> ' un hastalık oluşturması üzerine etkileri	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	45
TEŞEKKÜR	53
ÖZGEÇMİŞ	54
EKLER	55

EK1 <i>S. sclerotiorum</i> ' un farklı saf ITC bileşiklerinin buhar fazında ortalama koloni gelişimi (mm)	55
EK2 Farklı konsantrasyonlarda Saf ITC bileşikleri içeren PDA ortamında <i>S. sclerotiorum</i> ' un miselyal gelişimi (mm)	56
EK3 Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında <i>S. sclerotiorum</i> ' un sklerotlarının çimlenme oranı (%)	57
EK4 Farklı ITC bileşikleri uygulanmış ortamda <i>S. sclerotiorum</i> ' un apotesyum oluşumu (%)	58
EK5 Farklı ITC bileşiklerinin <i>S. sclerotiorum</i> ' un apotesyum oluşumu üzerine Etkileri (%)	59

ÖZET

**NEKROTROFİK BİTKİ PATOJENİ *Sclerotinia sclerotiorum*'A KARŞI
GLUKOZİNOLAT TÜREVİ ISOTHIOCYANATE'LARIN ANTİFUNGAL
ETKİLERİ**

Lahanagiller familyasına bağlı türlerde bulunan isothiocyanate (ITC) bileşikleri, fungal patojenleri kontrol etmede potansiyel olarak yararlıdır. *In vitro* koşullarda, saf ITC bileşiklerinin her birinin *Sclerotinia sclerotiorum*' un farklı fungal gelişim parametrelerine zehirlilik düzeyi, bu bileşikleri petri kapları içinde bulunan cam filtrele (Whatman GF/C 25mm) ekleyerek veya fungusun gelişme ortamında çözerek araştırılmıştır. Dört alifatik (methyl, allyl, butyl, ethyl ITCs) ve 3 aromatik (benzyl, 2-PE, phenyl) ITC bileşiği denemeye alınmıştır. Elde edilen sonuçlar, 7 ITC bileşiğinin *S. sclerotiorum*'un farklı gelişim dönemlerinde antifungal etkilerini doğrulamıştır. *S. sclerotiorum*'un Ss31 izolatu ile biyoetkinlik denemeleri, ITC'in farklı konsantrasyonlarının buharlaşmasına izin verildiği parafilm ile sarılmış PDA petri kapları kullanılarak sürdürülmüştür.

Denemeye alınan bileşikler arasında en fazla zehirli olanlar, allyl ve benzyl ITC'lar olmuştur. Uçucu fazda miselyal gelişim, allyl, methyl ve butyl ITC bileşikleri tarafından tamamen engellenmiştir. Aromatik ITC'lar, uçucu özelliklerinin düşük olmasından dolayı petri kaplarında daha düşük zehirlilik göstermiş, ancak agar içerisinde çözündüğünde alifatik ITC'lardan daha fazla zehirli olmuştur. Benzyl ITC, 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*, büyük olasılıkla yüksek konsantrasyonda allyl ve benzyl ITC'ları çıkaran glukozinolatları içeren *Brassica juncea*, *B. carinata*, *B. nigra* and *Sinapis* spp gibi bitki türleri tarafından yüksek oranda baskılanabilecektir.

2009, 59 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Sclerotinia sclerotiorum*, Isothiocyanates, antifungal activity

ABSTRACT

**ANTIFUNGAL ACTIVITY OF GLUCOSINOLATE-DERIVED
ISOTHIOCYANATES AGAINST NECROTROPHIC PLANT PATHOGEN
*Sclerotinia sclerotiorum***

Isothiocyanates (ITC) contained in members of the Brassicaceae potentially useful in controlling fungal pathogens. *In vitro* toxicity of individual pure ITCs to different fungal growth parameters of *Sclerotinia sclerotiorum* was studied by either adding them to glass filters (Whatman GF/C 25mm) in petri dishes, or dissolving them in the growing media. Four aliphatic (methyl, allyl, butyl, ethyl ITCs) and three aromatic ITCs (benzyl, 2-PE, phenyl) were tested. The results obtained confirmed the antifungal effects of seven ITCs at different developmental stages of *S. sclerotiorum*. Bioassays with *S. sclerotiorum* isolate Ss31 were performed using PDA petri plates sealed with parafilm in which different concentrations of ITCs were allowed to volatilize. Allyl and benzyl ITCs were the most fungitoxic of those compounds tested. At volatile phase, mycelial growth were completely inhibited with allyl, methyl and butyl ITCs. Aromatic ITCs were less toxic in the petri dishes due to their lower volatility, but were more toxic than the aliphatic ITCs when dissolved in the agar. Benzyl ITC exhibited the highest inhibitory effect on sclerotial germination with 0.0095 EC₅₀ value. Effects of ITCs on sclerotial carpogenic germination of *S. sclerotiorum* increased with increasing concentrations. Pathogenic *S. sclerotiorum* in soil would likely be most suppressed by species of plants such as *Brassica juncea*, *B. carinata*, *B. nigra* and *Sinapis* spp, which contain glucosinolates that release high concentrations of allyl and benzyl ITCs.

2009, 59 pages

Key Words: *Sclerotinia sclerotiorum*, Isothiocyanates, antifungal activity

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan isothiocyanate bileşiklerin bazı karakteristik özellikleri ve ortaya çıktığı bitkiler	17
Çizelge 4.1. Hatay ilinde örtüaltı sebze bitkilerinden elde edilen <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> izolatlarının alındığı konukçu bitkiler, lokasyonlar ve patojenisitesi.....	23
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında <i>S. sclerotiorum'</i> un miselyal gelişimine etkileri (%)	26
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında <i>S. sclerotiorum'</i> un ortalama miselyal gelişimi ve fungistatik-fungitoksik etkiler	27
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin PDA ortamında <i>S. sclerotiorum'</i> un miselyal gelişimine etkileri (%)	30
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin PDA ortamında <i>S. sclerotiorum'</i> un ortalama miselyal gelişimi ve fungistatik – fungitoksik etkileri	31
Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazının <i>S. sclerotiorum'</i> un sklerot çimlenmesine etkileri (%).....	34
Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında <i>S. sclerotiorum'</i> un ortalama sklerot çimlenmesi (%) ve bu bileşiklerin fungistatik - fungitoksik etkileri.....	35
Çizelge 4.8. Saf ITC bileşiklerinin farklı uygulamalardaki EC ₅₀ değerleri	36
Çizelge 4.9. Farklı ITC bileşiklerinin <i>S. sclerotiorum'</i> un apotesyum oluşumu üzerine etkileri (%).....	39
Çizelge 4.10. <i>In vivo</i> koşullarda Farklı saf ITC bileşiklerinin <i>S. sclerotiorum'</i> un hastalık oluşturması üzerine etkileri (%)	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Farklı sebze bitkilerinde <i>S. sclerotiorum</i> ' un oluşturduğu beyaz çürüklük belirtileri ve patojenin misel ve sklerotları	3
Şekil 4.1. <i>S. sclerotiorum</i> ' un farklı saf ITC bileşiklerinin buhar fazında ortalama miselyal gelişim (mm)	24
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin (sırayla butyl, methyl, phenyl, allyl, benzyl, 2-PE ve ethyl) buhar fazında <i>S. sclerotiorum</i> ' un miselyal gelişimine olan etkileri.1 (5 µl/L), 2 (10µl/L), 3 (50µl/L), 4 (70 µl/L), 5 (100µl/L) ve K (kontrol).....	25
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda Saf ITC bileşikleri içeren PDA ortamında <i>S. sclerotiorum</i> ' un miselyal gelişimi (mm)	29
Şekil 4.4. Saf ITC bileşiklerinin PDA ortamında <i>S. sclerotiorum</i> ' un miselyal gelişimine etkileri (%).....	30
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında <i>S. sclerotiorum</i> ' un sklerotlarının çimlenme oranı (%).....	33
Şekil 4.6. Saf ITC bileşiklerinin buhar fazının <i>S. sclerotiorum</i> ' un sklerot çimlenmesine etkileri.....	34
Şekil 4.7. ITC bileşiklerinin uygulandığı sklerotlarda <i>S. sclerotiorum</i> ' un apotesyum oluşumu	37
Şekil 4.8. Farklı ITC bileşikleri uygulanmış ortamda <i>S. sclerotiorum</i> ' un apotesyum oluşumu (%).....	38
Şekil 4.9. <i>In vivo</i> koşullarda farklı saf ITC bileşikleri uygulanan biber bitkilerinde <i>S. sclerotiorum</i> ' un oluşturduğu hastalık oranı (%)	40

1. GİRİŞ

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, oldukça yıkıcı ve kozmopolit bir fungal bitki patojenidir. Bu etmen, fasulye, lahana, marul, domates, ayçiçeği gibi bitkilerin içinde bulunduğu farklı familyalardan 278 cinse ait yaklaşık 408 bitki türünde beyaz çürüklük, gövde çürüklüğü ve meyve çürüklüğü olarak adlandırılan hastalıklara neden olmaktadır. Bu fungal patojenin neden olduğu hastalıklar, 60'dan fazla farklı isimlerle anılmaktadır (Purdy, 1979). Amerika Birleşik Devletleri'nde *S. sclerotiorum*'dan kaynaklanan yıllık kaybın 200 milyon doları aşığı bildirilmiştir. Aynı ülkede 1999 yılında, ayçiçeği bitkisinde *Sclerotinia* tabla çürüklüğü hastalığından oluşan kayıp, 100 milyon dolar olarak kaydedilmiştir (Anonim, 2005). Ülkemizde ise bu patojenin neden olduğu beyaz çürüklük hastalığının bir çok farklı kültür bitkisinde oldukça yaygın olduğu ve önemli verim kayıplarına yol açtığı bildirilmiştir (Kurt ve Erkilic, 1997; Irshad ve Onoğur, 2001; Yanar ve ark., 2004; Doğu ve ark., 2007; Tok ve Kurt, 2007). *S. sclerotiorum*'un neden olduğu aşırı ürün kaybı, yüksek düzeyde konukçu dayanıklılığının olmaması ve bu patojenin oluşturduğu hastalıkların mücadelesindeki zorluklar gibi önemli faktörler, bu patojen üzerinde sürekli araştırmaların yapılmasını zorunlu kılmıştır.

Nekrotrofik ve homotallik bir patojen olan *S. sclerotiorum*'un neden olduğu hastalıkların epidemiyolojisinde sklerotlar, uzun süreli canlı kalabilme yeteneği ve kitlesel çoğalma potansiyeli gibi özellikleri nedeni ile önemli bir yere sahiptir. Sklerotlar, yılın belirli zamanlarında, fungusun genetiksel özelliğine ve değişik çevresel koşullara bağlı olarak miselyum ya da apotesyum oluşturmak üzere çimlenirler. Miselyal olarak çimlenen sklerotlar, bitki dokusunu doğrudan enfekte edebilen hifler üretirler (Bardin ve Huang, 2001; Le Tourneau, 1979). Skerotların çimlenmesi sonucu oluşan apotesyumlar ise, konukçu bitkilerin toprak üstü aksamını enfekte eden askosporlar meydana getirirler. Her iki çimlenme tipinde ortaya çıkan hifler, şeffaf, bölmeli, dallanmış ve çok çekirdekli olup kültür ortamı ve bitki üzerinde beyaz-sarı renkte miselyum oluştururlar. Bu fungus, eşeysiz spor üretmemesine karşın apotesyal hymenium veya hifler üzerinde mikrokonidiler üretebilir (Kohn, 1979). Bununla birlikte, çimlenme yeteneği olmayan bu mikrokonidilerin, fungusun biyolojisindeki rolleri ise henüz bilinmemektedir (Bolton ve ark., 2006).

Bu patojenin neden olduğu pek çok hastalık, toprak sıcaklığı (Huang ve Kozub, 1989) ve nem (Morrall, 1977) gibi belirli çevresel koşullar altında toprak yüzeyinde veya yüzeye yakın alanlarda bulunan sklerotların karpogenik çimlenmesi ile oluşan eşeyli üreme organı apotesyumlardan çıkan askosporların enfeksiyonu ile gerçekleşir (Abawi ve Grogan, 1979; Steadman, 1979). Bu askosporlar, sağlıklı bitki dokusu üzerinde bir su filmi ve dış besin kaynağı yardımı ile çimlenebilirler (Abawi ve Grogan, 1979; Lumsden, 1979). Sklerotların çimlenmesi ile oluşan miselyumlar, sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörlere bağlı olarak bitki dokusunu doğrudan hastalandırabilir (Le Tourneau, 1979). Bunlar, stoma yolu ile penetrasyon ortaya çıkmadıkça apesoryumlarla mekanik gücü ve enzimleri kullanarak konukçu bitkinin kutikulasını penetre edebilirler (Lumsden ve Dow, 1973; Lumsden, 1979). Ayrıca enfeksiyon sürecinde *S. sclerotiorum* tarafından üretilen okzalik asit, stomaların açılmasını ayarlayan savunma hücrelerinin işlevinin bozulmasına neden olur (Guimarães ve Stotz, 2004; Lumsden ve Dow, 1973).

S. sclerotiorum geniş bir konukçu dizisine sahip olduğu için bu fungusun enfektelediği tüm bitkilere ait olan tek bir belirti tipi bulunmamaktadır. Yapraklar genellikle suda haşlanmış gibi lezyonlar gösterirler (Şekil 1.1). Bunlar hızla gelişerek yaprak sapından aşağı gövdeye doğru ilerlerler. Bu lezyonlar, nekrotik dokulara dönüşürler ve daha sonra beyaz kabarık miselyum kitlesi oluştururlar. Fungus ana gövdeye doğru gelişmeye başladığında tipik olarak solgunluk ortaya çıkar. Lezyon yaşlandıkça enfekteli dokuda beyazlaşma ortaya çıkar ve çoğu zaman sadece iletim dokuları kalacak şekilde bitki dokusu parçalanarak lifli bir görünüm kazanır. Bazen bitki dokusu dışında miselyum ortaya çıkmayabilir. Sklerotlar, tipik olarak enfekteli kısmın iç kısmında, çoğunlukla gövde boşluğu içinde oluşur ancak, yüksek nemli koşullar altında bitki dokusunun yüzeyinde de meydana gelebilir (Şekil 1.1). Bunlar, bitkinin çiçeklenme döneminde ve generatif aksamında yaygın olarak ortaya çıkarlar ve bu yüzden, hasat döneminde sıklıkla bulunurlar. Hastalık, konukçu bitkide başladığında enfeksiyon, temas yolu ile diğer sağlıklı bitkilere yayılabilir (Bolton ve ark.,2006).



Şekil 1.1. Farklı sebze bitkilerinde *S. sclerotiorum*' un oluşturduğu beyaz çürüklük belirtileri ve patojenin misel ve sklerotları

S. sclerotiorum'un neden olduğu hastalıkları geleneksel olarak kontrol etmek oldukça güçtür. Hastalık çıkışının sporadik yapısı nedeniyle, bu patojenin zarar verdiği önemli konukçu bitkilerde hastalığa karşı yüksek düzeyde dayanıklılık bulunmamaktadır. Bu hastalıkla biyolojik mücadelede, otuzdan fazla fungus ve bakteri türünün *S. sclerotiorum*'a karşı antagonistik etki gösterdiği bilinmektedir (Huang ve ark., 1993; Yuen ve ark. 1991; McQuilken ve ark. 1995). Ayrıca tarla koşullarında sklerotlara saldırıp içine girerek onların parçalanmasına yol açan *Coniothyrium minitans* ve *Sporidesmium sclerotivorum* gibi bazı mikoparazitlerin etkili olduğu bildirilmiştir (Ayers ve Adams, 1981). Bununla birlikte, bu gibi biyolojik etmenlerin bazı zorlukları

bulunmaktadır. Örneğin, büyük miktarlarda inokulum üretmek amacıyla *in vitro*'da *S. sclerotiorum*'u geliştirmek güçtür (Del Rio ve ark., 2002). *S. sclerotiorum*' un sera koşullarında topraktaki inokulum yoğunluğunu düşürmeye yönelik mücadele yöntemlerinden birisi de toprak solarizasyonudur (Katan, 1981; DeVay, 1991; Kurt ve Emir, 2004, Yanar, 2005). Bunun dışında belirli organik ve inorganik maddelerin (Kalsiyum siyanamid, bitki ekstraktı, uçucu yağlar) kullanımı, *S. sclerotiorum*'un mücadelesi için önerilmektedir (Klasse, 1995; Kurt ve Erkılıç, 1997; Huang ve ark., 2006; Soylu ve ark., 2005, 2007). Ayrıca benomyl, iprodione ve procymidone gibi fungusitleri kullanarak *S. sclerotiorum*'un neden olduğu hastalıkları kimyasal yolla kontrol yöntemi uzun süredir kullanılmaktadır (Anonim, 2002). Patojenin hem miselyal hem de sklerotiyal çimlenme özelliği nedeniyle farklı mücadele şeklinin uygulanması gereklidir. Örneğin, bitkinin toprak üstü aksamının askospor enfeksiyonundan korunması, hem yaprak uygulamaları hem de askospor inokulumunun azaltılmasını gerektirir. Oysaki toprak altı bitki dokularının miselyal enfeksiyondan korunması toprak uygulamalarını zorunlu kılar (Bardin ve Huang, 2001). Ancak, bu fungusun fungusitlere karşı her zaman dayanıklılık geliştirme riski bulunmaktadır (Demir ve Delen, 1991; Gossen ve ark., 2001; Hsiang ve ark., 2007). Günümüzde dünya genelinde ve ülkemizde *S. sclerotiorum* ile birlikte diğer toprak kökenli patojenlerin mücadelesinde, geniş spektrumlu biyolojik aktiviteye sahip toprak fumigantları da kullanılmaktadır. İnsan sağlığı ve çevre konusundaki olumsuzlukları nedeniyle metil bromidin üretimi ve kullanımındaki yasal sınırlamaların uygulamaya geçirilmesi ile birlikte toprak kökenli hastalıkların mücadelesinde bunun yerini kimyasal veya kimyasal olmayan alternatif yöntemler almaya başlamıştır.

