



**ÜZÜM BAĞLARINDA HASTALIK ETMENİ
KURŞUNİ KÜFÜN (*Botrytis cinerea*) BİYOLOJİK
MÜCADELESİNDE *Nepeta meyeri* (BENTH.) BİTKİ
EKSTRAKTLARININ KULLANILMASI**

Sinem KARAKUŞ

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Bilim Dalı

Prof. Dr. Ökkeş ATICI

2016

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ÜZÜM BAĞLARINDA HASTALIK ETMENİ KURŞUNİ KÜFÜN
(*Botrytis cinerea*) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE *Nepeta meyeri*
(BENTH.) BİTKİ EKSTRAKTLARININ KULLANILMASI

Sinem KARAKUŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

ÜZÜM BAĞLARINDA HASTALIK ETMENİ KURŞUNİ KÜFÜN (*Botrytis cinerea*) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE *Nepeta meyeri* (BENTH.) BİTKİ EKSTRAKTLARININ KULLANILMASI

Prof. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında, Sinem KARAKUŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 29/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Botanik Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Cafer KÖSE

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Salih MUTLU

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 03/03/2016 tarih ve 10/23 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2014-63

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

ÖZET

Doktora Tezi

ÜZÜM BAĞLARINDA HASTALIK ETMENİ KURŞUNİ KÜFÜN (*Botrytis cinerea*) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE *Nepeta meyeri* (BENTH.) BİTKİ EKSTRAKTLARININ KULLANILMASI

Sinem KARAKUŞ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu araştırmada allelopatik bir bitki olan *Nepeta meyeri* (Benth.)’den elde edilen esansiyel yağ, su ve metanolik özütler, üzümde (*Vitis vinifera* L. cv. Kareerik) önemli zararlara yol açan kurşuni küfün (*Botrytis cinerea*) biyolojik mücadelesinde kullanılmıştır. Araştırmada esansiyel yağın (EY) 600, 800 ve 1000 µl/Petri veya yaprak; su özütünün 2, 5 ve 10 ml/Petri veya yaprak; metanolik özütün 1, 2 ve 3 ml/Petri veya yaprak dozları çalışılmıştır. Özütler yapraklara fungus inokulasyonu ile aynı anda (EY+F), 1 gün önce (EY+F1G) ve 2 gün önce (EY+F2G) uygulanmıştır. *N. meyeri* EY içeriği GC/MS ile belirlenmiştir. Özütlerin öncelikle fungusun miseliyal gelişimi ve spor çimlenmesi üzerinde *in vitro* ve *in vivo* etkileri incelenmiştir. Daha sonra, özüt ve fungus uygulanmış yapraklarda ROS (H₂O₂ ve O₂^{•-}), lipid peroksidasyonu, fotosentetik pigmentler ve protein içerikleri ile antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, POD, APX, ve GR) aktiviteleri değerlendirilmiştir. EY içerisinde oransal olarak en fazla 4α,7α,7α-nepetalacton (%71.68) olduğu belirlenmiştir. EY, hem *in vitro* hem de *in vivo*da fungusun miseliyal ve spor çimlenmesini önemli seviyede engellerken, su ve metanolik özütler engellememiştir. Bu nedenle su ve metanolik özütler *in vivo* çalışmalarda kullanılmamıştır. Tek başına fungus uygulaması, yapraklarda ROS ve MDA seviyeleri ile çalışılan enzim aktivitelerini genelde artırırken, EY+F uygulamaları ise aynı parametreleri genelde düşürmüştür. Parametreler üzerinde EY uygulamalarından EY+F1G uygulamasının, dozlardan ise 1000 µl’lik dozun daha etkili olduğu belirlenmiştir. Sonuçlara göre, *N. meyeri* esansiyel yağlarının asmada *B. cinerea*’nın biyolojik mücadelesinde kullanılabilme potansiyelinin olduğu ileri sürülmüştür.

2016, 141 sayfa

Anahtar Kelimeler: Allelopati, Antioksidan enzim, Biyotik stres, *Botrytis cinerea*, *Nepeta meyeri*, *Vitis vinifera*

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

USING EXTRACTS OBTAINED FROM *Nepeta meyeri* (BENTH.) IN BIOLOGICAL CONTROL OF PATHOGEN GRAY MOLD (*Botrytis cinerea*) IN VINEYARDS

Sinem KARAKUŞ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Department of Botany

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this study, the extracts of essential oil (EO), water and methanolic obtained from *Nepeta meyeri* (Benth.), an allopathic plant, were used in the biological control of gray mold (*Botrytis cinerea*) that leads to substantial losses in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Kareerik). It was studied the doses of essential oil (600, 800 and 1000 µl/Petri or leaf), aqueous extract (2, 5 and 10 ml/Petri or leaf) and methanolic extract (1, 2 ve 3 ml/Petri or leaf). The extracts were applied to the leaves at the same time with the fungus (EO+F), and 1 day ago (EO+F1D) and 2 day ago (EY+2D) from the fungus inoculation. The content of EO obtained from *N. meyeri* was determined by GC/MS. First effects of the extracts were examined as *in vitro* and *in vivo* on the mycelium growth and spore germination of the fungus. Then, the levels of ROS (H₂O₂ ve O₂^{•-}), lipid peroxidation (as MDA), photosynthetic pigments and proteins, and the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, POD, APX and GR) were evaluated in the leaves on which was applied the fungus and the extracts. It was determined that 4α,7α,7α-nepetalacton was the highest (71.68%) as proportional in the EO. The EO inhibited the mycelium growth and spore germination of the fungus in both *in vitro* and *in vivo* while aqueous and methanolic extracts did not inhibit. For this reason, aqueous and methanolic extracts were not used at *in vivo* studies. Fungus treatment alone increased the levels of ROS and MDA and the activities of the enzymes while EO+F treatments, however, generally decreased the same parameters. EO+F1D treatment in the EO treatments and dose 1000 µl in the EO doses were more effective on the parameters than the other applications. It was suggested that the essential oils of *N. meyeri* could be used in an allopathic approach in biological control of the fungus that causes gray mold in grapevine.

2016, 141 pages

Keywords: Allelopathy, Antioxidant enzymes, Biotic stress, *Botrytis cinerea*, *Nepeta meyeri*, *Vitis vinifera*

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu araştırma, 2014-63 nolu Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi olarak desteklenmiş ve Fen-Fakültesi Bitki Fizyolojisi Laboratuvarında yapılmıştır.

Öncelikle çalışmalarımnda her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Biyoloji Bölüm Başkanımız ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın yapılabilmesi için imkan tanıyan Hakkari Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Ebubekir CEYLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm, tez izleme komitesinde bulunan Sayın Doç. Dr. Cafer KÖSE'ye ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye, deneylerin gerçekleşmesi aşamalarında büyük emekleri olan Sayın Doç. Dr. Salih MUTLU'ya, Sayın Doç. Dr. Serkan ERDAL'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Nevzat ESİM'e, Sayın Öğr. Gör. İhsan AYDIN'a, Sayın Arş. Gör. Veli İLHAN'a, Sayın Dr. Deniz TİRYAKİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman güzel bir aileye sahip olduğum için ne kadar şanslı olduğumu hissettiren ve hayatım boyunca attığım her adımda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, en zor zamanlarımda yanımda olan sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Ali KARAKUŞ'a ve beni sabırla bekleyen oğlum Sami Eymen'e şükranlarımı sunarım.

Sinem KARAKUŞ

Şubat 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ixx
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	400
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar	40
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları	41
3.2. Yöntemler.....	43
3.2.1. Bitki materyallerinin toplanması	43
3.2.2. <i>Nepeta meyeri</i> ' nin esansiyel yağlarının elde edilmesi ve analizi.....	44
3.2.3. <i>Botrytis cinerea</i> izolatlarının elde edilmesi ve saflaştırılması.....	45
3.2.4. Esansiyel yağın antifungal etkisinin belirlenmesi	46
3.2.4.a. Esansiyel yağın <i>in vitro</i> koşullarda patojenin miselyal gelişimi üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi.....	46
3.2.4.b. Esansiyel yağın <i>in vitro</i> koşullarda patojenin spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi	47
3.2.4.c. Asma yapraklarına fungusun enfekte edilmesi ve esansiyel yağın uygulanması.....	48
3.2.5. Su özütünün antifungal etkisinin belirlenmesi	49
3.2.5.a. Su özütünün <i>in vitro</i> koşullarda patojenin miselyal gelişimi üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi.....	49
3.2.5.b. Su özütünün <i>in vitro</i> koşullarda patojenin spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi	50
3.2.5.c. Yapraklara fungusun enfekte edilmesi ve su özütünün uygulanması.....	51

3.2.6. Metanolik özütün antifungal etkisinin belirlenmesi	52
3.2.6.a. Metanolik özütün <i>in vitro</i> koşullarda patojenin miselyal gelişimi üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi	52
3.2.6.b. Metanol özütün <i>in vitro</i> koşullarda patojenin spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi	53
3.2.6.c. Yapraklara fungusun enfekte edilmesi ve elde edilen metanolik özütün uygulanması	54
3.2.7. Bitkiler ile ilgili deneylerin yapılması	54
3.2.7.a. Klorofil miktarı tayini	54
3.2.7.b. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	55
3.2.7.c. Süperoksit anyon miktarının belirlenmesi	56
3.2.7.d. Lipid peroksidasyon seviyesinin belirlenmesi	57
3.2.7.e. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	58
1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi	58
2. Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi	59
3. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi	59
4. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini	60
5. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini	60
6. Çözünebilir protein miktarının tayini	61
3.2.8. İstatistik Analiz	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	63
4.1. <i>Nepeta meyeri</i> 'nin Esansiyel Yağ Analizi Sonuçları	63
4.2. Esansiyel Yağın <i>in vitro</i> Koşullarda Bitki Patojeni Fungusa Karşı Antifungal Etkileri	66
4.3. Esansiyel Yağın <i>B. cinerea</i> 'nın Miselyal Gelişimi Üzerine Etkisi	66
4.4. Esansiyel Yağın <i>B. cinerea</i> 'nın Spor Çimlenmesi ve Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Antifungal Etkileri	68
4.5. Esansiyel Yağın Yaprak Testleri İle Etkinliğinin Tespiti	70
4.6. Fotosentetik Pigment İçeriği Sonuçları	73
4.6.1. Klorofil <i>a</i> içeriği sonuçları	74
4.6.2. Klorofil <i>b</i> içeriği sonuçları	76
4.6.3. Toplam klorofil içeriği sonuçları	77

4.6.4. Karotenoid içeriği sonuçları	79
4.7. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı Sonuçları	81
4.8. Süperoksit Anyonu (O ₂ ⁻) Miktarı Sonuçları	83
4.9. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA miktarı) Sonuçları.....	85
4.10. Antioksidant Enzim Aktiviteleri Sonuçları	87
4.10.1. SOD enzim aktivitesi.....	87
4.10.2. POD enzim aktivitesi.....	89
4.10.3. CAT enzim aktivitesi.....	911
4.10.4. APX enzim aktivitesi.....	93
4.10.5. GR enzim aktivitesi	95
4.11. Çözülebilir protein miktarı sonuçları	97
4.12. Su Özütünün İn Vitro Koşullarda Bitki Patojeni Fungusa Karşı Antifungal Etkileri.....	99
4.13. Su Özütünün <i>B. cinerea</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi	100
4.14. Su Özütünün <i>B. cinerea</i> 'nın Spor Çimlenmesi ve Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Antifungal Etkileri.....	101
4.15. Su Özütünün Yaprak Testleri İle Etkililiğinin Tespiti	103
4.16. Metanolik Özütün İn Vitro Koşullarda Bitki Patojeni Fungusa Karşı Antifungal Etkileri	104
4.17. Metanolik Özütün <i>B. cinerea</i> 'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi	105
4.18. Metanolik Özütün <i>B.cinerea</i> 'nın Spor Çimlenmesi ve Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Antifungal Etkileri.....	105
4.19. Metanolik Özütün Yaprak Testleri İle Etkililiğinin Tespiti	1077
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	108
5.1. <i>N. meyeri</i> Esansiyel Yağın Miseliyal Gelişim ve Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	110
5.2. Su Özütünün Miseliyal Gelişimi ve Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi	113
5.3. Metanolik Özütün Miseliyal Gelişimi ve Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi	115
5.4. Klorofil <i>a</i> , Klorofil <i>b</i> , Toplam Klorofil ve Karotenoid Miktarlarının Değerlendirilmesi	116
5.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile Lipid Peroksidasyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi	117

5.6. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	121
KAYNAKLAR	128
ÖZGEÇMİŞ	142



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
ACC	: 1-aminosiklopropan 1-karboksilat
APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbik asit
CAT	: Katalaz
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
E.Ü.	: Enzim ünitesi
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
HR	: Hipersensitif direnç
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehid
nmol	: Nano mol
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
OH^-	: Hidroksil radikali
POX	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SAR	: Sistemik kazanılmış direnç
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitki hücrelerinde antioksidan savunma sistemleri	8
Şekil 1.2. Sağlıklı Karaerik üzüm	12
Şekil 1.3. Hastalıklı Karaerik üzümü	12
Şekil 1.4. Kurşuni küfün gelişimi	14
Şekil 1.5. <i>N. meyeri</i> 'nin oluşturduğu inhibisyon zonu	18
Şekil 3.1. Çeliklerin yetiştirilmesi	43
Şekil 3.2. <i>N. meyeri</i> 'nin kurutulması	44
Şekil 3.3. Esansiyel yağların elde edilmesi.....	45
Şekil 3.4. <i>B.cinerea</i> , <i>B. cinerea</i> 'nın konidiofor ve konidileri.....	46
Şekil 3.5. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik. ..	56
Şekil 3.6. Süperoksit anyonu miktarı standart grafiği.....	57
Şekil 3.7. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	60
Şekil 3.8. Protein tayini için kullanılan standart grafik	62
Şekil 4.1. <i>N. meyeri</i> 'nin esansiyel yağ analizi	65
Şekil 4.2. <i>B. cinerea</i> 'nın miseliyal gelişimi üzerine farklı konsantrasyondaki esansiyel yağın etkisi	66
Şekil 4.3. Kontrol ve en etkili esansiyel yağ konsantrasyonu.....	67
Şekil 4.4. Esansiyel yağ miselyum engelleme oranı.....	67
Şekil 4.5. Anormal olarak çimlenmiş	68
Şekil 4.6. Normal olarak çimlenmiş	68
Şekil 4.7. Esansiyel yağ spor çimlenme yüzdesi	69
Şekil 4.8. Esansiyel yağ çim tüpü uzunluğu	70
Şekil 4.9. Sağlıklı yaprak, patojen ve esansiyel yağ uygulamalı yapraklar (1000 µl)....	71
Şekil 4.10. 600 µl esansiyel yağ yaprak miselyum gelişim oranı.....	72
Şekil 4.11. 800 µl esansiyel yağ yaprak miselyum gelişim oranı.....	73
Şekil 4.12. 1000 µl esansiyel yağ yaprak miselyum gelişim oranı.....	73
Şekil 4.13. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının klorofil <i>a</i> içeriği üzerine etkileri.....	75

Şekil 4.14. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının klorofil <i>b</i> içeriği üzerine etkileri.....	77
Şekil 4.15. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının toplam klorofil içeriği üzerine etkileri.....	79
Şekil 4.16. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının karotenoid içeriği üzerine etkileri.....	81
Şekil 4.17. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının H ₂ O ₂ içeriği üzerine etkileri	83
Şekil 4.18. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının O ₂ ⁻ içeriği üzerine etkileri.....	85
Şekil 4.19. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının MDA seviyesi üzerine etkileri.....	87
Şekil 4.20. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkileri.....	89
Şekil 4.21. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının POD aktivitesi üzerine etkileri.....	91
Şekil 4.22. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkileri.....	93
Şekil 4.23. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkileri.....	95
Şekil 4.24. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkileri.....	97
Şekil 4.25. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının protein miktarı üzerine etkileri.....	99
Şekil 4.26. <i>B. cinerea</i> 'nın miseloyal gelişimi üzerine farklı konsantrasyondaki su özütünün etkisi	100
Şekil 4.27. Su özütü miselyum engelleme oranı.....	101
Şekil 4.28. Su özütü spor çimlenme yüzdesi	102
Şekil 4.29. Su özütü çim tüpü uzunluğu	103
Şekil 4.30. Patojen ve su özütü uygulamalı yapraklar	103
Şekil 4.31. Su özütü yaprak miselyum gelişim oranı	104

Şekil 4.32. <i>B. cinerea</i> 'nın miseliyal gelişimi üzerine farklı konsantrasyondaki metanol özütünün etkisi	105
Şekil 4.33. Metanol özütü spor çimlenme yüzdesi	106
Şekil 4.34. Metanol özütü çim tüpü uzunluğu	107
Şekil 4.35. Patojen ve metanol özüt uygulamalı yapraklar.....	107



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>N. meyeri</i> 'nin esansiyel yağ analizi	63
Çizelge 4.2. Esansiyel yağın miselyum engelleme oranına etkisi	67
Çizelge 4.3. EY dozlarının konidisor çim tüpü uzunluğuna etkisi.	69
Çizelge 4.4. EY dozlarının yapraklarda miselyum gelişimine etkisi.....	72
Çizelge 4.5. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında klorofil <i>a</i> miktarına (mg.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	74
Çizelge 4.6. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında klorofil <i>b</i> miktarına (mg.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	76
Çizelge 4.7. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında toplam klorofil miktarına (mg.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	78
Çizelge 4.8. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında karotenoid miktarına (mg.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	80
Çizelge 4.9. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında hidrojen peroksit miktarına (ng.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	82
Çizelge 4.10. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında süperoksit anyonu miktarına (ng.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	84
Çizelge 4.11. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında lipid peroksidasyon seviyesine (nmol.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	86
Çizelge 4.12. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında SOD enzim aktivitesine (EU.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	88
Çizelge 4.13. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında POD enzim aktivitesine (EU.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	90
Çizelge 4.14. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında CAT enzim aktivitesine (EU.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	92
Çizelge 4.15. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında APX enzim aktivitesine (EU.g ⁻¹ doku) ait bulguları.....	94
Çizelge 4.16. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında GR enzim aktivitesine (EU.g ⁻¹ doku) ait bulguları	96

Çizelge 4.17. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında çözülebilir protein miktarına (mg.g ⁻¹ doku) ait bulguları	98
Çizelge 4.18. Su özütünün miselyum engelleme oranına etkisi	100
Çizelge 4.19. Su özütü dozlarının konidisor çim tüpü uzunluğuna etkisi	102
Çizelge 4.20. Su özütünün yapraklarda miselyum gelişimine etkisi	104
Çizelge 4.21. Metanol özütü dozlarının konidisor çim tüpü uzunluğuna etkisi	106



1. GİRİŞ

Dünya nüfusu yirminci yüzyılın başında 5,5 milyara ulaşmış ve bu nüfusun 2050 yılında 8.5 milyara ulaşması beklenmektedir (Mutlu 2009). Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak kişi başına düşen işlenebilir tarım alanlarının çeşitli stres faktörlerinin etkisiyle kullanılamaz duruma gelmesi, şuan herhangi bir kıtlık tehlikesi olmasa da, uzun dönemde risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (Jones and Jones 1989; Bray *et al.* 2000; Mutlu 2009). Kültür bitkilerinin hastalık ve zararlılardan korunmasının yanında kaliteli ve artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyacını karşılayacak düzeyde ürün elde edilmesi amacıyla hastalık etmenleri, zararlılar ve yabancı otlara karşı çeşitli mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Bunların başında kimyasal savaş gelmekte olup, bunu kültürel ve biyolojik mücadele yöntemleri izlemektedir (Türküsay ve Onoğur 1998).

Yüzlerce sentetik kimyasal zirai ilaç tarımsal alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Zirai zararlılara karşı herbisit, pestisit, fungusit gibi sentetik kimyasallarla yapılan mücadele, ekosisteme ve toprağa verdiği zarardan dolayı tarımsal açıdan büyük problemlere neden olmaktadır. Ayrıca, bu tip sentetik kimyasalların geniş çapta kullanılması, çevre kirliliği ve insan sağlığı açısından büyük bir sorun haline gelmiştir. Günümüzde bu sentetik kimyasalların yerini alabilecek, daha güvenli ve bitkilerde doğal olarak üretilen sekonder metabolitler (veya allelokimyasallar) tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin doğal süreçte biyolojik parçalanmaları kolay olduğu için hem tüketiciler hem de çevre için daha sağlıklı olduğu bilinmektedir. Son yıllarda bitki fizyologları bu tip bileşikleri üreten yabani veya kültür bitkilerini incelemekte ve bitkilerdeki bu doğal sekonder bileşikleri elde edip uygulama yollarını araştırmaktadırlar. Bitkilerde doğal olarak üretilen böyle bileşiklerin, biyolojik kontrol amacıyla özellikle organik tarım açısından doğal herbisit, pestisit, fungusit vb. olarak kullanılmaları önerilmektedir (Vyvyan 2002; Singh *et al.* 2003; Weston and Duke 2003).

Doğada bitkiler arasında kimyasal bir iletişim ve çeşitli etkileşim yolları bulunur. Böylece bitkiler çevrelerindeki bitki ve diğer canlılarla ortak yaşam ilişkilerini belirler. Bu olaya bitki biyolojisinde allelopati denilir. Allelopatik ilişkide, bitkiler çevrelerinden canlıları olumlu veya olumsuz etkiler. Allelopatik ilişkiler esnasında kullanılan bileşiklere ise allelokimyasallar denilir. Allelokimyasallar bitki sekonder metabolitleri içerisinde değerlendirilirler. Allelopatik bitkiler var olan kaynakların diğer bitkiler tarafından tüketilmesini engelleyerek, büyüme ve gelişme sınırlarını artırmakta ve yeni yayılım alanları oluşturmaktadırlar. (Kocaçalışkan 2004; Willis 2007). Allelopatik bitkiler, yaşadığı ortamları kontrol edebilirler. Ceviz (*Jugland nigra*) en tanınmış allelopatik bitkilerden birisidir. Cevizde zehirlenme ve solunumu engelleyen kimyasal etken juglon'dur (5-hidroksinaftakinon). Biber, patlıcan ve domates gibi Solanaceae familyası üyeleri bu maddeye çok duyarlıdırlar. Bu bitkiler allelokimyasallara maruz kaldıkları zaman solma, kloroz ve son olarak da ölme belirtileri gösterirler. Bazı bitkiler ise böyle değişimlere hassas olmadığından söz konusu etkiler görülmemektedir. Örneğin, limon, bakla, pancar, havuç, mısır, kiraz, ahududu, menekşe vb. türlerin juglona karşı dayanıklı oldukları bilinmektedir. Biber ve domates gibi Solanaceae familyasına ait türler juglona daha duyarlıdır (Kocaçalışkan 2004; Willis 2007).

Allelokimyasal maddeler bitkide uçucu yağlar (esansiyel yağlar) olabildiği gibi uçucu olmayan bileşikler grubundan da olabilir. Bitkide uçucu olmayan bileşikler fenolik maddeler veya azotlu sekonder bileşikler grubunda olup suda çözülebilen veya çözünmeyen formlarda olabilirler. Uçucu yağlar ise terpen grubu bileşiklerdir. Oksijenli terpenoit türevleri (alkoller, aldehytler, ketonlar ve esterler), benzenoit yapıdaki bileşenler (alkoller, esterler, asitler, aldehytler, ketonlar, fenoller, fenol eterler, laktonlar vb.) ve nadir olarak azot ve kükürt içeren bileşenleri de içermektedirler. Uçucu yağların; analjezik, antiseptik, antifungal, antiviral, bakterisit, insektisit, sedatif, stimulan, antioksidan gibi etkileri vardır. Bu özellikler uçucu yağ türüne göre değişiklik gösterse de hepsinin ortak yanı genel olarak antibiyotik, dezenfekte edici, bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinin olmasıdır. Hidrofobik özellikte olmaları uçucu yağların antimikrobiyal ve antifungal etkilerini arttırmaktadır. Ayrıca bu özellikleri sayesinde ambalajlarda ve yenilebilir filmlerde sentetik maddelere alternatif koruyucu madde olarakta kullanılmaktadırlar (Kaya ve Günç Ergönül 2015).

Canlılar allelokimyasal maddelere maruz kaldığında büyüme ve gelişmeleri etkilenmektedir. Örneğin bitkilerde kolaylıkla görülebilen etkiler; çimlenmenin gecikmesi veya önlenmesi, tohumlarda koyulaşma ve şişkinlik, kök-gövde gelişiminde azalma, kök uçlarının şişmesi veya nekroze olması, kök sisteminde buruşma, kuru madde ve üretim kapasitesinin azalmasıdır. Bu anormal morfolojik etkiler, bitkilerde allelokimyasallar tarafından fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde olan değişimlerin sekonder etkileri olarak ortaya çıkar. Bitkilerden salınan allelokimyasalların sadece diğer bir bitkide değil, aynı zamanda bakteri, fungus ve zararlı böcekler gibi diğer zararlılar üzerinde de olumlu veya olumsuz etkileri gözlenmiştir (Reigosa *et al.* 2006).

Bitkiler olumsuz bir çevre veya ajanla karşılaştıklarında, hücreler’de ve dokular’da biyokimyasal ve fizyolojik olaylarda yıkıcı değişimler meydana gelerek bitkide ciddi zararlar ortaya çıkabilir. Böyle bir durumda bitkisel stresten bahsedilir. Tarım sektöründe ürün kaybına neden olan en önemli stres ajanlarından birisi biyotik streslerdir. Bu stresler dünyada üretilen bitkisel ürünlerin başında gelen bitkilerin neredeyse yarısını azaltarak tarım ticaretinin geleceğini olumsuz yönde etkiler. Biyotik stres ajanları herbivorlar ve patojen mikroorganizmalardır. Funguslar bu ajanlar içerisinde neredeyse en önemli yeri alır. Funguslar hızlı üremeleri ve hızlı yayılmaları ve birçok olumsuz koşullara dirençli olmalarından dolayı mücadeleleri zor biyotik stres ajanlarıdır (Patkowski and Urbanek 2003).

Bitkiler biyotik stres koşulları ile baş edebilmek için fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar bulundurlar. Biyokimyasal stratejiler; seçici iyon birikimi veya dışlanması, köklerle alınan iyonların kontrolü ve yapraklara taşınımı, tüm hücre düzeyinde veya hücresel boyutta iyonların dağılımı, uyumlu bileşiklerin sentezi, fotosentetik yolunun değişmesi, membran yapısındaki değişimler, antioksidant enzimlerin ve bitki hormonlarının uyarılması olarak sıralanabilirler (Seçkin 2005) .

Biyotik strese maruz kalan bitkilerde metabolik bozulmalara neden olan en önemli olaylardan biri oksidatif strestir. Oksidatif stres, serbest radikallerin, özellikle reaktif

oksijen türlerinin [süperoksit molekülü ($O_2^{\bullet-}$), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerinin ($OH^{\bullet}$)] sebep olduğu bozulmalardan dolayı bitki büyüme ve gelişmesinde önemli zararlara neden olur (Raychaudhuri 2000; Mayer *et al.* 2001). Bu bileşikler, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküllerdir. Başka moleküllerle kolayca elektron alış-verişine girerek onların yapısını bozan bu moleküllere ‘Serbest Radikaller, Oksidan Moleküller ya da Reaktif Oksijen Türleri’ adı da verilir (Neill *et al.* 2002). Oksidatif stres süresince, reaktif oksijen türleri (ROS) bitki hücresinin özellikle mitokondri, kloroplast ve peroksizom gibi farklı kısımlarında üretilerek hücrelerde hasara ve hatta ölüme bile neden olabilirler. Bu moleküllerin etki mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlamak için her biri hakkında aşağıda öz bilgiler verilmiştir.

Singlet Oksijen (1O_2); moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Oksijenin bu formunun üzerinde eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur. Fakat oksidan özelliği oldukça yüksektir (Desikan *et al.* 2005). Singlet oksijen farklı yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak üretilebilir. Kaynağı fotosentez reaksiyonlarında elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer *et al.* 1997; Güler 2008). Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur. $^{\bullet}OH$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Gechev *et al.* 2002; Mutlu 2009).

Moleküler oksijen bir elektron alarak kararsız bir yapı olan süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) anyonuna dönüşmektedir. Süperoksit anyonu enzimatik ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla meydana gelebilir. Bu radikal oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin oksidasyonuna da sebep olur. Bu radikalın lipid peroksidasyon, membran hasarı, hücresel toksisite ve DNA’daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Desikan *et al.* 2005). Süperoksit radikali ile hidroksi radikali

birbirleriyle reaksiyona girdiğinde biri okside olur diğeri indirgenir. Bu reaksiyon sonucunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur. Süperoksit radikali oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenir (Burtis and Ashwood 1999). Aerobik canlılarda $O_2^{\cdot-}$ 'lerin H_2O_2 'e çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir. Aynı zamanda süperoksit, hafif asidik koşullarda SOD olmadan kendiliğinden dismutasyonla H_2O_2 'e çevrilebilir. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde $O_2^{\cdot-}$ birikimine izin verilmez. Ancak, çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), özellikle proteinlerdeki HEM grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin oksitleyici özelliği nedeniyle ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 2006). Bunu katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler H_2O ve O_2 gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir. Oksidatif streslere tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücresel seviyelerini düzenlenmesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002). Hidroksil radikali ($\cdot OH$), oksijen radikalleri içerisinde en reaktif ve en toksik olanıdır. İyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda olduğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot OH$, su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler $\cdot OH$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1984). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\cdot OH$ 'ın başlıca hedefi yağ asitleri olup, zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998; Güler 2008).

Yukarıda özetlendiği şekliyle, ROS'ların hücrelerde en önemli etkilediği hedef yerlerden birisi membranlardaki doymamış lipidlerdir. ROS'lar doymamış lipidleri peroksidasyona uğratarak lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinen büyük bir hasara yol açarlar. Lipid peroksidasyonu membran bütünlüğünün yok olmasına, hücrenin elektrolitlere geçirgenliğinin artmasına neden olur. Özellikle Ca^{++} ve Na^{+} iyonlarının hücre içerisine kontrolsüz geçişi, hücrenin enerji oluşturan mekanizmalarını etkileyebilir. İntrasellüler Ca iyonlarındaki artış; protein ve lipidlerde daha fazla hasara neden olabilecek proteaz ve fosfolipazı aktive eder. Bu aynı zamanda DNA'da yapısal hasara ve hücre ölümüne neden olabilecek enzim inaktivasyonuna neden olabilir (Halliwell 1994). Biyolojik sistemlerde Lipid peroksidasyonunu başlatan serbest radikalın, süperoksit anyonu ile özellikle de hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Böyle oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalının moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir (Spiteller 2001; Kuru 2007). Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz ve Ozan 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun içsel seviyesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Yılmaz ve Ozan 2003; Kuru 2007).

ROS'ların yukarıda sayılan toksik özelliklerinin yanında, düşük seviyelerde üretilen ROS'ların ise en az dört değişik olumlu role sahip oldukları ileri sürülmüştür. ROS'lar ilk olarak hipersensitif hücre ölümüne neden olmaktadır. Hipersensitif, bitkinin sadece patojenin enfekte ettiği bölgedeki hücrelerini öldürmesi olayıdır. Hücre ölümü patojenin sadece enfeksiyonun olduğu bölgede lokalize olmasına neden olmakta ve bu

şekilde hastalığın yayılması önlenmektedir. Bu şekilde gelişen koruma mekanizmasına hipersensitif direnç (HR) denilir (Özcan vd 2001).

Reaktif oksijen türevlerinin ikinci bir fonksiyonu hastalık etmenine karşı doğrudan öldürücü etkide bulunmasıdır. Bilindiği gibi H_2O_2 yaraların enfekte olmasını önlemek ve çevreyi mikrop­lardan arındırmak için kullanılmaktadır (Özcan vd 2001).