Ülkemizde örtüaltı sebze yetiştirilen alanlarda toprak kökenli patojen fungusların mücadelesinde de sıklıkla kullanılan metam sodium, toprakla temas ettiğinde methyl isothiocyanate üreten önemli bir kimyasal fumiganttır. Bu bileşik, nematod, fungal patojenler, böcekler ve yabancı otlara karşı etkili geniş spektrumlu bir biyolojik aktivite gösterir (Munnecke ve ark., 1962). Bununla birlikte bu etken madde, Capparales takımına bağlı lahanagiller familyasında yer alan brokoli, beyaz lahana, karnabahar, karalahana, şalgam, turp, kanola, kolza ve değişik hardal bitkilerinin dokularında glukozinolat olarak üretilir. İkincil bitki metabolitleri olan glukozinolatlar, önemli miktarda thioglukozid kükürt bileşikleri içerirler. Bunlar, zincir yapılarına bağlı olarak

aromatik, alifatik ve indolyl olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Wittstock ve Halkier, 2002). Glukozinolat üreten tüm bitkiler, doku içerisindeki glukozinolattan fiziksel olarak ayrılan mirosinaz enzimi de üretirler. Bu bileşikler, göreceli olarak mikroorganizmalara karşı etkili değildir. Bitki dokusu parçalandığında glikozinolatlar ve mirosinaz enzimi temas haline gelirler (Brown ve Morra, 1997). Glikozinolatların, endojen myrosinaz (thioglukosid glukohidrolaz) tarafından hidrolize olması sonucu, kimyasal yapısı ve oranları buldukları ortama göre değişen isothiocyanate (ITC), thiocyanate, nitril ve oxazolidine gibi bileşikler ortaya çıkar (Brown ve Morra, 1997; Sarwar ve ark., 1998; Fahey ve ark., 2001). Bu bileşikler, geniş spektrumlu biyolojik bir etkinliğe sahip olduğu için bu konuda yapılan son çalışmalar, nematod, bakteri, fungus ve böceklerin mücadelesinde önemli bir araç olarak düşünülen bu bileşikleri içeren bitkilerin kullanımı üzerine odaklanmıştır (Fenwick ve ark., 1983; Brown ve Morra, 1997; Rosa ve ark., 1997). ITC'lar, lahanagillerin rotasyon, yeşil gübre bitkisi olarak veya tohumunu şeklinde toprağa uygulanması sonucu ortaya çıkan ve buharlaşma özelliğine sahip olan en önemli bileşiklerdir. Glukozinolatların parçalanma ürünleri içerisinde en fazla biyolojik aktiviteye sahip olan bileşiğin ITC olması ve sentetik bileşik olan methyl ITC'ın metil bromidin yerine alternatif bir toprak fumigantı olarak kullanılması, hastalık ve zararlılarla mücadelede doğal kökenli ITC'ların kullanımını arttırmıştır (Matthiessen ve Kirkegaard, 2006). Bu ITC'ların, 20.yy'ın başından beri geniş bir organizma grubuna (Walker ve ark., 1937) karşı zehirli olduğu ve zehirliliğin, proteinlerdeki kükürt içeren gruplarla spesifik olmayan ve dönüşümsüz bir tepkiden kaynaklandığı bilinmektedir (Brown ve Morra, 1997). Ayrıca son zamanlarda bu bileşikleri içeren bitkilerin toprak kökenli patojenlerin gelişimini engellemesi olayını tanımlamak için "biyofumigasyon" terimi kullanılmaktadır (Angus ve ark., 1994; Kirkegaard ve ark., 1996; Smolinska ve ark., 1997; Kirkegaard ve Sarwar, 1998; Gimsing ve Kirkegaard, 2009).

Saf ITC'ların farklı organik yapılarına bağlı olarak antifungal etkileri, uzun süredir bildirilmektedir (Walker ve ark., 1937; Drobnica ve ark., 1967). ITC'ların fungisidal konsantrasyonları, farklı fungal türler için değişiklik göstermektedir (Brown ve Mora, 1997). Bu bileşiklere karşı farklı duyarlılıklar, aynı etmenin izolatları ve hatta yaşam döngüsünün farklı evreleri arasında da ortaya çıkar (Mari ve ark., 1993; Smith ve Kirkegaard, 2002). Bu bileşiklerin, değişik hasat sonrası patojenlerin (Mari ve ark., 1993, 2002, 2008) yanı sıra, buğday kök çürüklüğü hastalığı etmeni *Gaeumannomyces*

graminis var. *tritici* (Angus ve ark., 1994), bezelye *Aphanomyces* kök çürüklüğü patojeni *Aphanomyces euteiches* (Lewis ve Papavizas, 1971), sklerot oluşturan funguslar (Smolinska ve Horbowicz, 1999), *Fusarium oxysporum* (Smolinska ve ark., 2003), sebzelerde çökerten ve fide yanıklığına neden olan *Rhizoctonia solani* (Dhingra ve ark., 2004), domates meyvesinde hastalık oluşturan *Alternaria alternata* (Troncoso-Rojas ve ark., 2005), Lahana bitkisinde *Alternaria brassicicola* ve *A. brassicae* (Sellam ve ark., 2007) ve şekerpancarında *Rhizoctonia solani* ve buğday bitkisinde *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Motisi ve ark., 2009)'yi içine alan geniş bir toprak ve yaprak kökenli patojen grubunun gelişimini engellediği bildirilmiştir. Ancak bu bileşiklerin her birinin *Sclerotinia sclerotiorum* başta olmak üzere patojenler ve funfal gelişim parametreleri üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu, oldukça zengin bir biyofumigasyon potansiyeline sahip Lahanagiller familyasına bağlı bitkileri ıslah ederken kullanılabilecek seleksiyon ölçütleri geliştirmede önemli olacaktır.

Bu çalışmada, saf ITC'ların toprak kökenli fungal bitki patojenlerinden *S. sclerotiorum*'un misel gelişimi, sklerot çimlenmesi ve apotesyum oluşumu üzerine antifungal etkileri, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Drobnica ve ark. (1967), phenyl isothiocyanate (ITC)'ın farklı türevleri, birçok saprofitik ve parazitik fungusların yanı sıra *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* ve *Rhizopus oryzae* üzerine antifungal etkilerini *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Çalışma sonucunda denemeye alınan bu bileşiklerin pek çoğunun, sözü edilen üç fungusu karşı eşit düzeyde gelişmeyi engelleyici etki gösterdiği saptanmıştır. Buna karşılık doğal bileşik olarak benzyl ve phenylethyl ITC'ın, *R.oryzae'* ye karşı düşük etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Drobnica ve ark. (1968), ITC'ların, *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* ve *Rhizopus oryzae* gibi farklı fungal türler üzerine antifungal etkilerini araştırmak amacıyla yürüttükleri çalışmada, biphenyl (Grup A), stilbene (Grup B), azobenzene (Grup C), naphthalene (Grup D) ve daha fazla yoğunlaştırılmış aromatik hidrokarbonlar (Grup E) gruplarının türevleri olan bileşikleri kullanmışlardır. Bu bileşikler içerisinde sadece A ve D grubu bileşiklerde antifungal özellikler belirlenmiştir. B, C ve E grubu türevlerinin muhtemelen suda çok zor çözünmeleri ve moleküllerinin çok büyük olması nedeniyle sporlara ve fungusların miselyumuna antifungal etkisi olmadığı bildirilmiştir.

Levis ve Papavizas (1971), lahanada bitkisinden elde edilen ve bir miktar kükürt içeren uçucu bileşiklerin, *Aphanomyces euteiches* fungusunun farklı gelişim dönemleri üzerine etkilerini belirlemek için yürüttükleri çalışmada, ITC bileşiklerinin fungusun gelişimi, zoospor oluşumu, hareketliliği ve zoospor çimlenmesini engellemede sülfitle göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte bu uçucu bileşiklerin, fungal etmenin oospor oluşturması üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Ayrıca topraklar, karbondisülfid metanethiol, allyl ITC, methyl ITC veya methyl disülfid ile fümige edildiğinde, patojen fungusun neden olduğu bezelye kök çürüklüğü hastalığının %90' ı aşan düzeyde engellendiği bildirilmiştir.

Muehlchen ve ark. (1990), lahanagiller familyasına bağlı bitkilerin toprak uygulamalarının, bezelye bitkisinde *Aphanomyces* kök çürüklüğü hastalığına etkilerini araştırmışlardır. Bitkiler yeşil gübre olarak toprağa karıştırılmış ve bezelyelerde hastalık ve verim gibi özellikler yönünden değerlendirmeler yapılmıştır. Tarla çalışmaları

sonucunda yapılan değerlendirmelerde, beyaz hardalın kök ürklğ hastalığının Őiddetini önemli oranda azalttığı saptanmıştır.

Angus ve ark. (1994), kanola ve hint hardalı köklerinden çıkan ITC bileşiklerinin biyofumigasyon özelliklerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, bu bitkilerin köklerinden çıkan gazların, buğday kök ürklğ patojenlerinden *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* fungusunun saf kültürlerinin gelişimini engellediği saptanmıştır. Ayrıca kanola köklerinden çıkan gazların, patojenin gelişimini hint hardalı kökünden çıkan gazlardan daha çok engellediği bildirilmiştir. Bununla birlikte kurutulan köklerin yaŐ köklerden daha etkili olduğu ve kanola köklerinden methyl ITC, hint hardalı köklerinden de phenylethyl ITC gazlarının çıktığı saptanmıştır.

Mayton ve ark. (1996), uçucu fungisidal bileşikler üreten Brassica cinsine bağlı genotipleri seçmek ve allyl isothiocyanates (AITC) konsantrasyonu ile fungal gelişimin engellenmesi arasında korelasyonun olup olmadığını belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmada, 6 lahanagil türünün her birinden bir çeşidin *Fusarium sambucinum*'un gelişimini engelleme durumunu araştırmışlardır. Elde edilen verilere göre, sadece *B. nigra* ve *B. napus* türüne ait çeŐitlerin, fungal gelişimi %50 oranda engellediği bildirilmiştir. Bu çalışmada etkili olan AITC, *B. nigra*, *B. juncea* ve *B. carinata* türlerine ait genotiplerde belirlenmiştir. Ayrıca, *F. sambucinum*'un radyal gelişiminin, lahanagil yaprak dokusunda üretilen AITC konsantrasyonları ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.

Potter ve ark. (1998), Gardiner ve ark. (1999), Kirkegaard ve ark. (2000), kanola bitkisinin kök dokularında bulunan yüksek düzeydeki glikozinolatlara yönelik yürüttükleri çalıŐmalarda, bu bitkilerin toprağa karıştırılması ile toprak fungusları ve nematotların gelişimini büyük oranda baskıladığını bildirmıŐlerdir. Ayrıca kanola yeşil gübre bitkisi olarak toprağa karıştırıldığında bu bitkilerin köklerinin, biosidal ITC bileşikleri için önemli bir kaynak olduğu saptanmıştır.

Smith ve ark. (1999), lahanagiller familyasına ait kanola (*Brassica napus*) bitkisinin çürüyen artıklarının biofumigasyon olarak adlandırılan bir süreçle, toprak kökenli bitki patojenlerinin inokulumunu azalttığı düŐünülerek yürüttükleri çalışmada, kanolanın kök artıklarının toprağa karıŐtırılmasıyla toprak kökenli 3 tahıl patojeni

üzerine etkisini araştırmışlardır. Saksı denemesi şeklinde yürütülen bu çalışmada dondurularak kurutulmuş kanola köklerinin çeşitli oranlarıyla inokulum hazırlanmıştır. Kanola dokularının patojen üzerindeki etkisi, dört yapraklı dönemde buğday fide köklerindeki hastalık belirtilerinin gelişimi esas alınarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Gaeumannomyces*, *Rhizoctonia* ve *Fusarium* fungusları, kanola artıklarına *Bipolaris* patojeninden daha duyarlı bulunmuştur.

Smolinska ve Horbowicz (1999), lahanagil familyasına bağlı 9 tür ve çeşidin, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Sclerotium cepivorum* ve *Sclerotinia sclerotiorum*'un dayanıklı yapılarının canlılıklarını azaltma yeteneği konusunda *in vitro* koşullarda bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışma sonucunda, kuru bitki dokularının yeniden nemlendirilmesi sonucunda ortaya çıkan uçucu ITC bileşiklerinin, *S.cepivorum* ve *F. oxysporum*' a karşı toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte denemeye alınan 9 bitkiden 5'i, biyosit etki gösterirken şalgam bitkisi dışında diğer bitkilerden elde edilen ITC' lerin patojenlere karşı öldürücü etkisi, bu bileşiklerin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir.

Charron ve Sams (1999), *Brassica* cinsine bağlı bitki türlerinin kurutulmuş yapraklarını kullanarak domates patojeni *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani*' nin engellenmesi konusunda yaptıkları çalışmada, her iki fungusun radyal gelişmesi en çok Hint hardalı ile engellenmiştir. Bu bitkilerden GC-MS ile elde edilen uçucu bileşiklerin %90' ından fazlasını AITC oluşturmuştur. Standart AITC bileşiği kullanıldığında *P. ultimum* gelişimi, 1,1 μmolL^{-1} konsantrasyonda kısmen baskılanmış ve 2,2 μmolL^{-1} ' de ise tamamen engellenmiştir. *R. solani* ise, 1.1, 2.2 ve 3.3 μmolL^{-1} ' de kısmen baskılanmıştır. Bu çalışma sonucunda, fungal patojenlerin mücadelesinde *Brassica* türlerinin kullanılmasının ümit verici olduğu ifade edilmiştir.

Kirkegaard ve ark. (2000), Lahanagil bitkilerini kullanarak buğday bitkisinde siyah kök çürüklüğü hastalık etmeni *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*'nin biyofumigasyonu konusunda yürüttükleri 2 yıllık tarla denemeleri sonucunda, kanola ve hint hardalı bitkilerinin patojenin inokulum yoğunluğunu önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar, uygulama sezonu sırasında özellikle yağış

gibi faktörlerin, biyofumigasyon işlemine önemli katkıda bulunduğunu ifade etmişlerdir.

Smolinska (2000), lahanagil familyasına bağlı bazı bitki artıklarının *Sclerotium cepivorum*'un sklerotları ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*' nin klamidosporlarının topraktaki miktarına etkisi konusunda yaptığı çalışmada, havada kurutulup parçalandıktan sonra toprağa karıştırılmış hardal bitkisinin, fungal propagullerin canlılığını etkili bir şekilde azalttığını saptamıştır. Ayrıca, toprağa kanola bitkisinin artıklarının eklenmesi, *S. cepivorum*'un sklerotlarının sayısında önemli bir azalışa neden olurken, *F. oxysporum*'un klamidosporları üzerinde farklı etki yarattığı bildirilmiştir. Buna ek olarak bitki materyalinin toprağa karıştırılmasının, topraktaki bakteriler ve funguslarda sayısal bir artışa yol açtığı gözlenmiştir.

Irshad ve Onoğur (2001), sera koşullarında yetiştirilen domateslerde sorun oluşturan önemli patojenlerden *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Sclerotium rolfsii*' nin neden olduğu hastalıkların mücadelesine yönelik olarak brokoli bitki materyalinin, hastalık çıkışına ve topraktaki patojen propagullerinin azalmasına olan etkisini denemişlerdir. Çalışma sonucunda, brokoli bitki materyali ile benomyl fungusitinin karışım uygulamasının, hastalık şiddeti üzerinde %100 etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Lazzeri ve Manici (2001), *in vitro*' da yüksek fungitoksik özellik sergileyen parçalanma ürünleri içeren glukozinolatlara sahip lahanagiller ve Capparidaceae familyalarına ait bitkilerin yeşil gübre olarak *Pythium* sp. ve toprakta toplam fungal populasyon üzerine olan allelopatik etkilerini araştırmışlardır. Saksıda gerçekleştirilen denemede, *Pythium* ile doğal olarak bulaşık toprağa taze bitki dokuları gerçek tarla oranında karıştırılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda, yeşil gübre uygulamalarının *Pythium* sp.' nin gelişimini baskıladığı ve ayrıca toplam toprak mikrobiyal aktivitesinde artışı teşvik ettiği bildirilmiştir.

Mari ve ark. (2002), armut meyvelerinde *Penicillium expansum* fungal etmeninin neden olduğu ve maviküf olarak bilinen hastalığın mücadelesinde, hint hardalından elde edilen ally-ITC bileşiğinin patojen fungus üzerine fungistatik etkisini araştırmışlardır. Meyve üzerindeki hastalığın neden olduğu lezyonlar üzerine gaz formunda belirli oranlarda yapılan uygulamanın lezyon oluşumunu %90 oranında

azalttığı saptanmıştır. Sentetik bir fungusit olan thiabendazole' e karşı dayanıklı olduğu belirlenen bu fungusu karşı AITC bileşiğinin, alternatif olabileceği yapılan çalışma ile ortaya konmuştur.

Smith ve Kirkegaard (2002), kanola bitkisinin kökleri tarafından üretilen temel ITC bileşiklerinden biri olan 2-phenylethyl (2-PE ITC)' in, bazı fungus, oomycet ve bakterilere karşı etkileri *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda bakterilerin, 2-PE ITC'ye karşı genel olarak ökaryotik patojenlerden daha tolerant olduğu saptanmıştır. Ökaryotlar arasında *Trichoderma spp.*, 2-PE ITC'ye karşı yüksek derecede tolerant olarak bulunurken, *Aphanomyces*, *Gaeumannomyces*, *Phytophthora* ve *Theilaviopsis* gibi fungusların bu bileşiğe karşı çok duyarlı oldukları bildirilmiştir.

Harvey ve ark.(2002), *in vitro*' da hint hardalı uçucu bileşiklerinin ve allyl isothiocyanate (AITC)' larının *Sclerotium rolfsii*' nin misel gelişimi ve sklerot çimlenmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Miselyumun radyal gelişiminin ölçülmesi ile belirlenen miselyal gelişim, hardal yağı uygulamasında 0,7 ve 1,0gL⁻¹ konsantrasyonlarında, sırasıyla %50 ve %90 düzeylerinde engellenmiştir. AITC ise *Sclerotium rolfsii*' nin misel gelişimini, 4,5µmolL⁻¹'ü aşan konsantrasyonda etkili bulunmuştur. Bununla birlikte çalışmada, *S. rolfsii*' nin sklerot çimlenmesinin AITC ile engellenmesi, misel gelişimini engellemeye göre daha güç olmuştur. Diğer bir deyişle, miselyumu öldürmek için gerekli olandan yaklaşık 200 kat daha fazla konsantrasyonlarda sklerotlar, güçlükle baskılanmış ve 7. günden sonra tekrar canlılık kazanmıştır.

Smolinska ve ark. (2003), *Fusarium oxysporum*' un dört farklı izolatlarının ITC bileşiklerine karşı duyarlılıklarını belirlemek ve bu bileşiklere en duyarlı olan fungal gelişim dönemini değerlendirmek için yürüttükleri çalışmada, 2-propenyl, ethyl, butyl, phenylethyl, benzyl ve phenyl ITC bileşikleri kullanmışlardır. Bu bileşikler içerisinde propenyl ve ethyl ITC bileşikleri, patojen üzerinde yüksek düzeyde fungistatik olarak saptanmıştır. Fungusun miselyal gelişimini engelleyen propenyl ve ethyl ITC' ların aynı konsantrasyonları, tüm izolatların konidial ve klamidiospor çimlenmesini tamamen baskıladığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, diğer ITC'lardan ethyl, benzyl ve phenylethyl

bileşiklerinin, *Fusarium oxysporum* fungusunun konidi ve klamidiosporlarına karşı fungistatik olduğu saptanmıştır.

Dhingra ve ark. (2004), önemli bir toprak patojeni olan *Rhizoctonia solani*'nin mücadelesine yönelik olarak lahanagil familyasına bağlı bitkilerden çıkartılan bir kimyasal olan allyl ITC (AITC)'in kullanımıyla ilgili bir çalışma yürütmüşlerdir. Sebze fidelik toprağına yeşil gübre olarak karıştırılan lahanagil bitkilerinden çıkan AITC ile birlikte saprofit gelişen fungusların da, patojen fungusu baskılayabileceği ifade edilmiştir. Hem *in vitro* ve hem de fidelik ortamlarında kurulan denemeler sonucunda *R. solani* nin gelişimi, AITC tarafından %90 oranda kontrol altına alınmıştır. Bu çalışmada AITC' in, metil bromid fumigantına karşı iyi bir alternatif olabileceği ortaya konmuştur.

Lazzeri ve ark. (2004), lahanagiller familyasına bağlı bitkilerin içermiş oldukları yüksek biyosit özelliklerini sağlayan bazı glukozinolat parçalanma ürünleri olan ITC ve nitrillerin, bazı toprak kökenli hastalıklara karşı etkisini *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Metil bromitle toprak fümigasyonuna karşı doğal bir alternatif olarak düşünülen bu çalışmada, önce kurutulup sonra suyla nemlendirilen bazı lahanagil bitkilerinin, *Pythium spp* ve *Rhizoctonia solani* üzerinde iyi bir fungitoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, saf glukozinolat bileşiği ve saf mirosinaz enzimiyle yapılan benzer denemelerle doğrulanmıştır.

Yanar ve ark. (2004), Tokat ve Amasya çevresinde seralarda yetiştirilen hıyar bitkilerinde *S. sclerotiorum*'un neden olduğu beyaz çürüklük hastalığının mücadelesine yönelik olarak yürüttükleri çalışmada, solarizasyonla birlikte tavuk gübresinin tekli ve karışım uygulamalarının, topraktaki patojenin sklerotlarının canlılığı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda, solarizasyon uygulanan parsellerde sklerotların canlılığı önemli ölçüde düşük bulunurken, solarizasyon uygulanan parsellerle tavuk gübresi + solarizasyon uygulanan parseller arasında önemli bir fark gözlenmemiştir.

Troncoso-Rojas ve ark. (2005), domates bitkisinin meyvesinde hastalık meydana getiren bir patojen olan *Alternaria alternata*'nın mücadelesinde, benzyl ITC (BITC)' in etkisi konusunda çalışma gerçekleştirmişlerdir. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda kurulan denemeler sonucunda, patojen büyük oranda kontrol altına alınmış ve aynı zamanda

hasat ve depolama esnasında BITC kullanımının, meyve kalitesini düşürücü herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Huang ve ark. (2006), fasulye, kanola ve buğday yetiştiriciliğinde özel formüle edilmiş bir madde olan S-H karışımı ve Perlka (Kalsiyum siyanamid)'nin toprağa karıştırılması yolu ile *Sclerotinia sclerotiorum*'un apotesyumlarının kontrolündeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, patojen için konukçu bitki olarak fasulye ve kanola, konukçu olmayan bitki olarak buğday seçilmiştir. Tarla çalışması şeklinde 4 yıl süren denemelerde, düşük (30 g/m²) ve yüksek (60 g/m²) olmak üzere 2 dozda olmak üzere S-H karışımı ve Perlka uygulanmıştır. Denemeler sonucunda, parsel (m²) başına düşen apotesyum sayısı sırayla, fasulyede 42, 46 ve 182 kanolada 89,42 ve 318 buğdayda 146, 143 ve 412 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, Kanada' nın üretim alanlarında *Sclerotinia*'nın neden olduğu hastalığın mücadelesinde S-H karışımı ve Perlka' nın kullanılabileceği bildirilmiştir.

Doğu ve ark.(2007), Çanakkale' de lahanagillerden *Sclerotinia sclerotiorum*' un neden olduğu beyaz çürüklük hastalığının şiddeti ve yaygınlığını araştırmak ve izolatlar arasındaki varyasyonları saptamak amacıyla yürüttükleri çalışmada, toplam 108 parselde sörvey yapılmış ve hastalıklı parsellerde en yüksek hastalık oluşumu, % 30 olarak bulunmuştur.

Larkin ve Griffin (2007), ABD' de patates ekim alanlarında *Rhizoctonia solani* gibi toprak kökenli patojenlerin oluşturdukları hastalıkların mücadelesinde lahanagiller familyasına ait bazı bitkilerin yeşil gübre olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Sera koşullarında yapılan bu denemede, *R. solani*' nin oluşturduğu hastalık şiddetinin %20-56 oranında kontrol edildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, lahanagiller familyasına ait bitkilerin patates ekim alanlarında yeşil gübre olarak kullanılmasının toprak kökenli patojenlerle mücadelede alternatif olarak önerilebileceği bildirilmiştir.

Mazzola ve ark.(2007), hint hardalı, kanola ve yabani hardal bitkilerinden elde edilen tohum unlarının, elmalarda dikim öncesi hastalıklara neden olan toprak kökenli patojenleri baskılaması üzerine etkilerini, sera denemeleri ile araştırmışlardır. Seçilen bitkilere ait tüm tohum unlarının, *Rhizoctonia solani*'nin neden olduğu kök enfeksiyonlarını büyük oranda engellediği bildirilmiştir. Buna karşılık denemeye alınan

sadece hint hardalına ait tohum unu uygulamasının, *Pythium* türlerinin toprak popülasyonunu etkilemediği bulunmuştur.

Sellam ve ark. (2007), lahanagillerde hastalığa neden olan *Alternaria brassicicola* ve *A. brassicae* izolatlarının farklı fungal gelişim parametreleri üzerine, 2 isothiocyanate (ITC) bileşiği ile birlikte brassinin ve camalexin fitoaleksinlerinin potansiyel toksik etkilerini değerlendirmek amacı ile *in vitro* koşullarda bir çalışma yapmışlardır. Elde edilen sonuçlar, fitoaleksinlerle birlikte allyl- ve benzyl ITC bileşiklerinin, her iki *Alternaria* türünün farklı gelişim dönemlerinde antifungal etkilere sahip olduğu doğrulanmıştır. Brassinin, benzyl ve allyl ITC uygulamalarında konidi çimlenmesi ve miselyal gelişme ile karşılaştırıldığında çim tübü uzaması, çok daha duyarlı olarak bulunmuştur.

Tok ve Kurt (2007), Akdeniz bölgesi örtü altında yetiştirilen domates bitkilerinde *Sclerotinia sclerotiorum*' un neden olduğu beyaz çürüklük hastalığının popülasyon çeşitliği üzerinde Hatay, Adana, Mersin ve Antalya illerinde yürüttükleri arazi çalışmasında, hastalık yaygınlığının % 50 ve hastalık oluşumunun % 10-60 arasında olduğunu belirlemişlerdir. Popülasyon çeşitliliğini ortaya koymak için yapılan bu çalışmada, patojene ait 17 farklı miselyal uyum grubu saptanmıştır.

Fan ve ark.(2008), *In vitro* koşullarda lahanagil ve lahanagil olmayan bitki materyallerinin 28 farklı fungal bitki patojenine karşı potansiyel biofumigasyon etkisini araştırmışlardır. Bu patojenler içerisinde *Ceratobasidium fimbriata* ve *Verticillium dahliae*, biyofumigasyona karşı *S. sclerotiorum* ve *F. culmorum*'dan daha duyarlı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kullanılacak bitki dokusunun miktarının, hedef patojen türüne bağlı olarak göz önüne alınması gerektiği vurgulanmıştır.

Mari ve ark.(2008), ITC bileşiklerden olan allyl, butenyl, benzyl, 2-phenylethyl ve 4-methylthiobutyl, sertçekirdekli meyvelerden nektarin ve şeftalide *Monilinia laxa* fungusunun neden olduğu kahverengi çürüklük hastalığının mücadelesinde kullanmışlardır. Yapılan denemeler sonucunda, hastalığın büyük oranda kontrol altına alındığı ve ITC'lerin bazı fitotoksik etkilerinin olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca hasat sonrası depolamada ITC'lerden kaynaklı bir kalite kaybına rastlanmadığı ifade edilmiştir.

Njoroge ve ark.(2008), hardal ve kanola bitkilerinin toprağa karıştırılarak polietilen örtüler çekmek suretiyle toprakta bulunan *F. oxysporum*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* ve floresans *Pseudomonas* türlerinin yoğunlukları üzerine etkilerini belirlemek ve bu lahanagil bitkilerinin metil bromit ile karşılaştırıldığında karpuz bitkisinde çökerten ve *Fusarium solgunluğu* hastalıkları üzerine etkinliğini değerlendirmek için 2 tarla denemesi yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda hardal ve kanola bitkilerinin uygulandığı biyofumigasyon işleminin toprak kökenli mikroorganizmaların popülasyonunu azaltmada etkili olmadığı bulunmuştur. Bazı durumlarda *F. oxysporum* ve *Pythium* spp.' nin popülasyon yoğunluğunun, kontrole göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte floresans *Pseudomonas* türleri de uygulamalardan etkilenmemiş ve popülasyonları, metil bromit ve hiç uygulama yapılmayan parsellere göre daha yüksek saptanmıştır.

Rahmanpour ve ark. (2009), sentetik saf alifatik ve aromatik ITC'ların yanı sıra hardal tozundan üretilmiş uçucu bileşiklere karşı *S. sclerotiorum*'un tepkilerini araştırmışlardır. ITC bileşiklerinin etanolde yapılan 3 farklı seyreltme düzeyi ve petri kapaklarına damlatma yöntemi kullanılarak PDA besi ortamındaki koloni gelişimi ölçülmüş ve allyl ITC'nin 0.01, benzyl ITC'nin 0.001, butyl ITC'nin 0.1 ve phenylethyl ITC'nin 0.1 ve 0.01 seyreltmeleri, fungal gelişimi, kontrole oranla 24 saat içinde önemli oranda engellemiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Fungal etmen *S. sclerotiorum*'un izolasyonu ve patojenisitesi

Örtü altı ve açık alanda sebze yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Hatay ilinde, *S. sclerotiorum*'un her yıl hastalığa neden olduğu domates, patlıcan ve biber gibi kültür bitkilerinden etmeni elde etmek için, sklerot, misel ve doku yumuşaması gibi tipik hastalık belirtisi gösteren bitkilerin gövde ve dal örnekleri alınarak kağıtlara sarılmış ve laboratuvara getirilerek izolasyon yapıncaya kadar +4°C'de bekletilmiştir. Hastalıklı bitkiden *S. sclerotiorum*'u izole etmek için, fungusun enfekteli bitki veya bitki artıklarından toplanmış olan sklerotları kullanılmıştır. Sklerotlar, oda koşullarında havada kurutulduktan sonra nemli filtre kağıdında 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra bu sklerotlar, %1'lik NaOCL'de 2 dakika yüzeyden steril edilip steril saf suda çalkalanmıştır. Steril edilen sklerotlar, aseptik olarak parçalandıktan sonra streptomycin sulfatı (100mg/L) içeren PDA (patates dekstroz agar) ortamına aktarılmıştır. Petri kapları, sklerot çimlenmesi ve koloni gelişimi için oda sıcaklığında (20±2 °C) 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkubasyon sonunda petri kaplarında gelişen misel ve sklerotlar +4°C'de saklanmıştır.

İzolasyon sonucu elde edilen izolatların virülensliğini belirlemek için her bir saksıda 5 bitki olacak şekilde geliştirilen domates bitkisi kullanılmıştır. Her bir izolatın PDA'da 2-3 gün boyunca gelişen kolonilerinden yaklaşık 3mm² büyüklüğünde miselyal diskler alınmış, miselyal kısım alta gelecek şekilde 6 haftalık bitkinin gövdesinin kotiledon bölgesinde açılan kısma yerleştirilmiş ve nemli pamuk ile 24 saat boyunca kapalı tutulmuştur. Bu süre sonunda pamuk çıkarılmış ve bitkiler her gün su püskürtülerek nemlendirilmiştir. Kontrol bitkilere ise sadece patojen içermeyen agar disk yerleştirilmiştir. İnokule edilen ve kontrol bitkiler, gece 20°C ve gündüz 24°C'de 12 saat ışık olacak şekilde ayarlı yetiştirme odalarında 2-3 hafta süreyle gelişmeye bırakılmıştır. Bu süre boyunca, günlük ölü bitki sayıları kaydedilmiş ve bu sayılar üzerinden AUDPC (hastalık gelişim eğrisi altında kalan alan) değerleri hesaplanmıştır (Kull ve ark.,2004). Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlı ve her bir tekrarda 5 bitki olacak şekilde kurulmuştur. Patojenisite denemesi sonunda belirlenen olan en virulent izolat, çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmıştır.

3.2. Glucosinolate'in parçalanma ürünü olan isothiocyanate'lar (ITC'lar)

Denemenin tüm aşamalarında, saf kimyasal bileşikler kullanılmıştır. Bunlardan; alifatik bileşiklerden methyl, propenyl, ethyl, butenyl, pentenyl ITC'lar ve aromatik bileşiklerden benzyl ve 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 bileşikler	Bileşik grubu	Glucosinolate'in yaygın adı	Moleküler 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	Brassica kökleri
Phenyl	Aromatik	Thiocarbanil, PITC	135,19	<i>Sinapis</i> spp. (Hardal)

3.3. *In vitro* koşullarda ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*'a karşı fungistatik ve fungisidal etkileri

3.3.1. ITC'ların patojenin miselyal gelişimi üzerine etkileri

Fungal gelişim üzerine ITC'ların buhar etkisini belirlemek için denemeye alınan bileşiklerin bir seri konsantrasyonları (0.0, 5, 10, 50, 70, 100µl/L) kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar çok küçük miktarlarda oldukları için etanolde seyreltilip, 1ml'lik stok solüsyon hazırlanmıştır. PDA üzerinde 4 gün süreyle *S. sclerotiorum*'un aktif olarak geliştirilmiş olan kolonilerinden 5mm çapında miselyal diskler, mantar delici yardımı ile alınmış ve yaklaşık 10ml PDA içeren petri kaplarının (10x100mm) orta kısmına miselyal kısım alta gelecek şekilde aktarılmıştır. Her bir petri kabı, ters çevrilerek alta geçmiş olan petrinin üst kapağına, bir cam filtre (Whatman GF/C 25mm) yerleştirilmiş ve ITC'ların her bir konsantrasyonu, cam filtrelele ayrı ayrı eklenmiştir. Cam kaplar hızlı bir şekilde kapatıldıktan sonra parafilm ile sarılmıştır. Kaplar, 20-22°C'de 5 gün süre ile inkube edilmiş ve bu süre boyunca günlük ortalama koloni çapları ölçölmüş ve radyal koloni gelişimi hesaplanmıştır.

Çalışmanın diğer aşamasında ITC'ların besi ortamına eklenerek değme etkisi araştırılmış ve bunun için kimyasal bileşiklerin stok solüsyonları hazırlanmıştır. ITC'lar, 0.0,70,90,100,200µl/L konsantrasyonlarda 10ml PDA içerisine katılarak iyice karıştırılmış ve petri kaplarına dökölmüştür. Daha sonra miselyal diskler PDA üzerine yerleştirilmiş ve kaplar yukarda belirtilen koşullarda 7 gün süreyle inkube edilmiştir. İnkubasyon sonucunda, günlük ortalama koloni çapları ölçölmüş ve radyal koloni çapları hesaplanmıştır.

Denemenin diğer aşamasında ITC'ların her biri en yüksek konsantrasyonda cam filtreye 0,1µl/L ve PDA içerisine 0,3µl/L kimyasal bileşik eklenmiş ve taşıyıcı kap, yukarıda ifade edildiği gibi hemen kapatılmıştır. Kap, 72 saat sonra açılmış ve cam filtre uzaklaştırılmıştır. ITC'ların fungistatik veya fungisidal olup olmadığını belirlemek için diğer 7 gün boyunca fungusun gelişmesine izin verilmiştir. Kontrol petrilere ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır.

3.3.2. ITC bileşiklerinin patojenin sklerot çimlenmesi üzerine etkileri

S. sclerotiorum'un sklerot canlılığı üzerine ITC'ların etkilerini belirlemek amacı ile patojenin sklerotları, PDA'da 10-14 gün süreyle geliştirilen saf fungal kültürden toplanmış ve %70 etanolde, 1-2 dakika yüzeyden dezenfekte edilmiştir. Yaklaşık 5-10mm büyüklüğündeki sklerotlardan 5'er adet, PDA içeren her bir petri kabına (10x100mm) aktarılmıştır. Homojen büyüklükteki sklerotların 0.0, 5, 10, 30, 50 ve 100µl/L konsantrasyondaki ITC'lara maruz bırakılması, **3.3.1' de** belirtildiği gibi sürdürülmüştür. Kontrol petrilere ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Sklerot çimlenmesi, 7 günlük inkubasyon boyunca her gün gözlenmiştir. ITC bileşiklerinin fungistatik ve fungisidal etkilerini belirlemek için 7. günden sonra ITC uzaklaştırılmış ve sklerotlar, 5 gün daha gelişmeye bırakılmıştır. Sklerotların canlılığını belirlemek için bu sklerotlar, %1.5'lik NaOCL'de 2 dakika yüzeyden dezenfekte edilip saf suda durulandıktan sonra PDA içeren petrilere aktarılmış ve 22°C'de 5 gün süreyle inkubasyondan sonra çimlenme oranı kaydedilmiştir.