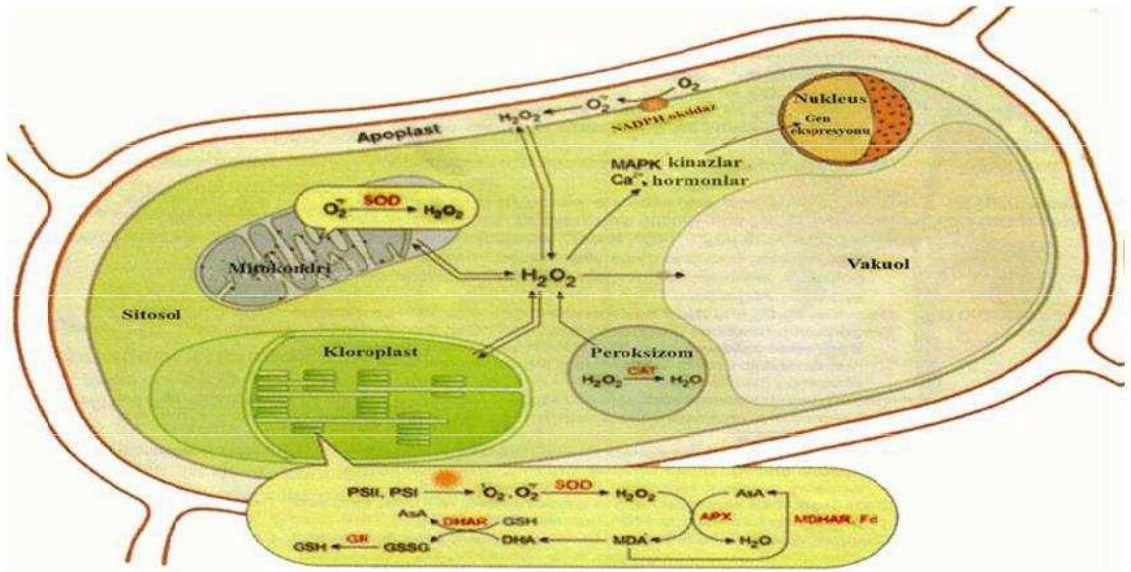
Reaktif oksijenin bir başka fonksiyonu da lignifikasyonda rol almasıdır. Lignin oluşumu bitkilerde enfeksiyondan sonra hücre duvarının sağlamlaştırılması bakımından önemlidir. Bitkide lignin oluşumunda gerekli olan ve birçok enzim reaksiyonlarında substrat olduğu bilinen H_2O_2 aynı zamanda sinyal molekülü gibi görev yapmaktadır. Ayrıca normal büyüme aşamasında, yaralanma ve patojenler gibi dış uyarılara yanıt olarak ta kullanılmaktadır (Özcan vd 2001; Patykowski 2006).

ROS'ların diğer bir rolü de bitkide sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır. Hastalık etmeninin enfeksiyonu sonucunda bitki hücresinde üretilen ROS'lar bitkinin savunma sistemini harekete geçirirler. Reaktif oksijenler sadece enfekte olmuş bölgelerdeki genleri uyarmakla kalmaz, aynı zamanda sistemik doku olarak bilinen ve bitkinin hastalıktan henüz etkilenmediği diğer bölgelere giderek oradaki savunma genlerinin de aktif hale gelmesini sağlarlar. Bu olay Sistemik Kazanılmış Direnç (SAR) olarak bilinir. SAR mekanizması uyarılmış bitkide, bundan sonraki enfeksiyonlara karşı dayanıklılık son derece artar (Neuenschwander *et al.* 1995).

Bununla birlikte yüksek seviyelerde üretilen ve hücrelerde temizlenmeyen ROS'lar, hücre metabolizmasında önemli bozulmalara neden olur. Bunlar özellikle hücre membranlarında bozulmalara yol açmanın yanında nükleik asitleri, proteinleri ve lipitleri oksitleyebilirler (Stadtman 2002).

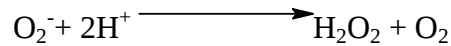
Bitki hücreleri ROS miktarını kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri artan ROS etkisinden korumak için ROS'u hücre ortamında temizleyen antioksidan enzimler veya enzimatik olmayan antioksidan bileşikler (Askorbat, Glutatyon, Fenolik Bileşikler, Tokoferoller vs.) içermektedirler (Halliwell 2006). Şekil 1.1'de antioksidan enzimler ile

ROS bileşikleri arasında ilişkiyi tanımlayan bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (Gechev *et al.* 2006). Antioksidan enzimler reaktif oksijen türlerini kademeli bir şekilde daha az toksik olan bileşiklere parçalayarak temizlerler. Buna ROS'ların süpürülmesi de denir. ROS'u ortamdan süpüren antioksidan enzimlerin başında süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve askorbat peroksidaz enzimleri gelir (Halliwell 2006).



Şekil 1.1. Bitki hücrelerinde antioksidan savunma sistemleri (Gechev *et al.* 2006)

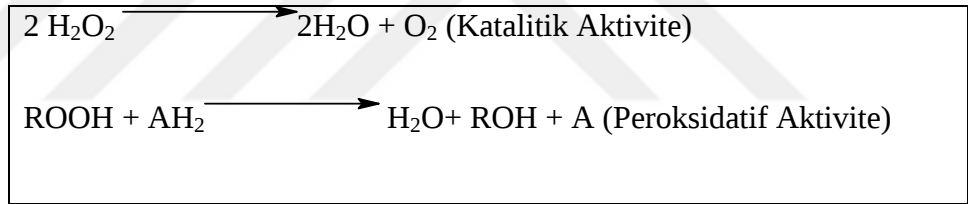
Süperoksit Dismutaz (SOD); süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Fridovich 1986; Güler 2008).



SOD'un biri sitoplazmada, diğeri mitokondride olmak üzere iki izoenzimi vardır. Ökaryotlardaki mitokondriyal SOD, karakteristik Mn^{+2} muhtevası ve amino asit dizilişi bakımından birçok bakterininkine benzer. Buna karşılık sitoplazmadaki ise, tamamen farklı yapıya sahiptir ve Cu^{+2} ile Zn^{+2} iyonu ihtiva eder. SOD, süperoksitin

parçalanmasını sağlayarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşum riskini azaltır. ROS'a karşı antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olan ve bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunan bu enzimin aktivitesinin çeşitli streslere cevap olarak arttığı ve bu artışların strese karşı dirençle bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Bowler *et al.* 1992; Foyer *et al.* 1995; Van Camp *et al.* 1996; Apel and Hirt 2004).

Katalaz (CAT); yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin 2 elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999). Aynı zamanda CAT, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Pek çok bitki hücresinde enzimin büyük bir kısmı, H_2O_2 'nin yüksek olduğu peroksizomlarda bulunur. CAT çok az miktarda mitokondri matriksinde de bulunur. CAT'ın bitki dokusunda H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patkowski and Urbanek 2003). Solunum zincirinde, oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H_2O_2 'yi O_2 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen radikal karakterli H_2O_2 'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir. Zira H_2O_2 , singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikallerinin ($OH^\bullet$) potansiyel kaynağıdır (Chaudiere and Ferrari 1999).

Peroksidaz (POD); H_2O_2 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizlerler (Bergmeyer and Grabl 1983).

Peroksidazların pek çok fizyolojik olayla ilişkisi olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir (Bunkelmann and Trelease 1996; Erdei *et al.* 2002; Durmuş 2003). Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Asada 1992). POD, bitkilerde büyük oranda bulunur. POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



Sonuç olarak peroksidazlar hidrojen peroksidi kontrol altında tutarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlarlar. Mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Amaya *et al.* 1999; Rout *et al.* 2000; Jaleel *et al.* 2008).

Bitki hücrelerinde H_2O_2 'in detoksifikasyonunda en önemli indirgen substrat askorbattır. Askorbat peroksidaz (APX) askorbatı H_2O_2 ve suya parçalamaktadır (Noctor 1998). Askorbik asit, ROS'ların geniş bir bölümünü uzaklaştırmakta ve zincir kırıcı olarak görev yapmaktadır (Bayer 1994). Yüksek bitkiler, algler, kamçılılar gibi birçok organizmada ROS'a karşı gerçekleştirilen savunmada önemli role sahip olduğu düşünülen enzimatik antioksidanlardır. Askorbat peroksidaz (APX) enzimi yüksek bitkilerde keşfedilmiştir. Vakuol, hücre duvarı, sitozolde bulunan guaiacol peroksidaz gibi birçok enzimden farklı olarak organellerde bulunmaktadır. APX izoenzimleri dört farklı hücresel kompartımanda görev almaktadır. Kloroplastlarda stromatal APX (sAPX) ve tilakoid membrana bağlı APX (tAPX), peroksizom (mikrobody) membranına bağlı APX (mAPX) ve sitozolik APX (cAPX). Beşinci bir APX izoenzimi (mitAPX) mitokondri membranına bağlı olarak bulunmuştur (Shigeoka *et al.* 2002).

Glutatyon redüktaz (GR); Glutatyon redüktaz, GSH-Px ile hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyonla

(GSH) dönüşümünü sağlamaktadır. Glutasyon redüktaz bitki, hayvan ve bakterilerde bulunur. NADPH varlığında Glutasyonun rejenerasyonunu sağlamak için askorbat-glutasyon döngüsünde anahtar enzimdir (Hou *et al.* 2004). NADPH varlığında okside glutasyonu indirgenmiş glutatyonla dönüştürerek antioksidan etki gösterir. GSH antioksidan olarak görev yapar. Serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girer, aminoasit taşınımında görev alır, glutasyon peroksidaz ve glutasyon S-transferaz enzimlerinin substratıdır. GR bitki dokularında kloroplast, mitokondri ve sitosolde bulunur (Ciceralli 2004).

Bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara maruz kalan bitkilerde reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Enfeksiyon sırasında, ROS'lar hem bitki hücresi hem de patojen tarafından üretilebilir (Patkowski and Urbanek 2003). Strese maruz kalan bitkiler, antioksidan savunma sistemlerin aktivasyonu ile oksidatif stresin üstesinden gelebilirler. Fakat radikal üretimi, antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aşacak kadar fazla olursa, o zaman bitkide meydana gelecek hasar geri dönüşümsüz olmaktadır (Alexieva 2003).

Asma (*Vitis* sp.) dünyada çok geniş bir alanda tarımı yapılan en yaygın ve en eski tarımsal ürünler içerisinde. Asma meyvesi olan üzüm, gerek beslenme gerekse sağlık açısından çok değerli bir besin kaynağıdır. Ayrıca, mineral maddelerden kalsiyum, potasyum, sodyum ve demir yönünden zengin olduğu gibi A, B ve C vitaminleri yönünden de önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Çelik vd 1998). Üzüm özelliklerine göre farklı şekillerde değerlendirilir. Bazı çeşitleri sofralık olarak tüketilmekte, bazıları kurutulmakta, diğerleri ise şarap, pekmez, sirke vb. elde edilmesinde kullanılmaktadır (Kısmalı 1996). Bağcılık, milli gelire sağladığı katkı ile ülkemiz ekonomisi içerisinde ayrı bir önem taşıyan tarımsal üretim koludur. Yurdumuzda uygun şartlara sahip olan bağcılık tarımı, geniş bir yayılım alanı bulmuştur. Ülkemizde toplam bağ sahası 462.296 hektar alanda yapılmakta olup, 4.275.659 ton üzüm üretilmektedir (Anonim 2014). Bağcılık, Erzincan İl'inde de önemli tarım kollarından biri olup bölgenin ve ülkemizin sofralık üzüm ihtiyacının önemli bir kısmını karşıladığı belirtilmektedir. Erzincan ilinde ise toplam 8.920 dekar alanda 5.970 ton üzüm üretilmektedir (Albayrak vd 2011). İl içerisinde gerek bağ alanı ve gerekse üzüm

Üretim miktarı itibariyle zml İlçesi, en önemli yer konumundadır. Karaerik zm eşidi (*Vitis vinifera* cv. Kareerik) siyah renkli, şekli basık-oval, ortalama 3-4 gram tane ağırlığında, çekirdek sayısı ortalama 1-4 orta kabuk kalınlığında, aroması tatlı-mayhoş, konik şeklinde, dolgun sıklıkta, 300-1500 gram salkım iriliğinde sofralık bir üzüm çeşitidir (Şekil 1.2 ve Şekil 1.3). Ayrıca, zm taneleri üzerinde kendine has bir buğunun ve tanelerin üzerindeki kabuğun orta kabuk kalınlığında olduğu, bu n edenle ağza alındığı anda üzümün dağıldığı belirtilmektedir (Gözener vd 2014).



Şekil 1.2. Sağlıklı Karaerik zm



Şekil 1.3. Hastalıklı Karaerik zm

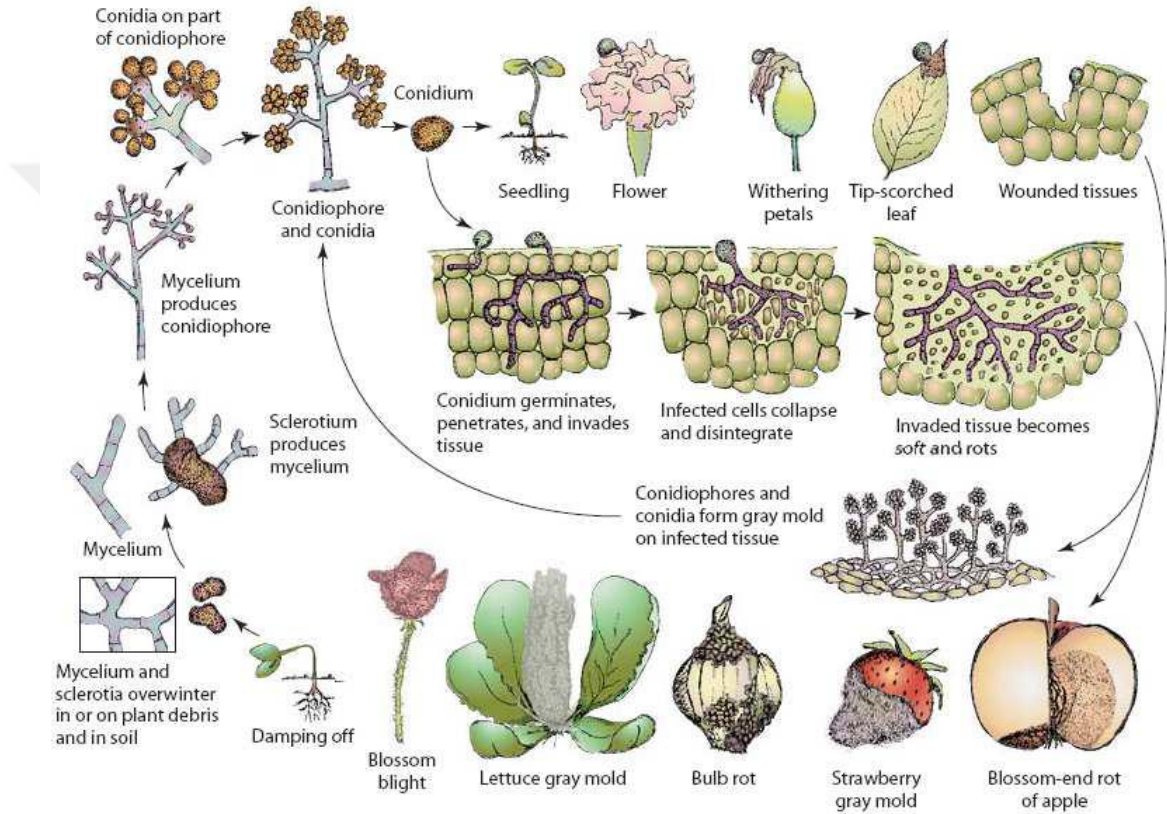
Üzümde kaliteyi ve verimi düşüren birçok hastalık bulunmaktadır (Caillot *et al.* 2012). Bağlar da bağ zararlıları (nematodlar, salkım güvesi, bağ uyuzu, kırmızı örümcekler, haziran böcekleri, vb.), mantari hastalıklar (külleme, mildiyö, l kol, antraknoz, kurşuni küf, kav, kök rklğ vb.), bakteriyel hastalıklar (bağ kanseri, bakteriyel yanıklık, asma vebası, vb.) ve virüs hastalıkları önemli kayıplara neden olabilmektedirler (Göktaş 2008; Schnee *et al.* 2013). Özellikle bağın çiçeklenme, ben düşme, üzümün hasad ve depolaması sırasında önemli kayıplara neden olan kurşuni küf (*Botrytis cinerea*) hastalığının önemi eski yıllardan beri bilinmektedir (Roslenbroich and Stuebler 2000; Delen 2001; Koplay 2003). Hastalık etmeni, asmanın çiçeklenme döneminden itibaren değişik dönemlerinde bağa bulaşabilmektedir (McClellan and Hewitt 1973; Delen 2001). Enfeksiyon hasat döneminde meyve kalitesi üzerinde olumsuz etki yaparak, sofralık ve şaraplık üzümlerde üzüm tanesinin albenisinin

düşmesine ve kimyasal yapısının değişmesine yol açar. Bu durum da sofralık üzümlerin ve bulaşık tanelerden üretilen şarapların tatsız, bakteriyel enfeksiyona ve oksidasyona karşıda hassas olmasına neden olur (Colley-Smith *et al.* 1980).

B. cinerea (anamorf; *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetzel), apothesyal ascomycetesler sınıfına dahil polifag bir fungustur (Rossi *et al.* 2011). Tüm dünya yüzeyine yayılmış, kapalı ve açık ortamda yetiştirilen süs bitkilerini, sebze ve meyveleri içine alan 200'den fazla ekonomik öneme sahip bitkide büyük kayıplara yol açabilen hasat öncesi ve sonrasında görülebilen bir bitki patojenidir (Miclea and Puia 2010; Qin *et al.* 2010; Rossi *et al.* 2011; Adongo *et al.* 2012; Vio-Michaelis *et al.* 2012). Bu patojen ile yapılan araştırmalara göre, patojen tüm vejetasyon süresince bağda bulunabilmektedir (Delen ve Koplay 2002). Primer enfeksiyonları başlatan konidiler ise, giysiler, araç-gereçler, sıçrayan sular, nemli hava akımları tarafından taşınarak yayılmaktadır (Agrios 2005). *B. cinerea*, erken dönemde asmanın çiçek organlarındaki (yumurtalık, stamen) doğal açıklıklardan girerek, bitki dokusu içinde latent enfeksiyonlarını oluşturmaktadır (McClellan and Hewitt 1973). Bağda çiçeklenme ve tanelerin olgunluk dönemleri, *B. cinerea* enfeksiyonları açısından önem taşımaktadır. Yaşlanan çiçeklerde resviretol sentezinin düşmesi *B. cinerea*'ya duyarlılığı arttırmaktadır. Taneler ise olgunlaştıkça patojene duyarlı hale gelir. Olgunlaşmamış tanelerde stilben, suberin, tanin gibi antifungal maddeler yoğun bulunmaktadır ve tanelere dayanıklılık kazandırmaktadır (Kan 2005).

Etmen kış boyunca toprakta çürümüş bitki artıkları üzerinde, miselyum ya da sklerot olarak bir yıl canlı kalabilir (Yıldız 1991). Kışlayan sklerotlar ve miselyumdan, hastalık için uygun koşullarda konidiler oluşmaktadır. Bağlarda, konidiler sonbahar dönemindeki en önemli hastalık birimleridirler. Enfeksiyon kaynağı olarak konidiler, bağda olduğu gibi serada da dikkate değer role sahiptirler. Bağda kışı sklerot olarak geçiren inokulum ilerde görülebilecek kurşuni küf hastalığı açısından önemlidir. Genellikle konidiler, mekaniksel olarak, iklim koşulları nedeniyle, böceklerce yaralanmış ya da patojenlerce nekroze edilmiş kısımlarda ve yaşlı çiçeklerde kolonize olarak bitkileri penetre etmektedirler (Şekil 1.4). Konidilerin çimlenebilmesi ve gelişebilmesi için optimal koşullar; serbest nem, 15-25°C'lik sıcaklık ve az rüzgarlı havadır. Ancak, 0-10°C gibi

düşük sıcaklıklarda da aktif bir patojendir ve bu nedenle özellikle depolanan üzümlerde de sorun olmaktadır (Elad *et al.* 2004). Yukarıda bahsi geçtiği gibi, hastalığın hem geniş bir konukçu dizisine sahip olması, hem de saprofitik özelliği nedeni ile bitkilerin hemen hemen her döneminde rastlanabilmektedir. Bu açıdan, patojen ile savaşım son derece önemlidir.



Şekil 1.4. Kurşuni küfün gelişimi (Agrios 2005)

B. cinerea, yoğun sporulasyonu olan, hızla ve kolayca yayılabilen, tüm hücrelerinde çoğunlukla heterojen karakterde çok sayıda çekirdek içeren, büyük morfolojik değişkenlik ile metabolik ve genetik çeşitliliğe sahip bir fungus olarak nitelendirilmektedir. Bu özellikler, patojen ile savaşımı hem güçleştirmekte hem de fungusitlere karşı duyarlılıklarının hızla azalabilmesine yol açmaktadır (Topolovec-Pintarić 2009).

Hastalığın kontrolünde sık dikimden, bitkileri yaralamaktan, ölü ya da enfekteli bitki parçacıklarının üretim alanlarından uzaklaştırılması ve uzun süre ıslak tutacak muamelelerden kaçınılması önerilmektedir. Dayanıklı çeşitler her zaman tercih edilmekle birlikte uzun süre bir koruma sağlanamadığı bilinmektedir (Paulitz and Belanger 2001). Hastalık etmenine karşı biyolojik savaş konusunda; fungal antagonistlerden bazı *Trichoderma* spp.'nin ve *Ulocladium* sp.'in, bakteriyel antagonistlerden olan *Bacillus* cinsine ait *Bacillus subtilis*'in *in vitro* ve *Bacillus licheniformis* ile *Pseudomonas fluorescens*'in bazı ırklarının da *in vivo* koşullarda patojenin gelişmesini engelledikleri bildirilmektedir (Lee *et al.* 2006). Kurşuni küfün kimyasal mücadelesinde, fungusit uygulamaları hastalığın şiddetini azaltsa da çevre kirliliği sorunu açısından alternatif savaşım yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Giderek artan dünya nüfusu ve buna bağlı olarak ürün yelpazesindeki çeşitlilik göz önünde bulundurulduğunda, hastalıklardan doğacak ürün kayıplarına yönelik yapılan çalışmalar da hız kazanmaktadır. Modern tarımın gelişmesiyle, global besin üretimi bir ölçüde artmıştır. Bunun yanında birçok biyotik faktörse (böcekler, mantar, bakteriler, virüsler ve yabancı otlar gibi) tarımsal üretimin düşmesine sebep olmaktadır (Singh *et al.* 2006). Günümüzde sentetik kimyasal maddeler (herbisit, fungusit ve pestisit) sürekli üretilmekte ve zirai alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat modern tarımda bu tarz sentetik maddelerin geniş çapta ve yoğun olarak kullanılması başta çevre kirliliği ve insan sağlığı açısından büyük bir sorun haline gelmiştir (Mutlu *et al.* 2011). Belirtilen bu sakıncalar, kullanılan bu kimyasalların çoğunun sentetik olarak üretilmeleri ve biyolojik parçalanmalarının çok zor veya bazen imkânsız olmasına bağlıdır. Tüm bu olumsuzluklar, araştırmacıları, biyolojik mücadele veya biyolojik ajanların entegre mücadele kapsamında kullanılmasına ilişkin araştırmalara yöneltmiştir (Demir 2009). Çünkü bitkilerde doğal yollarla sentezlenen yani biyolojik kaynaklı sekonder kimyasal bileşikler, biyolojik parçalanabilirlikleri mümkün ve kolay olduğu için hem tüketiciler hem de çevre için daha sağlıklı ve güvenilirdir (Weston and Duke 2003; Kocaçalışkan 2006). Bu yüzden son yıllarda bitki fizyologları bu tip kimyasalları üreten yabani ve kültür bitkilerini inceleme ve bu bitkilerdeki doğal kimyasalların bu alanda uygulama yollarını araştırmaktadırlar. Bu sentetik maddelerin meydana getirdiği çevre kirliliğine bir alternatif olarak bitkisel doğal sekonder metabolit ürünlerin

(allelkimyasallar) kullanılması daha sağlıklı ve güvenilir olacaktır. Çevredeki ömürleri kısa olduğundan birikim yapmazlar, doğal olduklarından insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkilemezler (Weston and Duke 2003).

Bitkilerden elde edilen böyle doğal maddelerin değişik patojenlere etkisi de araştırılmış ve değişik aromatik yağların patojenlere etkili olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan kekik, lavanta, biberiye, adaçayı gibi bitkilerin yağlarının fungal ve bakteriyel etmenlere karşı etkili olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bunlardan *Hedera helix*, *Datura stromonium*, *Ficus carica* ve *Avena sativa* yaprak ekstraktlarının *B. cinerea*'nın spor çimlenmesi ve koloni gelişimleri üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (Türküsay ve Onoğur 1998). Kekik yağının asmada *B. cinerea*'ya karşı uygulandığında iyi bir fungusit kadar etkili olduğu bildirilmiştir (Daferera *et al.* 2002). Salisilik asit gibi çevre kirliliğine yol açmayan maddelerin de bitkilerde enzim ve protein sentezini teşvik ederek kurşuni küfün gelişimi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Moret *et al.* 2003). *B. cinerea*'nın mücadelesinde patojenin kitin sentezine engel olunarak konidiospor üretimlerinin engellemesi gibi yeni metotlar da denenmektedir (Soulie *et al.* 2006).

Nepeta cinsi (*Lamiaceae*) yaygın olarak Orta ve Güney Avrupa, Güney-Batı, Orta ve Güney Asya'ya yayılan yaklaşık 280 türü içerir (Skaltsa *et al.* 2000; Tzakou *et al.* 2000; Mojaba *et al.* 2009). *Nepeta* türleriyle yapılan önceki araştırmalar, Türkiye'de 22 endemik tür dahil olmak üzere 44 takson ile temsil edildiğini ortaya koymuştur. Endemik ve endemik olmayan türleri, genellikle Doğu Anadolu ve Toros Dağlarında bulunur (Dirmenci 2003). *Nepeta* türleri idrar söktürücü, terletici, ateş düşürücü ve sakinleştirici olarak halk hekimliğinde kullanılır. Literatürde, bu türün cinsleriyle yapılan bitki kökenli kimyasal ve uçucu yağ analizleri bulunmaktadır. *Nepeta* türleri yüksek oranda bir esansiyel yağ olan nepetalacton içermesiyle karakterize edilir. *Nepeta* türleri nepetalacton içeren ve nepetalacton içermeyenler olarak iki gruba ayrılır. Bununla birlikte, temel esansiyel yağ bileşimi içinde bazı farklı *Nepeta* yağları da tespit edilmiştir. Nepetalacton gibi yağlar içeren bitkilerin çeşitli biyolojik aktiviteleri, kedi ve köpek cezbedici, güçlü bir böcek kovucu oldukları ve bazı böceklerle karşı savunma salgılarının bulunduğu belirtilmiştir (Kökdil vd 1997; Skaltsa *et al.* 2000; Tzakou *et al.* 2000; Sajjadi and Eskandari 2005a; Bisht *et al.* 2012).

Nepeta türlerinin monoterpenoitler, diterpenoitler, triterpenoitler ve monoterpenik, diterpenik laktonları içerdiği gösterilmiştir (Sajjadi and Mehregan 2005b). *Nepeta* türlerinin farmakolojik ve biyolojik etkileri özellikle esansiyel yağlarında bulunan nepetalactondan kaynaklanmaktadır. Nepetalacton doğada birkaç izomerik formu bulunan monoterpenoitlerdir. *Trans* ve *Cis* izomerleri bazı böceklerle karşı oldukça toksiktir ve çoğunun kedi-cezbedici ve sivrisinek kovucu özellikleri olduğu gösterilmiştir (İşcan *et al.* 2011).

Nepeta meyeri Türkiye’de Horasan, Doğubeyazıt, Kağızman, Tuzluca ve Iğdır’ı içine alan bölgede yoğun olarak bulunmaktadır. Bu tür tek yıllık ve kısa boylu olması sebebiyle diğer türlerden kolayca ayrılmaktadır. Yetiştirme ortamında 1-5 m çapında dairesel bir alanı kaplamaktadır. Bu alanda sadece türün bireyleri yer almaktadır. Diğer bitkilere ait bireyler bu alan içinde yetişmemektedir. (Dirmenci 2003). Yapılan çok sayıdaki arazi gözlemlerine ve laboratuvar çalışmalarına göre, *N. meyeri*’nin bulunduğu çevreye bazı doğal kimyasal bileşikler (allelokimyasallar) yaydığı, çevresindeki birçok yabani bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilediği ve çevresinde bir inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.5). Ayrıca, yapılan laboratuvar çalışmalarında bu bitkiden elde edilen su ekstraktlarının bazı kültür bitkilerinin (arpa, buğday vb.) çimlenme, büyüme ve gelişmesi üzerinde olumlu veya olumsuz etki yapabildiği belirlenmiştir (Mutlu and Atıcı 2009). Daha sonra *N. meyeri*’den salınan esansiyel yağların allelopatik potansiyelleri, bazı zararlı otlar üzerinde çalışılmış ve bu çalışma da *N. meyeri*’nin esansiyel yağlarının çalışılan zararlı otların çoğunun çimlenme ve büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu çalışmalara dayanılarak *N. meyeri*’nin allelopatik potansiyele sahip bir bitki olduğu kabul edilmektedir (Mutlu *et al.* 2010).



Şekil 1.5. *N. meyeri*'nin oluşturduğu inhibisyon zonu (Mutlu ve Atıcı 2009, 2011)

Nepeta'nın Türkiye'deki revizyonu ile ilgili bir çalışmada *N. meyeri* dışında hiçbir *Nepeta* türünün allelopatik özelliğinden bahsedilmemektedir (Dirmenci 2003).

Bu tarzda doğal kimyasal bileşiklerin, biyolojik kontrol amacıyla veya organik tarım açısından doğal herbisit, fungusit ve pestisit olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur (Singh *et al.* 2003, 2006, 2009).

N. meyeri ile yapılan önceki çalışmalarda, bitkinin kök ve gövdesinden elde edilen su ekstraktlarının bazı kültür bitkileri üzerine allelopatik etkisi, bazı büyüme parametrelerine (çimlenme, kök ve gövde uzunluğu ve kuru ağırlık gibi) bakılarak ortaya koyulmuştur (Mutlu ve Atıcı 2009). Daha sonra bu inhibisyona *N. meyeri*'den salınan esansiyel yağların, bazı önemli yabancı otlarının çimlenme, kök ve gövde uzunluğu ve kuru ağırlığına etkileri (Mutlu *et al.* 2010a) ile oksidatif stres parametreleri (antioksidan enzim seviyeleri, lipid peroksidasyon seviyesi, hidrojen peroksit miktarı gibi) üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2011).

Yukarıdaki literatür verilerine dayanarak biz de allelopatik özelliği olan *N. meyeri* bitkisinden elde edilecek esansiyel yağların, su ve metanolik özütün antifungal bir etkiye sahip olabileceği hipotezi ileri sürüldü. Bu hipotez doğrultusunda, asma (*Vitis vinifera* L.) bitki dokularında hastalık yapan patojenik mantarların kontrolünde *N. meyeri*'den elde edilen allelokimyasalların kullanılması amaçlandı. Bu amaç için

öncelikle *N. meyeri* bitkisinin esansiyel yağ, metanol ve su gibi allelopatik potansiyeli olan özütler elde edildi ve daha sonra üzümde büyük kayıplara yol açan Kurşuni Kûf (*Botrytis cinerea*) etmeni mantarın biyolojik mücadelesinde (biyo-fungisit olarak) kullanıldı. Bugüne kadar yapılan benzer araştırmalarda gerek sentetik gerek doğal fungisit ajanların, *in vitro* veya *in vivo* şartlarda patojen mantarın gelişimini nasıl etkilediği üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Biz ise bu çalışmalarda uygulanan allelokimyasalların sadece patojen mantar üzerinde oluşturduğu etkilere ilave olarak, hem enfeksiyon yapan mantarın hem de asma bitkisinde fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları nasıl etkilediğini araştırdık. Böylece hem mantarın hem de allelokimyasalların hastalık seyrinde bitkideki cevap mekanizmalarını takip edilmesi sağlandı. Çalışmada uygulanan allelokimyasal özütlerin, mantar üzerinde hif gelişimi ve spor çimlenmesi üzerine olan etkileri belirlendi. Ayrıca hem mantar ve hem de allelokimyasal özütle muamele edilmiş asma yapraklarında ROS oluşum seviyesi ve antioksidan enzimlerin (CAT, POD, APX, GR ve SOD) aktiviteleri belirlendi. Çalışmamız hem bu konudaki temel bilimlerde önemli bir boşluğu dolduracak hem de ileriki aşamalarda bu inhibisyona sebep olan etkili madde veya maddelerin saf olarak üretilmesine daha sonra da zirai alanlarda kullanılmasına öncülük edecektir. Organik tarımın önem kazandığı ve zamanla daha da gelişeceği öngörüldüğünde bu çalışmanın önemi daha da iyi anlaşılabacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kültür bitkilerinde kayıplara neden olan bitki hastalıklarının kontrolü için genellikle biyolojik, kültürel veya kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Biyolojik ve kültürel metotların birçok durumda yetersiz kalması sonucu ekonomik zararlara neden olan bitki hastalıklarının fungusit kullanılarak kontrol edilmesi gerekmektedir. Kullanılacak ilaçların çevreye ve insanlara olan olumsuz etkilerinin yanı sıra patojenlerin bunlara karşı dayanıklılık riski bu yöntemin uygulanmasında ortaya çıkan bir diğer olumsuz faktördür (Demirci 1996).