3.3.3. ITC bileşiklerinin apotesyum oluşumuna etkileri

ITC bileşiklerinin patojen fungusun sklerotlarının apotesyum oluşturması üzerine etkilerini belirlemek için Fawzy (1982) ile Müller ve ark.(1985)'in önerdiği yöntem değiştirilerek kullanılmıştır. Bu yöntemde, içerisinde 100g dere kumu bulunan 190ml'lik cam kavanozlar, 120°C'de 15 dakika süreyle otoklav edilmiştir. Ortamın nemliliğini sağlamak için kavanozdaki ortam, steril saf su ile doymuş hale getirilmiştir. Daha sonra *S. sclerotiorum*'un 7-10 günlük saf kültürlerinden geliştirilen sklerotlar, %70'lik etanolde 1-2 dakika yüzeyden dezenfekte edilip steril saf suda durulanmış ve birkaç saat kurumaya bırakılmıştır. Bu sklerotlardan her bir kavanoza 10 adet olacak şekilde, ortam içine hafifçe bastırarak yerleştirilmiştir. ITC'ların her bir konsantrasyonu (0.0,5,10,30,100 µl/L), sklerot içeren kavanozlara pipetle uygulandıktan sonra kapakları hemen kapatılmış ve gece 20°C ve gündüz 24°C'de 12 saat ışık (4800 lüks) olacak şekilde ayarlanmış iklim kabininde (PERCIVAL, USA) 10-14 hafta gelişmeye bırakılmıştır. Bu süre boyunca apotesyum oluşumları gözlenmiş ve gelişme gösterenler

kaydedilmiştir. Kontrol kavanozlara ise herhangi bir ITC uygulaması yapılmamıştır. Apotesyum oluşturmeyen sklerotlar alınarak yüzeyden dezenfekte edilip durulanıp kurutulduktan sonra PDA içeren petri kaplarına aktarılıp 7-10 günlük inkubasyondan sonra canlılık yönünden değerlendirilmiştir.

3.3.4. Veri analizleri

S. sclerotiorum'un, her bir konsantrasyonun her bir uygulaması sonunda sahip olduğu EC₅₀ değeri (fungal gelişmeyi %50 azaltan etkili konsantrasyon), SAS istatistik programı ile log₁₀ ITC konsantrasyonuna karşı gelişimin engellenme oranı üzerinden regrasyon analizi yapılarak hesaplanmıştır.

Misel gelişimi, sklerot çimlenmesi ve apotesyum oluşumu denemeleri, her uygulamada 3 tekrar olacak şekilde düzenlenmiş ve tüm denemeler, 2 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen tüm veriler, varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar, LSD testine göre (P>0.05) karşılaştırılmıştır.

3.4. *In vivo* koşullarda ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*' un hastalık oluşturması üzerine etkileri

ITC'ların *S. sclerotiorum*'un hastalık oluşturması üzerine fumigant etkisini sera koşullarında belirlemek için, *in vitro* koşullarda misel ve sklerot çimlenmesi denemeleri sonucunda patojene karşı yüksek etki gösteren konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu amaçla, PDA' da geliştirilmiş 10-14 günlük saf kültürlerden elde edilen sklerotlar, yüzeyden dezenfekte edilip durulanarak kurumaya bırakılmıştır. İnokulum olarak seçilen 20 adet sklerot, içerisinde sulanmış torf-perlit-steril dere kumu (1:1:2) karışımı bulunan 15cm'lik her bir saksıya aktarılmış ve 1 hafta boyunca beklenerek ortamı kolonize etmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda, ITC bileşiklerinin 1 µl ve 2 µl olmak üzere 2 konsantrasyonu, nemli saksı toprağına pipetle uygulanmış ve üzeri polietilen torbalarla hemen kapatılmıştır. Saksılar, 14 gün boyunca kapalı tutulduktan sonra torbalar açılmış ve saksı toprağı birkaç gün havalandırılmıştır. Daha sonra Sera Demre biber çeşidine ait 14-21 günlük fideler, her bir saksıda 5 bitki olacak şekilde şaşırtılmıştır. Kontrol saksılara ise herhangi bir ITC uygulanmamıştır. İnokule edilen ve

kontrol saksılar, gece 20°C ve gündüz 24°C'de 12 saat ışık (4800 lük) olacak şekilde ayarlanmış iklim kabininde 10-14 hafta gelişmeye bırakılmıştır. Tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak kurulan denemede, her bir uygulama için 3 saksı ve her saksıda 5 bitki olacak şekilde toplam 15 bitki kullanılmıştır. Yaklaşık 4 haftalık gelişimden sonra sağlam ve ölü bitkiler kaydedilerek, hastalık oranı (%) ve ITC bileşiklerinin etkileri (%) hesaplanmıştır. Tüm verilere varyans analizi uygulandıktan sonra ortalamalar, LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *Sclerotinia sclerotiorum* izolatlarının toplanması, izolasyonu ve Patojenisitesi

Örtüaltı ve açık alanda sebze yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Hatay ili ve ilçelerinde, kültür bitkilerinde beyaz çürüklük yapan *S. sclerotiorum* fungusuna ait izolatları toplamak amacıyla sörvey çalışması yapılmıştır. Sörvey sırasında bölgede bu patojenin sıklıkla hastalık oluşturduğu domates, biber, fasulye, marul, kavun gibi bitkilerden etmeni izole etmek için bitki örnekleri toplanmıştır. Sebze üretim alanlarında sklerot, misel ve doku yumuşaması gibi tipik hastalık belirtisi (Şekil 1.1) gösteren bitkilerin gövde, dal ve meyve örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu 2008 yılı içerisinde Hatay ve ilçelerinde *S. sclerotiorum* fungusuna ait toplam 37 izolat elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Çizelge 4.1’ de görüleceği gibi bu izolatların yaklaşık %92’ si domates bitkisinden elde edilirken diğer izolatlar, marul, fasulye ve kavun bitkilerinden izole edilmiştir. Örtü altında domates yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgemizde, izolatların çoğunluğu yüksek tünellerden sağlanmıştır.

İzolasyon sonucu elde edilen izolatların virülensliğini belirlemek için her bir saksıda Aspandos çeşidi domates bitkisine ait 5 bitki geliştirilmiştir. Bu bitkilerin kotiledon bölgesine uygulanan patojen inokulasyonundan 3 hafta sonra yapılan patojenisite değerlendirmesinin sonucunda, AUDPC değeri olarak Meydan köyünden alınan Ss31 nolu izolat, en yüksek virülensliğe sahip olurken, 14 izolat 90 AUDPC değeri ile aynı grup içerisinde yer almıştır. Diğer izolatlar ise 70-85 AUDPC değerleri arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Hatay ilinde örtüaltı sebze bitkilerinden elde edilen *S. sclerotiorum* izolatlarının alındığı konukçu bitkiler, lokasyonlar ve patojenisitesi

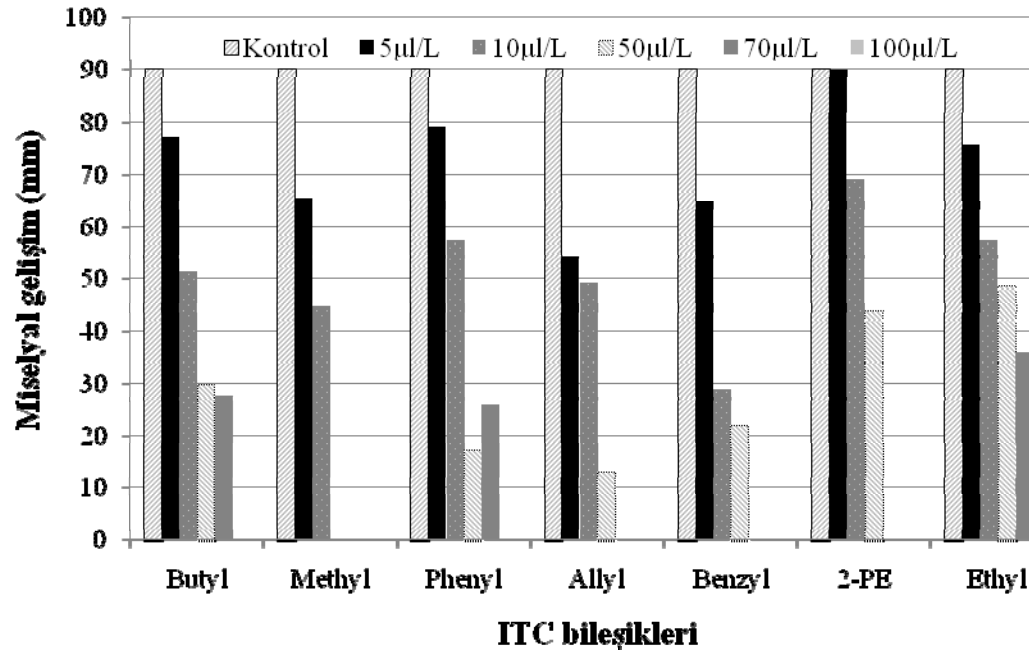
İzolat No	Konukçu bitki	Örnek alınan yer	Kaynak	AUDPC
Ss1	Domates	Kırıkhan	Tünel	80 d*
Ss2	Domates	Antakya	Tünel	75 ef
Ss3	Marul	Dörtyol	Tünel	90 b
Ss4	Domates	Samandağ	Tünel	90 b
Ss5	Domates	Samandağ	Tünel	90 b
Ss6	Domates	Samandağ	Tünel	90 b
Ss7	Fasulye	Anayazı	Tünel	70 g
Ss8	Domates	Antakya	Tünel	70 fg
Ss9	Domates	Samandağ	Tünel	85 c
Ss10	Kavun	Alahan	Tünel	70 g
Ss11	Domates	Serinyol	Sera	70 fg
Ss12	Domates	Serinyol	Sera	75 ef
Ss13	Domates	Serinyol	Sera	75 ef
Ss14	Domates	Serinyol	Sera	80 d
Ss15	Domates	Serinyol	Sera	75 e
Ss16	Domates	Serinyol	Sera	80 d
Ss17	Domates	Arsuz	Sera	70 g
Ss18	Domates	Arsuz	Sera	70 g
Ss19	Domates	Arsuz	Sera	70 g
Ss20	Domates	Arsuz	Sera	70 g
Ss21	Domates	Arsuz	Sera	70 g
Ss22	Domates	Arsuz	Sera	70 g
Ss23	Domates	Samandağ	Sera	80 d
Ss24	Domates	Samandağ	Sera	90 b
Ss25	Domates	Samandağ	Sera	90 b
Ss26	Domates	Meydan Köyü	Sera	90 b
Ss27	Domates	Meydan Köyü	Sera	90 b
Ss28	Domates	Meydan Köyü	Sera	80 d
Ss29	Domates	Meydan Köyü	Sera	80 d
Ss30	Domates	Meydan Köyü	Sera	85 c
Ss31	Domates	Meydan Köyü	2.Sera	100 a
Ss32	Domates	Meydan Köyü	2.Sera	90 b
Ss33	Domates	Meydan Köyü	2.Sera	90 b
Ss34	Domates	Meydan Köyü	2.Sera	90 b
Ss35	Domates	Meydan Köyü	2.Sera	90 b
Ss36	Domates	Meydan Köyü	2.Sera	90 b
Ss37	Domates	Meydan Köyü	2.Sera	90 b

*Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine (P=0.05) göre aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

4.2. *In vitro* koşullarda ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*'a karşı fungistatik ve fungisidal etkileri

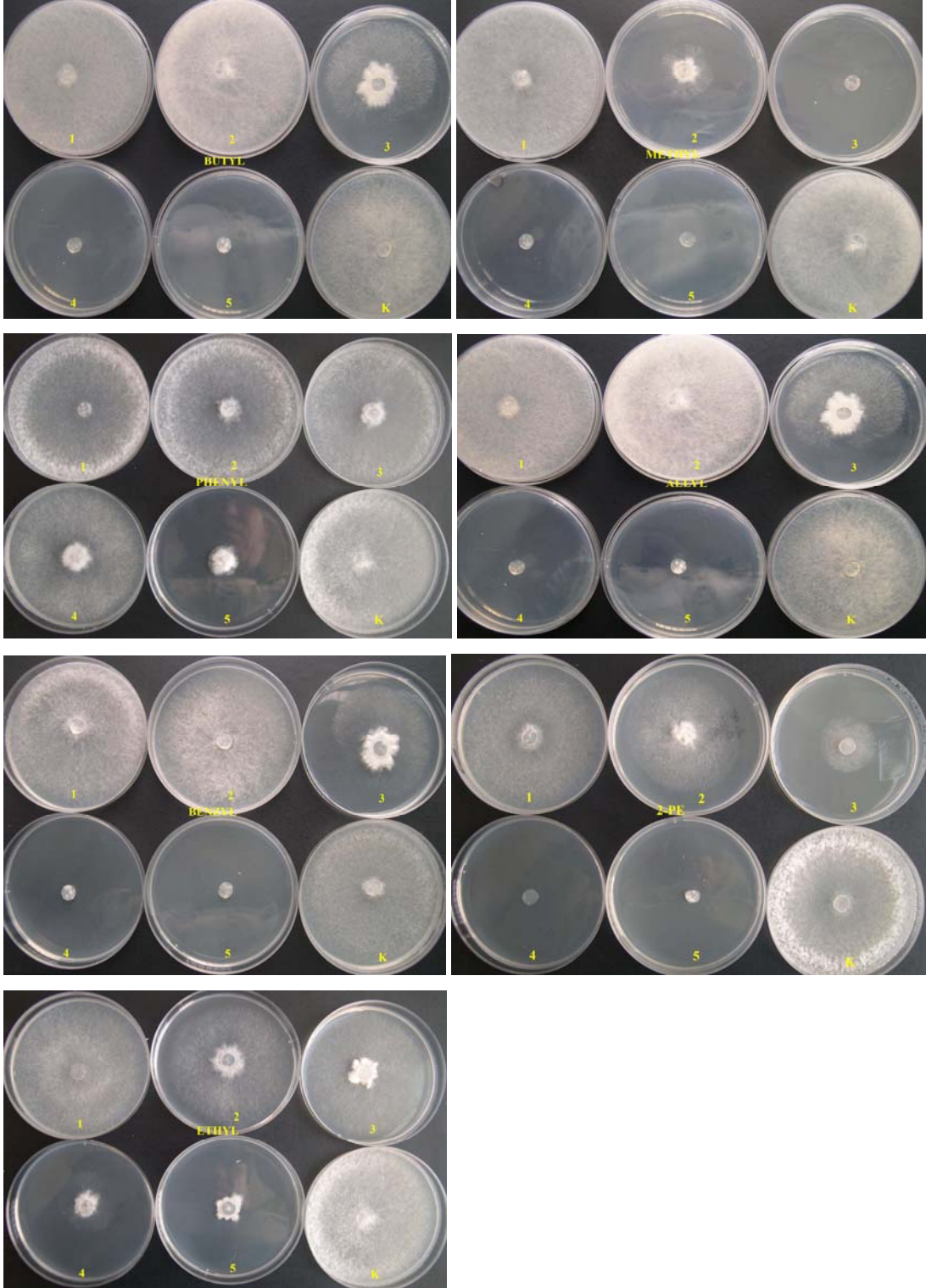
4.2.1. ITC'ların Patojenin miselyal gelişimi üzerine etkileri

Fungal gelişim üzerine ITC'ların buhar etkisini belirlemek için bileşiklerin bir seri konsantrasyonları (0,0, 5, 10, 50, 70 ve 100 µl/L) kullanılmıştır. *S. sclerotiorum*' un yüksek düzeyde virulent Ss31 nolu izolatının kullanıldığı çalışmada, 20-22°C'de 5 gün süre ile inkubasyon yapılmış ve bu süre boyunca günlük ortalama koloni çapları ölçülerek radyal koloni gelişimi hesaplanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *S. sclerotiorum*' un farklı saf ITC bileşiklerinin buhar fazında ortalama miselyal gelişim (mm)

Şekil 4.1. ve 4.2' de buhar fazında ITC' ların *S. sclerotiorum*' un misel gelişimi incelendiğinde, methyl' in 10 µl/L konsantrasyonundan sonra patojenin misel gelişimi gözlenmezken, allyl, benzyl ve 2-Phenylethyl (2-PE)' in 50µl/L konsantrasyonlarından sonra herhangi bir miselyal gelişme saptanamamıştır. Bununla birlikte tüm ITC' ların, 100µl/L konsantrasyonda fungusun misel gelişimi ortaya çıkmamıştır.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin (sırayla butyl, methyl, phenyl, allyl, benzyl, 2-PE ve ethyl) buhar fazında *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimine olan etkileri. 1 ($5\mu\text{l/L}$), 2 ($10\mu\text{l/L}$), 3 ($50\mu\text{l/L}$), 4 ($70\mu\text{l/L}$), 5 ($100\mu\text{l/L}$) ve K (kontrol)

ITC bileşiklerinin buhar fazında *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimine etkileri (%) göz önüne alındığında (Çizelge 4.2), 5 µl/L konsantrasyonda en yüksek etkiye allyl sahip olurken, en düşük etkiyi ethyl göstermiştir. Diğer bileşikler benzer etkiyi gösterdikleri için istatistiksel olarak hemen aynı grupta yer almıştır. Konsantrasyon 10 katı arttırıldığında ise (50 µl/L), en yüksek etkileri, 100,0, 87,0, 70,3 ve 70,0 ile sırasıyla methyl, allyl, butyl ve phenyl ITC' lar izlemiştir.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimine etkileri (%)

Uygulama	Konsantrasyonlar (µl/L)				
	5	10	50	70	100
Butyl	22,8 b*	48,7 b	70,3 c	72,3 bc	100,0 a
Methyl	34,7 ab	55,3 b	100,0 a	100,0 a	100,0 a
Phenyl	20,8 bc	42,8 bc	70,0 c	74,2 b	100,0 a
Allyl	45,7 a	50,7 b	87,0 b	100,0 a	100,0 a
Benzyl	35,0 ab	71,2 a	78,2 bc	100,0 a	100,0 a
2-PE	24,3 b	42,7 bc	51,3 d	64,0 c	100,0 a
Ethyl	5,0 c	30,8 c	56,0 d	100,0 a	100,0 a

* Aynı sütun içerisinde farklı harfleri içeren ortalamalar, LSD (P<0,05) testine göre birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

Denemenin bu aşamasında ITC'ların her biri en yüksek konsantrasyonda filtreye eklenmiş ve petri kabı, yukarıda ifade edildiği gibi hemen kapatılmıştır. Kap, 72 saat sonra açılmış ve cam filtre uzaklaştırılmıştır. ITC'ların fungistatik veya fungisidal olup olmadığını belirlemek için diğer 7 gün boyunca fungusun gelişmesine izin verilmiştir. Kontrol petrilere ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Petri kaplarındaki gelişmeler incelendiğinde (Çizelge 4.3), ITC'ların bazı konsantrasyonlarında gelişme devam ederken bazı konsantrasyonlarda herhangi bir gelişme gözlenmemiştir. Çizelge 5'de görüldüğü gibi butyl, phenyl ve ethyl 100µl/L konsantrasyonda fungistatik etkiye sahip olurken, allyl ve benzyl 70µl/L' de fungistatik, 100µl/L' de fungitoksik etki göstermiştir. Bununla birlikte en düşük konsantrasyonda fungistatik etki, 50µl/L ile

methyl' de görülürken, en yüksek konsantrasyonda ise 100µl/L ile ethyl' de saptanmıştır.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında *S. sclerotiorum*' un ortalama miselyal gelişimi ve fungistatik - fungitoksik etkiler

Uygulama	Kontrol	10	Konsantrasyonlar (µl/L)			
			30	50	70	100
Butyl	90,0	77,2	51,5	29,7	27,7 *	0,0 *
Methyl	90,0	65,3	44,7	0,0 *	0,0 **	0,0 **
Phenyl	90,0	79,2	57,2	17,3	25,8	0,0 *
Allyl	90,0	54,3	49,3	13,0	0,0 *	0,0 **
Benzyl	90,0	65,0	28,8	21,8	0,0 *	0,0 **
2-PE	90,0	90,0	69,2	44,0	0,0 **	0,0
Ethyl	90,0	75,7	57,3	48,7	36,0	0,0 *

* Fungistatik etki, ** Fungitoksik etki

^xAynı sütun içerisinde farklı harfleri içeren ortalamalar, LSD (P<0,05) testine göre birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

Son yıllarda bitkisel üretimde sorun olan toprak kökenli patojenlerin neden olduğu hastalıkların mücadelesinde biyofumigasyon amacıyla yeşil gübre bitkisi olarak Capparales takımına bağlı lahanagil familyasına ait bitki türlerinin kullanımı oldukça yoğun bir şekilde dikkati çekmektedir. Bu bitkilerin dokularında ikincil metabolit olarak üretilen glikozinolatlar, dokunun parçalanması ile myrosinaz enzimi tarafından hidrolize olarak isothiocyanate, thiocyanate, nitril ve oxazolidine'e parçalanır. Bunlar içerisinde ITC'ların fungal miselyumun gelişimini engellemesi üzerine birçok çalışmalar gözlenmektedir (Mari ve ark., 1993; Sarwar ve ark., 1998).

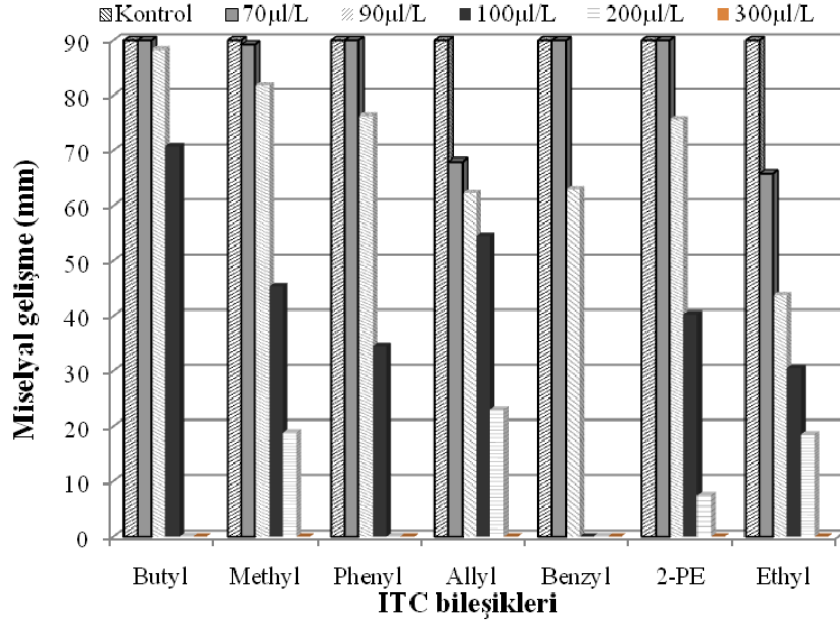
In vitro koşullarda ITC'ların buhar fazında *S. sclerotiorum*'un miselyal gelişimlerine etkisi incelendiğinde, en düşük konsantrasyonda allyl ITC, patojenin miselyal gelişimini engellemede en yüksek aktiviteye sahip olmuştur. Artan konsantrasyona bağlı olarak allyl ile birlikte methyl ve butyl ITC'lar, fungal koloninin radyal gelişimini kontrole oranla yüksek düzeyde engellemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, patatestte toprak kökenli hastalıkların mücadelesinde *Brassica* cinsine bağlı türlerin

çıkardığı uçucu bileşiklerin *S. sclerotiorum*'un PDA ortamında radyal koloni gelişimini %90,2 oranında engellediğini bildiren Larkin ve Griffin (2007)'in bulguları ile uyum içerisindedir. Ayrıca bu veriler, PDA'da geliştirilen *S. sclerotiorum*'un, saf ITC'lar ve hardal tozundan üretilmiş uçucu bileşiklere karşı toleransı incelendiğinde, bunlardan allyl, benzyl, butyl ve phenylethyl ITC'ların koloni gelişimini 24 ve 72 saat içinde önemli ölçüde engellediğini bildiren Rahmanpour ve ark. (2009) tarafından da desteklenmektedir. *Fusarium oxysporum*'un farklı gelişim dönemlerine saf ITC bileşiklerinin zehirlilik düzeyini belirlemek amacıyla yürütülen benzer bir çalışmada (Smolinska ve ark., 2003), denemeye alınan ITC bileşiklerinden propenyl, ethyl ve buthyl ITC'in patojenin miselyal gelişimi üzerine en etkili bileşikler olduğu ve bu etkinin fungitoksik değil fungistatik olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak lahanagiller familyasına ait hint hardalı gibi bitki türlerinin yapraklarında bulunan allyl ITC'in konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olarak *Fusarium sambucinum*, başta olmak üzere *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Colletotrichum coccodes*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria brassicicola* ve *A. brassicae* gibi patojenlerin radyal koloni gelişimini baskıladığı, birçok biyoetkinlik çalışmaları ile ortaya konmuştur (Issiki ve ark., 1992; Mayton ve ark., 1996; Charron ve Sams, 1999; Smolinska ve Horbowicz, 1999; Harvey ve ark., 2002; Smolinska ve ark., 2003; Sellam ve ark., 2007). Ayrıca, günümüzde Allyl ITC'ın genel bir toprak fumigantı olarak doğrudan kullanımı önerilmektedir (Minuto ve ark., 1999). Benzer grupta yer alan methyl ITC, ticari fumigant olarak toprakta metam sodyum tarafından salınmaktadır.

Denemeye alınan bileşiklerin en yüksek konsantrasyonda gelişimi engelleme durumu ele alındığında allyl ile birlikte methyl ve benzyl ITC bileşikleri, *S. sclerotiorum* üzerinde fungitoksik etkiye sahip olurken butyl, phenyl ve ethyl ITC'lar patojenin misel gelişimi üzerinde fungistatik etki göstermiştir. Allyl ITC içeren hind hardalı kullanılarak yapılan bir çalışmada (Mayton ve ark., 1996), *Fusarium sambucinum*'un miselyal gelişimi üzerine Allyl ITC'in yüksek konsantrasyonlarda fungitoksik etki gösterdiği bildirilmiştir.

S. sclerotiorum'un fungal gelişimi üzerine ITC'ların değme etkisini PDA besi ortamında belirlemek için, bileşiklerin bir seri konsantrasyonları (0,0,70, 90, 100, 200 ve 300µl/L) kullanılmıştır. Bu bileşikler, PDA besi ortamına karıştırıldıktan sonra 20-

22°C’de 5 gün süre ile inkube edilmiş ve bu süre boyunca günlük ortalama koloni çapları ölçülerek radyal koloni gelişimi hesaplanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda Saf ITC bileşikleri içeren PDA ortamında *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimi (mm)

Şekil 4.3’ de görüleceği gibi, 100µl/L konsantrasyondan itibaren benzyl gelişimi engellerken, diğer bileşikler, 2 kat daha fazla konsantrasyonda miselyal gelişimde etkili olmuştur. Bununla birlikte 300µl/L konsantrasyonda tüm bileşikler, *S. sclerotiorum*' un gelişimini tamamen engellemiştir.

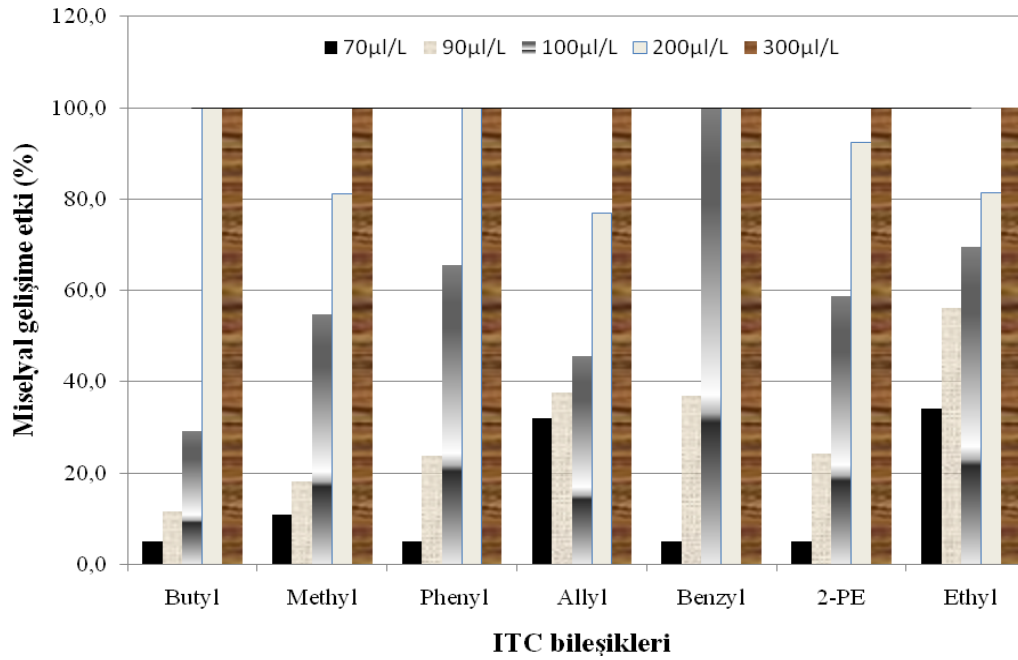
Farklı ITC bileşiklerinin PDA ortamına karıştırıldığı durumda *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimine etkileri (%) incelendiğinde (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4), tüm bileşikler 300µl/L konsantrasyonda *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimini %100 etkilemiştir. Öte yandan en düşük konsantrasyonda (70µl/L), bileşikler içerisinde sadece allyl ve ethyl yüksek etki göstermiştir. Diğer tüm konsantrasyonlarda tüm bileşikler artan konsantrasyonlarda giderek artan etkiler göstermişlerdir.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin PDA ortamında *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimine etkileri (%)

Uygulama	Konsantrasyonlar ($\mu\text{L/L}$)				
	70	90	100	200	300
Butyl	5,0 b*	11,7 b	29,2 f	100,0 a	100,0 a
Methyl	10,8 b	18,2 b	54,7 d	81,2 b	100,0 a
Phenyl	5,0 b	23,7 b	65,5 bc	100,0 a	100,0 a
Allyl	32,0 a	37,7 ab	45,5 e	77,0 b	100,0 a
Benzyl	5,0 b	37,0 ab	100,0 a	100,0 a	100,0 a
2-PE	5,0 b	24,3 b	59,7 cd	92,5 a	100,0 a
Ethyl	34,2 a	56,2 a	69,5 b	81,5 b	100,0 a

* Aynı sütun içerisinde farklı harfleri içeren ortalamalar, LSD ($P<0,05$) testine göre birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

Patojen üzerine %100 etkinin görüldüğü 100 $\mu\text{L/L}$ konsantrasyonda benzyl ilk sırayı alırken bunu, %69,5, %65,5 ve %59,7 ile sırasıyla ethyl, phenyl ve 2-PE isothiocyanate bileşikleri izlemiştir.



Şekil 4.4. Saf ITC bileşiklerinin PDA ortamında *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimine etkileri (%)

Denemeye alınan ITC bileşiklerinin patojen misel gelişimi üzerine fungistatik ve fungitoksik etkileri karşılaştırıldığında (Çizelge 4.5), methyl, allyl, 2-PE ve ethyl 300µl/L konsantrasyonda fungistatik olarak bulunurken, butyl, phenyl ve benzyl aynı konsantrasyonda fungitoksik olarak saptanmıştır. Öte yandan Butyl, phenyl ve benzyl 200µl/L konsantrasyonda fungistatik olarak ta bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin PDA ortamında *S. sclerotiorum*' un ortalama miselyal gelişimi ve fungistatik - fungitoksik etkileri

Uygulama	Konsantrasyonlar (µl/L)					
	Kontrol	70	90	100	200	300
Butyl	90,0	90,0 a ^x	88,3 a	70,8 a	0,0 b*	0,0 a**
Methyl	90,0	89,2 a	81,8 a	45,3 c	18,8 a	0,0 a*
Phenyl	90,0	90,0 a	76,3 a	34,5 ed	0,0 b*	0,0 a**
Allyl	90,0	68,0 b	62,3 ab	54,5 b	23,0 a	0,0 a*
Benzyl	90,0	90,0 a	63,0 ab	0,0 f*	0,0 b*	0,0 a**
2-PE	90,0	90,0 a	75,7 a	40,3 cd	7,5 b	0,0 a*
Ethyl	90,0	65,8 b	43,8 b	30,5 e	18,5 a	0,0 a*

* Fungistatik etki, ** Fungitoksik etki

^xAynı sütun içerisinde farklı harfleri içeren ortalamalar, LSD (P<0,05) testine göre birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

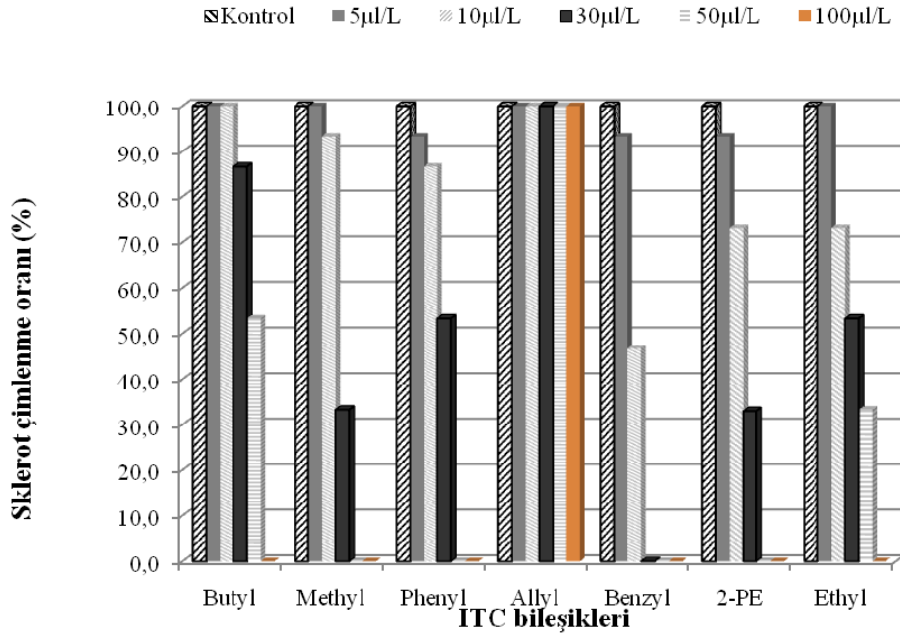
ITC bileşiklerinin PDA besi ortamına karıştırıldıktan sonra *S. sclerotiorum*'un radyal gelişime etkisinin araştırıldığı aşamada, buhar fazına göre daha yüksek konsantrasyonlar kullanılmış ve bileşiklerin, patojenin koloni gelişimini tamamen engellemesi için gerekli konsantrasyonun 3 katı olması gerektiği saptanmıştır. Her iki deneme aşamalarında yer alan 100µl/L konsantrasyonu karşılaştırıldığında, buhar fazında misel gelişimi %100 düzeyinde engellenirken, PDA ortamına karıştırıldığında patojenin radyal gelişimi, %100 oranında sadece benzyl ITC bileşiği tarafından engellenmiş ve bunu ethyl ve phenyl ITC izlemiştir.

Buhar fazında ve agar içerisine karıştırılarak çözünmüş ITC'ler, alifatik (methyl, allyl, butyl, ethyl) ve aromatik (benzyl, 2-PE,phenyl) bileşikler olarak *S. sclerotiorum* üzerinde zehirlilik seviyesi yönünden farklı sonuçlar verebilmektedir. Agar içerisinde

çözünmüş ITC bileşikleri kullanarak yapılan denemelerde benzyl gibi aromatik ITC'ların, diğerlerine göre 20 kat daha fazla zehirli olduğu bulunmuştur (Drobnica ve ark., 1967). Bu sonuçlar, elde ettiğimiz bulgularla uyum içerisinde görülmektedir. Ayrıca bunun nedeninin, aromatik ITC'ların düşük orandaki uçuculuğunun ITC konsantrasyonunda yavaş bir artışa yol açmasından ve büyük olasılıkla katılaşmadan sonra ITC'ların tüm agar yüzeyinde düzenli dağılımından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Sarwar ve ark.,1998). Aynı çalışmada, aromatik ITC'ların agar içinde çözüldüklerinde alifatik ITC bileşiklerinden daha fazla zehirli olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ITC'lara karşı fungus ve fungus benzeri organizmaların duyarlılığı incelendiğinde, *Gaeumannomyces* en duyarlı, *Rhizoctonia* ve *Fusarium* orta düzey, *Bipolaris* ve *Pythium* en düşük duyarlılık gösteren patojenler olarak belirlenmiştir. Ayrıca *Pythium*'un agar içinde çözülmüş ITC'lara karşı diğer funguslardan 2-16 kat daha dayanıklı olduğu kaydedilmiştir.