Son yıllarda, zararlılara ve hastalıklara karşı pestisit kullanımının azaltılması için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Hedef organizmalar üzerinde daha etkili ve biyolojik temellere dayalı ürünlerin kullanılmaya başlanması alternatif olanaklar sağlamıştır (Eşiz Dereboylu ve Tort 2010).

Allelopati; yaşayan organizmaların ürettiği ve çevreye salgıladığı bazı bioaktif moleküller ile aynı veya farklı türlerin büyümesi, gelişmesi üzerinde direk veya indirek etkileri olarak tanımlanmaktadır. Allelopatik etkiye sahip sekonder bileşiklerin bioaktif özellikleri ve tarımda kullanım imkanlarının olması sebebiyle, allelopatik potansiyeli olan bitkiler üzerinde yapılan çalışmaların her geçen gün yoğunlaştığı belirtilmiştir. Tüm bu çalışmalardan elde edilecek bilgilerin hastalık, zararlı, yabancı ot mücadelesinde pratiğe aktarılması ile çevre ve insan sağlığına olumsuz etkileri tartışılan pestisit kullanımının azaltılmasına katkıda bulunabileceği saptanmıştır (Yılar 2007).

Üzüm, içerdiği besin maddeleri ve bu maddelerin insan sağlığına etkileri sebebiyle tüketicinin her zaman dikkatini çeken bir meyve türüdür. İnsanların isteklerinden dolayı üzümün mevsimi dışında da tüketiciye ulaşabilmesi ve bu nedenle depolanması gerekmektedir. Ülkemiz sofralık üzüm üretim miktarıyla dünya üzüm üretiminde büyük bir paya sahip olmasına karşın, ihracat oranları düşük kalmaktadır. Bunun sebebi üretim kadar hasat sonrası uygulamalar konusunda daha çok araştırma sonucunun pratiğe aktarılmasının yetersiz olmasına bağlanmıştır (Yazar 2013).

Türkiye tarımında önemli bir yere sahip olan bağcılık, günümüzde üretimden pazarlamaya kadar geçen süreç içerisinde birçok sorunla karşı karşıyadır. Bu sorunlar içerisinde üzüm yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde gün geçtikçe önemi artan, ekonomik boyutlara ulaşan zarar ile üzüm üretimini sınırlandıran fungal hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır (Göktaş 2008).

Erzincan ilinde 1997–2000 yıllarında yürütülen survey çalışması ile bağ alanlarında fungal hastalık etmenleri belirlenerek sorun olan etmenlerin bulunuş oranları ve yayılış oranları tespit edilmiştir. Hastalıklı bitkilerden alınan örneklerden yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen izolatların tanıları yapılmıştır. Bunlar içerisinde yaygın olarak izole edilen etmenler; *B. cinerea*, *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Stereum hirsutum*, *Sphaceloma ampelinum* olarak belirlenmiştir (Albayrak vd 2002).

Üzüm klimakterik olmayan bir meyve olup hasattan sonra muhafazasını sınırlayan iki önemli faktör bulunmaktadır. Bunlardan biri üzümlerde su kaybının meydana gelmesi, ikincisi üzüm tanelerinin patojenlere karşı duyarlılık göstermeleridir (Cappellini *et al.* 1986). *B. cinerea*'nın (kurşuni küf) neden olduğu kurşuni küf çürüklüğü üzümün muhafazasını sınırlayan önemli hastalıklardan biridir. Kurşuni küf; taç yönetimi, hasat öncesi fungusit uygulaması ve hasat sonrasında SO₂ ile fümigasyon yapılarak, sodyum metabisülfite açığa çıkaran SO₂ jeneratörleri kullanılarak kontrol edilmeye çalışılmaktadır (Tozlu 2001; Elad *et al.* 2004).

B. cinerea ülkemizde özellikle serada yetiştirilen birçok üründe ve bağda sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Patojenin gelişimi için seraların sıcaklık ve nem koşullarının uygun olması sebebiyle biber, çilek, domates, hıyar, marul, patlıcan gibi sebze ve meyvelerde şiddetli enfeksiyonlar meydana getirebilmektedir (Delen *et al.* 1984). Akdeniz Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda kurşuni küfün biber, domates, hıyar, marul ve patlıcanda çürümelere neden olduğunu gözlenmiştir. *B. cinerea*, sofralık ve şaraplık üzümlerde de şiddetli enfeksiyonlara neden olan bir patojendir. Bu patojenin tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz için de önemli bir kültür bitkisi olan asmanın üzerinde meydana getirdiği kayıpların önemi uzun yıllardan beri bilinmektedir (Delen *et al.* 1984; Köycü vd 2005).

Literatürde doğal maddelerle bitki hastalıklarının sebep olduğu ürün kayıplarının önlenmesine yönelik pek çok çalışmaya rastlanmaktadır. Araştırmacıların bazıları bitkisel ekstraktları, bazıları ise bitkilerin uçucu yağlarını ele almış ve bunların entegre mücadelede alternatif bir yaklaşım olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar sentetik pestisitlerin yerine bitki hastalıklarının kontrolünde çevre dostu ve düşük toksisiteli yeni antifungal bileşiklerin kullanılmasına yönelik çalışmalara yönelmişlerdir.

Yeni tüketici eğilimleri ve yasal değişiklikler daha sağlıklı ve çevre dostu bir gıda üretim sistemini gerektirmektedir. Bunun için SO₂ uygulamasına alternatif yöntemler bulma arayışı içerisine girilmiştir. Yeni alternatif sistemlerden modifiye atmosfer ve termal uygulamaların tekli yada kombinasyon şeklinde uygulanması, düşük toksitede doğal yenilebilir kaplamaların uygulanması ile daha güvenli, doğal ve sağlıklı meyveler elde edilmektedir. Yapılan araştırmalarda sofralık üzüm muhafazasında küflenmelere karşı değişik bitki ekstraktları ve uçucu lipoprotein, kitosan gibi doğal antifungalların kullanılabileceği bildirilmiştir (Valverde *et al.* 2005; Xu *et al.* 2009).

Bhaskara Reddey *et al.* (1998), *Thymus vulgaris*'in (Laval1-Laval 2) iki önemli yağ tipini antifungal aktivite için tanımlamışlar ve test etmişlerdir. Çalışmada Laval-1 ve Laval-2 yağlarının sırasıyla %53.5 ve %66.2'sini oluşturan p-cymene, linalool, terpinen-4-ol ve thymol içinde oldukça yüksek bulunmuş olup bu yağ tiplerinden elde edilen yağ sıvılarının *B. cinerea* ve *Rhizopus stolonifer*'e karşı antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiş olup çilekte *B. cinerea* ve *R. stolonifer* Laval-1'in maximum konsantrasyon sıvısı (%73.6 ve %73'ün üstünde) ve Laval-2'nin maximum konsantrasyon sıvısı (%75.6 ve %74.8) tarafından kontrol edilmiştir. Araştırma boyunca hiçbir görsel fitotoksiteye rastlanmamış olup Laval-2'deki antimikrobiyal yağ bileşikleri içeriğinin oldukça yüksek yer kapsadığı ve daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Mutisia acuminata Ruiz et Pav'nın antimikrobiyal aktivitesinin pH üzerindeki etkisi araştırılmış, *A. niger*, *B. cinerea* ve *Pyricularia oryzae*'nin de içinde bulunduğu sekiz mikroorganizmaya *M. acuminata*'nın metanol ve su ekstraktları uygulanmıştır. Sonuç

olarak *M. acuminata* ekstraktlarının, *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi ve spor çimlenmesine karşı en iyi antifungal aktiviteyi gösterdiği ve bunda ortam pH'sının önemli bir rolü olduğu belirlenmiştir (Catalano *et al.* 1998).

Türküsay ve Onoğur'un (1998) yaptıkları çalışmada Ege Bölgesi'nde doğal floraya ait bazı tek ve çok yıllık bitkiler ile kültür bitkilerinin yapraklarından su içinde hazırlanan ekstraktların bitki patojeni *Alternaria alternata*, *A. solani*, *B. cinerea* ve *Drechslera sorokiniana*'ya karşı *in vitro* antifungal etkileri araştırılmıştır. *Hedera helix*'in yaprak ekstraktı spor çimlenmesini en yüksek oranda engellediği, bundan sonra en etkili olanın *Datura stramonium* olduğu belirtilmiştir. Patojenlerin koloni gelişimi ise yine en yüksek oranda *H. helix* yaprak ekstraktı olmak üzere *Ficus carica* ve *Avena sativa* ekstraktları tarafından da engellendiği tespit edilmiştir. *A. sativa*, *Xanthium strumarium*, *F. carica*, *Nicotiana tabacum* ve *D. stramonium* ekstraktlarının ise etmenlerin sporulasyon yoğunluğunu %12 ile %82 arasında değişen oranlarda engellediği belirtilmiştir.

Hadacek ve Greger (2000), *B. cinerea*, *Cladosporium hebarum*, *Fusarium avenaceum* fungus türleri üzerinde juglon ve faltarindiol'un (*Peucedanum cervaria* türünden izole edilen madde) antifungal etkilerini araştırmıştır. Değişik yöntemlerle juglon ve faltarindiol'un Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerlerini tespit etmiş ve juglonun faltarindiolden daha etkili olduğunu bulmuştur.

Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseoli*, *B. cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Aspergillus parasiticus* gibi funguslara karşı adaçayı, yabani kekik, güvey otu, geyik otlarının fungistatik ve fungisidal aktivitesi test edilmiştir. Dekoksiyon (kaynatma) yöntemiyle yapılan çalışmalarda antifungal aktivite gözlenmiştir. Yabani kekik, güvey otu, geyik otu kullanılan tüm funguslarda etkili iken adaçayı zayıf bir etki göstermiştir. Yabani kekik ve güvey otunun tüm konsantrasyonlarının fungusları inhibe ettiği belirtilmiştir (Özcan and Boyraz 2000).

Üzümlerde *B. cinerea*'nın kontrolünde yağların etkisi laboratuvar ve saha çalışmalarıyla test edilmiştir. Kekik (*Thymus vulgaris* L.), karanfil (*Syzygium aromaticum* L.) ve massoia lakton (*Cryptocarya massoia* R.Br. ağaç kabuğundan türetilmiştir) gibi uçucu

yağların %0.33 ya da daha az konsantrasyonlarda yapraklarda fitotoksik olmadığı belirtilmiştir. Yapraktaki nekrotik lezyonları kekik ve massoia lakton yağlarının %0.33 oranda azalttığı belirtilmiştir (Walter *et al.* 2001).

Daferera *et al.* (2002) yapılan bir çalışmada *B. cinerea*'ya kekik yağının asmanın çiçeklenme döneminde ve ben düşme zamanındaki uygulamalarıyla iyi bir fungusit kadar etkili olduğu bildirilmiştir.

Bouchra *et al.* (2003), Fas'da Labiatae familyasına ait yedi bitkinin uçucu yağları GC-MS ile analiz edilmiş ve *B. cinerea*'ya karşı *in vitro* antifungal aktiviteleri bakımından değerlendirmiştir. Bunlar arasında, *Origanum compactum* ve *Thymus glandulosus*'un misel büyümesini büyük ölçüde önlediği belirtilmiştir. Her iki yağın 100 ppm'lik konsantrasyonuna *B. cinerea* inhibisyonu %100 olduğu gösterilmiştir. *Mentha pulegium*'un 250 ppm'de aktivite gösterdiği, misel büyüme inhibisyonun ise %58.5 olduğu belirtilmiştir. Çalışılan yağların ana bileşenleri de incelenmiştir. *T. glandulosus* ve *O. compactum* iki ana bileşenleri olan timol ve karvakrol'un 100 ppm'de %100 inhibisyona sebep olarak güçlü antifungal etkileri olduğu gösterilmiştir.

Alternaria mali Roberts, *Fusarium oxysporum* Synder & Hassen, *B. cinerea* Pers., *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary ve *Colletotrichum circinans* (Berk.) Vogl.'a karşı kekik (*Thymus vulgaris* L.), kimyon (*Cuminum cyminum* L.), ardıç (*Juniperus communis* L.), nane (*Mentha piperita* L.), zakkum (*Nerium oleander* L.), sarmaşık (*Hedera helix* L.), çörtük (*Echinophora tenuifolia* L.), ısırgan (*Urtica dioica* L.), okaliptus (*Eucalyptus* sp.), yavşan (*Artemisia* spp.) bitkilerinin ekstratları, ardıç, çörtük, kekik, kimyon, nane, okaliptus, yavşan bitkilerinin ise uçucu yağlarının antifungal etkileri araştırılmıştır. Ekstraktlar 0.5 ml, 1 ml ve 2 ml/100 ml besiyeri dozunda, uçucu yağlar ise 1 µl, 10 µl ve 50 µl/petri dozunda uygulanmıştır. Tüm fungusların miseliyal gelişimini tamamen engelleyen ekstraktın kekik olduğu belirtilmiştir. Kekik, kimyon, nane, okaliptus ve yavşan uçucu yağları yüksek dozlarda tüm fungusların misel gelişimini %100 engellemiştir. Ardıç ve çörtük uçucu yağlarının ise düşük dozda antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Koçak 2004).

Ceviz (*Juglans regia* L.) varyetelerinin (Yalova-2, Yalova-3, Yalova-4, Sebin, 1974-7) yapraklarından hazırlanan özütlerin ve juglon (5-Hidroksi-Naftakinon) allelokimyasalının bazı bakteri ve funguslar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ceviz özütleri ve juglonun, kullanılan 11 bakteri türünden 5 bakteri türünde (*Pseudomonas gingeri*, *Pseudomonas phaseolica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*) inhibisyon etkisi gözlemlenmiştir. Kullanılan 9 fungus türü (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *Geotrichum candidum*, *B. cinerea* ve *Candida albicans*) üzerinde de inhibisyon etkisi görülmüştür (Albayrak 2006).

Doymamış yağ asidi ve E vitamini açısından zengin olan *V. vinifera* çekirdek yağı yemeklik yağ olarak tercih edilmektedir ve diğer bitkisel yağlara alternatiftir. Çekirdek yağı antioksidan özelliği nedeniyle kozmetik preparatlara da katılmaktadır. Ayrıca, üzüm çekirdeği yağının önemli biyolojik etkilere (antihiperlipidemik, antihepatotoksik, antiaterosklerotik, antioksidan, fungusit, insektisit) sahip olduğu da belirtilmiştir (Demiryürek 2006).

Çin’de yetişen çeşitli bitkilerden hazırlanan ekstraktların gıda kaynaklı patojenler *A. niger*, *B. cinerea*, *F. moniliforme*, *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk ve *Phyllosticta caricae* C. Massal.’ye karşı antifungal etkileri araştırılmıştır. Ekstraktlar sıcak su, %80 metanol ve aseton ile hazırlanmıştır. Çalışmada *Cinnamomum cassia* metanol ekstraktının *F. moniliforme* ve *P. caricae*’ye karşı MIC değerinin 13.3 mg/ml, *C. cassia* aseton ekstraktının *B. cinerea* ve *G. cingulata*’ya karşı MIC değerinin ise sırasıyla 8.3 mg/ml ve 10 mg/ml olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak *C. cassia* ekstraktlarının gıda kaynaklı patojenlerin gelişimini engellemede antifungal etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Lee *et al.* 2007).

Sofralık üzümlerde *B. cinerea* ile mücadelede buhar şeklinde kekik yağının ana maddesi olan karvakrol ile muamelenin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; fungal gelişimin azalmasının karvakrol konsantrasyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Etilen ve solunum oranı karvakrol uygulaması ile en düşük değeri alırken, kontrolde en yüksek değeri aldığı tespit edilmiştir. Bu veriler karvakrol uygulamasının SO₂ uygulamasına

alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Martínez-Romero *et al.* 2007).

Bazı bitki ekstraktlarının sentetik fungusitlere alternatif olabileceği araştırılmıştır. *Dolichos kilimandscharicus* ve *Maerua subcordata*'nın kök bölgesinden, *Phytolacca dodecandra*'nın ise meyvesinden elde edilen metanol ekstraktları *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *S. rolfsii*, *R. solani*, *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces. et De Not. ve *P. ultimum*'a karşı *in vitro* koşullarda agar difüzyon metodu kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar standart fungusit ile karşılaştırıldığında *D. kilimandscharicus* kök ekstraktının bazı fungal patojenlerin miselial gelişimini fungusitler kadar engellediği tespit edilmiştir (Tegege and Pretorius 2007).

Nakıl bitkisinin (*Silene armeria* L.) uçucu yağ ve n-hekzan, etil asetat, kloroform ve metanol ekstraktlarının antifungal etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağ ve yaprak ekstraktlarının *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. capsici*, *Colletotrichum capsici* (Syd.) E. J. Butler et Bisby, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* ve *R. solani*'ye karşı sırasıyla %39.6-67.0 ve %9.3-61.3 engelleme gösterdikleri belirlemiştir. *B. cinerea* sporlarının çimlenmesinde ise uçucu yağın ve yaprak ekstraktının güçlü bir engelleyici olduğu saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda *S. armeria* uçucu yağ ve ekstraktlarının fungusitlere alternatif olabileceği bildirilmektedir (Bajpai *et al.* 2008).

Lamiaceae familyasına ait *Satureja icarica* P.H. Davis'in metanol ekstraktının antifungal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ekstrakt *B. cinerea* ve *F. oxysporum*'un da içinde bulunduğu 14 bitki patojenine karşı test edilmiştir. Ekstraktların patojenlere karşı etkili olduğu ve inhibisyon zon çaplarında 11.6-18.8 mm arasında olduğu bildirilmiştir (Dulger and Hacıoglu 2008a).

Yapılan bir çalışmada hasat sonu patojenleri *Aspergillus flavus* Link : Fr., *Penicillium frequentans* Rank, *B. cinerea*, *Geotrichum candidum* Link, *F. oxysporum* ve *A. alternata*' ya karşı *Salvia tigrina* Hedge & Hub.-Mor. (adaçayı)'nın yaprak ve kök etanol ekstraktlarının antifungal aktiviteleri incelenmiştir. Bu ekstraktların MIC değerlerinin 12-25 mg/ml arasında olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bütün

ekstraktların standart bir fungusitle karşılaştırıldığında antifungal aktivitelerinin bulunduğu saptanmıştır (Dulger and Hacıoglu 2008 b).

Rubus ulmifolius Schott (böğürtlen) bitkisinin *in vitro* koşullarda antifungal aktivitesini belirlemek için metanol ekstraktı *F. solani* ve *B. cinerea*'nın içinde bulunduğu 37 bitki patojenine karşı incelenmiştir. Bu patojenlere karşı *R. ulmifolius* metanol ekstraktının oldukça etkili olduğu bildirilmiştir. *R. ulmifolius*'un kimyasal yapısı Gaz Kromatografi (GC) ile incelendiğinde antifungal etkinin fenolik bileşiklerden tanen sayesinde olduğu belirlenmiştir (Sisti *et al.* 2008).

Tripathi *et al.* (2008), *B. cinerea*'ya karşı *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citriodora*, *Eupatorium cannabinum*, *Lawsonia inermis*, *Ocimum canum*, *O. gratissimum*, *O. sanctum*, *Prunus persica*, *Zingiber cassumunar* ve *Z. officinale*'nin esansiyel yağlarının fungusit özelliği gösterdiğini tespit etmişlerdir. *O. sanctum*, *P. persica* ve *Z. officinale*'nin uçucu yağları diğer fungusit yağlar ile karşılaştırıldığında daha düşük Minimum İnhibitör Konsantrasyonunu (MİK) gösterdiği için araştırmada kullanılmıştır. *O. sanctum*, *P. persica* ve *Z. officinale*'nin MİK değerleri, sırasıyla 200, 100 ve 100 ppm (mg / l) olarak bulunmuştur. Yağların antifungal gücü bazı yaygın sentetik fungusitler ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Uçucu yağların kullanım alanı, depolama sırasında *B. cinerea*'nın neden olduğu üzümde kurşuni küfün kontrolünde gözlenmiştir. *O. Sanctum* ve *P. Persica*'nın yağı 4 ve 5 güne kadar üzümün depolama ömrünü arttırdığı gösterildi. *Z. officinale* yağı ile muamele edildiğinde depolama ömrünü 6 güne kadar arttığı gözlemlenmiştir. Yağlar, meyve kabuğu üzerinde herhangi bir fitotoksik etki sergilememiştir. Bu nedenle, yağların uzun vadeli ve geniş kapsamlı denemeden sonra, potansiyel bir çevre dostu olduğundan fungusit kaynağı olabileceği tavsiye edilmiştir.

Sofralık üzümlerde hasat sonrası ve raf ömrü süresince hastalıkların kontrolünde kekik (*Thymus vulgaris* L.) ve tatlı basil (*Ocimum basilicum* L.) esansiyel yağlarının etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada; hasat sonrasında Tabarze üzüm çeşidine Thyme ve Tatlı basilin esansiyel yağları ile 0, 200, 400, 600 ppm olacak şekilde sprey şeklinde uygulama yapılmıştır. Daha sonra 1°C'de 2 ay soğukta muhafaza edilmiştir.

Muhafaza dönemi sonunda kullanılan esansiyel yağların maya, küf gelişimini ve sap kararmasını önemli derecede engellediği bildirilmiştir (Abdolahi *et al.* 2009 a).

Thompson Seedless üzüm çeşidinde doğal uygulamalarla çürümenin azaltılmasının amaçlandığı bir çalışmada; hasattan sonra *Foeniculum vulgare* MILL. ve *Satureja hortensis* L.'den elde edilen esansiyel yağlar üzümlere 0, 200, 400, 600 ppm dozlarında sprey şeklinde uygulanmış ve üzümler 1°C'de 2 ay soğukta muhafaza edilmiştir. Muhafaza dönemi sonunda esansiyel yağların çürümeyi önlemek için kullanılan kimyasallara alternatif olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir (Abdolahi *et al.* 2009 b).

Fungisit uygulamalarına alternatif olarak *Peganum harmala* L.'nin yaprak, çiçek ve tohum kısımlarından elde edilen su, etanol ve metanol ekstraktlarının *Phytophthora drechsleri* Tucker, *Verticillium dahliae*, *S. sclerotiorum*, *Cladosporium cucumerinum* Ellis et Arthur, *Corynespora cassiicola* (Berk. et M. A. Curtis) C. T. Wei, *Alternaria* sp., *B. cinerea*, *Monosporascus cannonballus* Pollack et Uecker, *F. oxysporum*, *M. phaseolina* ve *R. solani*'ye karşı antifungal etkileri araştırılmıştır. *P. harmala*'nın su ile hazırlanan tohum ekstraktı patojenlerin miseliyal gelişimini engellediği rapor edilmiştir (Sarpeleh *et al.* 2009).

In vivo'da *B.cinerea*'ya karşı etkilerinin tespit edildiği kekik (*Thymus vulgaris* L.) ve tatlı basil (*Ocimum basilicum* L.) esansiyel yağlarının Tabarzeh üzüm çeşidinde muhafaza sırasında ağırlık kaybını, tane ve salkım kararmasını azalttığı bildirilmiştir (Abdolahi *et al.* 2010).

Kozak Siyahı üzüm çeşidinde etanol, mentol ve thymol uygulamalarının soğukta muhafaza sürecinde etkinliğini belirlemek için yapılan bir çalışmada; salkımlar %40 etanol içeren solüsyona batırılmış, mentol ve thymol uygulamalarında ise salkımların yanına 0.1 ml dozunda mentol ve thymol emdirilmiş gazlı bez konulmuştur. Bu uygulamaların haricinde kükürt içeren fumigasyon örtüsü de olan bir uygulama grubu daha oluşturulmuştur. Tüm salkımlar polietilen torbalarla paketlenerek 0-1°C ve %85-90 nispi nem koşullarında 90 gün süre ile depolanmış ve 30 gün ara ile bazı kalite özellikleri incelenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, üzümlerin modifiye atmosferde

muhafazasında etanol, mentol ve thymol uygulamalarının kontrol uygulamasına göre daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda uygulamaların kükürt uygulamasına benzer etki gösterdiği ve alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir (Bal ve Kök 2011).

Esansiyel bergamot yağı ile birlikte veya tekli olarak hidrosimetil selüloz ve kitosan ile kaplamanın üzümlerin soğukta muhafazadaki güvenliği ve kalitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; esansiyel yağ ile kaplamanın kalite değişkenlerinde önemli derecede gelişme sağladığı tespit edilmiştir. Tüm kaplama uygulamalarının soğukta muhafaza sonrasında mekanik direnci artırdığı tespit edilmiştir (Sánchez-González *et al.* 2011).

Yüksek antioksidan özelliği olan narın antifungal özelliğini araştırmak için iki farklı deney yapılmıştır. İlk deneyde narın 3 farklı bölgesinden (kabuğu, tohum ve yaprak), 2 farklı özütün (sulu ve metanolik), 4 farklı konsantrasyonlarda (0, 500, 1000 ve 1500 ppm) hasat sonrası 3 farklı mantar türünde etkisi incelenmiştir (*Penicillium italicum*, *Rhizopus stolonifer* ve *B. cinerea*). İkinci deneyde ise farklı bölgelerinden alınan iki farklı özlerin antioksidan kapasite ve fenolik içeriği ölçülmüştür. Metanolik ekstresi %41,25 ve %49,82 ile misel büyümesi ve spor çimlenmesinde en yüksek inhibitör etki gözlenmiştir. Kabuk ve tohum özütlerinin, yaprak özütünden daha fazla inhibitör etkisi olduğu belirtilmiştir. Narın farklı bölgelerindeki fenolik düzeyinin, özellikle kabuğu ve çekirdek özlerinde çok yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bileşikler, bu ekstraktların antifungal aktiviteye neden olabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle, nar kabuğu ve tohumunun fenolik içeriğinin fazla olması, ekstrelerin yüksek antifungal ve antioksidan aktivite neden olabileceğini ortaya koymuşlardır (Tehranifar *et al.* 2011).

Ephedra breana, *Fabiana imbricata*, ve *Nolana sedifolia* bitkilerinin metanolik ekstratı ve etanolik fraksiyonunun antifungal aktivite gösterdiği belirlemek için mantar bitki ekstraktları ile 14 gün boyunca aynı ortama bırakılmış ve bunların antifungal bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. Çalışılan üç bitkinin metanolik fraksiyonu ile *F. Imbricata*'nın etanolik fraksiyonu antifungal etki göstermemiştir. Fitopatojen *B. cinerea*'yı kontrol etmek için *E. Breana* ve *N. sedifolia*'nın etanolik özleri in vitro da

antifungal aktiviteye sahip olduğundan alternatif olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Vio-Michaelis *et al.* 2012).

Bu çalışmada, siyah kimyon, rezene ve nane uçucu yağların *B. cinerea*'ya karşı inhibe edici etkileri, *in vitro* ve *in vivo* da çeşitli konsantrasyonlarda test edilmiştir. *In vitro* sonuçlar, *B. cinerea* büyümesi siyah kimyon ve rezene yağlarının 400 ve 600 µL konsantrasyonlarında tamamen engellendiği gösterilmiştir. *In vivo* sonuçlarda siyah kimyon, rezene ve nane yağları kontrolü uygulanmış tüm konsantrasyonlarda ile karşılaştırıldığında eriksi meyvelerde *B. cinerea* büyümesini inhibe ettiği belirtildi. Buna ek olarak, yüksek konsantrasyonlarda üç yağın titrasyon asitliği, toplam çözünabilir katı, karbonhidrat içeriği, pH ve ağırlık kaybı yüzdesi gibi meyve kalite özellikleri üzerinde olumlu etkileri gösterilmiştir. Böylece yağlar eriksi meyvelerde *B. cinerea* enfeksiyonu inhibe ettiği ve depolama ömrünü arttığı belirtilmiştir. Bu araştırma, siyah kimyon, rezene ve nanenin *in vitro* ve *in vivo* da eriksi meyvelerde hasat sonrası uçucu yağların antifungal etkilerini doğrulamıştır. Bu nedenle, bu uçucu yağlar eriksi meyvelerde hasat sonrası fitopatojenik mantarları kontrol etmek için kimyasallara alternatif olabileceği belirtilmiştir (Aminifard and Mohammadi 2013).

Vitis vinifera sürgünlerinin metanolik ve etanolik ham özütlerinin asmaları etkileyen başlıca üç mantar patojenlerine (*Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* ve *B. cinerea*) karşı önemli antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Aktif özler, LC-PDA-ESI-MS ile analiz edilmiştir. Orta basınçlı sıvı kromatografisi altı saf bileşenler elde edilmiştir. Tanımlanan altı bileşik (ampelopsin A, hopeaphenol, trans-resveratrol, ampelopsin H, ε-viniferin, and Evitisin B), *P. Viticola*'ya karşı mantar önleyici aktivite göstermiştir. ε-Viniferin de *B. cinerea*'ya karşı düşük bir antifungal aktivite göstermiştir. Tespit edilen bileşiklerin hiçbiri, *E. necator* çimlenmesini önlememiştir. Bağcılıkta *V. vinifera*'yı etkileyen üç büyük mantar patojenlere karşı doğal atık malzemeden potansiyel yeni bir mantar ilacı geliştirileceği belirtilmiştir (Schnee *et al.* 2013).

Başka bir çalışmada 7 farklı bitkisel yağın; üzüm çekirdeği (*Vitis vinifera*), Kekik (*Thymus sp.*), Biberiye (*Rosmarinus officinalis*), Ozon (*Olea europaea*), Nane (*Menta piperita oleum*), Fesleğen (*Ocimum basilicum*) ve Adaçayı (*Salvia spp.*)'nın bağcılık açısından önemli olan; Kurşuni küf (*B. cinerea*) ve İki noktalı kırmızı örümcek

(*Tetranychus urticae*) üzerine 3 farklı dozdaki etkisi ve kullanım olanakları incelenerek, değerlendirilmiştir. Sonuç olarak kekik, biberiye ve nane yağlarının *B. cinerea*'ya karşı organik bağ yönetiminde kullanılabileceği belirtilmiştir (Mermer Doğu and Zobar 2014).

Son yıllarda allelopatik bitkilerin allelopatik etkileşimde bitkide sebep olduğu olayları stres fizyolojisi açısından açıklamaya çalışan çalışmalar da mevcuttur. Diğer çevresel streslerde olduğu gibi, allelopatik stres altındaki bitkilerin de strese cevaplarının en ilki ve en önemlisi bu strese maruz kaldıklarında artan reaktif oksijen türlerini (ROS) zararsız hale dönüştüren bazı metabolik yolların aktive olmasıdır (Singh *et al.* 2009; Mutlu *et al.* 2011). Hücrede artan ROS, hücre hasarı ve ölümlerinin tetikleyicisi olabileceği gibi çevre hücrelerdeki savunmaya bağlı genlerin indüksiyonu için yayılabilir bir sinyal olarak ta çalışılmaktadır. ROS bileşikleri arasında hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksid anyonu (O_2^-) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$) gibileri sayılabilir. Bu bileşiklere serbest radikaller de denilir. Bunlar bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküller olarak tanımlanırlar. Stres şartlarında ROS bileşiklerinin seviyeleri kontrol edilemeyecek seviyede artarsa, bunlar başta hücre zarlarına (doymamış lipidlere) ve diğer biyomoleküllere saldırarak kararlı yapılarının bozulmasına ve bu sayede hücre hasarına ve ölümüne neden olurlar. Bitkiler, hücrelerini bu tarzdaki oksidatif hasardan koruyan antioksidan sistemler ile birlikte bunların daha zararsız formlara dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimlere de sahiptirler. Örneğin, süperoksid gruplarından hızlı bir şekilde oluşan singlet oksijen (1O_2), hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Bu zararlı süperoksid grubu süperoksid dismutaz (SOD) enzimiyle H_2O_2 ve oksijene çevrilir. Süperoksid grubuna göre daha az zararlı etkilere sahip olan H_2O_2 , katalaz (CAT) ve peroksidaz (POX) gibi diğer antioksidan enzimlerle su ve oksijen gibi ürünlere dönüştürülerek etkisizleştirilir. Bir bitkinin allelopatik strese girdiğini göstermesi bakımından bu ROS bileşikleri ile bunların bertaraf edilmesini sağlayan antioksidan enzimlerin (CAT, POD, SOD) hücresel seviyeleri oldukça önemlidir (Ye *et al.* 2006; Sing *et al.* 2006, 2009; Mutlu *et al.* 2011).