4.2.2. ITC bileşiklerinin patojenin sklerot çimlenmesi üzerine etkileri

S. sclerotiorum'un sklerot canlılığı üzerine ITC'ların etkilerini belirlemek amacı ile patojenin sklerotları, PDA'da geliştirilip dezenfekte edildikten sonra farklı konsantrasyonlardaki ITC'lara maruz bırakılmıştır. Sklerot çimlenmesi, 7 günlük inkubasyon boyunca her gün gözlenmiş ve 5. günde çimlenme oranı belirlenmiştir (Şekil 4.5). Şekil 4.5'de görüldüğü gibi kontrol petrielerde bulunan tüm sklerotlar çimlendikten sonra yapılan değerlendirme sonucunda, allyl bileşiğinin tüm konsantrasyonunda sklerot çimlenmesinin gerçekleştiği saptanmıştır. Bununla birlikte en düşük konsantrasyon olan 5µl/L' de phenyl, benzyl ve 2-PE dışında kalan diğer tüm ITC bileşikleri uygulanan petrielerde sklerotların %100' ü çimlenmiştir. Konsantrasyon 2 katına çıkarıldığında (10µl/L), en düşük sklerot çimlenme oranı sırasıyla, benzyl, 2-PE, ethyl ve phenyl' de bulunmuştur. Öte yandan 50µl/L konsantrasyonda methyl, phenyl, benzyl ve 2-PE bileşiklerinin uygulandığı petrielerde sklerot çimlenmesi görülmemiştir. En yüksek konsantrasyonda (100µl/L), allyl dışında tüm bileşikler sklerot çimlenmesini tamamen engellemiştir.



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında *S. sclerotiorum*' un sklerotlarının çimlenme oranı (%)

ITC bileşiklerinin fungistatik ve fungisidal etkilerini belirlemek için 5. günden sonra ITC uzaklaştırılmış ve sklerotlar, 3 gün daha gelişmeye bırakılmıştır. Sklerotların canlılığını belirlemek için bu sklerotlar, %1.5'lik NaOCl'de 2 dakika yüzeyden dezenfekte edilip saf suda durularıp kurutulduktan sonra PDA içeren petrilere aktarılmış ve 22°C'de 5 gün süreyle inkubasyondan sonra çimlenme oranı kaydedilmiştir.

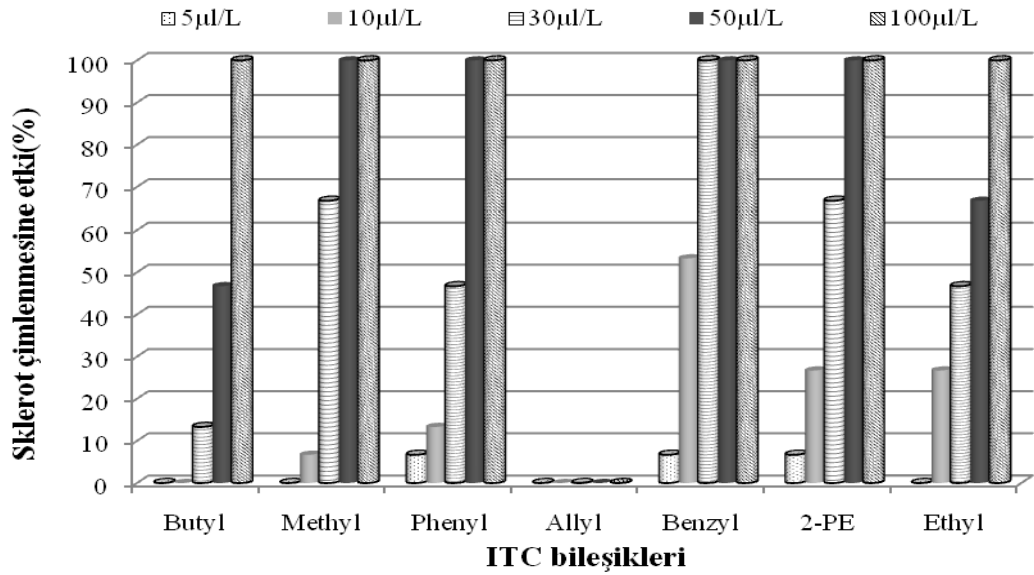
S. sclerotiorum' un sklerot çimlenmesine etkileri yönünden ITC bileşikleri ayrı ayrı incelendiğinde (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6), allyl dışındaki bileşikler farklı düzeylerde etkiler göstermiştir. Patojen fungusun sklerot çimlenmesinin, saf ITC bileşiklerinin buhar fazında tamamen engellenmesi, 30µl/L konsantrasyonunda benzyl ITC ile gerçekleşmiştir. Yüksek uçuculuk özelliğine sahip alifatik bileşiklerden olan allyl ITC'nin sklerot çimlenmesine herhangi bir etkisi bulunmamıştır.

Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazının *S. sclerotiorum*' un sklerot çimlenmesine etkileri (%)

Uygulama	Konsantrasyonlar (µl/L)				
	5	10	30	50	100
Butyl	0,0 a*	0,0 b	13,3 cd	46,7 b	100,0 a
Methyl	0,0 a	6,7 b	66,7 ab	100,0 a	100,0 a
Phenyl	6,7 a	13,3 b	46,7 bc	100,0 a	100,0 a
Allyl	0,0 a	0,0 b	0,0 d	0,0 c	0,0 b
Benzyl	6,7 a	53,3 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
2-PE	6,7 a	26,7 ab	66,7 ab	100,0 a	100,0 a
Ethyl	0,0 a	26,7 ab	46,7 bc	66,7 b	100,0 a

*Aynı sütun içerisinde farklı harfleri içeren ortalamalar, LSD (P<0,05) testine göre birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

Denemeye alınan bileşikleri içerisinde methyl ve benzyl buhar fazında hem miselyal gelişme hem de sklerot çimlenmesi üzerine yüksek düzeyde etkili olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.6. Saf ITC bileşiklerinin buhar fazının *S. sclerotiorum*' un sklerot çimlenmesine etkileri

S. sclerotiorum' un sklerot çimlenmesi üzerine buhar fazındaki saf ITC bileşiklerinin fungistatik ve fungitoksik etkileri incelendiğinde (Çizelge 4.7), 30µl/L konsantrasyonda sadece benzyl fungistatik özellik göstermiştir. 50µl/L konsantrasyonda ise phenyl ve 2-PE fungistatik özelliğe sahip olurken, methyl fungitoksik etki göstermiştir. Konsantrasyon 2 katına çıktığında (100µl/L), butyl ve ethyl fungistatik özellik gösterirken, benzyl ve 2-PE, fungitoksik etkiye sahip olmuştur.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında *S. sclerotiorum*' un ortalama sklerot çimlenmesi (%) ve bu bileşiklerin fungistatik - fungitoksik etkileri

Uygulama	Konsantrasyonlar (µl/L)				
	5	10	30	50	100
Butyl	100,0 a ^x	100,0 a	86,7 ab	53,3 b	0,0 b*
Methyl	100,0 a	93,3 a	33,3 cd	0,0 c**	0,0 b
Phenyl	93,3 a	86,7 a	53,3 bc	0,0 c*	0,0 b
Allyl	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
Benzyl	93,3 a	46,7 b	0,0 d*	0,0 c	0,0 b**
2-PE	93,3 a	73,3 ab	33,0 cd	0,0 c*	0,0 b**
Ethyl	100,0 a	73,3 ab	53,3 bc	33,3 b	0,0 b*

* Fungistatik etki, ** Fungitoksik etki

^xAynı sütun içerisinde farklı harfleri içeren ortalamalar, LSD (P<0,05) testine göre birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

Yüksek konsantrasyonda (30µl/L) benzyl ITC bileşiği, fungitoksik bir etki göstermiştir. Bu ve diğer bulgular, hardal bitkisinin dokularında üretilen benzyl ITC'nin, sklerotlar üzerinde hem fungitoksik hem de fungistatik etkilere sahip olduğunu ve bu bileşiğe karşı *Sclerotium cepivorum*' un sklerotlarının, *Fusarium oxysporum*'un klamidosporlarına göre daha az duyarlılık gösterdiğini bildiren Smolinska ve Horbowicz (1999)' in sonuçları ile uyum içerisinde. *Sclerotium rolfsii*'nin sklerotlarının çimlenmesi üzerine ITC bileşiklerinin etkisi konusunda yapılan bir çalışmada (Harvey ve ark.,2002), sklerot çimlenmesinin Allyl ITC ile engellenmesinin, aktif olarak gelişen miselyumların engellenmesine göre çok daha güç olduğunu ve miselyumları öldürmek için gerekli olandan yaklaşık 200 kat daha fazla

konsantrasyonlarda sklerotların sadece baskılandığı ve 7. günden sonra tekrar canlandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte eğer sklerotlar, ITC ile muamele edilmeden önce çimlenmeye teşvik edilebilirse allyl ITC'nin daha düşük konsantrasyonlarının, hem saprofitlerin hem de *S. rolfsii*'nin yeni gelişen miselyumlarının gelişimini engellemesinin sağlanabileceği ileri sürülmüştür.

S. sclerotiorum'un, her bir uygulaması sonunda her bir konsantrasyonun sahip olduğu EC₅₀ değeri (fungal gelişmeyi %50 azaltan etkili konsantrasyon), SAS istatistik programı ile log₁₀ ITC konsantrasyonuna karşı gelişimin engellenme oranı üzerinden regresyon analizi yapılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Saf ITC bileşiklerinin farklı uygulamalardaki EC₅₀ değerleri

Uygulama	Buhar	PDA	Sklerot çimlenmesi
Butyl	0.0145	0.1114	0.0484
Methyl	0.0539	0.1153	0.0229
Phenyl	0.0160	0.0964	0.0225
Allyl	0.0073	0.1044	-
Benzyl	0.0078	0.0897	0.0095
2-PE	0.0214	0.0971	0.0167
Ethyl	0.0198	0.0834	0.0271

Çizelge 4.8'de görüleceği gibi buhar fazında ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri, en yüksek 0.0539 ile methyl ITC' de belirlenirken, en düşük değer 0.0078 ile benzyl ITC' de bulunmuştur. ITC bileşiklerinin PDA besi ortamındaki EC₅₀ değerleri, 0.0834-0.1153 arasında değişiklik göstermiştir. Her iki uygulama karşılaştırıldığında methyl, buhar fazında besi ortamına karıştırma uygulamasına göre daha etkili olduğu görülmektedir. Tüm ITC bileşiklerinin patojenin sklerot çimlenmesindeki EC₅₀ değerleri incelendiğinde, allyl ITC'in sklerot çimlenmesine herhangi bir etkisi olmadığı, buna karşılık benzyl'in en düşük ve butyl' in en yüksek EC₅₀ değerlerine sahip olduğu saptanmıştır.

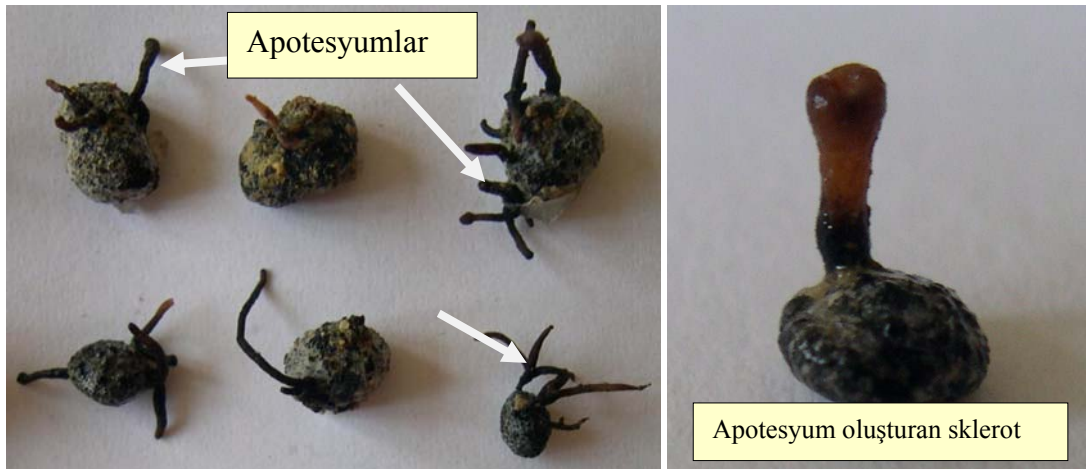
Farklı ITC uygulamaları sonucunda elde edilen EC₅₀ değerleri, buhar fazındaki uygulamada alifatik bileşiklerin zehirlilik düzeyinin aromatik bileşiklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Benzer bir çalışmada (Mari ve ark., 2008), *Monilinia laxa*'ya karşı *in vitro* koşullarda allyl, butenyl, benzyl, 2-PE ve 4-methylthiobutyl ITC

bileşikleri denenmiştir. Konidi çimlenmesi ve misel gelişimine etki, ED₅₀ yönünden incelenmiş ve en yüksek etkinin 4-methylthiobutyl, benzyl, allyl, butenyl ve 2-PE ITC bileşikleri ile sağlandığı bildirilmiştir. Bu veriler, buhar fazında elde ettiğimiz zehirlilik düzeyi ile ilgili sonuçları destekler niteliktedir.

PDA besi ortamında ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri incelendiğinde benzyl, phenyl ve 2-PE ITC gibi aromatik bileşiklerin *S. sclerotiorum*'un miselyal gelişimi ve sklerot çimlenmesi üzerine zehirlilik düzeyinin alifatik bileşiklere göre çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, aromatik ITC'ların alifatik olanlara göre daha aktif ve zehirli olduğunu bildiren Carter ve ark. (1963) ve Sellam ve ark. (2007)'nin verileri ile uyum içerisinde görülmektedir. Yapılan bir başka çalışmada (Smith ve Kirkegaard, 2002), PDA ortamına farklı konsantrasyonlarda karıştırılmış 2-PE ITC bileşiğinin ED₅₀ değerleri, 8 fungus içerisinde farklı oranlarda ortaya çıkmıştır. Buna göre *Gaeumannomyces* ve *Sclerotinia*, 2-PE ITC'a karşı toleransı çok düşük bulunurken, *Trichoderma* ve *Alternaria* en yüksek toleransa sahip olmuştur.

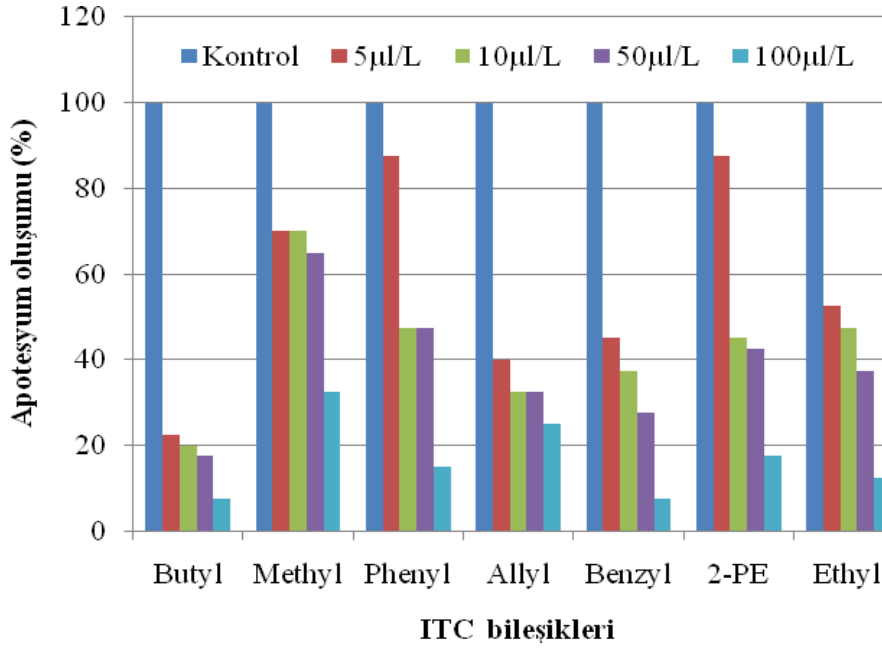
4.2.3. ITC bileşiklerinin apotesyum oluşumuna etkileri

ITC bileşiklerinin patojen fungusun sklerotlarının apotesyum oluşturması üzerine etkilerini belirlemek için, içerisinde 100g dere kumu bulunan 190ml'lik cam kavanozların her birinde 10 adet sklerot olacak şekilde yerleştirilmiştir. ITC'ların her bir konsantrasyonu (0.0,5,10,50,100µl/L), sklerot içeren kavanozlara uygulandıktan sonra kapakları hemen kapatılmış ve iklim kabininde 10-14 hafta gelişmeye bırakılmıştır. Bu süre boyunca apotesyum oluşumları gözlenmiş (Şekil 4.7) ve gelişme gösterenler kaydedilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. ITC bileşiklerinin uygulandığı sklerotlarda *S. sclerotiorum*'un apotesyum oluşumu

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi en düşük konsantrasyonda apotesyum oranı (%) phenyl ve 2-PE’de görülürken, bunları methyl ve ethyl ITC bileşikleri izlemiştir. ITC konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak apotesyum oluşumundaki en istikrarlı azalış, butyl, allyl ve benzyl’ de ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.8. Farklı ITC bileşikleri uygulanmış ortamda *S. sclerotiorum*' un apotesyum oluşumu (%)

Denemeye alınan saf ITC bileşiklerinin patojenin apotesyum oluşumuna etkileri (%) incelendiğinde (Çizelge 4.9), en düşük konsantrasyonda (5 µl/L), phenyl ve 2-PE dışında kalan ITC bileşiklerinin apotesyum oluşumunu, %30-77,5 arasında değişen oranlarda engellediği bulunmuştur. Bunun nedeni, aromatik bileşiklerden olan phenyl ve 2-PE'in uçuculuk oranının yüksek olmamasına bağlanabilir. Slerotların yüksek konsantrasyonlarda ITC bileşiklerine maruz bırakılması, etkinlik yönünden farklılıklar yaratmıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak uçuculuk oranı yüksek olan alifatik bileşikler, en yüksek etkileri göstermişlerdir.