Domates yapraklarına uygulanan O-hidroksietil'in *B. cinerea* gelişimini kısıtladığı belirtilmiştir. *B. cinerea* ile enfekte edilmemiş, enfekte edilen, O-hidroksietil uygulanan ve enfekte edilip O-hidroksietil ile muamele edilen bitkilerde süperoksit anyonu, hidrojen peroksit üretim oranı ve süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz aktiviteleri çalışılmıştır. O-hidroksietil uygulanan bitkilerde enfekte edilip O-hidroksietille muamele edilenlere göre hidrojen peroksit miktarının iki kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. *In vitro* testler de *B. cinerea* konidyumların çimlenmesinin H_2O_2 tarafından inhibe edildiği saptanmıştır. Yüksek H_2O_2 konsantrasyonu misel büyümesini engellemek için gereklidir. Sonuçlar incelendiğinde O-hidroksietil'in domates bitkilerinde H_2O_2 üretimini tetiklediğini ve *B. cinerea* enfeksiyonunda H_2O_2 'yu sınırladığı gözlenmiştir (Małolepsza and Urbanek 2000).

B. cinerea ile enfekte olmuş domates yapraklarından izole edilen kloroplastlarda toplam askorbat ve askorbat-glutasyon döngüsü ile ilgili enzimler, APX, GR, GST ve GSH-Px aktivitelerine karşı etkisi incelenmiştir. Çalışma sonunda enfekte olmuş yaprakların kloroplastlarında klorofil kaybı gözlenirken enfeksiyondan sonra GSH ve glutasyon içeriğinde artan bir azalma, GR aktivitesinde de artış olduğu belirtilmiştir (Kuz'niak and Sklodowska 2001).

Tosun vd (2001), tarafından yapılan çalışmada kullanılan kimyasal mücadele yöntemlerine bioaktivatörlerin entegre edilerek daha az kimyasal kullanılması amaçlanmıştır. Muhtemelen konukçu dayanıklılığındaki artışı gösteren spesifik peroksidaz enzim aktivitesindeki değişimler, tek tek ve kombine edilmiş uygulamalardan sonra, domates fidesi yapraklarından analiz edilmiştir. Domatesin kurşuni küfe (*B. cinerea*) karşı söz konusu bileşiklerde etkinlik testleri serada, kontrollü koşullar altında, saksı denemeleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu bileşiklerin yüksek etkililiği ile artan peroksidaz enzim aktivitesi arasındaki olası ilişkiler değerlendirilmiştir. Kurşuni küfün en etkili kontrolü sırasıyla %84 ve %81 etkililik ile *Trichoderma harzianum*+LaFÜ+be+mm (893.8 g/l) ve %37,5 cyprodinil + %25 fludioxonil+LaFÜ+be+mm (893.8 g/l) kombinasyonu uygulamaları sonucunda bulunmuştur. Bu sonuçlar sırasıyla %65 ve %78 artış ile spesifik enzim aktivitelerine

paralellik göstermiştir. Böylelikle bioaktivatörlerin fungusitler ile kombine edilerek pratiğe aktarılabileceği sonucuna varılmıştır.

Fusarium oxysporium f.sp. *ciceris* ile enfekte edilen nohut bitkisinin gövdelerinde patojen enfeksiyonundan sonra lipid peroksidasyonun artışına paralel olarak askorbat peroksidaz, katalaz, süperoksitdismutaz ve peroksidaz enzimlerinin aktivitesinde artış belirlenmiştir (Limonos *et al.* 2002).

Bitki patojenlerine karşı savunma reaksiyonlarında birçok bitki enzimi görev almaktadır. Bu bitki savunma enzimleri arasında hücre yapısını güçlendiren savunma bariyerlerinin oluşumuna katkıda bulunan lignin ve diğer oksidatif fenollerin oluşumunu katalizleyen peroksidaz gibi antioksidanların yanı sıra patojenlere karşı savunmada fitoaleksin ve diğer fenolik bileşiklerin biyosentezinde görev alan enzimler de etkili olmaktadır. Biber, domates ve buğday gibi birçok bitkide yapılan çalışmalarda bütün bu enzimler ile patojenlere karşı savunma arasında bir bağlantı olduğu tespit edilmiştir (Mohammadi and Kazemi 2002).

Patojenle enfeksiyon sonucunda bitki hücresinde oksidatif strese neden olan NO ve ROS meydana gelmektedir. Bu ROS patojenin hücre içine girişini engellediği gibi HR'nın (hipersensitif cevap) oluşumunda görev yapan savunma enzimlerinin (SOD, POD, PAO, APX vs.) aktifleşmesi ve dolayısıyla ROS'ların etkisiz hale getirilmesi, glutatyon (GSSG) oluşumu, ligninleşmenin meydana gelmesi, patojenlerin enfeksiyonu sonucunda NO meydana gelmesi ki NO programlanmış hücre ölümü süresince askorbat peroksidazın ifade edilmesinde dolayısıyla askorbat ve glutatyonun azalması gibi olaylarda anahtar olarak görev yapmaktadır (Gara *et al.* 2003).

Gayosa *et al.* (2004) tarafından *Phytophthora capsici* hastalık etmeni (300 zoospor ml⁻¹) ile enfekte edilen tek çeşit duyarlı biber bitkisinde (2-4 yapraklı) da oksidatif metabolizma ve fenolik bileşikler incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda katalaz, peroksidaz enzimlerin hastalıkla enfeksiyon sonucunda aktivitelerinde ve toplam fenolik bileşiklerin miktarlarında artış olduğu saptanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada *B. cinerea* ile aşılınmış fasulye yaprağından salınan H_2O_2 seviyesinin, yaprak dokusu üzerindeki izolatın virülanslığı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Oksidatif strese fasulye genotiplerinin duyarlılığı *B. cinerea*'nın kendi duyarlılığı ile ilişkilidir. *B. cinerea* ile enfekte edilmiş *Arabidopsis thaliana* yaprağında da, mantar hiflerinin birkaç hücre tabakası uzaklığındaki apoplastik alanda H_2O_2 tespit edilmiştir. Ayrıca lipid peroksidasyonunda gözlenmiştir. Antioksidanların kurşuni küf hastalığı gelişimini azalttığı belirtilmiştir (Kan 2005).

B. cinerea ile enfekte edilen domates bitkisinin (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. "Perkoz") yapraklarında uygulamadan 2, 6, 24 ve 48 saat sonra günlere paralel olarak süperoksit, H_2O_2 ve OH gibi serbest radikallerin miktarlarında ve peroksidaz aktivitesinde artış tespit edilirken, katalaz aktivitesinde kontrollere göre bir azalma saptanmıştır (Malolepsza and Rozalska 2005). Buna karşın Kuzniak ve Slodowska (2005) tarafından yapılan çalışmada ise *B. cinerea* ile enfekte edilen domates bitkisinin (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. "Perkoz") yapraklarında katalaz aktivitesinin kontrollere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Uygulamanın 1. ve 2. günlerinde kontrollerine göre sırasıyla %188 ve %165'lik bir enzim aktivite artışı gözlenirken 4. günde ise kontrole göre %41'lik bir azalma tespit edilmiştir.

B. cinerea'ya daha az (Perkoz) ve daha çok (Corindo) duyarlı domates yapraklarında H_2O_2 ve askorbat içeriğinin yanı sıra peroksidaz (PO) ve katalaz (CAT) enzimleri çalışılmıştır. Her iki çeşit sitosolünde H_2O_2 miktarı artmıştır. Her iki çeşidin enfeksiyonundan 48 saat sonra sitosolde PO aktivitesinin arttığı belirtilmiştir. Çeşitler arasında askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerinde önemli bir fark gözlenmemiştir. Apoplastik bölgelerde PO aktivitesi incelenmiştir. Perkoz'da diğer çeşidine göre PO aktivitesi daha önce artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Perkoz çeşitinde enzim aktiviteleri çoğunlukla arttığı belirtilmiştir. Perkoz ve Corindo domates çeşitlerinin *B. cinerea* enfeksiyonuna karşı farklı direnç gösterdiği ve bu dirençte apoplastik PO hücre duvarının sertleşmesinin de anahtar rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2005).

Serrano *et al.* (2006), tarafından yapılan bir çalışmada sofralık üzüm (*Vitis vinifera* L. cv. Crimson Çekirdeksiz) patent olarak geliştirilen *Aloe vera* jeli ile kaplanarak, 1 °C'de 35 gün depolanmıştır. Yapılan çalışmada raf ömrü 20 °C de gözlenmiştir. Kaplanmamış salkımlarda toplam fenolik ve askorbik asit gibi fonksiyonel bileşiklerde hızlı bir şekilde kayıp olduğu, toplam antioksidan aktivitesinde azalma (TAA) ve toplam antosiyanında artışına sebep olduğu belirtilmiştir. Aksine, *Aloe vera* jeli ile kaplanmış üzümlerde soğuk depolama veya raf ömrü boyunca yukarıdaki değişikliklerde gecikme meydana geldiği saptanmıştır. Sonuç olarak *Aloe vera* jelinin üzümlerde hasat sonrası depolamada kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Yapılan başka bir çalışmada domates dokularının ve *B. cinerea* sporlarının eksojenik H₂O₂'ya karşı duyarlılığı araştırılmıştır. Bu amaçla apoplastik enzim aktivitelerinden, peroksidaz (PO), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzim aktiviteleri gözlenmiştir. 40 mM H₂O₂ *B. cinerea* sporlarının çimlenmesini inhibe etmiştir. 100 mM H₂O₂ sporların tamamının çimlenmesini engellemediği, yapraklara H₂O₂'nin farklı konsantrasyonlarda uygulandığında enfeksiyon olduğu gözlemlenmiştir. Dokulardaki zararlı H₂O₂ konsantrasyonu peroksidaz aktivitesini uyardığı belirtilmiştir. Yapraklar enfekte edilip H₂O₂ uygulandığında apoplastlarda CAT aktivitesinin artırdığı, SOD aktivitesine ise etki etmediği gözlemlenmiştir. Sporlar çimlendiğinde üretilen enzimler apoplastlardaki H₂O₂'nin ayrışmasını sağladığı belirtilmiştir. Böylece *B. cinerea*'nın enfeksiyonun ilk aşamalarında reaktif oksijen türlerini inhibe ettiği hipotezini ileri sürmüşlerdir. Peroksidaz enziminin hücre duvarının sertleşmesinde ve lignifikasyonunda etkili olduğu fakat fungal gelişimini inhibe etmede yeterli olmadığı belirtilmiştir (Patykowski 2006).

Xu *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada, sofralık üzüm (*Vitis vinifera* cv. Redglobe) greyfurt çekirdeği ekstresine (GSE) daldırılmış ve fizyolojik etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar GSE uygulamalarında bütün salkımlarda solunum hızı ve etilen yayılımını düşürdüğünü göstermiştir. GSE uygulamaları süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), ve katalaz (CAT) aktivitelerini arttırmış, fakat polifenol oksidaz (PPO) aktivitesi baskılamıştır. Ayrıca, GSE uygulanan üzümlerde malondialdehit (MDA) ve membran geçirgenliğinin artması gecikmiştir. GSE ile tedavi edilen

üzümlerde kontrole göre toplam fenolik bileşiklerin bozulmasının önemli ölçüde daha düşük olduğu gösterilmiştir. GSE'nin sofralık üzümün hasat sonrası depolama süresini uzatmak için gelecek vaat eden bir ürün olabileceği belirtilmiştir.

Nepeta türlerinin güçlü antibakteriyal ve antifungal etkileri olduğu başka bir çalışmada gösterilmiştir. Bu etkinin ana unsuru olarak nepetalactone'nin yanı sıra 1,8- Cineol'un da bu etkiden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (Mothana 2012).

N. meyeri ile yapılan daha önceki çalışmalarda bu bitkinin kök ve gövdesinden elde edilen su ekstraktlarının bazı kültür bitkileri üzerine allelopatik etkileri, bazı büyüme parametrelerine (çimlenme, kök ve gövde uzunluğu ve kuru ağırlık gibi) bakılarak ortaya konmuştur (Mutlu ve Atıcı 2009). Daha sonra bu inhibisyona *N. meyeri*'den salınan esansiyel yağların etkili olabileceğini düşünerek bu yağların bazı önemli tarla zararlıları yabancı otların çimlenme, kök ve gövde uzunluğu ve kuru ağırlığına etkileri (Mutlu *et al.* 2010b) ile oksidatif stres parametreleri (antioksidan enzim seviyeleri, lipid peroksidasyon seviyesi, hidrojen peroksit miktarı gibi) üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2011).

N. meyeri bitkisi üzerinde yapılan çok sayıda arazi gözlemleri bu bitkinin doğal herbisit, fungusit ve pestisit olarak kullanılmasının oldukça önemli olabileceğini belirtmektedir (Mutlu and Atıcı 2009).

Mutlu *et al.* (2010a) yaptıkları çalışmada, *N. meyeri*'den elde ettikleri uçucu yağı 7 yabancı ot türünün (*A. retroflexus* L., *Portulaca olerace* L., *Bromus intermedius* Guss., *C. album*, *Cynodon dactylon* L., *Bromus danthoniae* Trin., *Lactuca serriola* L.) erken fide gelişimi ve tohum çimlenmesi üzerine etkilerini test etmişlerdir. Uçucu yağın %0.01 konsantrasyonunda uygulandığı zaman 3 yabancı ot türünün (*B. intermedius*, *B. danthoniae* ve *L. Serriola*) çimlenmesini %50'den daha fazla engellediği, %0.02 konsantrasyonunda uygulandığı zaman ise 2 yabancı ot türünün (*C. album* ve *C. dactylon*) tohum çimlenmesini %70'den fazla engellediğini tespit etmişlerdir. %0.02 konsantrasyonunda uygulanan dozun *A. retroflexus*, *B. danthoniae* *B. intermedius*, *L. serriola*'nın çimlenmesini %100 oranında engellediğini bildirmişlerdir.

Nepeta meyeri toprak üstü kısımlarından su distilasyonu ile uçucu yağ GC ve GC-MS kombinasyonu ile analiz edilmiştir. On sekiz yağ bileşeni tespit edilmiştir. Uçucu yağın ana bileşenlerinin 4α-7α-7β-nepetalacton (%53.2), 1,8- Cineol (%29.3) ve camphor (%4.1) olduğu belirtilmiştir (Sefidkon and Shaabani 2004).

Nepetalacton'nun, *Nepeta* yağlarının en temel bileşeni olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmada gösterildiği üzere, *N. meyeri* yağında temel bileşen olan 4α, 7α, 7β-nepetalacton (%68.1) yüksek miktarda karakterize edilmiştir (Esmaceli *et al.* 2006).

Nepeta rtanjensis bitkisinin esansiyel yağ analizleri sonucunda ana bileşenin 4α,7α,7β –Nepetalacton olduğu tespit edilmiştir. *N. rtanjensis*'ten izole edilmiş uçucu yağın incelenen tüm micromycetes sınıfına karşı güçlü bir antifungal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. *In vitro*'da misel büyüme üzerine etkisinde *N. rtanjensis*'in uçucu yağı *Alternaria* türlerinde en etkili olduğu bulundu. 0.6–0.8 µg mL⁻¹ konsantrasyonlarında *Alternaria* türlerinin misel büyümesini inhibe ettiğini tespit etmiştir. Uçucu yağların düşük toksisite, biyolojik parçalanma ve şiddetli antimikrobiyal etkinliği ile biyoajan olarak kullanılabileceğini belirtilmiştir (Grbić *et al.* 2008).

Nepeta rtanjensis esansiyel yağının ana bileşenin monoterpenoit olan 4α,7α,7β –Nepetalacton oluşturmaktadır. *Nepeta rtanjensis* bitkisinin esansiyel yağını funguslarda konidiumların çimlenmesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. *Cladosporium cladosporioides*'in konidiumlarının *Nepeta rtanjensis*'in esansiyel yağına çok duyarlı olduğu en küçük dozlarda (0.1 µg ml⁻¹) bile konidiumlarının çimlenmesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Grbić *et al.* 2011).

Başka bir çalışmada *N. meyeri*'nin esansiyel yağları GC-MS de hidrodistilasyonla analiz edilmiştir. Bitkinin esansiyel yağlarında on dört bileşik tanımlanmıştır. Analiz edilen yağdan 4α, 7α, 7β-nepetalacton (%83.4) ve 4α, 7α, 7β-nepetalacton (%8.83) gibi ana bileşenler tespit edilmiştir (Mutlu *et al.* 2011).

Nepeta meyeri'den su distilasyonu ile uçucu yağlar GS-MS ile analiz edilmiş ve on bir yağ bileşeni tespit edilmiştir. Uçucu yağın ana bileşenlerinin 4α, 7α, 7β-

Nepetalactone (%80.32); 4a α ,7 α ,7 $\alpha\alpha$ -Nepetalactone (%10.32); trans- Pulegol (%3.13); 1,8 Cineole (%2.95) olduğu belirtilmiştir. Esansiyel yağın antifungal aktivitesi 16 fitopatojenik fungus üzerine test edilmiştir. Yapılan deneyler *N. meyeri* yağını 16 fitopatojenik fungusların misel büyümesini tamamen inhibe ettiğini göstermiştir. Yağın etkisi ticari olarak kullanılan benomil fungusitten daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan esansiyel yağ (0.25, 0.50 ve 1.0 mg/ml), önemli ölçüde tüm bitki patojen mantarların gelişmesini önlemiştir. Uçucu yağ 16 bitki patojenin %18.5 ile %100 büyümesini engellediği belirtilmiştir. Bu çalışmanın bulguları uçucu yağların fungusit olarak potansiyel bir kullanıma sahip olduğunu göstermektedir (Kordali *et al.*2013).

N. meyeri Benth.'den hidrodistilasyon yöntemiyle izole edilen uçucu yağla başka bir çalışmada GS-MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Yağın %99.99'dan daha fazlasını temsil eden uçucu yağ içerisinde 11 bileşen tanımlanmıştır. *N. meyeri*'den elde edilen *n*-hexane ekstresi GS-MS yöntemiyle analiz edilerek toplam 21 bileşen tanımlanmıştır. Elde edilen uçucu yağ ve ekstratlar *Amaranthus retroflexus* L., *Cirsium arvense* L., *Chenopodium album* L. ve *Sinapsis arvensis* L., yabancı ot tohumlarına uygulanmıştır. *N. meyeri*'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın tüm dozları kullanılan bütün yabancı ot tohumlarının çimlenmesini %100 oranında engellediği belirlenmiştir. *N. meyeri*'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstratlerden aseton ekstresi çimlenme üzerine %5.33-%42 değerleri arasında etki ederek genel olarak en etkili sonuçları verdiği, *S. arvensis* tohumlarının çimlenme, kök ve sürgün büyümesini ise tamamen engellediği belirtilmiştir. *N. meyeri*'nin kök kısımlarından elde edilen ekstratlerden aseton ekstresi en etkili ekstre olarak belirlenmiş olup, *A. retroflexus*, *C. album* ve *S. arvensis*'in çimlenme, kök ve sürgün büyümesini tamamen engellemiştir. Sera denemesinde ise petri denemesinde de kullanılan 20 mg'lık doz kullanılmıştır. Uçucu yağ ve ekstratların yüksek dozu (20 mg) hem petri denemesinde hem de sera denemesinde etkili bulunmuştur. Sera denemelerinde uçucu yağın fide ölümlerine etki oranı %28 - %64 değerleri arasında olurken, ekstratlerde de fidelerin ölüm oranları yüksek bulunmuştur. Metanol ekstresinin *A. retroflexus*'un fide ölümlerine etki oranı %40.67 - %66 değerleri arasında, *C. album* üzerine kloroform ekstresinin etki oranı %31.33 - %62.67 değerleri arasında, *C. arvense* üzerine kloroform ekstresi etki oranı

%33.33 - %60.67 değerleri arasında ve hekzan ekstresinin *S. arvensis*'in fide ölümlerine etki oranının %32 - %59.33 değerleri arasında olduğu belirtilmiştir (Tazegül avuşoğlu 2012).

Yukarıdaki çalışmalarda belirtildiği gibi *Nepeta* cinsleri içerisinde 4 α ,7 α ,7 β -nepetalacton ve 4 α ,7 α ,7 α -nepetalacton içerenler, antibakteriyal, antifungal ve antiviral özelliklere sahiptirler. Bu çalışmada materyal olarak kullanılacak *Nepeta meyeri* bitkisinde de bu bileşiklerin yüksek oranda bulunduğu birçok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir. (Esmaili *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2010a; Mutlu *et al.* 2011). Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında *Nepeta meyeri*'nin de antifungal olarak etki edeceği hipotezi ileri sürülebilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

İnkübatör	: Memmert, GERMANY, INBE 410 1583
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Otoklav	: Hirayama, JAPAN, HVE 50
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Işık mikroskobu	: Boeco BM-180, Germany
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Nuaire
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Otomatik pipetler	: Ependhof, Axigen
pH metre	: WTW unilab pH metre
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Sıcak su banyosu	: Wise Bath
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
UV Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
Multiskan Spektrofotometre	: Multiscan GO
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
Etüv	: Memmert, GERMANY, INBE 410 1583
Saf Su cihazı	: Nüve NS 112
Vortex karıştırıcı	: IKA, U. S. A., MS2

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

1. %5'lik $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ (Titanyum disülfat çözeltisi) (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1 gram $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ 20 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
2. %19'luk NH_4OH (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 4.16 mL NH_3 20 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.
3. 2 M'lık H_2SO_4 (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 40 mL %98'lik H_2SO_4 alınmış 160 mL saf su içerisine ilave edildikten sonra 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
4. 65 mM K_2HPO_4 , pH: 7.8 (Süperoksit anyonu miktarının belirlenmesinde kullanılan tampon): 1.132 g K_2HPO_4 70 mL saf su da çözölmüş pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
5. 10 mM Hydroxilamine (Süperoksit anyonu miktarının ölçölmesinde kullanılır): 0.0069 g Hydroxilamine alınmış 10 ml saf suda çözdürölerek hazırlanmıştır.
6. 17 mM amonyum benzono sülfonik asit (ABSA) (Süperoksit anyonu miktarının ölçölmesinde kullanılır): 0.1472 g alınmış ve 50 ml saf suda çözündürölerek hazırlanmıştır.
7. 17 mM 1-Naftilamine (Süperoksit anyonu miktarının ölçölmesinde kullanılır): 0.243 g 1- Naftilamine alınmış 10 ml asetonda çözülmüş ve son hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
8. %5 lik TCA (trikloroasetik asit) (Lipid peroksidasyon içeriğinin belirlenmesinde) : 100 mL saf su içerisine 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözüne kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.
9. %0.5 lik TBA (tiobarbutirik asit) (Lipid peroksidasyon içeriğ i belirlenmesinde): 100 mL saf su içine 20 gram TCA çözüölür ve içerisine %0.5 g TBA ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanmıştır.
10. 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA (Antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 2.72 g KH_2PO_4 180 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile

Ph: 7.0'ye kadar titre edildikten sonra saf su ile 200 mL'ye tamamlanmış ve 0.5 g PVP ve 0.04 g EDTA ilave edilerek hazırlanmıştır.

11. 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.7 g KH_2PO_4 200 mL saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

12. 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 g metionin alınır, hazırlanan 250 mL 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.

13. 63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 g NBT alınır, hazırlanmış olan 250 mL 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.

14. 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 g EDTA alınır, hazırlanmış olan 250 mL 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.

15. 13 μM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0.019 g riboflavin, 500 mL saf suda çözülmüştür.

16. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 54 μL quairol ve 15 μL H_2O_2 'dan ($d=1.13$ g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözülerek hazırlanmıştır.

17. 0.1 M Na_2HPO_4 (pH: 5.5) (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na_2HPO_4 alınarak, 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

18. 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılacak tampon): 1.4 g KH_2PO_4 , 80 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilir ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

19. 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılacak substrat çözeltisi): 408 μL %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

20. 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılmıştır): 41 μL % 30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

21. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi ölçümünde kullanılan reaksiyon karışımı: 0.0090 gr Askorbik asit, 0.068 gr KH_2PO_4 , 0.0059 gr EDTA ve 8.6 μL H_2O_2 100 mL saf su içerisinde çözülmüştür.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Bitki materyallerinin toplanması

Bu çalışmada, asma (*Vitis vinifera* L. cv. Kareerik) bitkisi ve üzümlerinde bir hastalık etmeni olan kurşuni küf (*Botrytis cinerea*) mücadelesinde allelopatik yaklaşımların etkisi araştırılmıştır. Allelopatik kaynağı bitki olarak yabani bitki olan kedi nanesi (*Nepeta meyeri* Benth.) kullanılmıştır. Çalışmada, kullanılan Karerik üzüm çeşidi, Kuzeydoğu Anadolu Tarım Bölgesi'nin standart tescilli tek standart üzüm çeşitidir. Erzincan'ın Üzümlü İlçesi bağlarında uygun zamanda ve uygun koşullarda çelikler alınmış ve laboratuvara getirilmiştir. Araziden toplanan tek gözlü çelikler, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü seralarına getirilmiş ve uygun koşullarda köklendirilmiştir. Bunun için Karaerik üzüm çeşidine ait kış dinlenmesini tamamlamış, 1 yaşlı çubuklardan hazırlanan tek gözlü çelikler torf-kum karışımı ile doldurulmuş saksılar içerisine dikilmiştir. Dikilen çelikler düzenli olarak sulanmış ve bir aylık inkübasyon sonrası köklenen çeliklerden aynı zamanda sürgünler oluşmuştur. Köklenmiş asma fideleri 5 yapraklı fidan oluşuncaya kadar uygun sera koşullarında (23°C'de 8 saat gece / 16 saat gündüz) yetiştirilmişlerdir. Deneysel çalışmalarda bu fidanlardan alınan yaprak sapları, yaprak ayaları ve sürgün eksplantları kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çeliklerin yetiştirilmesi

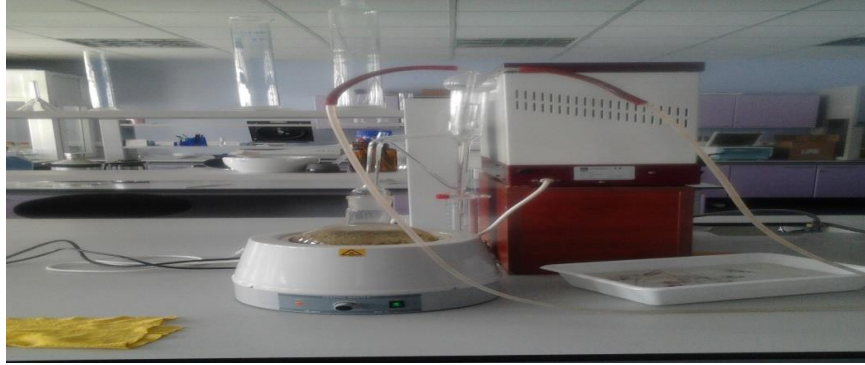
Çalışmada kullanılan diğer bitki olan *N. meyeri* çiçeklenme dönemi olan Haziran ayı içerisinde Erzurum Horasan ilçesi civarından toplanmıştır (GPS koordinatları $40^{\circ} 2' 13.2792''$ ve $42^{\circ} 11' 5.7984''$). Doğal habitatında toplanan bitkiler direk güneş almayan havadar bir ortamda kurutulmuştur.



Şekil 3.2. *N. meyeri*'nin kurutulması

3.2.2. *Nepeta meyeri*'nin esansiyel yağlarının elde edilmesi ve analizi

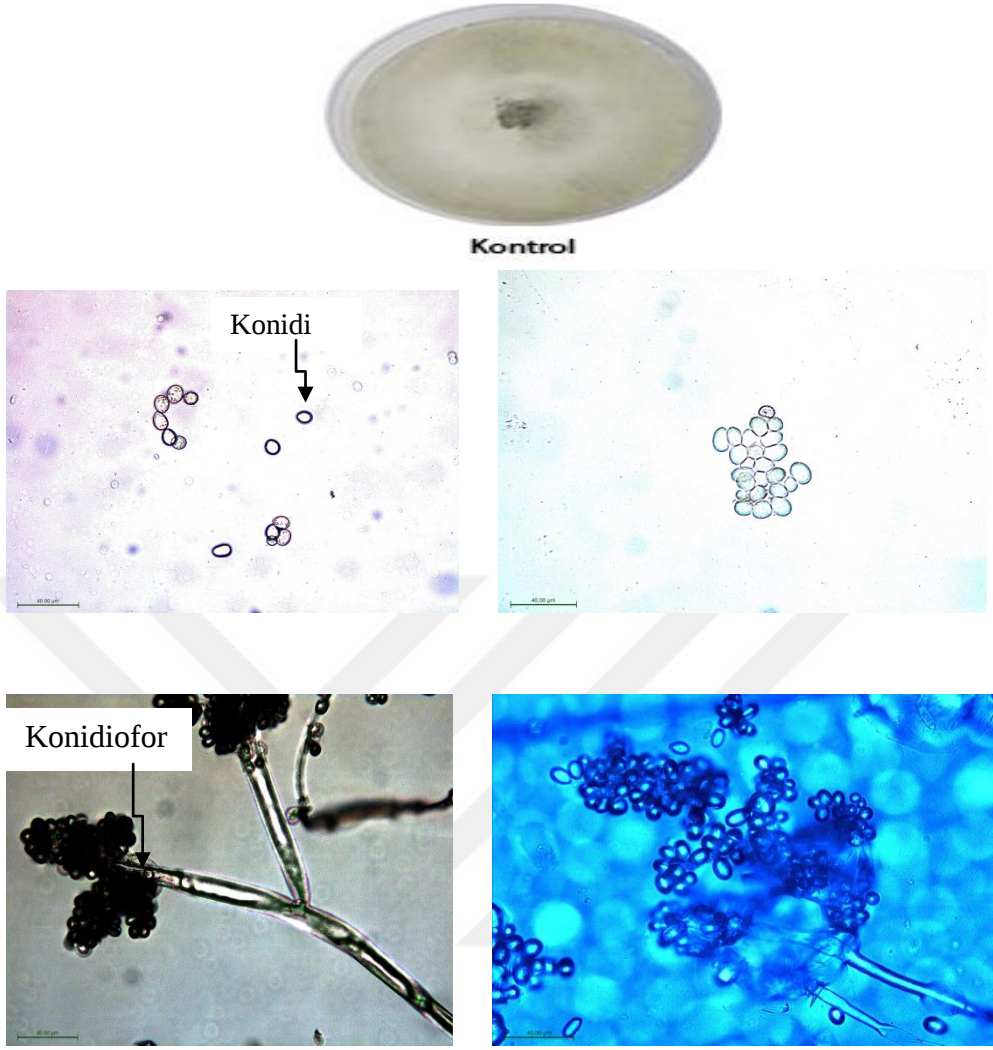
Bitkilerimiz gölgede iyice kurutulup kök, gövde ve çiçek kısımları ayrıldıktan sonra Waring blender yardımıyla parçalanmıştır. Literatürde yaygın olan yöntemlerle esansiyel yağları elde edilmiştir (Mutlu and Atıcı 2009; Singh *et al.* 2009; Mutlu *et al.* 2011). Esansiyel yağların analizleri GC/MS kütle spektrum yöntemiyle yapılmıştır. Bu işlem Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Laboratuvarında yapılmıştır.



Şekil 3.3. Esansiyel yağların elde edilmesi

3.2.3. *Botrytis cinerea* izolatlarının elde edilmesi ve saflaştırılması

B. cinerea izolatları Erzincan ilinin Üzümlü ilçesinde üzüm bağlarında hastalıklı bitkilerden temin edilmiştir. Fungus izolasyonunda Patates Dekstroza Agar (PDA) besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri Petrilere döküldükten sonra fungus izolasyonları yapılmıştır (Şekil 3.4). *B. cinerea* izolatları çalışmalarda kullanılmak üzere eğik agarda +4°C ve silika jel içerisinde -20°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. *B. cinerea*, *B. cinerea*'nın konidiofor ve konidileri

3.2.4. Esansiyel yağın antifungal etkisinin belirlenmesi

3.2.4.a. Esansiyel yağın *in vitro* koşullarda patojenin miselyal gelişimi üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi

Öncelikle *Nepeta meyeri*'den elde edilen esansiyel yağ (EY), bir yüzey artırıcı madde olan Tween- 20 içerisinde çözülmüştür. Bunun için %0.5 (v/v) oranında Tween- 20 içeren 10 ml steril saf suya 10 µl esansiyel yağ ilave edilmiş ve iyice çözününceye kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 600 µl, 800 µl, 1000 µl EY çözeltisi bir otomatik pipetle yaklaşık 20 ml PDA besiyeri içeren Petrilere ilave edilmiştir. Kontrol Petrilere sadece Tween- 20'li steril saf su ilave edilmiştir. Sonuçta her Petriye konulan saf (seyreltilmemiş) EY miktarları sırasıyla şöyle olmuştur; 0.6 µl/Petri, 0.8 µl/Petri, 1

μl /Petri. Bu miktarlar, Petrilerdeki 20 ml besiyeri içerisinde seyreceğinden, her Petride 1 ml başına düşen nihai konsantrasyonlar 0.03 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 0.04 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 0.05 $\mu\text{l}/\text{ml}$ oranlarında olmuştur. EY konsantrasyonlarının ayarlanmasında literatürde benzer çalışmalardan ve yaptığımız ön denemelerden faydalanılmıştır.

Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan Petriler oda sıcaklığında 1 gün bekletildikten sonra, daha önceden PDA ortamında geliştirilmiş olan 7-10 günlük fungus kültürlerinden 4 mm çapındaki diskler alınarak EY içeren ve içermeyen Petriler içine inokule edilmiştir. Petrilerin etrafı parafilm ile kapatılmış ve 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirmeler kontrol Petrilerinde fungusun petrileri tamamen kaplaması beklenmeden ortam yüzeyindeki fungusun misel çapları ölçülerek yapılmıştır. İnkübasyonun 2. gününden itibaren her gün Petriler kontrol edilmiş ve günlük olarak fungal misel çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Misel çapının ölçümü fungus misel çapının birbirine dik ayrı yönde ölçülmesi şeklinde yapılmıştır (Benjilali *et al.* 1984). Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü ve kontrol örneklili yürütülmüştür. Denemeler beş kez tekrar edilmiştir.

Kontrollere göre bitki ekstraktlarının % engelleme oranları,

$E = (K - M) / K \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır (Deans and Svoboda 1990).

Burada:

E= Engelleme (%)

K= Kontrol petrisindeki misel çapı (mm)

M= Uygulama yapılan petrideki misel çapı (mm)

3.2.4.b. Esansiyel yağın *in vitro* koşullarda patojenin spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi

Esansiyel yağın patojenin spor çimlenmesine ve çim tüpü uzunluğuna etkilerini belirlemek amacıyla EY yukarıda verildiği şekilde 600 μl , 800 μl , 1000 μl dozları kullanılmıştır. PDA ortamında geliştirilen 7-10 günlük fungus kültürlerinin sporulasyonunu sağlamak için kültürler, içinde Tween 20 bulunan 5 ml steril saf suya steril bir cam çubuk yardımıyla kültürün yüzeyi kazınmıştır. Buradan elde edilen

süspansiyon (1×10^5 konidi/ml) 3 katlı gazlı bezden geçirilerek içerisindeki miselyal parçacıklar uzaklaştırılmıştır. Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanmış esansiyel yağ içeren Petrilere hazırlanan sporulasyonundan 10 µl ilave edilmiştir. Örnekler 25°C’de karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

Değerlendirmeler, 24 saat sonra ışık mikroskopunda, mikrometre yardımıyla sayılan 100 spordan çimlenen ve çimlenmeyen sporların belirlenmesi şeklinde yapılmıştır. Belirgin olarak uzunluklarının 1/2’si kadar çim tüpü oluşturmuş sporlar çimlenmiş olarak kabul edilmiştir. Çim tüpü uzunluğunun değerlendirilmesinde 40x büyütmeli objektif kullanılmış ve her bir tekerrürdeki 30 sporun çim tüpü uzunluğu (µm) ölçülerek ortalamaları hesaplanmıştır. 40x büyütmeli objektif ile 3 farklı görüntü alanında görülen sporlar sayılarak ve toplam spor sayısı, çimlenen spor sayısına oranlanarak % çimlenme oranı belirlenmiştir.

$$\% \text{ çimlenme} = [a/(a+b)] \times 100$$

a; çimlenen spor sayısı

b; çimlenmeyen spor sayısı

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü ve kontrol örnekli yürütülmüştür. Denemeler beş kez tekrar edilmiştir.

3.2.4.c. Asma yapraklarına fungusun enfekte edilmesi ve esansiyel yağın uygulanması

Genç üzüm yaprağı sulu sodyum hipoklorit (%5) ile 10 dk sterilize edilmiş ve steril su içerisinde durulanmıştır. Bir steril delici üzüm yapraklarında eşit büyüklükte disklerin (18 mm çap) alınması için kullanılmıştır. Yapraklar steril filtre kağıtları içeren petrilere yerleştirilerek (Deliere *et al.* 2010) önceden PDA besiyerinde geliştirilmiş *B. cinerea*’nın 4 günlük kolonilerinin kenar kısımlarından bir delici ile 1 cm çapında diskler alınmış ve hafifçe yaralanmış yaprak kısmına degecek şekilde her yaprağa karşılıklı olarak yerleştirilmiştir. Uygulama yapılan yapraklara 600 µl, 800 µl, 1000 µl EY çözeltileri uygulanmıştır. Kontrol yapraklara ise sadece steril saf su püskürtülmüştür.

(Vallejo *et al.* 2003). İnokulasyonlu ve inokulasyonsuz yapraklar 23°C’de 7 gün, 12 saat ışık ve 12 saat karanlık olacak şekilde bir iklim kabininde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda *B. cinerea* izolatlarının yapraklar üzerinde oluşturduğu lezyonların çapı ölçülerek elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yukarıdaki muameleler yapıldıktan sonra, enzimlerin çalışılması için yedinci gün yapraklar alınarak derin dondurucuya bırakılmıştır.

600 µl, 800 µl, 1000 µl EY uygulanan yapraklarda kontrol, tek başına esansiyel yağ ve tek başına fungus uygulaması tüm dozlarda tekrar yapılmıştır.

Esansiyel Yağlı Yapraklarda Grupların Oluşturulması;

- 1. Kontrol (K):** Hiçbir uygulama yapılmayan yaprak.
- 2. Esansiyel Yağlı (EY):** Yapraklara sadece esansiyel yağ uygulanmıştır.
- 3. Fungus (F):** Yapraklara sadece fungus enfekte edilmiştir.
- 4. Esansiyel Yağ+Fungus (EY+F):** Yapraklara fungus ve esansiyel yağ beraber uygulanmıştır.
- 5. Esansiyel Yağ+Fungus (1 Gün Sonra) (EY+F(1G)):** Yapraklara esansiyel yağ uygulandıktan bir gün sonra fungus enfekte edilmiştir.
- 6. Esansiyel Yağ+Fungus (2 Gün Sonra) (EY+F(2G)):** Yapraklara esansiyel yağ uygulandıktan iki gün sonra fungus enfekte edilmiştir.

3.2.5. Su özütünün antifungal etkisinin belirlenmesi

3.2.5.a. Su özütünün *in vitro* koşullarda patojenin miselyal gelişimi üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi

Su özütünü hazırlamak amacıyla *N. meyeri*’nin yaprakları kullanılmıştır. Bu işlemde iyice öğütülmüş 20 gr bitki materyali 100 ml suda sulandırılarak çalkalayıcı üzerinde 8 saat süre ile oda sıcaklığında ekstraksiyona bırakılmıştır (Schnee *et al.* 2013). Bu materyal önce 4 katlı steril tül bentten süzüldü ve santrifüj yapılmıştır. Elde edilen

süpernetant bir kez de Whatman filtre kağıdından süzöldükten sonra millipordan da geçirilerek steril edilmiştir. Hazırlanan bu %20'lik (w/v) stok çözeltiden 2 ml, 5 ml, 10 ml dozlarında otomatik pipetlerle alınıp steril boş petrilere ilave edilmiş ve sonra besiyeri üzerlerine dökölmüştür. Her Petride 20 ml besiyeri olduğu düşünölrse, Petrilerde son konsantrasyon sırasıyla %2, %5 ve %10 (w/v) olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan Petriler oda sıcaklığında 1 gün bekletildikten sonra, daha önceden PDA ortamında geliştirilmiş olan 7-10 günlük fungus költürlerinden 4 mm çapındaki diskler alınarak ekimleri yapılmıştır. Petrilerin etrafı parafilm ile kapatılmış ve 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirmeler kontrol Petrilerinde fungusun petrileri tamamen kaplaması beklenmeden ortam yüzeyindeki fungusun misel çapları ölçölerek yapılmıştır. İnkübasyonun 2. gününden itibaren her gün petriler kontrol edilmiş ve günlük olarak fungal misel çapları ölçölerek kaydedilmiştir. Misel çapının ölçümü fungus misel çapının birbirine dik ayrı yönde ölçölmesi şeklinde yapılmıştır (Benjilali *et al.* 1984). Denemeler, tesadöf parselleri deneme desenine göre beş tekerrörlü ve kontrol örneklü yürütölmüştür. Denemeler beş kez tekrar edilmiştir.

Kontrollere göre bitki ekstraktlarının % engelleme oranları,

$E = (K - M) / K \times 100$ formölüne göre hesaplanmıştır (Deans and Svoboda 1990).

Burada:

E= Engelleme (%)

K= Kontrol petrisindeki misel çapı (mm)

M= Uygulama yapılan petrideki misel çapı (mm)

3.2.5.b. Su özötünün *in vitro* koşullarda patojenin spor çimlenmesi ve çim töpü uzunluğu üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi

Su özötünün patojenin spor çimlenmesine ve çim töpü uzunluğuna etkilerini belirlemek amacıyla 2 ml, 5 ml, 10 ml dozları (%2, %5 ve %10) kullanılmıştır. PDA ortamında geliştirilen 7-10 günlük fungus költürlerinin sporulasyonunu sağlamak için, költürleri içinde Tween- 20 bulunan 5 ml steril saf suya steril bir cam çubuk yardımıyla költürün yüzeyi kazınmıştır. Buradan elde edilen süspansiyon (1×10^5 konidi/ml) 3 katlı gazlı bezden geçirilerek içerisindeki miselyal parçacıklar uzaklaştırılmıştır. Bir gün önceden

hazırlanmış su özütü içeren besiyerlerine hazırlanan sporulasyondan 10 µl ilave edilmiştir. 25°C’de karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

Değerlendirmeler, 24 saat sonra ışık mikroskopunda, mikrometre yardımıyla sayılan 100 spordan çimlenen ve çimlenmeyen sporların belirlenmesi şeklinde yapılmıştır. Belirgin olarak uzunluklarının 1/2’ si kadar çim tüpü oluşturmuş sporlar çimlenmiş olarak kabul edilmiştir. Çim tüpü uzunluğunun değerlendirilmesinde 40x büyütmeli objektif kullanılmış ve her bir tekerrürdeki 30 sporun çim tüpü uzunluğu (µm) ölçülerek ortalamaları hesaplanmıştır. 40x büyütmeli objektif ile 3 farklı görüntü alanında görülen sporlar sayıldı ve toplam spor sayısı, çimlenen spor sayısına oranlanmış % çimlenme oranı belirlenmiştir.

$$\% \text{ çimlenme} = [a/(a+b)] \times 100$$

a; çimlenen spor sayısı

b; çimlenmeyen spor sayısı

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü ve kontrol örnekli yürütülmüştür. Denemeler beş kez tekrar edilmiştir.

3.2.5.c. Yapraklara fungusun enfekte edilmesi ve su özütünün uygulanması

Genç üzüm yaprağı sulu sodyum hipoklorit (%5) ile 10 dk sterilize edilmiş ve steril su içerisinde durulanmıştır. Bir steril delici üzüm yapraklarında disklerin (18 mm çap) alınması için kullanılmıştır. Yapraklar steril filtre kağıtları içeren petrilere yerleştirilerek (Deliere *et al.* 2010) önceden PDA besiyerinde geliştirilmiş *B. cinerea*’nın 4 günlük kolonilerinin kenar kısımlarından bir delici ile 1 cm çapında diskler alınmış ve hafifçe yaralanmış yaprak kısmına degecek şekilde her yaprağa karşılıklı olarak yerleştirilmiştir. Uygulama yapılan yapraklara 2ml, 5ml ve 10 ml su özütü çözeltileri uygulanmıştır. Kontrol yapraklara ise sadece steril saf su püskürtülmüştür (Vallejo *et al.* 2003). İnokulasyonlu ve inokulasyonsuz yapraklar 23°C’de 7 gün 12 saat ışık ve 12 saat karanlık olacak şekilde bir iklim kabininde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda *B. cinerea* izolatlarının yapraklar üzerinde oluşturduğu lezyonların çapı ölçülerek elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yukarıdaki

muameleler yapıldıktan sonra, enzimlerin çalışılması için yedinci gün yapraklar alınarak derin dondurucuya bırakılmıştır.

3.2.6. Metanolik özütün antifungal etkisinin belirlenmesi

3.2.6.a. Metanolik özütün *in vitro* koşullarda patojenin miselyal gelişimi üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi

Metanolik özütün miselyal gelişime etkilerini belirlemek amacıyla kurutulmuş ve öğütülmüş 200 gr bitki örneği alınmış ve 1000 ml metanolde ekstrakte edilmiştir (2-3 gün). Bu işlem aynı örnek üzerinden 3 kez tekrarlanmıştır ve her seferinde elde edilen özütler birleştirilmiştir. Metanol, metanolik özütten bir evaporatör yardımıyla 45°C vakum altında uzaklaştırılmıştır. Elde edilen çökeleğe, içerisindeki lipidlerin uzaklaştırılması için 100 ml Hekzan ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Hekzan fraksiyonu ortamdaki aynı şartlarda alınmıştır. Bu işlem aynı çökelek ile iki kez daha yapılmış ve elde edilen Hexan fraksiyonları birleştirilmiştir. Hekzan evapore edilmiş ve geri kalan çökelek tartılmıştır (Satyajit *et al.* 2006). Elde edilen çökelekten 1 gr alınmış ve 100 ml steril saf su içerisinde çözölmüştür. Hazırlanan bu çözelti Whatman filtre kâğıdından süzölmüştür. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 ml (500 ppm), 2 ml (1000 ppm) ve 3 ml (1500 ppm) dozlarında otomatik pipetlerle alınıp petrilere ilave edilmiştir ve önceden hazırlanmış Petilerdeki besiyeri üzerlerine dökölmüştür (Tehranifar *et al.* 2011). Petriler oda sıcaklığında 1 gün bekletildikten sonra, daha önceden PDA ortamında geliştirilmiş olan 7-10 günlük fungus költürlerinden 4 mm çapındaki diskler alınarak ekimleri yapılmıştır. Petrilerin etrafı parafilm ile kapatılmış ve 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirmeler kontrol petrilerinde fungusun petrileri tamamen kaplaması beklenmeden ortam yüzeyindeki fungusun miselleri ölçölerek yapılmıştır. İnkübasyonun 2. gününden itibaren her gün petriler kontrol edilmiş ve günlük olarak fungal misel çapları ölçölerek kaydedilmiştir. Misel çapının ölçümü fungus misel çapının birbirine dik ayrı yönde ölçölmesi şeklinde yapılmıştır (Benjilali *et al.* 1984). Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü ve kontrol örnekli yürütölmüştür. Denemeler üç kez tekrar edilmiştir.

Kontrollere göre bitki ekstraktlarının % engelleme oranları,

$E = ((K - M) / K) \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır (Deans and Svoboda 1990).

Burada:

E= Engelleme (%)

K= Kontrol petrisindeki misel çapı (mm)

M= Uygulama yapılan petrideki misel çapı (mm)

3.2.6.b. Metanol özütün *in vitro* koşullarda patojenin spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine antifungal etkilerinin belirlenmesi

Metanol özütün patojenin spor çimlenmesine ve çim tüpü uzunluğuna etkilerini belirlemek amacıyla 1 ml (500 ppm), 2 ml (1000 ppm) ve 3 ml (1500 ppm) dozları kullanılmıştır. PDA ortamında geliştirilen 7-10 günlük fungus kültürlerinin sporulasyonunu sağlamak için, kültürleri içinde Tween 20 bulunan 5 ml steril saf suya steril bir cam çubuk yardımıyla kültürün yüzeyi kazınmıştır. Buradan elde edilen süspansiyon (1×10^5 konidi/ml) 3 katlı gazlı bezden geçirilerek içerisindeki miselyal parçacıklar uzaklaştırılmıştır. Bir gün önceden hazırlanmış metanol özütü içeren besiyerlerine hazırlanan sporulasyondan 10 µl ilave edilmiştir. 25°C’de karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirmeler, 24 saat sonra ışık mikroskopunda, mikrometre yardımıyla sayılan 100 spordan çimlenen ve çimlenmeyen sporların belirlenmesi şeklinde yapılmıştır. Belirgin olarak uzunluklarının 1/2’si kadar çim tüpü oluşturmuş sporlar çimlenmiş olarak kabul edilmiştir. Çim tüpü uzunluğunun değerlendirilmesinde 40x büyütmeli objektif kullanılmış ve her bir tekerrürdeki 30 sporun çim tüpü uzunluğu (µm) ölçülerek ortalamaları hesaplanmıştır. 40x büyütmeli objektif ile 3 farklı görüntü alanında görülen sporlar sayılarak ve toplam spor sayısı, çimlenen spor sayısına oranlanmış % çimlenme belirlenmiştir.

$$\% \text{ çimlenme} = [a/(a+b)] \times 100$$

a; çimlenen spor sayısı

b; çimlenmeyen spor sayısı

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü ve kontrol örnekli yürütülmüştür. Denemeler beş kez tekrar edilmiştir.

3.2.6.c. Yapraklara fungusun enfekte edilmesi ve elde edilen metanolik özütünün uygulanması

Genç üzüm yaprağı sulu sodyum hipoklorit (%5) ile 10 dk sterilize edilmiş ve steril su içerisinde durulanmıştır. Bir steril delici üzüm yapraklarında disklerin (18 mm çap) alınması için kullanılmıştır. Yapraklar steril filtre kağıtları içeren petrilere yerleştirilmiştir (Deliere *et al.* 2010). Önceden PDA besiyerinde geliştirilmiş *B. cinerea*'nın 4 günlük kolonilerinin kenar kısımlarından bir delici ile 1 cm çapında diskler alınmış ve hafifçe yaralanmış yaprak kısmına degecek şekilde her yaprağa karşılıklı olarak yerleştirilmiştir. Uygulama yapılan yapraklara 1 ml (500 ppm), 2 ml (1000 ppm) ve 3 ml (1500 ppm) metanol özütü çözeltileri uygulanmıştır. İnokulasyonlu ve inokulasyonsuz yapraklar 23°C'de 7 gün 12 saat ışık ve 12 saat karanlık olacak şekilde bir iklim kabininde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda *B. cinerea* izolatlarının yapraklar üzerinde oluşturduğu lezyonların çapı ölçülerek elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yukarıdaki muameleler yapıldıktan sonra, enzimlerin çalışılması için yedinci gün yapraklar alınarak derin dondurucuya bırakılmıştır.

3.2.7. Bitkiler ile ilgili deneylerin yapılması

3.2.7.a. Klorofil miktarı tayini

Yaprak numunelerinden 0.1 gr alınarak bisturi ile parçalanmıştır. Parçalanmış örnekler üzerine 10 ml %80' lik aseton ilave edildikten sonra tokmakla iyice ezilerek ekstraktı çıkarılmıştır. Ezilen örnekler filtre kağıdından süzülmüş, elde edilen ekstraktın ependorf tüplerine aktararak 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantların 450, 645 ve 663 nm'lerdeki absorbans değerleri okunmuştur. Okunan bu absorbans

değerleri aşağıdaki formüllerde yerine konarak klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid değerleri hesaplanmıştır (Lichtenthaler 1987).

$$\text{Klorofil a} = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$\text{Klorofil b} = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$\text{Total klorofil} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

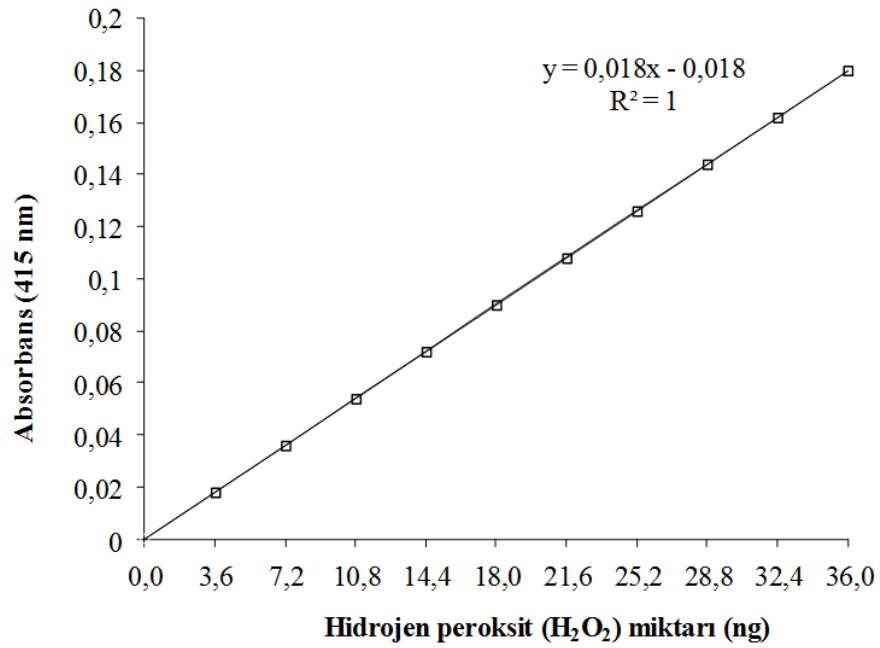
$$\text{Karotenoid} = (4.07 \times A_{450} - (0.0435 \times \text{Klorofil a} + 0.367 \times \text{Klorofil b}))$$

3.2.7.b. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

0.5 gram yaprak alınarak 10 mL aseton içinde homojenize edilip homojenat 10 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1.5 mL'si, sırasıyla 0.15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ (titanyum disülfat) ve 0.3 mL %19'luk NH₄OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılmıştır. Çökelek oluşuktan sonra karışım tekrar 10.000 xg'de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir.

Elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ (sülfürik asit) içinde çözölmüş ve 415 nm'de dalga boyunda spektrofotometrede absorbansı ölçölerek kaydedilmiştir. Bu ortalama absorbans değlerleri, daha önceden hazırlanmış standart grafik yardımıyla nanogram cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürölmüştür. Sonuçlar g yaprak başına düşen H₂O₂ miktarı (ngram /g yaprak) olarak verilmiştir (He *et al.* 2005).

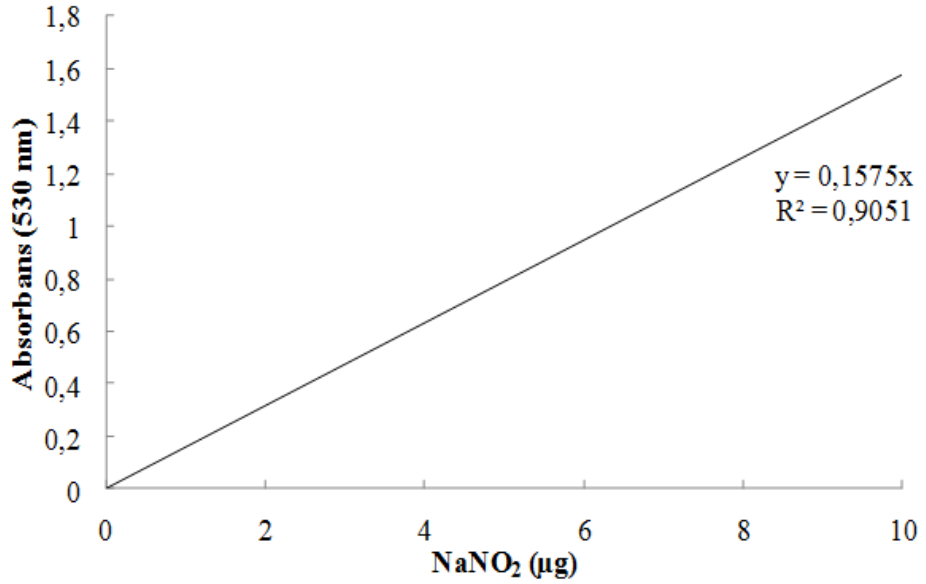
H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılan H₂O₂ standardı için, %35'lik H₂O₂ çözeltisinden hazırlanan 3 mM'lık stok çözeltiden eppendorf tüplerine sırasıyla; 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 nanogram şeklinde konulmuştur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 mL'ye tamamlamış ve her tüpe 0.15 mL %5'lik Ti(SO₄)₂ ve 0.3 mL %19'luk NH₄OH eklenmiştir. Çökelek oluşuktan sonra karışım 5 dakika 10.000 xg'de daha santrifüj edilmiştir. Sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık H₂SO₄ içinde çözölmüş ve 415 nm'de absorbans köre karşı okunmuştur. Absorbans değlerlerine karşılık gelen nanogram H₂O₂ değlerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.5. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.

3.2.7.c. Süperoksit anyon miktarının belirlenmesi

Toz haline getirilen 0.5 g yaprak üzerine 2 mL 65 mM (pH: 7.8) fosfat tamponu ilave edilerek homojenize edilmiştir. Homojenat 5000 x g'de 10 dk. ve + 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 1 ml alınır üzerine 0.9 ml fosfat tamponu ve 0.1 ml 10 mM hydroxylamine hidroklorid eklenmiştir. Çözelti karıştırılmış ve 20 dakika 25°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra karışımdan 1 ml alınarak üzerine 1 ml 17 mM aminobenzene sülfonik asit ve 1 ml 17 mM 1- naftilamin eklenir karıştırılmış ve 20 dakika 25°C'de inkübe edilmiş. Spektrofotometre de 530 nm'de absorbans değerleri ölçülerek sonuçlar NaNO₂ standart grafiğine bakılarak değerlendirilmiştir (Eltner and Heupel 1976).



Şekil 3.6. Süperoksit anyonu miktarı standart grafiği

3.2.7.d. Lipid peroksidasyon seviyesinin belirlenmesi

0.5 g yaprak alınarak 5 mL %5'lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat 10.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0.5'lik TBA çözeltisi eklenmiştir. Karışım kaynar suda 30 dakika inkübe edilerek ve tüpler buz banyosuna alınmış reaksiyon durdurulmuştur. Örnekler tekrar 10 dakika 10000 xg'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okunarak ve daha sonra 600 nm deki nonspesifik absorpsiyon için absorbans değeri ölçülmüştür.

Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değer çıkarılmış ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/g): $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde sunulmuştur (Ananieva *et al.* 2002).

3.2.7.e. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Yaprak dokusundan 0.5 gr alınıp sıvı azot ile toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Sonra üzerine 5 mL soğuk homojenat tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0.1 M KH_2PO_4 pH: 7.0) ilave edilerek ve karışım bir santrifüj tüpüne aktarılmış 15000 xg' de ve +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kullanılır (Angelini *et al.* 1990). Bütün enzim ekstraktları, enzim çalışmaları süresince 4°C'de tutulmuştur. Kullanılan malzemelerin (pipet uçları vs.) ve ortamın steril olmasına dikkat edilmiştir.

1. Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

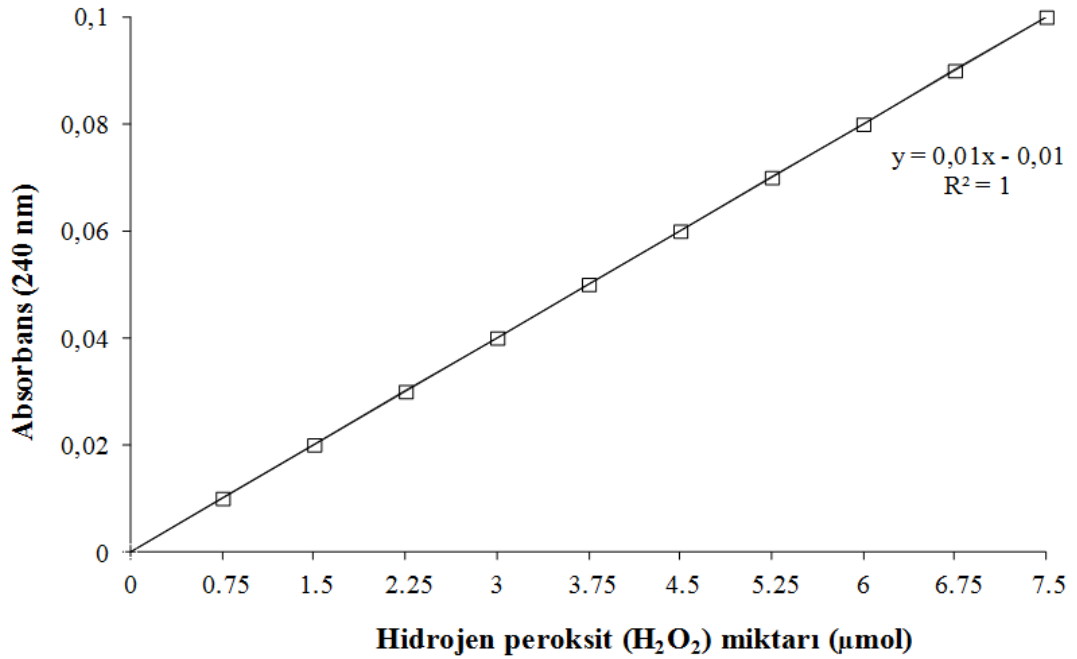
Süperoksid dismutaz (SOD) enzim aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır. Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 13 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için küvete yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 mL alınmış ve üzerine 30 μL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 μL eklenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirilerek başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin reaksiyon çözeltisiyle yapılmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna sebep olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g yaprak olarak hesaplanmıştır (Agarwal and Pandey 2004).

2. Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi

Guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M, Na_2HPO_4 (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5 mM H_2O_2 içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 µL enzim ekstraktı eklenmiştir. 470 nm'de absorbans artışı 5 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. Absorbansı 25°C'de 1 dakikada, 0.01 abs artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak hesaplanmıştır (Yee *et al.* 2002).

3. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Ortamdaki H_2O_2 'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlayan katalaz absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Gong *et al.* 2001). Reaksiyon sonucunda azalan H_2O_2 miktarını belirlemek için standart grafik hazırlanır. Standart grafik hazırlarken, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuş, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 mL 103.5 mM KH_2PO_4 ve 30 µL su ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans köre karşı okunarak absorbans değerlerine karşılık gelen µM H_2O_2 değerleriyle standart grafik elde edilmiştir. Enzim aktivitesi ölçümü için 3 mL'lik küvete, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 1.475 mL ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1.5 mL konulduktan sonra, 25 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuş ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Ortalama bu absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla µmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülmüştür. 1 dakika içinde 25°C'de, absorbansı 1 µmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

4. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini

Askorbat peroksidaz aktivitesi, absorbanstaki azalışa bağlı olarak 290 nm’de ölçülür (Nakano and Asada 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 μM askorbik asid (ASC), 5 mM H₂O₂ ve 100 μl enzim ekstraktı içeren 3 ml’lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm’de ASC için 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplanarak ve sonuçlar g/taze ağırlık başına ifade edilmiştir.

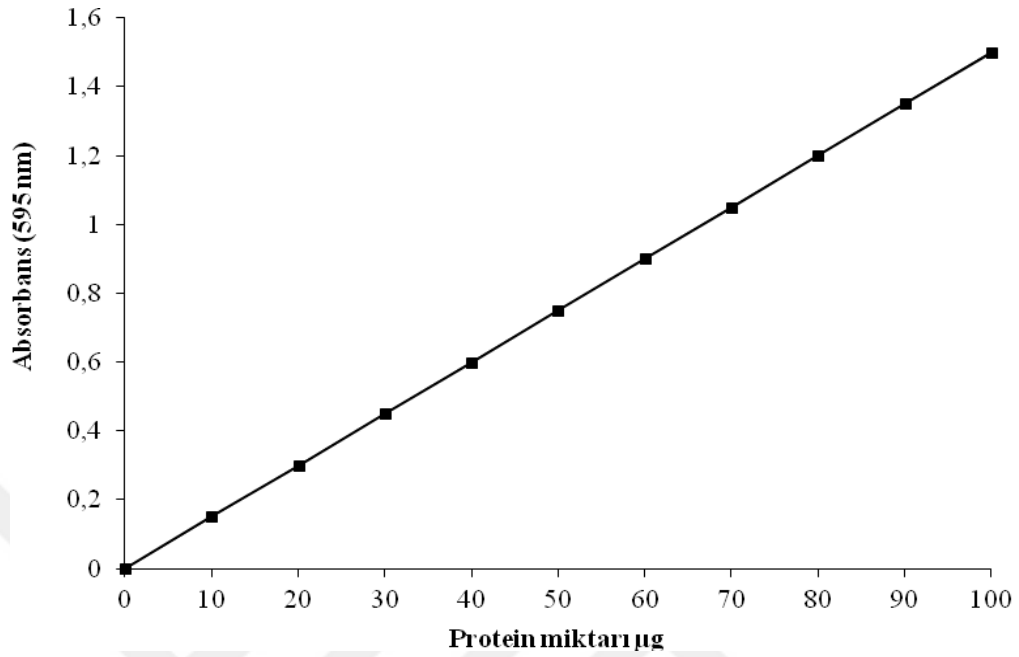
5. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976) metoduna göre belirlenmiştir. Substrat olarak 0.25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanılmıştır. Yükseltgenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için indirgeyici faktör olarak NADPH kullanılmıştır. Enzim aktivitesi için, 200 μl 0.5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 250 μl GSSG ve 500 μl NADPH ihtiva eden karışıma 50 μl enzim ekstraktı eklenmiştir. NADPH’ın

oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlenmiştir. GR aktivitesi EU/ml olarak ifade edilmiştir.