Çizelge 4.9. Farklı ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*' un apotesyum oluşumu üzerine etkileri (%)

Uygulama	Konsantrasyonlar (µl/L)			
	5	10	50	100
Butyl	77,5 a*	80,0 a	82,5 a	92,5 a
Methyl	30,0 ab	30,0 ab	35,0 ab	67,5 a
Phenyl	12,5 b	52,5 a	52,5 a	85,0 a
Allyl	60,0 ab	67,5 a	67,5 a	75,0 a
Benzyl	55,0 ab	62,5 a	72,5 a	92,5 a
2-PE	12,5 b	55,0 a	57,5 a	82,5 a
Ethyl	47,5 ab	52,5 a	62,5 a	87,5 a

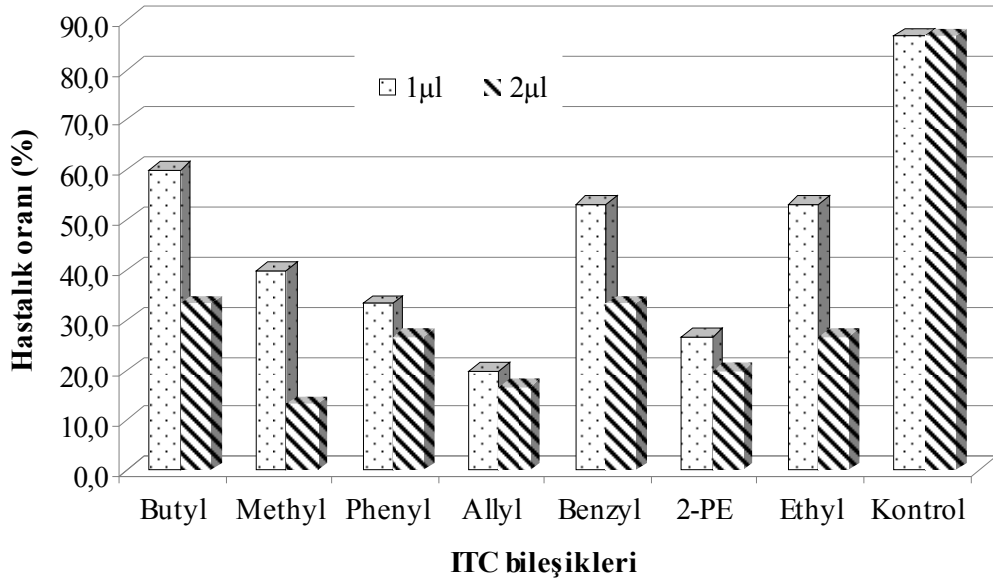
* Aynı sütun içerisinde farklı harfleri içeren ortalamalar, LSD (P<0,05) testine göre birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

En yüksek konsantrasyonda ise (100µl/L) denemeye alınan tüm bileşikler patojenin apotesyum oluşumuna aynı etkiyi göstermiş ve istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır.

4.3. *In vivo* koşullarda ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*' un hastalık oluşturması üzerine etkileri

Saksı denemesi şeklinde gerçekleştirilen bu çalışmada, duyarlı bitki olarak Sera Demre çeşidi biber bitkisi kullanılmış ve inokulasyondan 4 hafta sonra hastalık gelişimi yönünden değerlendirmeler yapılmıştır (Şekil 4.9).

Şekil 4.9.'de görüldüğü gibi kontrol bitkilerde hastalık oranı %80'in üzerinde belirlenirken, en düşük hastalık oranları (%) allyl ve 2-PE'de kaydedilmiştir. Bunları ise phenyl ve ethyl ITC bileşikleri izlemiştir.



Şekil 4.9. *In vivo* koşullarda farklı saf ITC bileşikleri uygulanan biber bitkilerinde *S. sclerotiorum*' un oluşturduğu hastalık oranı (%)

Denemede kullanılan tüm saf ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*' un hastalık oluşturmaya etkileri (%) değerlendirildiğinde (Çizelge 4.10), 1µl konsantrasyonda en yüksek etkiyi, %76,7 ile allyl ITC gösterirken en düşük etkiler, %31,7 ve 38,3 ile sırasıyla butyl ve ethyl ITC'larda kaydedilmiştir. 2µl konsantrasyonda ise, denemeye alınan tüm ITC bileşikleri, %63,3-85,0 arasında değişen oranlarda benzer etkiler göstermiş ve istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır.

ITC bileşiklerinin fungal hücre yapısında gösterdiği zehirlilik, genel olarak proteinler ve aminoasitlerde bulunan sülfidril, disülfid ve amino grupları ile spesifik olmayan ve geri dönüşümsüz gerçekleşen tepkimelere ve metabolik enzimlerin inaktivasyonuna bağlanmaktadır (Kojima ve Oawa, 1971; Banks ve ark.,1986; Kawakishi ve Kaneko, 1987).

Çizelge 4.10. *In vivo* koşullarda farklı saf ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*' un hastalık oluşturmaya üzerine etkileri (%)

Uygulama	Konsantrasyonlar (µl)	
	1	2
Butyl	31,7 b*	63,3 a
Methyl	55,0 ab	85,0 a
Phenyl	61,7 ab	68,3 a
Allyl	76,7 a	81,7 a
Benzyl	36,7 ab	63,3 a
2-PE	70,0 ab	76,7 a
Ethyl	38,3 ab	70,0 a

* Aynı sütun içerisinde farklı harfleri içeren ortalamalar, LSD (P<0,05) testine göre birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

ITC bileşiklerine karşı fungal duyarlılıktaki farklılıklar, sadece hücre zehirlilik düzeyi ile değil aynı zamanda ITC'ların hücreleri penetre etme yetenekleri ile de ilişkili olabilir (Wood, 1975; Nastruzzi ve ark., 1996). Ayrıca lipofilik bir bileşik olan PE-ITC'ın, plasma membranı içinde bulunan enzimlerle tepkimeye girdiği ve böylece hücre ölümleri ile gelişimin engellenmesine yol açtığı ifade edilmiştir (Troncoso-Rojan ve ark.,2005).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, saf ITC'ların toprak kökenli fungal bitki patojenlerinden *S. sclerotiorum*'un misel gelişimi, sklerot çimlenmesi ve apotesyum oluşumu üzerine antifungal etkileri, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırılmıştır. Bu amaçla, örtüaltı ve açık alanda sebze yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Hatay ili ve ilçelerinde, kültür bitkilerinde beyaz çürüklük yapan *S. sclerotiorum* fungusuna ait izolatları toplamak amacıyla sörvey çalışması yapılmış ve bölgede bu patojenin sıklıkla hastalık oluşturduğu domates, biber, fasulye, marul, kavun gibi bitkilerden toplam 37 izolat elde edilmiştir. Patojenisite değerlendirmesinin sonucunda, Samandağ-Meydan köyünden alınan Ss31 nolu izolat, en yüksek virülensliğe sahip olmuş ve bu izolat, *in vitro* ve *in vivo* denemelerde kullanılmıştır.

In vitro koşullarda ITC'ların buhar fazında *S. sclerotiorum*'un miselyal gelişimlerine etkisi incelendiğinde, en düşük konsantrasyonda allyl ITC, patojenin miselyal gelişimini engellemede en yüksek aktiviteye sahip olmuştur. Artan konsantrasyona bağlı olarak allyl ile birlikte methyl ve butyl ITC'lar, fungal koloninin radyal gelişimini kontrole oranla yüksek düzeyde engellemiştir.

Denemeye alınan bileşiklerin en yüksek konsantrasyonda gelişimi engelleme durumu ele alındığında allyl ile birlikte methyl ve benzyl ITC bileşikleri, *S. sclerotiorum* üzerinde fungitoksik etkiye sahip olurken butyl, phenyl ve ethyl ITC'lar patojenin misel gelişimi üzerinde fungistatik etki göstermiştir.

ITC bileşiklerinin PDA besi ortamına karıştırıldıktan sonra *S. sclerotiorum*'un radyal gelişime etkisinin araştırıldığı aşamada, buhar fazına göre daha yüksek konsantrasyonlar kullanılmış ve bileşiklerin, patojenin koloni gelişimini tamamen engellemesi için gerekli konsantrasyonun 3 katı olması gerektiği saptanmıştır. Her iki deneme aşamalarında yer alan 100µl/L konsantrasyonu karşılaştırıldığında, buhar fazında misel gelişimi %100 düzeyinde engellenirken, PDA ortamına karıştırıldığında patojenin radyal gelişimi, %100 oranında sadece benzyl ITC bileşiği tarafından engellenmiş ve bunu, ethyl ve phenyl ITC izlemiştir. Yine aynı konsantrasyonda benzyl ITC fungistatik bulunurken en yüksek konsantrasyonda, butyl, phenyl ve benzyl ITC fungitoksik olarak belirlenmiştir.

S. sclerotiorum'un sklerot çimlenmesinin, saf ITC bileşiklerinin buhar fazında tamamen engellenmesi, benzyl ITC ile 30µl/L konsantrasyonda gerçekleşmiştir. Yüksek uçuculuk özelliğine sahip alifatik bileşiklerden olan allyl ITC'nin sklerot çimlenmesine herhangi bir etkisi bulunmamıştır. Ayrıca en yüksek konsantrasyonda (30µl/L) benzyl ITC bileşiği, fungitoksik bir etki göstermiştir.

Farklı ITC uygulamaları sonucunda elde edilen EC₅₀ değerleri, buhar fazındaki uygulamada alifatik bileşiklerin zehirlilik düzeyinin aromatik bileşiklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir.

PDA besi ortamında ITC bileşiklerinin EC₅₀ değerleri incelendiğinde benzyl, phenyl ve 2-PE ITC gibi aromatik bileşiklerin *S. sclerotiorum*'un miselyal gelişimi üzerine zehirlilik düzeyinin alifatik bileşiklere göre çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Denemede kullanılan ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*'un apotesyum üretimine etkilerinin ilk kez irdelendiği bu aşamada, en düşük konsantrasyonda phenyl ve 2-PE dışındaki bileşiklerin apotesyum oluşumunu %30-77,5 arasında engellediği bulunmuştur. Apotesyum oluşumunun yüksek konsantrasyonlarda ITC bileşiklerine maruz bırakılması, etkinlik yönünden farklılıklar yaratmıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak uçuculuk oranı yüksek olan alifatik bileşikler, en yüksek etkileri göstermişlerdir.

In vivo koşullarda ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*'un hastalık oluşturmaya üzerine etkileri incelendiğinde, kontrol bitkilerde hastalık oranı %80'in üzerinde belirlenirken, en düşük hastalık oranları (%) allyl ve 2-PE'de kaydedilmiştir. Bunları ise phenyl ve ethyl ITC bileşikleri izlemiştir. Tüm saf ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*'un hastalık oluşturmaya etkileri (%) değerlendirildiğinde, 1µl konsantrasyonda en yüksek etkiyi, %76,7 ile allyl ITC gösterirken %31,7 ve %38,3 ile en düşük etkiler, sırasıyla butyl ve ethyl ITC'larda kaydedilmiştir. 2µl konsantrasyonda ise, denemeye alınan tüm ITC bileşikleri, %63,3-85,0 arasında değişen oranlarda benzer etkiler göstermiş ve istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır.

Bu sonuçlar ışığında patojene yönelik olarak aşağıda belirtilen noktalar önerilebilir:

- ITC, genel bir biyosidal özelliğe sahip olduğu için günümüzde metil bromidin piyasadan ve kullanımdan çekilmesi sonucunda günümüzde

daha önce metil bromid ile toprak fumigasyonu sonucu kontrol edilebilen organizmalar hedef alınarak, 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. Bu arada seçilen konsantrasyonların yüksek olmaması, ekonomik ve pratik açıdan hem üretici hem de çevre açısından önemli yararlar sağlayacaktır.

- *S. sclerotiorum* gibi 400'den fazla konukçusu olan bir patojen için ITC bileşikleri seçilirken miselyal gelişimi, apotesyum oluşumu ve hastalık oluşumunu önlemeye yönelik olarak allyl ITC gibi alifatik bileşiklere ve sklerot çimlenmesini engellemek için benzyl ITC gibi aromatik bileşiklere yer verilmelidir.
- Toprakta bulunan patojen fungus *S. sclerotiorum*, yüksek konsantrasyonda allyl ve benzyl ITC'ları çıkaran glukozinolatları içeren *Brassica juncea*, *B. carinata*, *B. nigra* and *Sinapis* spp gibi bitki türleri tarafından büyük olasılıkla yüksek oranda baskılanabilecektir. Bu amaçla, bu patojenle bulaşık olan üretim alanlarındaki organik tarım uygulamalarında başvurulan yöntemlerden birisi olan biyofumigasyon işleminde bu bitkileri kullanmak daha yararlı sonuçlar verebilecektir.
- Birçok geleneksel toprak fumigantı çevreye zararlı, insanlara zehirli ve yararlı toprak organizmaları üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu için yeşil gübre veya tohumunu şeklinde *Brassica* ve *Sinapis* cinslerine ait türlerin kullanımı, beyaz çürüklük hastalığı ile mücadelede önemli bir alternatif sağlayabilecektir. Eğer biyofumigasyon; solarizasyon, kompost uygulamaları ve pestisitlerin entegre kullanımı gibi yöntemlerle kombine halinde olursa, hastalıkla mücadeleyi daha iyi bir noktaya götürebilecektir.

KAYNAKLAR

- Abawi, G.S. and Grogan, R.G., 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, 69: 899-904.
- 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 Soil**, 162: 107-112.
- Anonim, 2002. **Bitki Koruma Ürünleri**. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, s.253.
- Anonim, 2005. *Sclerotinia Initiative Brochure*. Fargo, ND: United States Department of Agriculture, www.whitemoldresearch.com
- Ayers, W.A. and Adams, P.B. 1981. Mycoparasitism and its application to biological control of plant disease. In Biological Control. in **Crop Production Beltsville Symposium in Agricultural Research**, vol. 5. (Papavizas, G.C., ed.). New Jersey: Allenheld, Omsun & Co., pp. 91-103.
- Banks, J.G., Board, R.G., Sparks, N.H.C., 1986. Natural antimicrobial system and their potential in food preservation of the future. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 8:103-107.
- Bardin, S.D. and Huang, H.C., 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 23: 88-98.
- Bolton, M.D., Bart, P.H.J., Thomma, B.P.H.J., and Nelson, B.D., 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, 7: 1-16.
- Brown, P.D. and Morra, M.J., 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate containing plants. **Adv. Agron.**, 61: 167-231.
- Carter, G.A., Garraway, J.L., Spencer, D.M., Wain, R.L., 1963. Investigation on Fungicides. VI. The antifungal activity of certain dithiocarbamic and hydroxydithioformic acid derivatives. **Ann. App. Biol.**, 51: 135-161.
- 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.

- Del Rio, L.E., Martinson, C.A., and Yang, X.B., 2002. Biological control of *Sclerotinia* stem rot of soybean with *Sporidesmium sclerotivorum*. **Plant Disease**, 88: 1352-1356.
- Demir, S.T. ve Delen, N. 1991. *Sclerotinia* (*Monilinia*) spp. izolatlarının bazı fungusitlere karşı duyarlılıkları üzerinde araştırmalar. **VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi**, s. 275-279, İzmir.
- DeVay, J. E., 1991. Historical review principles of soil solarisation. Page, 1-15 in;soil solarisation. DeVay, J. E., Stapleton, J. J., and Elmore, C. L., eds. FAO Plant Prot. Bull.
- Dhingra, O. D., Costa, M. L. N., and Silva, Jr. G. J.,2004. Potential of allyl isothiocyanate to control *Rhizoctonia solani* seedling damping off and seedling blight in transplant production, **J.Phytopathology**, 152:352-357.
- Doğu, D. M., Mert-Türk, F., Yıldırım, İ., 2007. Çanakkale’de lahanagillerde beyaz çürüklük etmeni *Sclerotinia sclerotiorum*’un yaygınlığının ve izolatlar arasındaki varyasyonların saptanması. **Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi**, s. 282, Isparta.
- Drobnica, L., Zemanova, M., Nemeč, P., Antos, K., Kristian, P., Stullerova, A., Knoppova, V. and Nemeč, P., 1967. Antifungal activity of isothiocyanates and their analogues. **Appl. Microbiol.**, 15: 701-703.
- Drobnica, L., Zemanova, M., Nemeč. P., Antos. K., Kristian. P., Martvon, A., and Zavodska. E. 1968. Antifungal activity of isothiocyanates and related compouds. **Applied Microbiology**. p: 582-587.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talatay, P.,2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plant. **Phytochemistry**, 56:5-51.
- Fan, C.M. Xiong, G.R, Qi,P. Ji,G.H and He,Y.Q. 2008. Potential Biofumigation Effects of Brassica oleracea var. Caulorapa on Growth of Fungi.**J.Phytopathology** 156:321-325
- Fawzy,R.,1982.Untersunhungen über die lebensdauer von sklerotien pflanzenpathogener pilze unter dem Einfluß hyperparasitischer und antagonistischer organismen in Abhängigkeit von der Bodentemperatur und anderen Faktoren. **Diss Univ. Bonn.**, S. 116.