6. Çözünabilir protein miktarının tayini

Çözünabilir proteinlerin kantitatif tayini Bradford'a (1976) göre yapılmıştır. Çalışmada kullanılan yapraklardan 0.1 gr alınıp önce sıvı azotla sonra fosfat tamponunda (0.5 M KH_2PO_4 ; pH:7) iyice homojenize edilmiştir. Homojenat 12000 x g'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatanttan 0.2 ml alınıp, 3 ml Coomassie reaktifiyle karıştırılmış ve 10 dk sonra absorbansları 595 nm'de belirlenmiştir. Hesaplama için bir standart grafikten yararlanılarak protein miktarları μg protein/g doku olarak sunulmuştur. Standart grafik şu şekilde hazırlanmıştır; 1ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albumin (BSA) çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μg protein içeren hacimler tüplere aktarılıp, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 0.2 ml'ye tamamlanmıştır. Bu tüplere 3'er ml Coomassie reaktifi ilave edilip vorteks ile karıştırılmıştır. Kör numune olarak 0.2 ml aynı tampondan ve 3 ml Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılmıştır. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 595 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.8. Protein tayini için kullanılan standart grafik

3.2.8. İstatistik Analiz

Sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek ve her örnekten 3 tekerrür şeklinde yapılmıştır. Sonuçların karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile hesaplanmıştır. Analizler $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak yorumlanmış olup tüm analizler SPSS (20.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Yüzde değerlerimize ait verilerimiz normal dağılışa uyması sebebiyle bu verilerimizin istatistik analizinde açılı transformasyonu uygulanmamıştır. Her doz kendi içerisinde analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada allelopatik bir bitki olan *Nepeta meyeri* (Benth.)’den elde edilen esansiyel yağ, su ve metanolik özütler, Karaerik üzüm çeşidinde büyük kayıplara yol açan kurşuni küf (*Botrytis cinerea*) etmeni mantarın biyolojik mücadelesinde (biyo-fungusit olarak) kullanılmıştır. Kullanılan allelokimyasal özütlerin patojen mantar üzerinde oluşturduğu etkilere ilave olarak, asma bitkisinde fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları nasıl etkilediği de araştırılmıştır. Böylece hem mantarın hem de allelokimyasal özütlerin hastalık seyrinde bitkideki cevap mekanizmalarını nasıl etkilediği belirlenmiştir. Çalışmada uygulanan allelokimyasal özütlerin, mantar üzerinde hif gelişimi ve spor çimlenmesi üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Ayrıca hem mantar ve hem de allelokimyasal özütle muamele edilmiş asma yapraklarında ROS oluşum seviyesi ve antioksidan enzimlerin (CAT, POD, APX, GR ve SOD) aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler üzerinde analiz yapılmış istatistiki değerlendirmeler çizelge ve şekillerle sunulmuştur. Ayrıca antifungal etkilerin görsel görünümü fotoğraflanarak gösterilmiştir.

4.1. *Nepeta meyeri*’nin Esansiyel Yağ Analizi Sonuçları

Nepeta meyeri Benth.’den hidrodistilasyon yöntemiyle izole edilen uçucu yağlar GS-MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Otuz altı esansiyel yağ (EY) bileşeni tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Analiz edilen yağdan 4 α ,7 α ,7 α -nepetalacton (%71.68), 4 α , 7 β , 7 α -nepetalacton (%71.34) ve 4 α , 7 α , 7 β -nepetalacton (%70.17) gibi ana bileşenler tespit edilmiştir. Şekil 4.1’de ise EY ait GC/MS sonucu verilmiştir.

Çizelge 4.1. *N. meyeri* ’nin esansiyel yağ analizi

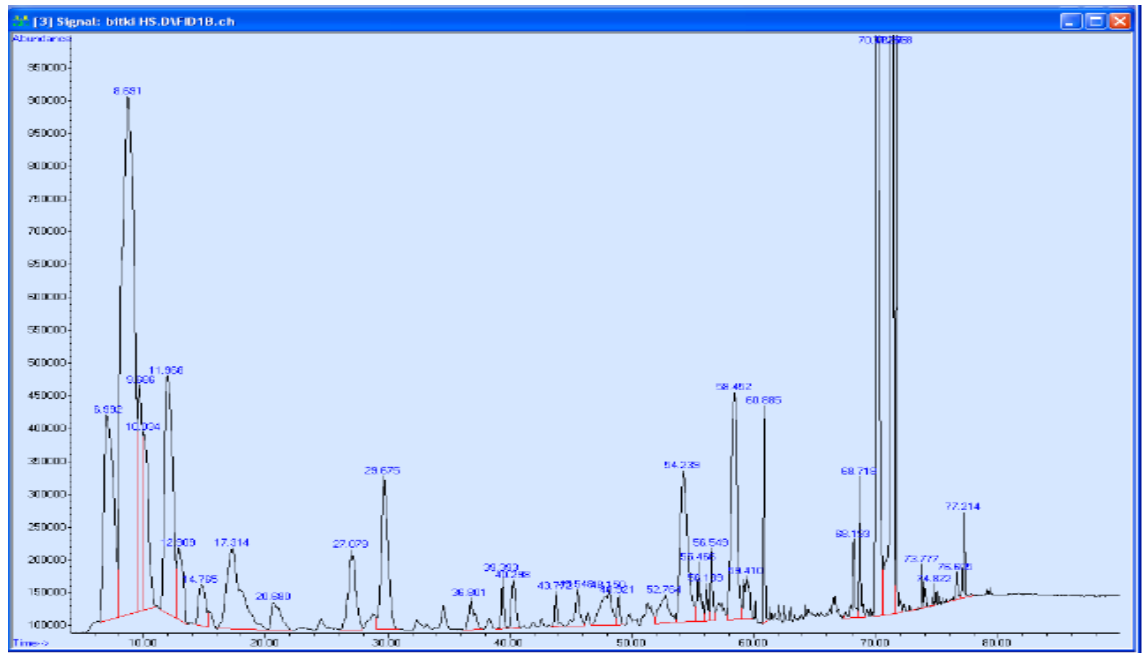
Bileşik adı	RT	% ORAN
METHANE, THIOBIS-	7.69	1.63
PINENE<BETA->	17.32	3.73
LIMONENE	23.09	0.13

Çizelge 4.1. (devam)

OCIMENE<(Z)-BETA->	27.1	2.31
CINEOLE <1,8->	29.68	3.61
1,3,5,7-CYCLOOCTATETRAENE	32.39	0.12
HEXENAL<2E->	34.54	0.18
(R)-(+)-3-METHYLCYCLOPENTANONE	36.59	0.05
OCTANONE<3->	37.21	0.12
HEXENOL<3Z->	39.41	0.22
1-OCTEN-3-OL	43.79	0.22
1,3-CYCLOHEXADIENE, 2-METHYL-5-(1-METHYLETHENYL)-	46.4	0.18
BOURBONENE<BETA->	47.87	1.81
AMORPHENE<GAMMA->	52.8	1.1
CARYOPHYLLENE<E->	54.25	4.36
CAMPHOR	56.15	0.33
BISABOLENE<(Z)-ALPHA->	57.21	0.44
GERMACRENE D	58.46	7.11
1-ISOPROPENYL-3-PROPENYL-CYCLOPENT	59.21	0.26
BICYCLOGERMACRENE	59.41	0.48
BENZENE ACETALDEHYDE	60.14	0.1
METHYL SALICYLATE	61.4	0.09
CALAMENENE<CIS->	61.73	0.11
2,6-DİMETHYL-1,3,5,7-OCTATETRAENE,E,E-	62.07	0.14
ANETHOLE<E->	63.02	0.07
BENZENEPROPANOIC ACID, METHYL ESTER	64.29	0.1

Çizelge 4.1. (devam)

3-BUTEN-2-ONE, 4-(2,6,6-TRIMETHYL-1-CYCLOHEXEN-1-YL)-, (E)-	66.7	0.12
CARYOPHYLLENE OXİDE	68.21	0.43
(-)-SPATHULENOL	68.74	0.61
NEPETALACTONE<4a-ALPHA,7-ALPHA,7a-BETA->	70.17	27.87
NEPETALACTONE<4a-ALPHA,7-BETA,7a-ALPHA->	71.34	28.26
NEPETALACTONE<4a-ALPHA,7-ALPHA,7a-ALPHA->	71.68	1.42
1,2-BENZENEDICARBOXYLIC ACID, DIMETHYL ESTER	74.21	0.02
DIHYDROISONEPETALACTONE	74.66	0.02
2-CYCLOHEXEN-1-ONE, 3-METHYL-6-(1-METHYLETHYL)-	74.85	0.04
PHENOL, 2-(1,1-DIMETHYLETHYL)-5-METHYL-	77.24	0.19

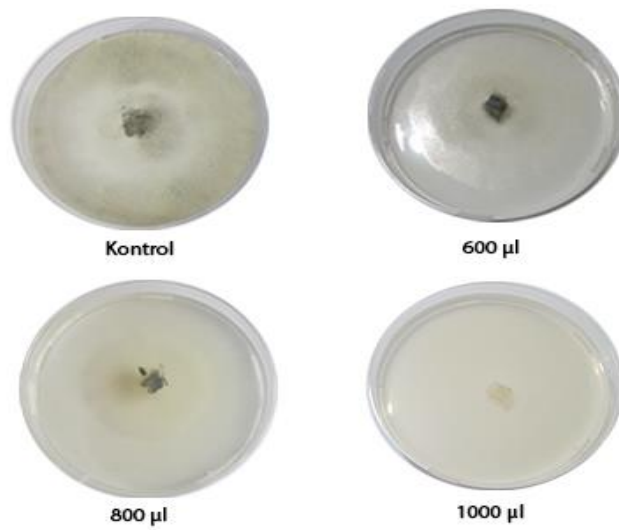
Şekil 4.1. *N. meyeri* 'nin esansiyel yağ analizi

4.2. Esansiyel Yağın *İn Vitro* Koşullarda Bitki Patojeni Fungusa Karşı Antifungal Etkileri

İn vitro koşullarda 3 farklı konsantrasyondaki (600 µl, 800 µl, 1000 µl) esansiyel yağ dozlarının fungusun miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine etkilerinin farklı seviyelerde olduğu belirlenmiş ve antifungal etkileri ayrı ayrı çizelgeler halinde verilerek yorumlanmıştır.

4.3. Esansiyel Yağın *B. cinerea*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi

EY dozlarının *Botrytis cinerea*'nın miseliyal gelişimi üzerine etkileri Şekil 4.2'de verilmiştir. *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi üzerindeki antifungal etkinin doz oranına paralel olarak arttığı belirtilmiştir. En yüksek engelleme oranı %80.72 ile 1000 µl'lik dozda görülmüştür (Şekil 4.3). %49.39 oranı ile 800 µl ve %25.3 oranı ile 600 µl dozda etki göstermiştir. Sonuç olarak ekstraktın 1000 µl dozunda *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi engelleme yüksek oranda meydana gelirken, 800 µl ve 600 µl dozlarında ise bu oranın daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4 incelendiğinde ekstraktın farklı oranlarda engelleme oluşturduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi üzerine farklı konsantrasyondaki esansiyel yağın etkisi

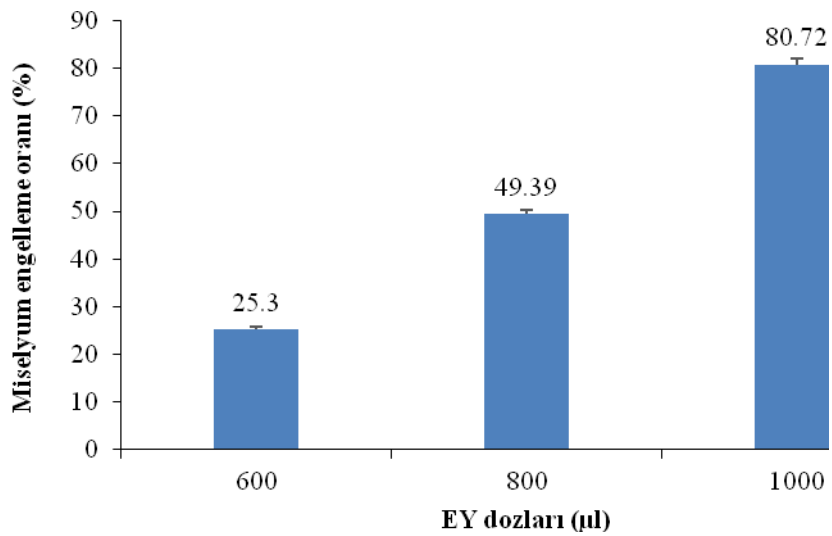


Şekil 4.3. Kontrol ve en etkili esansiyel yağ konsantrasyonu

Çizelge 4.2. Esansiyel yağın miselyum engelleme oranına etkisi

EY dozları (µl)	MEO
600	25.3± 0.55 ^a
800	49.39± 0.81 ^b
1000	80.72±1.2 ^c

*Aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. ±; Standart hata

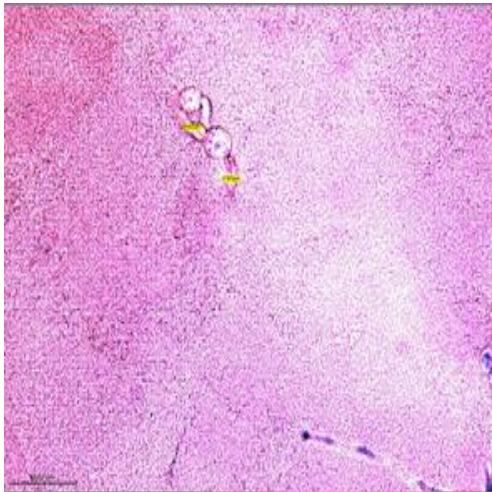


Şekil 4.4. Esansiyel yağ miselyum engelleme oranı

4.4. Esansiyel Yağın *B. cinerea*'nın Spor Çimlenmesi ve Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Antifungal Etkileri

Çimlenme oranları tespit edilirken, mikroskop altında incelenen konidiosporların bazılarının esansiyel yağın yüksek dozlarında çimlendiği; fakat bu çim borularında kontrole göre anormal görünen kalınlaşma veya deformasyonlar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6). Anormal çimlenme gösteren bu konidiosporlar çimlenmeyen grupta değerlendirilmiştir (Benjlali *et al.* 1984).

B. cinerea'nın konidiospor çimlenme yüzdesi (Şekil 4.7) ve çim tüpü uzunluğu üzerine EY dozlarının antifungal etkilerine ait bulgular Şekil 4.8'de verilmiştir. Konidiosporlar kontrol grubunda %100 çimlenirken, 1000 µl dozda sporların %18'nin, 800 µl'de %55'nin, 600 µl'de ise %66'sının çimlendiği belirlenmiştir. Çim tüpü uzunluğuna bakıldığında kontrol grubunda 134.26 µm iken, 1000 µl'de 38.15 µm, 800 µl'de 59.67 µm ve 600 µl'de ise 81.04 µm olduğu tespit edilmiştir. EY uygulamalarda doz oranına paralel olarak çim tüpü uzunlukları azalmıştır. Sonuçlar incelendiğinde spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğunu engelleyerek en yüksek antifungal etkinin 1000 µl'lik doz'da gerçekleştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.5. Anormal olarak çimlenmiş konidiospor

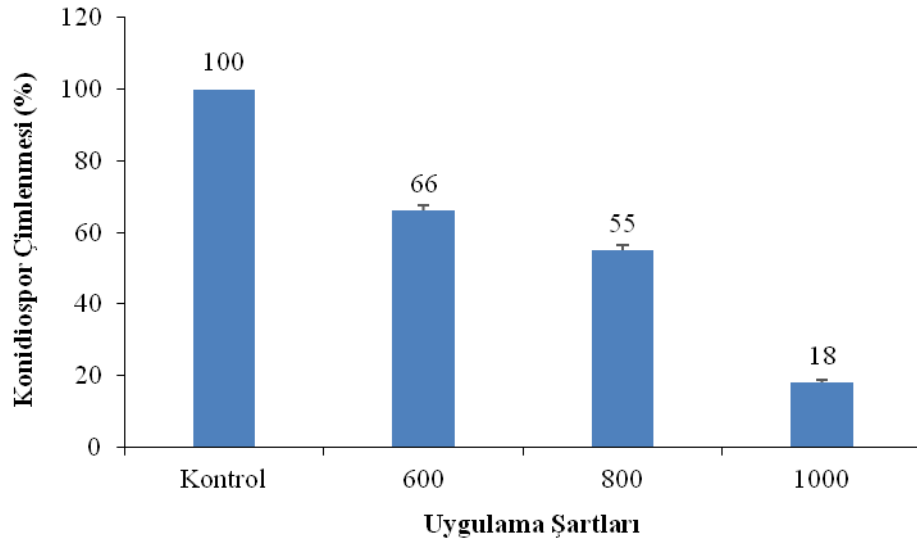


Şekil 4.6. Normal olarak çimlenmiş konidiospor

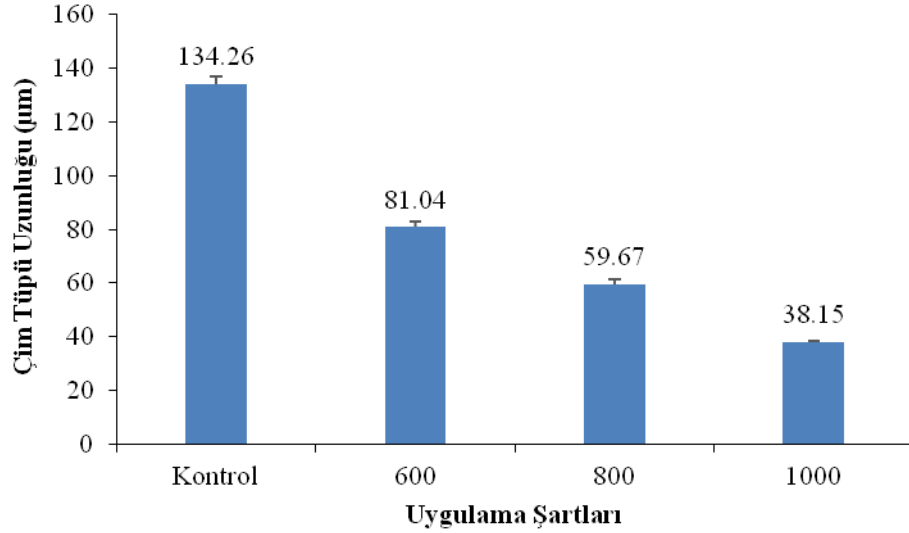
Çizelge 4.3. EY dozlarının konidiospor çim tüpü uzunluğuna etkisi

	EYA dozları (µl)			
	KONTROL	600	800	1000
Konidiospor Çimlenmesi (%)	100±0.0 ^d	66±1.58 ^c	55±1.37 ^b	18±0.7 ^a
Çim tüpü uzunluğu (µm)	134.26±1.5 ^d	81.04±1.06 ^c	59.67±0.89 ^b	38.15±0.41 ^a

*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. ±: Standart hata



Şekil 4.7. Esansiyel yağ spor çimlenme yüzdesi



Şekil 4.8. Esansiyel yağ çim tüpü uzunluğu

4.5. Esansiyel Yağın Yaprak Testleri İle Etkinliğinin Tespiti

EY dozlarının (600, 800 ve 1000 µl) antifungal etkileri Petri şartlarının yanında canlı yaprak denemeleriyle de belirlenmiştir. Yapraklara çalışılan EY dozları 3 farklı şekilde uygulanmıştır. Bunlar, (1) EY ile fungus aynı anda (E+F); (2) EY uygulamasından 1 gün sonra fungus uygulaması (E+F(1G)) ve (3) EY uygulamasından 2 gün sonra fungus uygulaması (E+F(2G)). Değerlendirmeler yapraklar üzerindeki lezyon çapları ölçülerek yapılmıştır. Değerlendirme sonuçlarına göre, tüm konsantrasyonlarda esansiyel yağ uygulamasından bir gün sonra fungusun yapraklara inokule (E+F(1G)) edilerek yapılan uygulamada, lezyon oluşumunu kontrol grubuna göre daha fazla etki göstererek azalttığı görülmüştür (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12). Çalışmada 600 µl'lik doz yaprak miselyum gelişim oranı (MGO) Şekil 4.10'da, 800 µl'lik doz MGO Şekil 4.11'de ve 1000 µl'lik doz MGO Şekil 4.12'de verilmiştir. Örneğin fungus uygulanan yapraklarda misel gelişimi alanı 600'de 20.24 iken, 800'de 21.60 ve 1000'de 19.78 olmuştur. E+F uygulanan yapraklarda misel gelişimi alanı 600'de 17.45 iken, 800'de 16.40 ve 1000'de 14.56 olmuştur. E+F(1G) uygulanan yapraklarda misel gelişimi alanı 600'de 16.64 iken, 800'de 14.80 ve 1000'de 11.16 olmuştur. E+F(2G) uygulanan yapraklarda ise misel gelişimi alanı 600'de 17.20 iken, 800'de 15.54 ve 1000'de 12.40 olmuştur (Çizelge 4.4).



Kontrol (K)



Esansiyel Yağlı (EY)



Fungus (F)



Esansiyel Yağ + Fungus (EY+F)



Esansiyel Yağ + Fungus (1G) (EY+F(1G))



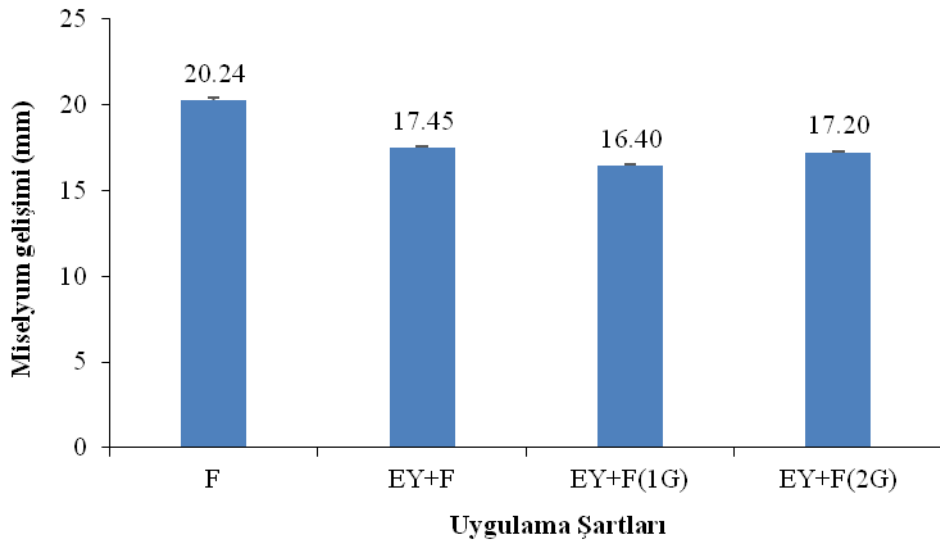
Esansiyel Yağ + Fungus (2G) (EY+F(2G))

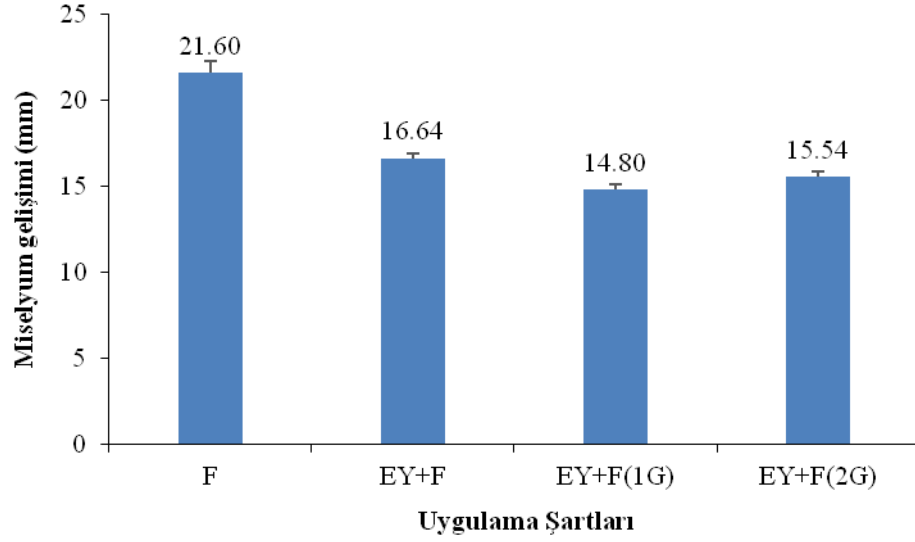
Şekil 4.9. Sağlıklı yaprak, patojen ve esansiyel yağ uygulamalı yapraklar (1000 µl)

Çizelge 4.4. EY dozlarının yapraklarda miselyum gelişimine etkisi

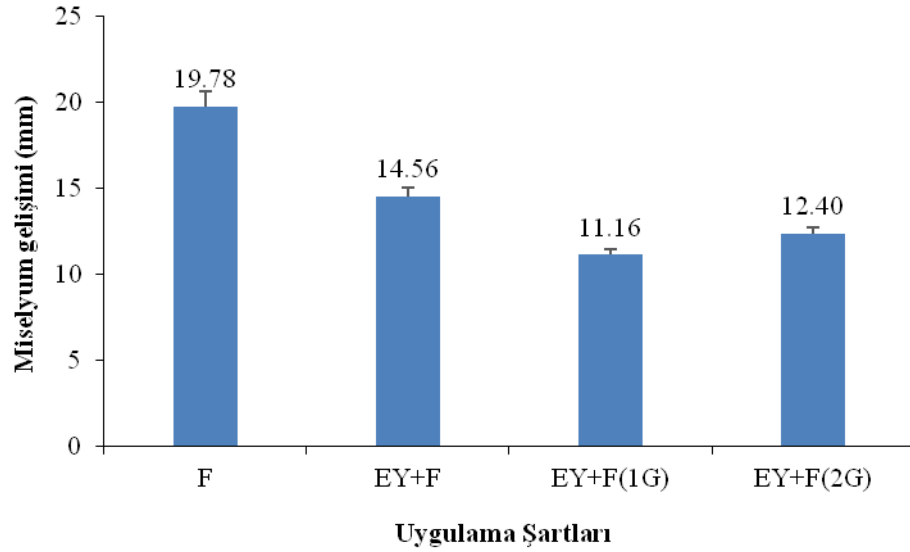
EYA dozları (µl)			
	600	800	1000
F	20.24±0.16 ^c	21.60±0.68 ^c	19.78±0.89 ^c
EY+F	17.45±0.08 ^b	16.64±0.3 ^b	14.56±0.53 ^b
EY+F(1G)	16.40±0.08 ^a	14.80±0.32 ^a	11.16±0.29 ^a
EY+F(2G)	17.20±0.07 ^b	15.54±0.33 ^{ab}	12.40±0.31 ^{ab}

*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. ±: Standart hata

**Şekil 4.10.** 600 µl esansiyel yağ yaprak miselyum gelişim oranı



Şekil 4.11. 800 µl esansiyel yağ yaprak miselyum gelişim oranı



Şekil 4.12. 1000 µl esansiyel yağ yaprak miselyum gelişim oranı

4.6. Fotosentetik Pigment İçeriği Sonuçları

EY'nin asma bitkisi yaprak dokusunda klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarları aşağıda verilmiştir.

4.6.1. Klorofil *a* içeriği sonuçları

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.5. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında klorofil *a* miktarına (mg.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	5.59±0.25 ^e	4.92±0.06 ^d	5.46±0.07 ^e
EY	5.33±0.18 ^{de}	4.85±0.05 ^{cd}	5.10±0.06 ^d
F	3.90±0.05 ^a	3.95±0.03 ^a	3.90±0.03 ^a
EY+F	4.33±0.15 ^b	4.27±0.03 ^b	4.37±0.03 ^b
EY+F(1G)	4.89±0.14 ^{cd}	4.86±0.05 ^{cd}	4.64±0.04 ^c
EY+F(2G)	4.48±0.14 ^{bc}	4.73±0.05 ^c	4.42±0.03 ^b

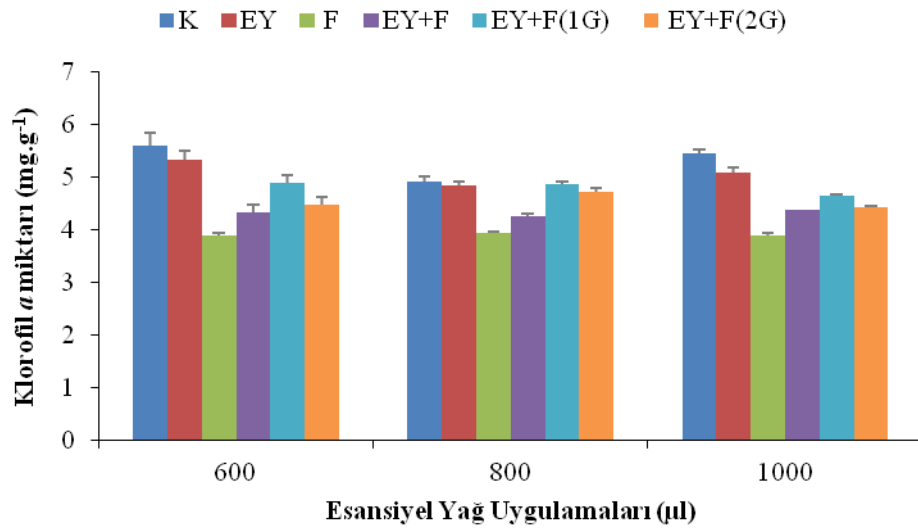
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, klorofil *a* içeriğini kontrolüne göre %4.66 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %30.24 ($P<0.05$) düşürmüştür. Klorofil *a* içeriğini EY+fungus birlikte uygulaması (EY+F) tek başına fungus uygulamasına göre %11.02 artırmıştır. Ayrıca, EY+1 gün sonra fungus uygulaması (EY+F(1G)) ve EY+2 gün sonra fungus uygulaması (EY+F(2G)) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %25.38 ve %14.87 ($P<0.05$) oranında artırmışlardır (Çizelge 4.5).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, klorofil *a* içeriğini kontrolüne göre %1.43 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %19.72 ($P<0.05$) düşürmüştür. Klorofil *a* içeriğini EY+fungus birlikte uygulaması (EY+F) tek başına fungus uygulamasına göre %8.1 artırmıştır. Ayrıca, EY+1 gün sonra fungus uygulaması (EY+F(1G)) ve EY+2 gün sonra fungus uygulaması (EY+F(2G)) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %23.03 ve %19.74 ($P<0.05$) oranında artırmışlardır (Çizelge 4.5).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, klorofil *a* içeriğini kontrolüne göre %6.6 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %28.58 ($P<0.05$) düşürmüştür. Klorofil *a* içeriğini EY+fungus birlikte uygulaması (EY+F) tek başına fungus uygulamasına göre %12.05 artırmıştır. Ayrıca, EY+1 gün sonra fungus uygulaması (EY+F(1G)) ve EY+2 gün sonra fungus uygulaması (EY+F(2G)) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %18.97 ve %13.33 ($P<0.05$) oranında artırmışlardır (Çizelge 4.5).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması klorofil *a* miktarını tüm dozlarda önemli derecede düşürmüştür. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda klorofil *a* miktarını artırırken, EY uygulamaları arasında EY+F(1G) uygulamasının tüm gruplarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının klorofil *a* içeriği üzerine etkileri

4.6.2. Klorofil *b* içeriği sonuçları

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.6. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında klorofil *b* miktarına (mg.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	2.32±0.06 ^b	4.10±0.05 ^e	3.13±0.03 ^d
EY	1.95±0.04 ^a	3.46±0.03 ^c	2.73±0.02 ^b
F	2.98±0.07 ^c	2.70±0.03 ^a	2.54±0.01 ^a
EY+F	3.44±0.09 ^d	3.72±0.03 ^d	3.64±0.02 ^e
EY+F(1G)	3.67±0.12 ^d	3.62±0.03 ^d	3.61±0.02 ^e
EY+F(2G)	3.16±0.07 ^c	3.33±0.02 ^b	2.90±0.02 ^c

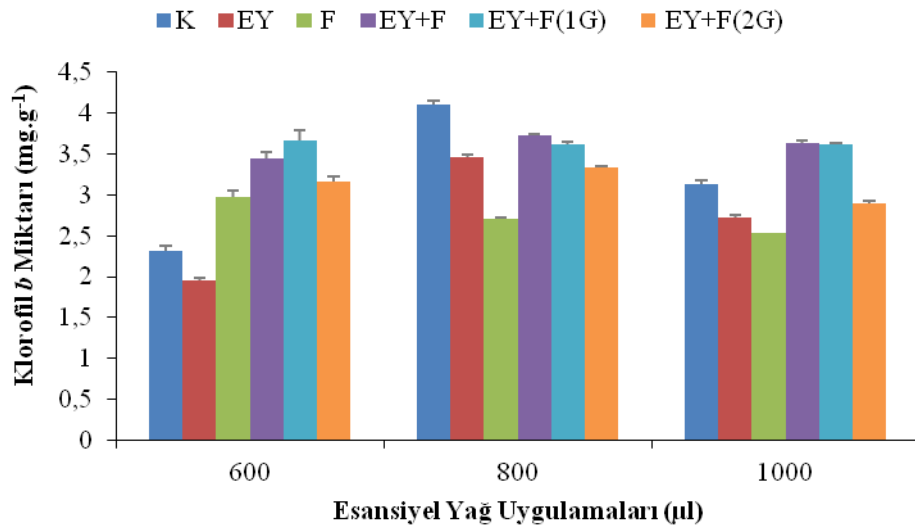
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P < 0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, klorofil *b* içeriğini kontrolüne göre %15.95 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %28.44 ($P < 0.05$) artırmıştır. Klorofil *b* içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %15.43 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %23.15 ($P < 0.05$) ve %6.04 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.6).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, klorofil *b* içeriğini kontrolüne göre %15.61 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %34.15 ($P < 0.05$) düşürmüştür. Klorofil *b* içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %37.77 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %34.07 ve %23.33 ($P < 0.05$) oranında artırmışlardır (Çizelge 4.6).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, klorofil *b* içeriğini kontrolüne göre %12.78 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %18.85 düşürmüştür. Klorofil *b* içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %43.30 ($P<0.05$) artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %42.12 ($P<0.05$) ve %14.17 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.6).

Klorofil *b* miktarını EY uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda artırırken, EY uygulamaları arasında 1000 µl dozun tüm dozlarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının klorofil *b* içeriği üzerine etkileri

4.6.3. Toplam klorofil içeriği sonuçları

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.7. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında toplam klorofil miktarına (mg.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	7.91±0.16 ^c	9.04±0.05 ^e	8.59±0.09 ^e
EY	5.05±0.06 ^a	8.32±0.03 ^c	7.84±0.07 ^c
F	6.88±0.1 ^b	6.66±0.02 ^a	6.45±0.04 ^a
EY+F	7.77± 0.12 ^c	8.00±0.03 ^b	8.01±0.07 ^c
EY+F(1G)	8.56± 0.16 ^d	8.47±0.04 ^d	8.25±0.07 ^d
EY+F(2G)	7.65±0.08 ^c	8.07±0.03 ^b	7.32±0.04 ^b

*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

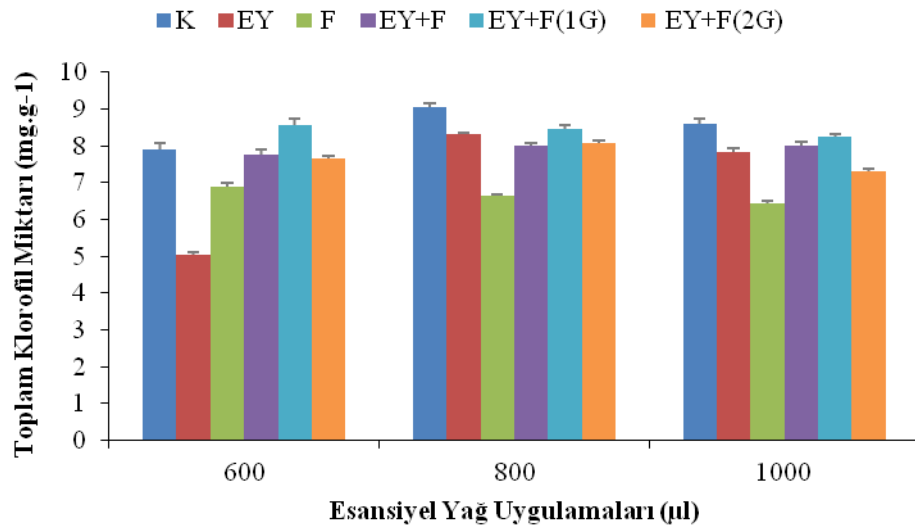
Tek başına 600 µl EY uygulaması, toplam klorofil içeriğini kontrolüne göre %36.16 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %13.03 düşürmüştür. Toplam klorofil içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %12.93 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %24.41($P<0.05$) ve %11.19 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.7).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, toplam klorofil içeriğini kontrolüne göre %7.97 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %26.33 ($P<0.05$) düşürmüştür. Toplam klorofil içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %20.12 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %27.17 ($P<0.05$) ve %21.17 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.7).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, toplam klorofil içeriğini kontrolüne göre %8.74 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %24.92 düşürmüştür. Toplam

klorofil içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %24.18 ($P<0.05$) artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %27.9 ($P<0.05$) ve %13.48 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.7).

Yapraklara fungus uygulaması toplam klorofil miktarını tüm gruplarda düşürmüştür. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda doz oranına paralel olarak toplam klorofil miktarını artırırken, EY uygulamaları arasında 1000 µl dozun ve EY+F(1G) uygulamasının tüm dozlarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının toplam klorofil içeriği üzerine etkileri

4.6.4. Karotenoid içeriği sonuçları

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.8. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında karotenoid miktarına (mg.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	1.09±0.07 ^c	1.26±0.04 ^d	1.85±0.05 ^d
EY	1.08±0.05 ^c	0.96±0.02 ^c	1.44±0.04 ^c
F	0.76±0.04 ^a	0.85±0.02 ^{ab}	1.36±0.03 ^c
EY+F	0.99±0.05 ^{bc}	0.91±0.02 ^c	0.86±0.01 ^a
EY+F(1G)	0.98±0.06 ^{bc}	0.96±0.02 ^c	1.19±0.02 ^b
EY+F(2G)	0.86±0.05 ^b	0.81±0.02 ^a	1.13±0.02 ^b

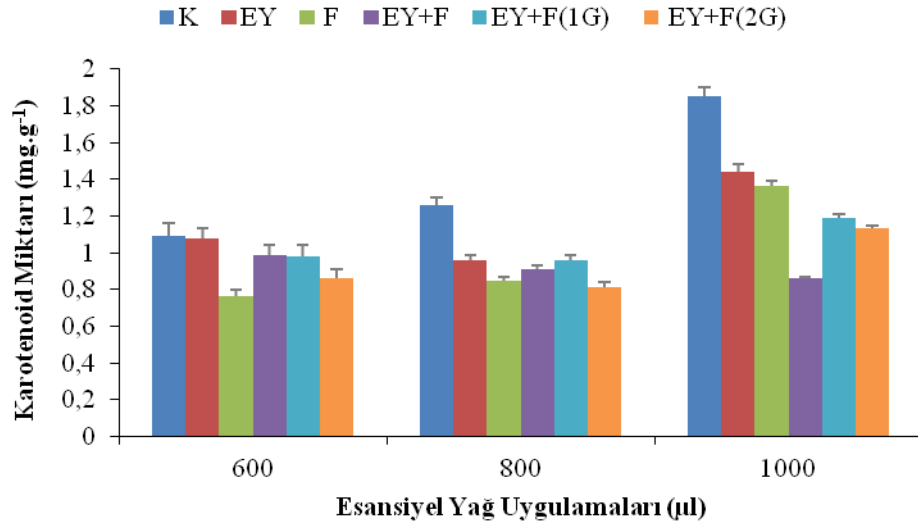
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, karotenoid içeriğini kontrolüne göre %0.92 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %30.28 ($P<0.05$) düşürmüştür. Karotenoid içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %30.26 ($P<0.05$) artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %28.94 ve %13.15 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.8).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, karotenoid içeriğini kontrolüne göre %23.81 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %32.54 ($P<0.05$) düşürmüştür. Karotenoid içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %7.05 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %12.94 artışa ve %4.71 oranında azaltmıştır (Çizelge 4.8).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, karotenoid içeriğini kontrolüne göre %22.17 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması da %26.49 ($P<0.05$) düşürmüştür. Karotenoid içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %36.77 ($P<0.05$) azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %12.5 ve %16.92 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.8).

Yapraklara fungus uygulaması karotenoid miktarını tüm dozlarda düşürmüştür. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda doz oranına paralel olmayan artış ve azalış gözlemlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının karotenoid içeriği üzerine etkileri

4.7. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı Sonuçları

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.9. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında hidrojen peroksit miktarına (ng.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	44.15±0.09 ^a	43.73±0.32 ^b	40.31±1.19 ^a
EY	42.52±0.06 ^a	41.89±0.24 ^a	39.51±1.04 ^a
F	60.21±0.12 ^c	58.56±0.55 ^e	58.11±2.77 ^d
EY+F	58.02±0.07 ^c	55.14±0.37 ^d	53.48±2.44 ^{cd}
EY+F(1G)	52.13±0.04 ^b	49.23±0.27 ^c	44.94±1.4 ^{ab}
EY+F(2G)	54.22±0.07 ^b	50.17±0.28 ^c	49.34±1.36 ^{bc}

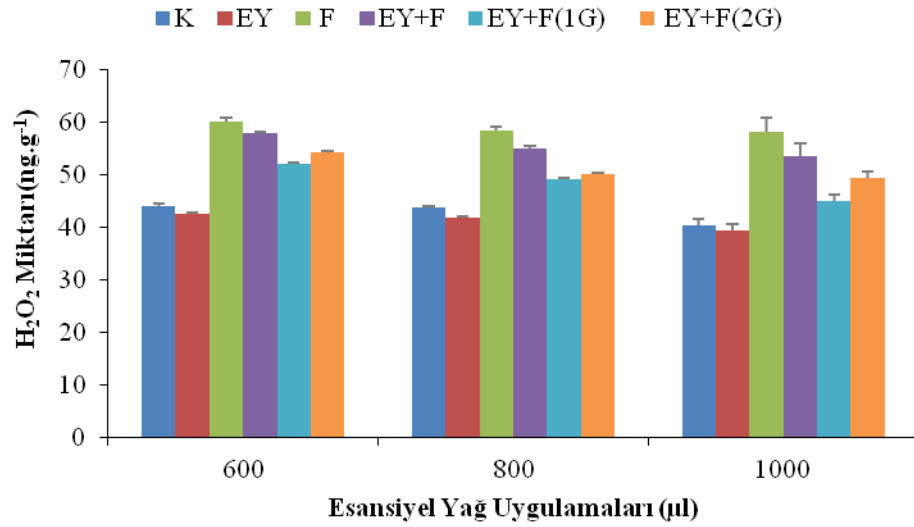
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, hidrojen peroksit içeriğini kontrolüne göre %3.70 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %36.37 ($P<0.05$) artırmıştır. Hidrojen peroksit içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %3.64 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %13.42 ve %9.95 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.9).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, hidrojen peroksit içeriğini kontrolüne göre %4.21 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %33.91 ($P<0.05$) artırmıştır. Hidrojen peroksit içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %5.85 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da fungus uygulamasına göre sırasıyla %15.94 ve %14.33 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.9).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, hidrojen peroksit içeriğini kontrolüne göre %1.99 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %44.15 ($P<0.05$) artırmıştır. Hidrojen peroksit içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %7.97 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %22.67 ($P<0.05$) ve %15.1 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.9).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması hidrojen peroksit miktarını tüm dozlarda artırmıştır. EY uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda doz oranına paralel olarak hidrojen peroksit miktarını azaltırken, EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları arasında 1000 µl dozun ve EY+F(1G) uygulamasının tüm gruplarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının H_2O_2 içeriği üzerine etkileri

4.8. Süperoksit Anyonu ($O_2^{\cdot-}$) Miktarı Sonuçları

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.10. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında süperoksit anyonu miktarına (ng.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	3.85±0.08 ^a	4.12±0.03 ^a	3.96±0.03 ^a
EY	3.81±0.07 ^a	4.06±0.04 ^a	3.78±0.03 ^a
F	5.44±0.09 ^c	5.83±0.06 ^d	5.46±0.13 ^d
EY+F	5.22±0.08 ^{bc}	5.24±0.07 ^c	4.98±0.05 ^c
EY+F(1G)	4.98±0.08 ^b	4.76±0.04 ^b	4.40±0.04 ^b
EY+F(2G)	5.16±0.06 ^b	4.88±0.03 ^b	4.80±0.04 ^c

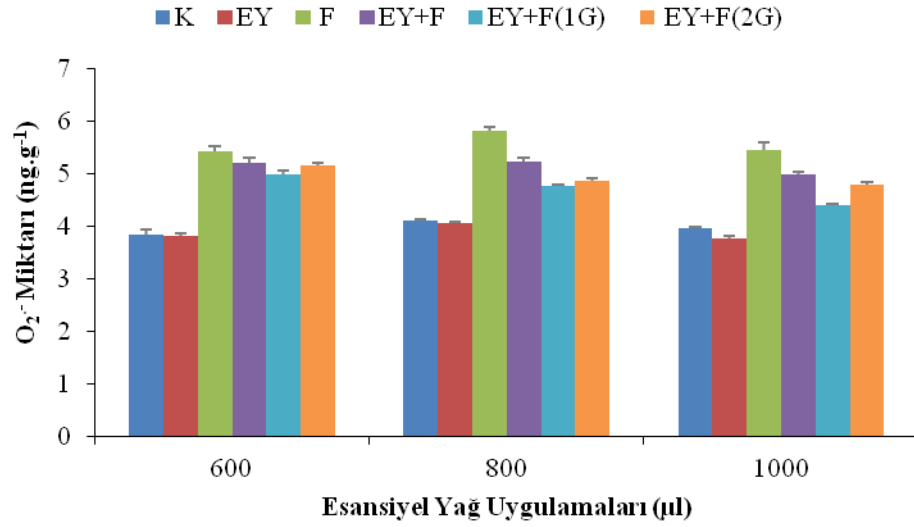
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, süperoksit anyonu içeriğini kontrolüne göre %1.04 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %41.29 ($P<0.05$) artırmıştır. Süperoksit anyonu içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %4.05 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %8.46 ve %5.15 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.10).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, süperoksit anyonu içeriğini kontrolüne göre %1.46 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %41.5 ($P<0.05$) artırmıştır. Süperoksit anyonu içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %10.13 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %18.36 ve %16.3 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.10).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, süperoksit anyonu içeriğini kontrolüne göre %4.55 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %37.87 ($P<0.05$) artırmıştır. Süperoksit anyonu içeriğini EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %8.8 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %19.42 ($P<0.05$) ve %12.09 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.10).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması süperoksit anyonu miktarını tüm dozlarda artırmıştır. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda süperoksit anyonu miktarını azaltırken, EY+F(1G) uygulamasının tüm gruplarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının O_2^- içeriği üzerine etkileri

4.9. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA miktarı) Sonuçları

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.11. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında lipid peroksidasyon seviyesine (nmol.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	1.66±0.02 ^a	1.59±0.03 ^a	1.70±0.01 ^a
EY	1.64±0.02 ^a	1.62±0.03 ^a	1.68±0.01 ^a
F	2.33±0.07 ^d	2.27±0.05 ^d	2.52±0.05 ^d
EY+F	1.95±0.03 ^c	2.05±0.06 ^c	2.33±0.02 ^c
EY+F(1G)	1.79±0.03 ^b	1.85±0.04 ^b	1.75±0.01 ^a
EY+F(2G)	1.92±0.04 ^c	1.91±0.04 ^b	2.04±0.03 ^b

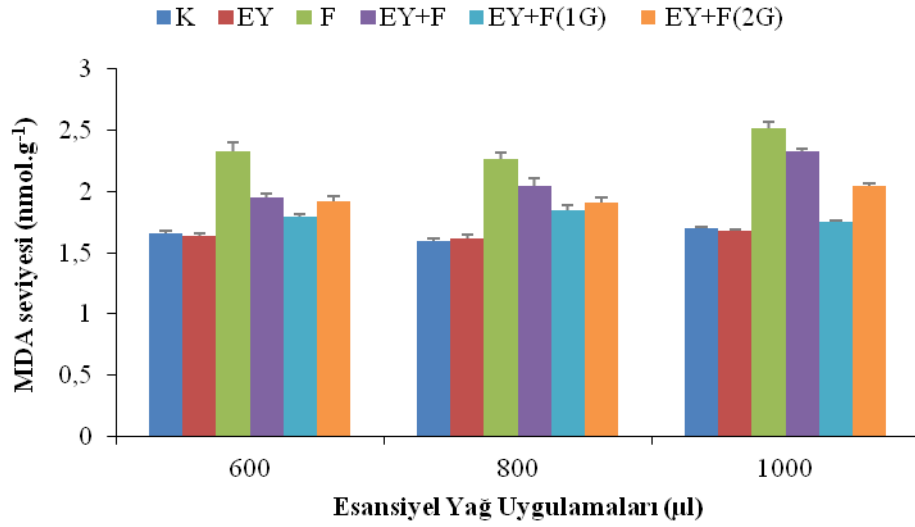
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, lipid peroksidasyon seviyesi kontrolüne göre %1.21 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %40.36 ($P<0.05$) artırmıştır. Lipid peroksidasyon seviyesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %16.31 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %23.18 ve %17.6 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.11).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, lipid peroksidasyon seviyesi kontrolüne göre %1.88 oranında artırmış, tek başına fungus uygulaması da %42.76 ($P<0.05$) artırmıştır. Lipid peroksidasyon seviyesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %9.7 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %18.51 ve %15.86 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.11).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, lipid peroksidasyon seviyesi kontrolüne göre %1.18 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %48.23 ($P<0.05$) artırmıştır. Lipid peroksidasyon seviyesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %7.54 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %30.56 ($P<0.05$) ve %19.05 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.11).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması lipid peroksidasyon seviyesini tüm dozlarda artırmıştır. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda lipid peroksidasyon seviyesini azaltırken, EY+F(1G) uygulamasının tüm gruplarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının MDA seviyesi üzerine etkileri

4.10. Antioksidant Enzim Aktiviteleri Sonuçları

4.10.1. SOD enzim aktivitesi

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.12. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında SOD enzim aktivitesine (EU.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	546.2±10.9 ^{ab}	555.9±2.8 ^a	490.1±4.7 ^{ab}
EY	530.7±5.4 ^a	559.0±2.6 ^a	486.3±3.7 ^a
F	576.4±9.3 ^c	552.3±0.5 ^a	506.1±4.8 ^c
EY+F	565.4±6.0 ^{bc}	559.5±2.7 ^a	502.1±5.9 ^{bc}
EY+F(1G)	564.0± 6.8 ^{bc}	553.2±1.7 ^a	498.1±2.8 ^b
EY+F(2G)	564.1± 5.4 ^{bc}	554.6±1.5 ^a	496.8±2.1 ^b

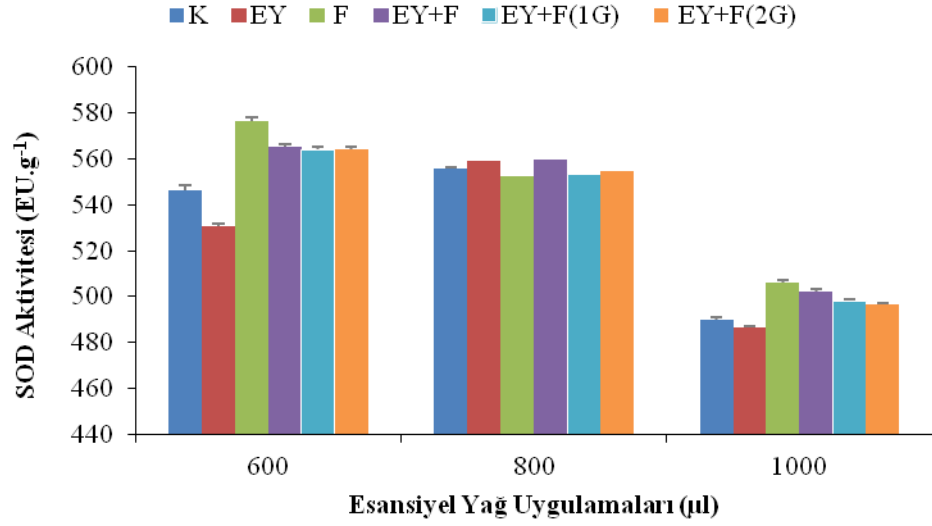
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, SOD enzim aktivitesi kontrolüne göre %2.84 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %5.53 artırmıştır. SOD enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %1.91 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %2.15 ve %2.13 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.12).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, SOD enzim aktivitesi kontrolüne göre %0.56 oranında artırırken, tek başına fungus uygulaması %0.65 düşürmüştür. SOD enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %1.29 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %0.16 ve %0.4 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.12).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, SOD enzim aktivitesi kontrolüne göre %0.77 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %3.27 artırmıştır. SOD enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %0.8 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %1.58 ve %1.84 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.12).

SOD aktivitesi fungus ve EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tüm dozlar arasında değişkenlik göstermiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkileri

4.10.2. POD enzim aktivitesi

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.13. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında POD enzim aktivitesine (EU.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	177.47±0.75 ^a	168.8±2.5 ^a	179.3±1.7 ^a
EY	171.63±1.16 ^b	160.7±1.9 ^a	176.3±0.8 ^a
F	269.14±1.75 ^e	280.9±5.1 ^d	285.8±3.7 ^e
EY+F	258.14±1.19 ^d	264.1±1.8 ^c	249.3± 2.4 ^d
EY+F(1G)	244.87±1.03 ^c	242.1±2.1 ^b	206.7±1.7 ^b
EY+F(2G)	255.42±1.13 ^d	243.4±1.8 ^b	237.1±1.9 ^c

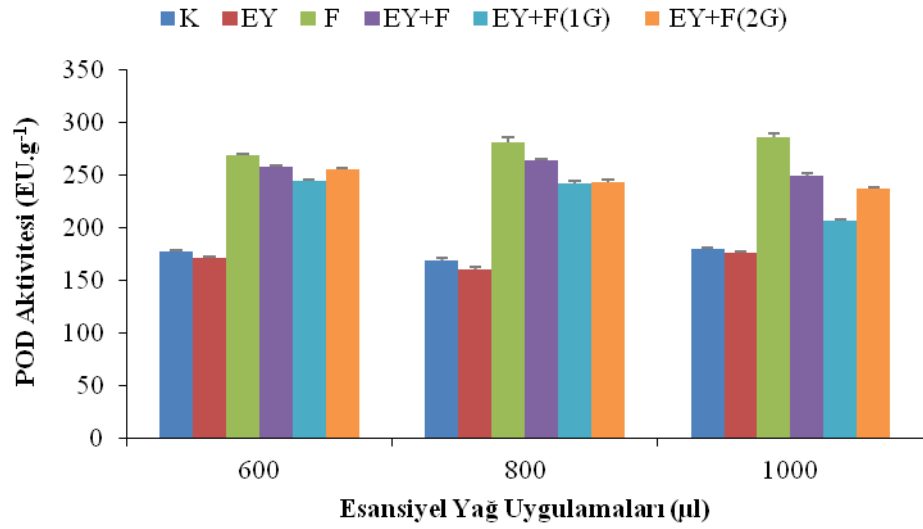
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, POD enzim aktivitesi kontrolüne göre %3.3 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %51.65 ($P<0.05$) artırmıştır. POD enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %4.1 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %9.02 ve %5.1 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.13).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, POD enzim aktivitesi kontrolüne göre %4.79 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %66.38 ($P<0.05$) artırmıştır. POD enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %6 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %13.81 ve %13.36 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.13).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, POD enzim aktivitesi kontrolüne göre %1.7 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %59.32 ($P<0.05$) artırmıştır. POD enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %12.77 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %27.67 ($P<0.05$) ve %17.13 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.13).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması POD aktivitesini tüm dozlarda artırmıştır. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda doz oranına paralel olarak POD aktivitesini azaltırken, EY uygulamaları arasında 1000 µl dozun ve EY+F(1G) uygulamasının tüm gruplarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının POD aktivitesi üzerine etkileri

4.10.3. CAT enzim aktivitesi

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.14. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında CAT enzim aktivitesine (EU.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	33.65±0.14 ^b	33.45±0.21 ^a	31.04±0.78 ^a
EY	32.98±0.21 ^a	32.94±0.25 ^a	31.55±0.62 ^{ab}
F	40.12±0.31 ^d	38.44±0.48 ^c	34.09±1.12 ^c
EY+F	38.18±0.25 ^c	35.36±0.34 ^b	33.58±0.65 ^{bc}
EY+F(1G)	38.12± 0.18 ^c	35.18±0.27 ^b	31.75±0.36 ^{ab}
EY+F(2G)	38.04±0.14 ^c	35.20±0.33 ^b	32.57±0.59 ^{bc}

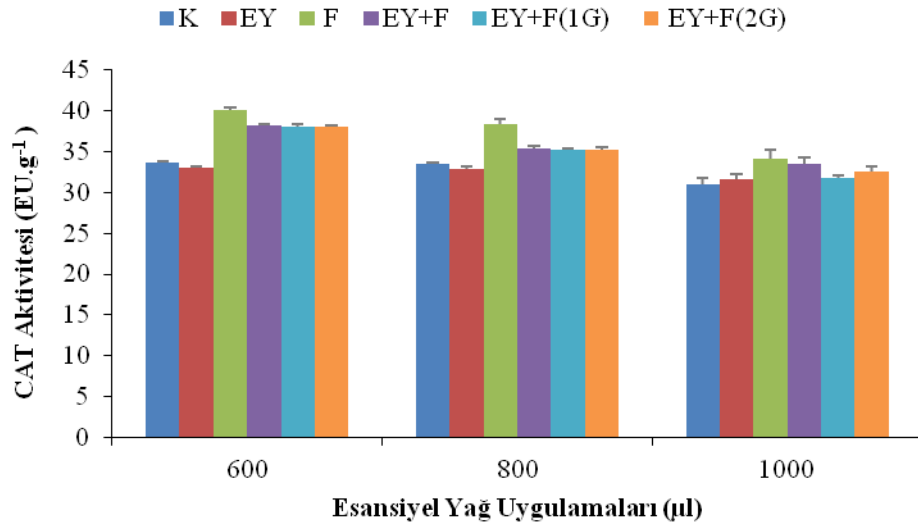
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, CAT enzim aktivitesi kontrolüne göre %2 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %19.22 ($P<0.05$) artırmıştır. CAT enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %4.84 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %4.99 ve %5.19 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.14).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, CAT enzim aktivitesi kontrolüne göre %1.53 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %14.91($P<0.05$) artırmıştır. CAT enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %8.02 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %8.49 ve %8.43 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.14).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, CAT enzim aktivitesi kontrolüne göre %1.64 oranında artırmış, tek başına fungus uygulaması da %9.82 ($P<0.05$) artırmıştır. CAT enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %1.5 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %6.87 ve %4.46 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.14).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması CAT aktivitesini tüm dozlarda artırmıştır. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda CAT aktivitesini azaltmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkileri

4.10.4. APX enzim aktivitesi

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.15. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında APX enzim aktivitesine (EU.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	65.63±1.86 ^a	64.17±0.44 ^a	58.13±0.7 ^a
EY	64.65±4.85 ^a	64.24±0.33 ^a	55.46±0.6 ^a
F	77.67±5.93 ^a	80.63± 0.8 ^d	75.45±1.7 ^d
EY+F	71.12±3.16 ^a	76.02±0.48 ^c	70.13±1.0 ^c
EY+F(1G)	76.87±5.41 ^a	70.56±0.64 ^b	66.41±0.6 ^b
EY+F(2G)	71.19 + 3.77 ^a	75.88±0.54 ^c	70.14±1.0 ^c

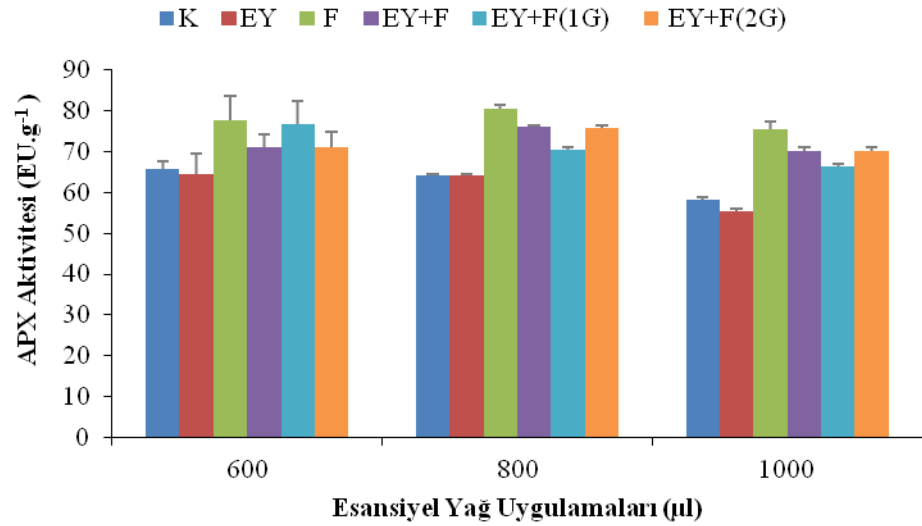
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, APX enzim aktivitesi kontrolüne göre %1.5 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %18.34 ($P<0.05$) artırmıştır. APX enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %8.44 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %1.03 ve %8.35 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.15).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, APX enzim aktivitesi kontrolüne göre %3.01 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %25.65 ($P<0.05$) artırmıştır. APX enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %5.72 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %12.49 ve %5.9 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.15).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, APX enzim aktivitesi kontrolüne göre %4.6 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %29.79 ($P<0.05$) artırmıştır. APX enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %7.04 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %11.99 ve %7.04 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.15).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması APX aktivitesini tüm gruplarda artırmıştır. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda APX aktivitesini azaltmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkileri

4.10.5. GR enzim aktivitesi

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.16. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında GR enzim aktivitesine (EU.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	362.74±3.29 ^a	385.17±8.55 ^a	377.04±6.72 ^a
EY	360.25±3.72 ^a	381.42±5.55 ^a	401.36±9.38 ^a
F	463.12±9.77 ^c	498.84±11.36 ^c	571.64±12.11 ^d
EY+F	452.14±7.41 ^{bc}	460.84±7.97 ^b	565.56±11.53 ^d
EY+F(1G)	436.89±7.35 ^b	442.13±8.32 ^b	510.83±8.45 ^c
EY+F(2G)	441.32±5.98 ^b	444.62±8.15 ^b	443.93±6.08 ^b

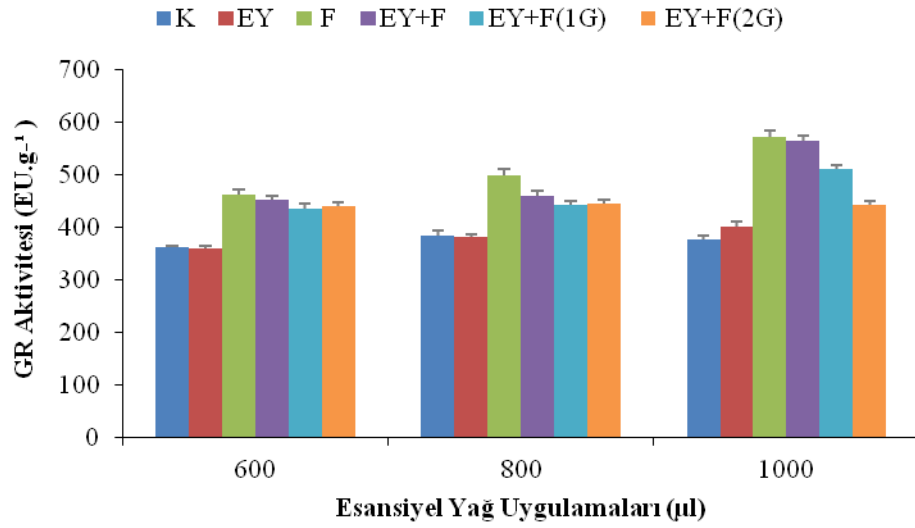
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, GR enzim aktivitesi kontrolüne göre %0.69 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %27.67 ($P<0.05$) artırmıştır. GR enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %2.38 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %5.67 ve %4.71 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.16).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, GR enzim aktivitesi kontrolüne göre %0.98 oranında düşürürken, tek başına fungus uygulaması %29.51($P<0.05$) artırmıştır. GR enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %7.62 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %11.37 ve %10.87 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.16).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, GR enzim aktivitesi kontrolüne göre %6.45 oranında artırmış, tek başına fungus uygulaması da %51.61 ($P<0.05$) artırmıştır. GR enzim aktivitesi EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %1.07 azaltmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %10.64 ve %22.35 oranında azaltmışlardır (Çizelge 4.16).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması GR aktivitesini tüm dozlarda artırmıştır. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda GR aktivitesini azaltmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkileri

4.11. Çözülebilir protein miktarı sonuçları

Aşağıda sırasıyla 600 µl, 800 µl ve 1000 µl EY uygulamalarından elde edilen bulgular ayrı ayrı sunulmuş ve sonunda genel bir değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.17. 600, 800, 1000 µl EY ve fungus uygulamasının asma yapraklarında çözülebilir protein miktarına (µg.g⁻¹ doku) ait bulguları

Gruplar	600	800	1000
K	5445.2±73.9 ^c	5145.5±167.6 ^b	5573.1±214.2 ^c
EY	5456.1±112.6 ^c	5170.4±190.6 ^b	5525.6±161.4 ^c
F	4014.2±87.4 ^a	4006.7±136.0 ^a	4221.3±70.1 ^a
EY+F	4091.5±128.6 ^{ab}	4118.4±126.8 ^a	4582.2±89.3 ^{ab}
EY+F(1G)	4189.7± 52.6 ^b	4395.3±165.4 ^a	4861.6±123.3 ^b
EY+F(2G)	4170.4±67.0 ^b	4214.1±237.0 ^a	4671.9±84.5 ^b

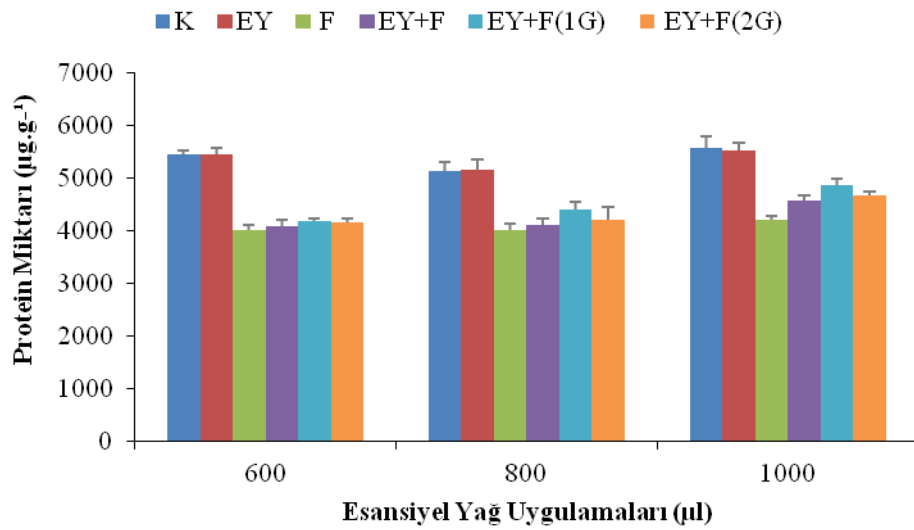
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. K: Kontrol, EY: Esansiyel yağ, F: Fungus, ±: Standart hata

Tek başına 600 µl EY uygulaması, çözülebilir protein miktarı kontrolüne göre %0.2 oranında artırmışken, tek başına fungus uygulaması da %26.28 ($P<0.05$) azaltmıştır. Çözülebilir protein miktarı EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %1.92 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %4.37 ve %3.89 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.17).