- Fenwick, G.R., Heaney, R.K., and Mullin, J.W., 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 18: 123-201.
- Gardiner, J.B., Morra, M.J., Eberlein, C.V., Brown, P.D., Borek, V., 1999. Allelochemicals released in soil following incorporation of rapeseed (*Brassica napus*) green manures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 3837-3842.
- Gossen, B.D., Rimmer, S.R. and Holley, J.D., 2001. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant disease**, 85: 1206.
- Guimarães, R.L. and Stotz, H.U., 2004. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, 136: 3703-3711.
- Gimsing, A. L. and Kirkegaard, J. A., 2009. Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil, **Phytochem Rev.**, 8: 299-310.
- Harvey, S.G., Nannahan, H.N., and Sams, C.E., 2002. Indian mustard and allyl isothiocyanate inhibit *Sclerotium rolfii*. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 127: 27-31.
- Hsiang, T., Liao, A., Benedetto, D., 2007. Sensitivity of *Sclerotinia homoeocarpa* to demethylation-inhibiting fungicides in Ontario, Canada, after a decade of use. **Plant Pathology**, 56: 500-507.
- Huang, H.C. and Kozub, G.C., 1989. A simple method for production of apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Protection Bulletin**, 31: 333-345.
- Huang, H. C., Yanke, L. J., and Phillippe, R. C., 1993. Bacterial suppression of basal pod rot and end rot of dry peas caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Microbiol.* 39:227-233.
- Huang, H.C., Erickson, R.S., Phillippe, L.M., Mueller, C.A., Sun, S.K., Huang, J.W., 2006. Control of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* by soil amendment with S-H mixture or Perlka in bean, canola and wheat fields. **Soil Biology & Biochemistry**, 38: 1248-1352.
- Irshad, M., and Onoğur, E., 2001. Evaluation of broccoli plant material incorporation into soil for the control of *Sclerotium rolfii* Sacc. and *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in tomato under greenhouse conditions. **J. Turk. Phytopath.**, 30: 47-56.

- Isshiki, K., Tokuoka, K., Mori, R., and Chiba, S. 1992. Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 56:1476-1477.
- Katan, J., 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. **Ann. Rev. Phytopathol.**, 19: 211-236.
- Kawakishi, S., Kaneko, T., 1987. Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. **J. Agric. Food Chem.**, 35: 85-88.
- Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W., and Desmarchelier, J.M. 1996. *In vitro* suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. **Plant Pathology**, 45: 593-603.
- Kirkegaard, J.A. and Sarwar, M., 1998. Biofumigation potential of brassicas. **Plant Soil**, 201: 71-89.
- Kirkegaard, J. A., Sarwar, M., Wong, P. T. W., Meats, A., Howe, G., Newell, M., 2000. Field studies on the biofumigation of take-all by brassica break crops. **Australian Journal of Agricultural Research**, 51(4):445-456.
- Klasse, H.J., 1995. Control of *Sclerotinia sclerotiorum* by using calcium cyanamide fertilizer (PERLKA). **VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi**, s. 244-246, Adana.
- Kohn, L.M., 1979. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. **Mycotaxon**, 9: 365-444.
- Kojima, M. and Oawa, K., 1971. Studies on the effect of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. (1). Effect of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeast. **J. Ferment. Technol.**, 49: 740-746.
- Kull, L.S., Pedersen, W.L., Palmquist, D., and Hartman, G.L., 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, 88: 325-332.
- Kurt, Ş. ve Erkılıç, A., 1997. Marul'da Beyaz Çürüklüğe (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) Karşı Sarmısak Ekstraktı ve Iprodione'un Etkinliğinin Belirlenmesi. **Ç.Ü.Z.F Dergisi**, 13 (1): 111-119.
- Kurt, Ş. and Emir, B., 2004. Effect of soil solarization chicken litter and viscera on populations of soilborne fungal pathogens and pepper growth. **Plant Pathology Journal**, 3(2):118-124.

- Larkin, R.P. and Griffin, T.S., 2007. Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. **Crop Protection**, 26:1067-1077.
- Lazzeri, L. and Manici, L.M., 2001. Allelopathic effect of glucosinolate-containing plant green manure on *Pythium* sp. and total fungal population in soil. **HortScience**, 36: 1283-1289.
- Lazzeri, L., Leoni, O., Manici, L. M. 2004. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. **Ind. Crops Prod.**, 20:59-65.
- Le Tourneau, D., 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, 69: 887-890.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C., 1971. Effect of sulfur-containing volatile compounds and vapors from cabbage decomposition on *Aphanomyces euteiches*. **Phytopathology**, 61: 208-214.
- Lumsden, R.D., 1979. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, 69: 890-896.
- Lumsden, R.D. and Dow, R.L., 1973. Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. **Phytopathology**, 63: 708-715.
- Mari, M., Iori, R., Leoni, O., and Marchi, A., 1993. *In vitro* activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens, **Annual Applied Biology**, 123: 155-164.
- Mari, M., Leoni, O., Lori, 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., Palmieri, S., 2008. Control of Brown rot on Stone fruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates, **Postharvest Biology and Technology**, 47:61-67.
- Matthiessen, J.N. and Kirkegaard, J.A., 2006. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. **Crit. Rev. Plant Sci.**, 25:235-265.
- Mayton, H.S., Oliver, C., Vaughn, S.F., and Loria, R., 1996. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. **Phytopathology**, 86:267-271.

- Mazzola, M., Granatstein, D.M., Elfving, D.C., and Mullinix, K., 2001. Suppression of specific apple root by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. **Phytopathology**, 91: 673-679.
- McQuilken, M. P., Mitchell, S. J., Budge, S. P. Whippes, J. M., Fenlon, J. S. and Archer, S. A. 1995. Effects of on sclerotial survival and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* in field-grown oilseed rape. **Plant Pathol.**, 44: 883-896.
- Minuto, A., Gilardi,G.,Pome,A.,and Gullino, M.L.1999. Soil fumigation with allylisothiocyanate: Preliminary results in Italy. **Proc. Annu. Intl. Res. Conf. Maethyl Bromide Alternatives Emissions Reductions**, 40:1
- Morrall, R.A.A., 1977. A preliminary study of the influence of water potential on sclerotium germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Botany**, 55: 8-11.
- Motisi, N., Montfort,F., Doré, 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 Pathology**, 58: 470-478.
- Muehlchen,A.M. Rand, R.E. and Parke, J.L., 1990. Evaluation of crucifer green manures for controlling *Aphanomyces* root rot of peas. **Plant Dis.**, 74:651-654.
- Munnecke, D. E., Domsch, K. H., and Eckert, J. W., 1962. Fungicidal activity of air passed through columns of soil treated with fungicides. **Phytopathology**, 52: 1298-1306.
- Müller, J.D., Cline, M.N., Sinclair, J.B., Jacobsen, B.J. 1985. *In vitro* test for evaluating efficacy of mycoparasites on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease Reporter**, 69: 584-587.
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R., Palmieri, S. 1996. *In vitro* cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44: 1014-1021.
- Njoroge, S.M.C., Riley, M.B., and Keinath,A., 2008. Effect of incorporation of *Brassica* spp. residues on population densities of soilborne microorganisms and on damping-off and Fusarium wilt of watermelon. **Plant Disease**, 92: 287-294.

- Potter, M. J., Davies, K.A., Rathjen, A. J., 1998. Suppressive impact of glucosinolates in *Brassica* vegetative tissues on root lesion nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, 24:67-80.
- Purdy, L.H., 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, 69: 875-880.
- 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.
- Rosa, E.A.S., Heaney, R.K., and Fenwick, G.R., 1997. Glucosinolates in crop plants. **Hort. Rev.**, 19: 99-205.
- 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.
- Sellam, A., Lacomis-Vasilescu, B., Hudhomme, P., and Simoneau, P. 2007. In vitro antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. **Plant Pathology**, 56: 296-301.
- Smith, B.J., Sarwar, M., Wong, P.T.W., and Kirkegaard, J.A., 1999. Suppression of cereal pathogens by canola root tissues in soil. 10th International Rapeseed Congress, Canberra.
- 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., Knudsen, G.R., Morra, M.J., and Borek, V., 1997. Inhibition of *Aphanomyces euteiches* f.sp. *pisi* by volatiles produced by hydrolysis of *Brassica napus* seed meal. **Plant Disease**, 81: 288-292.
- Smolinska, U. and Horbowicz, M., 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, 147: 119-124.
- Smolinska, U., 2000. Survival of *Sclerotium cepivorum* Sclerotia and *Fusarium oxysporum* Chlamydospores in Soil Amended with Cruciferous Residues. **J. Phytopathology**, 148: 343-349.

- 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.
- Soylu, E. M., Yiğitbaş. H., Tok, T. M., Soylu, S., Kurt, Ş., Baysal, Ö., Kaya, A.D., 2005. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 112(3):229-239.
- Steadman, J.R., 1979. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, 69: 904-907.
- Tok, F.M., Kurt, Ş., 2007. Akdeniz bölgesi örtü altı domates bitkilerinden elde edilen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bare izolatlarının miselyal uyum grubu (MUG) ve patojenisite yöntemleri ile karakterizasyonu. **Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi**, s.284, Isparta.
- Troncoso-Rojas, R., Sanchez-Estrada, A., Ruelas, C., Garcia, H.S. and Tiznado-Hernandez, M.E., 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*, **J. Sci. Food Agric.**, 85:1427-1434.
- Walker, J.C., Morell, S., and Foster, H.H., 1937. Toxicity of mustard oils and related sulphur compounds to certain fungi. **Am. J. Bot.**, 24: 536-541.
- Wittstock, U. and Halkier, B.A., 2002. Glukosinolate research in the Arabidopsis era. **Trends Plant Sci.**, 7: 263-270.
- Wood, J.L., 1975. Biochemistry. **In Chemistry and Biochemistry of thiocyanic acid and its derivatives**. Ed. A.A. Newman. pp. 156-221. Academic Press, London.
- Yanar, Y., Kadioğlu, İ., Asav, Ü., Onaran, A., 2004. Sera koşullarında *Sclerotinia sclerotiorum*'un sebep olduğu beyaz çürüklük hastalığının kontrolünde solarizasyonun kullanılması. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi**, s.166.
- Yanar, Y., 2005. Tokat iklim koşullarında *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary' un sklerotium canlılığı üzerine solarizasyonun etkisi. **GOP Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 22(1):15-19.
- Yuen, G. Y., Craig, M. L., Kerr, E. D., and Steadman, S. R., 1991. Epiphytic colonization of dry edible bean by bacteria antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and potential for biological control of white mold disease. **Biol. Control**, 1:293-301.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her aşamada bilgi birikimi ve anlayışıyla desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Şener KURT'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Sayın M. Fatih TOK'a (Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü) , diğer öğretim üyelerine ve her zaman yanımda olan çok değerli arkadaşım Aslı SABUNCUGİL'e teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Antakya'da 1978'de doğdum. İlk, Orta ve Lise öğrenimimi Serinyol beldesinde tamamladım. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden 2004 yılında mezun oldum. 2006 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladım.

EKLER

EK1. *S. sclerotiorum*' un farklı saf ITC bileşiklerinin buhar fazında ortalama koloni gelişimi (mm)

Uygulama	5	Konsantrasyonlar (µl/L)				Kontrol
		10	50	70	100	
Butyl	90,0	45,0	25,0	22,5	0,0	90,0
	76,5	52,5	32,5	31,5	0,0	90,0
	60,0	56,5	31,5	29,0	0,0	90,0
Methyl	85,0	53,5	0,0	0,0	0,0	90,0
	54,0	52,0	0,0	0,0	0,0	90,0
	57,0	28,5	0,0	0,0	0,0	90,0
Phenyl	90,0	52,5	42,5	33,5	0,0	90,0
	72,5	62,5	20,0	19,0	0,0	90,0
	75,0	56,5	27,5	25,0	0,0	90,0
Allyl	50,5	47,5	10,0	0,0	0,0	90,0
	55,0	49,0	12,5	0,0	0,0	90,0
	57,5	51,5	16,5	0,0	0,0	90,0
Benzyl	70,0	30,0	24,0	0,0	0,0	90,0
	65,0	27,5	18,5	0,0	0,0	90,0
	60,0	29,0	23,0	0,0	0,0	90,0
Ethyl	70,0	48,0	46,0	31,0	0,0	90,0
	79,0	65,0	51,0	48,0	0,0	90,0
	78,0	59,0	49,0	29,0	0,0	90,0
2-PE	90,0	71,5	30,0	0,0	0,0	90,0
	90,0	67,0	53,5	0,0	0,0	90,0
	90,0	69,0	48,5	0,0	0,0	90,0

EK2. Farklı konsantrasyonlarda Saf ITC bileşikleri içeren PDA ortamında *S. sclerotiorum*' un miselyal gelişimi (mm)

Uygulama	Konsantrasyonlar (µl/L)					Kontrol
	70	90	100	200	300	
Butyl	90,0	90,0	65,0	0,0	0,0	90,0
	90,0	75,0	70,0	0,0	0,0	90,0
	90,0	90,0	77,5	0,0	0,0	90,0
Methyl	90,0	90,0	50,0	20,0	0,0	90,0
	90,0	90,0	45,0	15,5	0,0	90,0
	77,5	55,5	41,0	21,0	0,0	90,0
Phenyl	90,0	90,0	33,5	0,0	0,0	90,0
	90,0	70,0	40,0	0,0	0,0	90,0
	90,0	64,0	30,0	0,0	0,0	90,0
Allyl	80,0	61,5	50,0	34,0	0,0	90,0
	69,0	50,0	53,5	12,0	0,0	90,0
	55,0	75,5	60,0	23,0	0,0	90,0
Benzyl	90,0	47,5	0,0	0,0	0,0	90,0
	90,0	66,5	0,0	0,0	0,0	90,0
	90,0	75,0	0,0	0,0	0,0	90,0
2-PE	90,0	90,0	40,0	7,5	0,0	90,0
	90,0	60,0	43,0	15,0	0,0	90,0
	90,0	72,0	38,0	0,0	0,0	90,0
Ethyl	67,5	42,5	33,5	19,0	0,0	90,0
	61,0	44,0	27,0	15,0	0,0	90,0
	69,0	45,0	31,0	21,5	0,0	90,0

EK3. Farklı konsantrasyonlardaki Saf ITC bileşiklerinin buhar fazında *S. sclerotiorum*' un sklerotlarının çimlenme oranı (%)

Uygulama	Konsantrasyonlar ($\mu\text{l/L}$)					Kontrol
	5	10	30	50	100	
Butyl	100,0	100,0	60,0	80,0	0,0	100,0
	100,0	100,0	100,0	60,0	0,0	100,0
	100,0	100,0	100,0	20,0	0,0	100,0
Ortalama	100,0	100,0	86,7	53,3	0,0	
Methyl	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	100,0	100,0	60,0	0,0	0,0	100,0
	100,0	80,0	40,0	0,0	0,0	100,0
Ortalama	100,0	93,3	33,3	0,0	0,0	
Phenyl	100,0	80,0	40,0	0,0	0,0	100,0
	80,0	80,0	40,0	0,0	0,0	100,0
	100,0	100,0	80,0	0,0	0,0	100,0
Ortalama	93,3	86,7	53,3	0,0	0,0	
Allyl	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Ortalama	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
Benzyl	100,0	60,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	100,0	60,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	80,0	20,0	0,0	0,0	0,0	100,0
Ortalama	93,3	46,7	0,0	0,0	0,0	
2-PE	100,0	80,0	40,0	0,0	0,0	100,0
	100,0	80,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	80,0	60,0	60,0	0,0	0,0	100,0
Ortalama	93,3	73,3	33,3	0,0	0,0	
Ethyl	100,0	100,0	40,0	40,0	0,0	100,0
	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	100,0	20,0	20,0	60,0	0,0	100,0
Ortalama	100,0	73,3	53,3	33,3	0,0	

EK4. Farklı ITC bileşikleri uygulanmış ortamda *S. sclerotiorum*' un apotesyum oluşumu (%)

Uygulama	5	Konsantrasyonlar (μL)		
		10	50	100
Butyl	30	40	70	30
	20	40	0	0
	10	0	0	0
	30	0	0	0
Ortalama	22,5	20,0	17,5	7,5
Methyl	0	100	90	0
	80	60	80	50
	100	100	90	50
	100	20	0	30
Ortalama	70,0	70,0	65,0	32,5
Phenyl	100	80	70	0
	100	10	50	50
	100	100	0	10
	50	0	70	0
Ortalama	87,5	47,5	47,5	15,0
Allyl	0	0	50	40
	30	60	30	0
	100	70	50	30
	30	0	0	30
Ortalama	40,0	32,5	32,5	25,0
Benzyl	30	0	0	30
	0	0	100	0
	100	100	10	0
	50	50	0	0
Ortalama	45,0	37,5	27,5	7,5
2-PE	100	100	0	0
	100	10	80	0
	100	70	70	70
	50	0	20	0
Ortalama	87,5	45,0	42,5	17,5
Ethyl	100	0	30	10
	50	100	0	0
	10	70	20	0
	50	20	100	40
Ortalama	52,5	47,5	37,5	12,5

EK5. Farklı ITC bileşiklerinin *S. sclerotiorum*' un apotesyum oluşumu üzerine etkileri (%)

Uygulama	5	Konsantrasyonlar (μL)		
		10	50	100
Butyl	70,0	60,0	30,0	70,0
	80,0	60,0	100,0	100,0
	90,0	100,0	100,0	100,0
	70,0	100,0	100,0	100,0
Ortalama	77,5	80,0	82,5	92,5
Methyl	100,0	0,0	10,0	100,0
	20,0	40,0	20,0	50,0
	0,0	0,0	10,0	50,0
	0,0	80,0	100,0	70,0
Ortalama	30,0	30,0	35,0	67,5
Phenyl	0,0	20,0	30,0	100,0
	0,0	90,0	50,0	50,0
	0,0	0,0	100,0	90,0
	50,0	100,0	30,0	100,0
Ortalama	12,5	52,5	52,5	85,0
Allyl	100,0	100,0	50,0	60,0
	70,0	40,0	70,0	100,0
	0,0	30,0	50,0	70,0
	70,0	100,0	100,0	70,0
Ortalama	60,0	67,5	67,5	75,0
Benzyl	70,0	100,0	100,0	70,0
	100,0	100,0	0,0	100,0
	0,0	0,0	90,0	100,0
	50,0	50,0	100,0	100,0
Ortalama	55,0	62,5	72,5	92,5
2-PE	0,0	0,0	100,0	100,0
	0,0	90,0	20,0	100,0
	0,0	30,0	30,0	30,0
	50,0	100,0	80,0	100,0
Ortalama	12,5	55,0	57,5	82,5
Ethyl	0,0	100,0	70,0	90,0
	50,0	0,0	100,0	100,0
	90,0	30,0	80,0	100,0
	50,0	80,0	0,0	60,0
Ortalama	47,5	52,5	62,5	87,5