Tek başına 800 µl EY uygulaması, çözülebilir protein miktarı kontrolüne göre %0.48 oranında artırmışken, tek başına fungus uygulaması %22.24 ($P<0.05$) azaltmıştır. Çözülebilir protein miktarı EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %2.78 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %9.69 ve %5.17 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.17).

Tek başına 1000 µl EY uygulaması, çözülebilir protein miktarı kontrolüne göre %0.86 oranında azalmış, tek başına fungus uygulaması ise %24.26 ($P<0.05$) azaltmıştır. Çözülebilir protein miktarı EY+F uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre %8.54 artırmıştır. Ayrıca, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %15.16 ($P<0.05$) ve %10.67 oranında artırmışlardır (Çizelge 4.17).

Yapraklara tek başına fungus uygulaması protein miktarını tüm gruplarda azaltmıştır. EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda doz oranına paralel olarak protein miktarı artırırken, EY uygulamaları arasında 1000 µl dozun ve EY+F(1G) uygulamasının tüm dozlarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Asma yapraklarında EY ve fungus uygulamalarının protein miktarı üzerine etkileri

4.12. Su Özütünün *İn Vitro* Koşullarda Bitki Patojeni Fungusa Karşı Antifungal Etkileri

İn vitro koşullarda 3 farklı konsantrasyondaki (2 ml, 5 ml, 10 ml) su özütü ekstraktlarının fungusun miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine etkilerinin farklı seviyelerde olduğu belirlenmiştir.

Su özütü ekstraktlarının fungusun miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine antifungal etkileri ayrı ayrı çizelgeler halinde verilerek yorumlanmıştır.

4.13. Su Özütünün *B. cinerea*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi

Su özütünün *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi üzerine etkileri Şekil 4.26'da verilmiştir. Şekil 4.26 incelendiğinde ekstraktın düzenli oranlarda engelleme oluşturmadığı belirlenmiştir. *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi üzerindeki antifungal etkinin doz oranına paralel olarak artmadığı belirlenmiştir. Bu patojen için en yüksek antifungal etkiyi %23.52 oranıyla 10 ml'lik doz sağlamıştır (Şekil 4.27). Sonuç olarak ekstraktın 2 ml, 5 ml ve 10 ml'lik dozlarında *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi engellemesi doz oranına paralel olarak artmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.18).

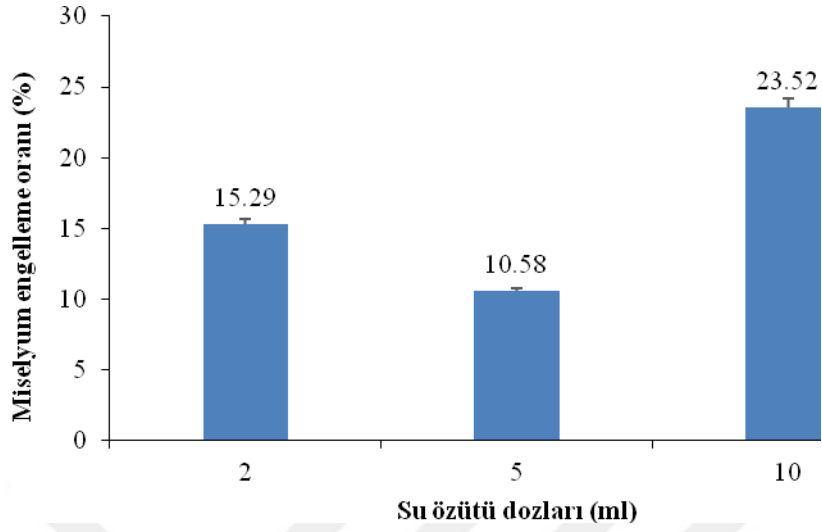


Şekil 4.26. *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi üzerine farklı konsantrasyondaki su özütünün etkisi

Çizelge 4.18. Su özütünün miselyum engelleme oranına etkisi

Su özütü dozları (ml)	MEO (%)
2	15.29±0.16 ^b
5	10.58±0.07 ^a
10	23.52±0.31 ^c

*Aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P < 0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. ±: Standart hata



Şekil 4.27. Su özütü miselyum engelleme oranı

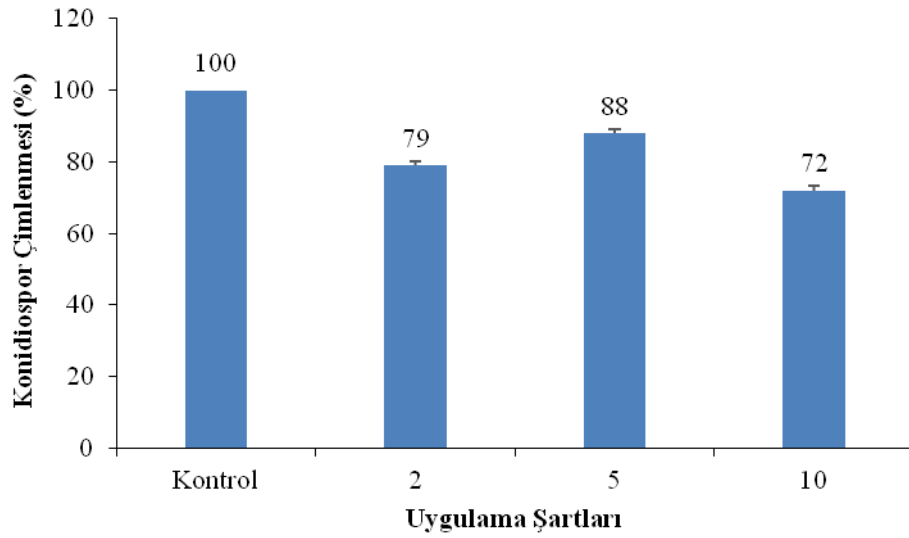
4.14. Su Özütünün *B. cinerea*'nın Spor Çimlenmesi ve Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Antifungal Etkileri

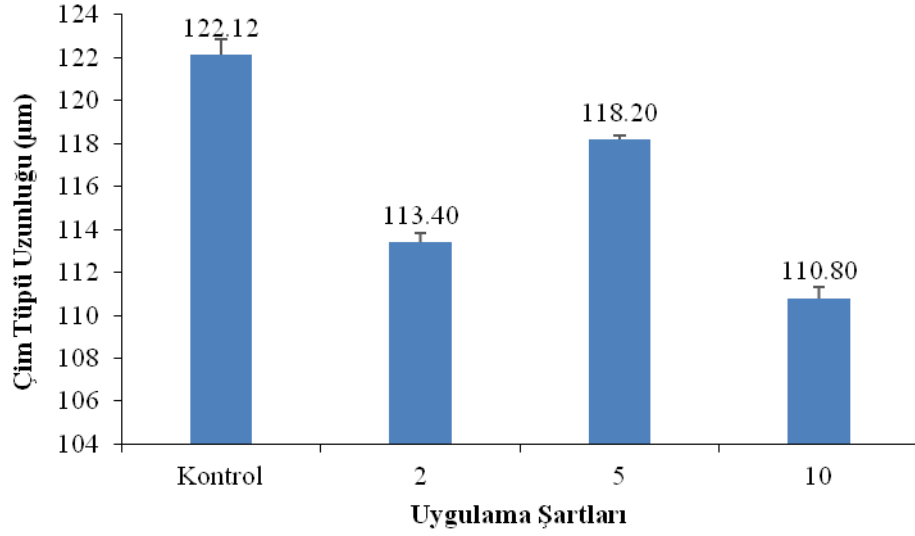
B. cinerea'nın konidisor çimlenme yüzdesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine ekstraktın antifungal etkilerine ait bulgular Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da verilmiştir. Konidisorlar kontrol grubunda %100 çimlenirken, 2 ml de sporların %79'u, 5 ml de %88'i, 10 ml de ise %72'sinin çimlendiğini belirlenmiştir. Çim tüpü uzunluğuna bakıldığında kontrol grubunda 122.12 μm iken 2 ml de 113.4 μm , 5 ml de 118.2 μm ve 10 ml de ise 110.8 μm olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğuna doz oranının paralel olarak etki etmediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19 Su özütü dozlarının konidiospor çim tüpü uzunluğuna etkisi

	Su özütü dozları (ml)			
	KONTROL	2	5	10
Konidiospor Çimlenmesi (%)	100±0.0 ^d	79±1.09 ^c	88±1.09 ^b	72±1.3 ^a
Çim tüpü uzunluğu (µm)	122.12±1.53 ^c	113.4±0.89 ^a	118.2±0.35 ^b	110.8±0.98 ^a

*Aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. ±: Standart hata

**Şekil 4.28.** Su özütü spor çimlenme yüzdesi



Şekil 4.29. Su özütü çim tüpü uzunluğu

4.15. Su Özütünün Yaprak Testleri İle Etkililiğinin Tespiti

Yapraklar üzerindeki lezyon çapları ölçülerek yapılan değerlendirme sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.31’de verilmiştir. Yaprak miselyum gelişimi 10 ml de 39.1 mm, 5 ml de 32.6 mm, 2 ml de 31.3 mm ve kontrolde 28 mm olarak ölçülmüştür. Bu sonuca göre petri uygulamasında etkili olan konsantrasyon yaprak uygulamasında etkili olmamıştır. Su özütünün yüksek dozda uygulanması yaprakta çürümeye sebep olmuştur. Bu değerlendirme sonuçlarına göre, su özütünün orantılı bir şekilde etkili olmadığı yaprak uygulamaları ile de tespit edilmiştir (Şekil 4.30).

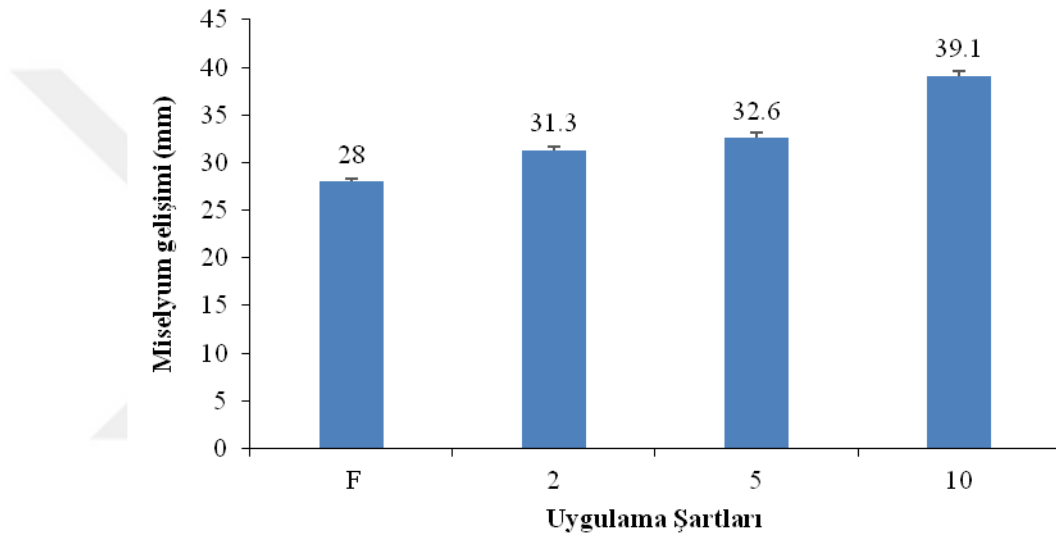


Şekil 4.30. Patojen ve su özütü uygulamalı yapraklar

Çizelge 4.20. Su özütünün yapraklarda miselyum gelişimine etkisi

Su özütü dozları (ml)				
	0.0	2	5	10
Y	28.0±0.27 ^a	31.3±0.38 ^b	32.6±0.57 ^b	39.1±0.54 ^c

*Aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. ±: Standart hata

**Şekil 4.31.** Su özütü yaprak miselyum gelişim oranı

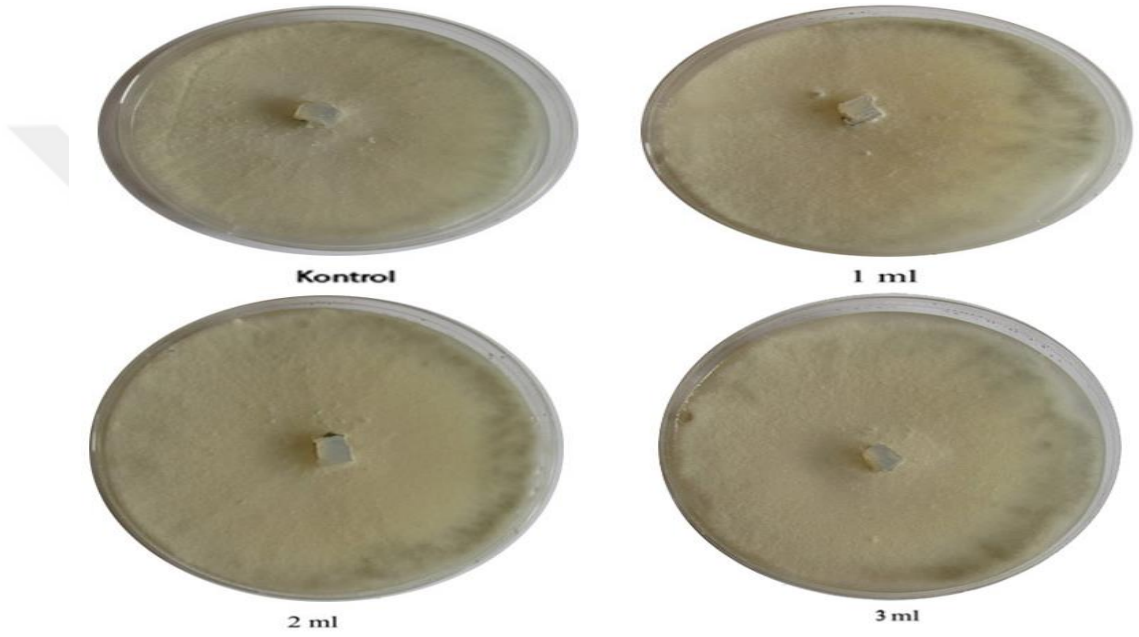
4.16. Metanolik Özütün *İn Vitro* Koşullarda Bitki Patojeni Fungusa Karşı Antifungal Etkileri

İn vitro koşullarda 3 farklı konsantrasyondaki (1 ml, 2 ml, 3 ml) metanolik özüt ekstraktlarının fungusun miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine etkilerinin farklı seviyelerde olduğu belirlenmiştir.

Metanolik özütü ekstraktlarının fungusun miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine antifungal etkileri ayrı ayrı çizelgeler halinde verilerek yorumlanmıştır.

4.17. Metanolik Özütün *B. cinerea*'nın Miseliyal Gelişimi Üzerine Etkisi

Metanolik özütün *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi üzerine etkileri Şekil 4.32'de verilmiştir. Şekil 4.32 incelendiğinde 1 ml, 2 ml, 3 ml ekstraktların engelleme oluşturmadağı belirlenmiştir. Herhangi bir engelleme tespit edilemediği için petri miselyum engelleme oranı grafiksel olarak verilmemiştir.



Şekil 4.32. *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi üzerine farklı konsantrasyondaki metanol özütünün etkisi

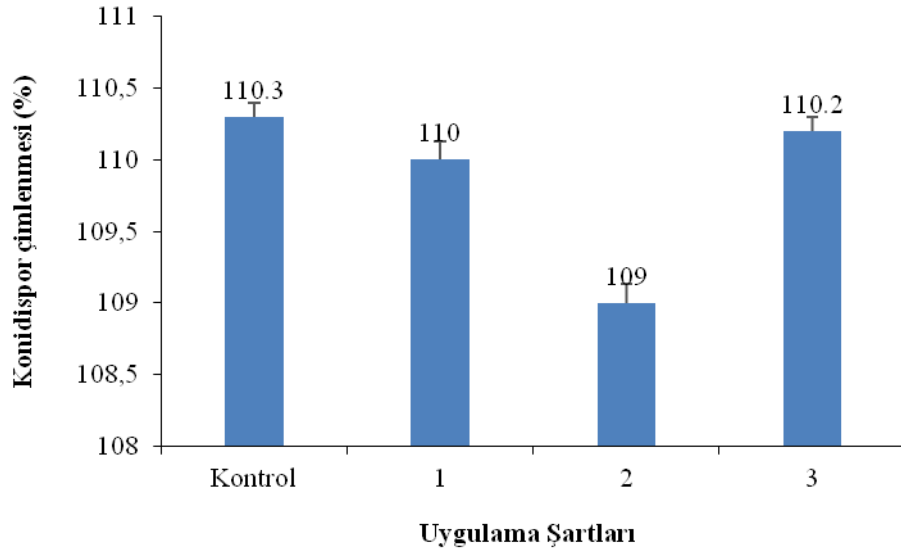
4.18. Metanolik Özütün *B.cinerea*'nın Spor Çimlenmesi ve Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Antifungal Etkileri

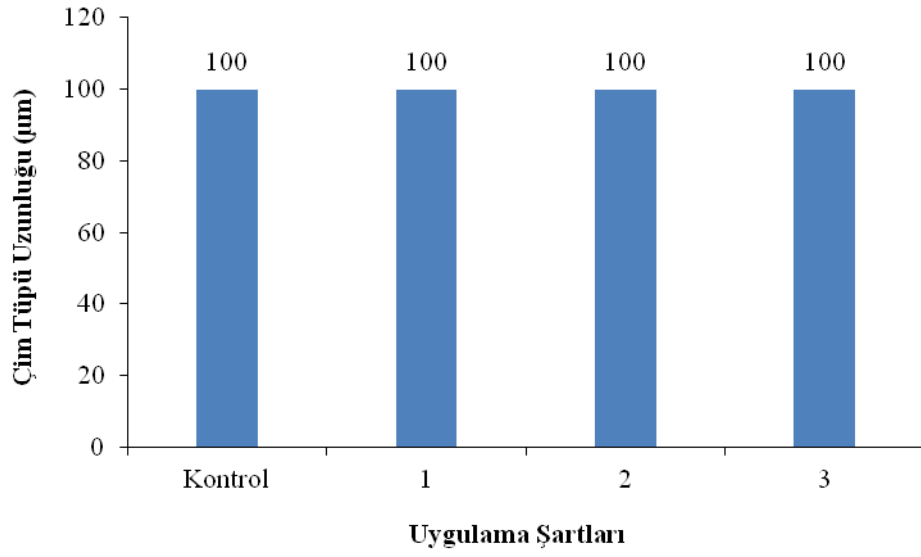
B. cinerea'nın spor çimlenme yüzdesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine ekstraktın antifungal etkilerini belirlemek üzerine yapılan denemelerin sonuçları Şekil 4.33 ve Şekil 4.34'de verilmiştir. Spor çimlenmesinde kontrol ve deney grupları %100 çimlenmiştir. Çim tüpü uzunluğunda ise kontrol grubunda 110.3 μm iken 1 ml de 110.0 μm , 2 ml de 109.0 μm ve 3 ml de ise 110.2 μm olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğuna kontrol grubuna göre deney gruplarında herhangi bir fark tespit edilememiştir.

Çizelge 4.21. Metanol özütü dozlarının konidiospor çim tüpü uzunluğuna etkisi

Metanol özütü dozları (ml)				
	KONTROL	1	2	3
Konidiospor Çimlenmesi (%)	100±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
Çim tüpü uzunluğu (µm)	110.3±0.99	110.0±1.3	109.0±1.31	110.8±1.02

*Aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma testine göre $P<0.05$ önem seviyesinde anlamsızdır. ±: Standart hata

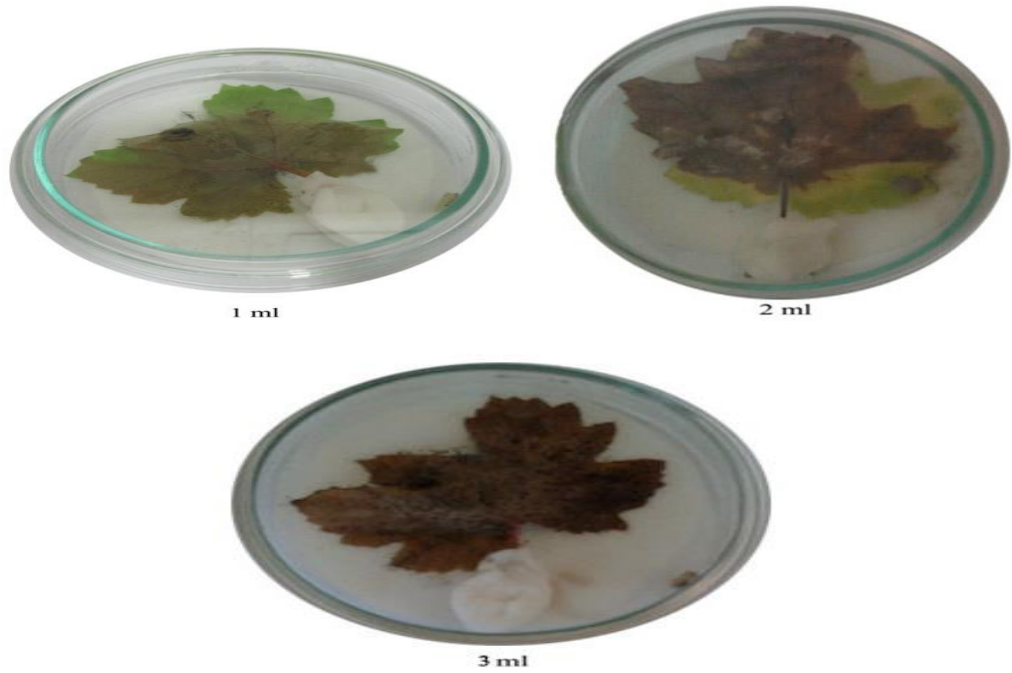
**Şekil 4.33.** Metanol özütü spor çimlenme yüzdesi



Şekil 4.34. Metanol özütü çim tüpü uzunluğu

4.19. Metanolik Özütün Yaprak Testleri İle Etkililiğinin Tespiti

Metanolik özüt (1 ml, 2 ml, 3 ml) ekstraktları yapraklara uygulandığında yaprakların çürümeye neden olmuştur (Şekil 4.35). Bundan dolayı yapraklar üzerindeki lezyon çapları ölçülmemiştir.



Şekil 4.35. Patojen ve metanol özüt uygulamalı yapraklar

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tarımsal üretimde üzüm yetiştiriciliği Türkiye’de önemli bir yere sahip olmakla birlikte önemli sorunları da barındırmaktadır. Bunların başında, yüksek verim ve kaliteli ürün elde edilmesinde en büyük engeli oluşturan hastalıklar gelmektedir. Bağ hastalıkları arasında en önemli yeri fungal kaynaklı hastalıklar işgal eder (Göktaş 2008). Kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), Ülkemiz bağlarında ekonomik zarara yol açan en önemli fungal hastalıklar arasındadır (Erkan vd 2002).

Bu fungusun neden olduğu hastalık, hem bağlarda hem de depoda üzüm verimi ve kalitesinde büyük kayıplara neden olmaktadır. Bu kayıplar bağda yetiştirme periyodu esnasında olabildiği gibi ürünlerin depolama sürecinde de oluşabilmektedir. Günümüzde bu fungusa karşı sentetik fungusitlerle yapılan mücadeleler yeterli olmamakla birlikte ekolojik ve sağlık sorunlarına da neden olmaktadır. Bu amaçla çok fazla miktarda sentetik fungusitler her yıl bağlarda ve üzüm depolarında bilinçli-bilinçsiz kullanılmaktadır (Aminifard and Mohammadi 2013). Diğer taraftan bağlarda bu mantari hastalığa karşı allelopatik yaklaşımlarla mücadele etme henüz değerlendirilmemiştir. Bazı allelopatik yaklaşımlı çalışmalarda birçok bitki patojeni fungusları üzerinde önemli sonuçlar alınmıştır (Bouchra *et al.* 2003; Koçak 2004; Lee *et al.* 2007). Örneğin, Ceviz (*Juglans regia* L.) yapraklarından hazırlanan özütlerin ve juglon (5-Hidroksi-Naftakinon) allelokimyasalının bazı bakteri ve funguslar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ceviz özütleri ve juglon’un, kullanılan 11 bakteri türünden 5 bakteri türünde (*Pseudomonas gingeri*, *Pseudomonas phaseolica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*) inhibisyon etkisi gözlemlenmiştir. Kullanılan 9 fungus türü (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *Geotrichum candidum*, *B. cinerea* ve *Candida albicans*) üzerinde de inhibisyon etkisi görülmüştür (Albayrak 2006). Başka bir çalışmada ise *Nepeta rtanjensis* bitkisinin esansiyel yağını funguslarda konidiumların çimlenmesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. *Cladosporium cladosporioides*’in konidiumlarının *N. rtanjensis*’in esansiyel yağına çok duyarlı olduğu ve en küçük dozlarda bile konidiumlarının çimlenmesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Grbić *et al.*

2011). Kurşuni Küf üzerinde etkili olabilecek ve hastalığın yayılmasını kontrol edebilecek allelokimyasalların belirlenmesi, bağlarda büyük bir kazanım sağlayabilir. Bazı *Nepeta* türlerinin antioksidan özelliklere (Dapkevicius *et al.* 1998), aynı zamanda fungus (Cigremis vd 2010), bakteri (Rigano *et al.* 2011), virüs ve kene türleri üzerinde önemli etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Bourrel *et al.* 1993; Nostro *et al.* 2001; Çalmaşur vd 2006; Dinler vd 2010 Rigano *et al.* 2011). Yapılan pek çok gözlemlerde *N. meyeri*'nin doğal çevrede diğer yabancı türlerin gelişmesine izin vermediği belirlenmiştir (Mutlu ve Atıcı 2009). Literatürlerde *N. meyeri*'nin allelopatik etkisiyle ilgili çalışmalar yer almakta fakat bitkilerde hastalık yapan fungus patojenleri üzerine antifungal etkileri hakkında pek fazla çalışma bulunmamaktadır (Sefidkon and Shaabani 2004; Esmaeili *et al.* 2006; Mutlu ve Atıcı 2009; 2010a). Yapılan mevcut çalışmalarda *N. meyeri*'nin sahip olduğu allelopatik potansiyeli ile kültür bitkilerinde sorun olan yabancı otlara karşı güçlü herbisidal etki gösterdiği belirlenmiştir (Mutlu ve Atıcı 2009; 2010a; 2010b). Bu çerçevede *N. meyeri* bitkisinin salgıladığı sekonder metabolit olan bu kimyasal bileşiklerin (allelokimyasalların) doğal fungusit olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırılması büyük önem arz etmektedir. Bu amaç için allelopatik özelliğe sahip olan *Nepeta meyeri* bitkisinden belirli ekstraksiyon teknikleri ile esansiyel yağ, su ve metanolik özütler elde edilmiştir. Çalışmada bu allelokimyasal özütler Karaerik üzümde (*Vitis vinifera* L.) güçlü bir hastalık etmeni olan Kurşuni Küf (*Botrytis cinerea*) mantarın kontrolünde ve mücadelesinde kullanılmıştır. Araştırmamızda *N. meyeri* özütlerinin mantar üzerinde *in vitro* ve *in vivo* etkilerini belirlemenin yanında, hastalık esnasında asma yapraklarının fizyolojik ve biyokimyasal cevapları da değerlendirilmiştir. Kullanılan allelokimyasal potansiyele sahip özütlerin *B. cinerea*'nın hif gelişimi, çim tüpü uzunluğu ve spor çimlenmesi üzerine olan etkileri belirlenmiştir. *N. meyeri*'den elde edilen özütlerden su ve metanolik özütler, *B. cinerea*'nın gelişimi üzerinde *in vitro* ve *in vivo* şartlarda herhangi bir etkiye neden olmamıştır. Bu nedenle asma yapraklarının biyokimyasal cevap mekanizmalarının belirlenmesinde sadece *N. meyeri*'nin esansiyel yağ (EY) özütü kullanılmış ve tez içinde bu deneylerden elde edilen veriler sunulmuştur. Çalışmada, hem *B. cinerea* hem de EY özütü muamele edilmiş asma yapraklarında stres toleransının derecesini belirlemede, lipid peroksidasyon (MDA miktarı) seviyesi, reaktif oksijen türlerinin (hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu) ve pigmentlerin (klorofil ve karotenoid) miktarları belirlenmiştir.

Bunlara ilave olarak, hücrelerdeki enzimatik antioksidan cevap mekanizmalarını takip etmek için antioksidan enzimlerin (SOD, POD, APX, GR ve CAT) aktiviteleri de değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen verilerin yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırılmalı değerlendirmeleri aşağıda sunulmuştur.

5.1. *N. meyeri* Esansiyel Yağın Miseliyal Gelişim ve Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Çalışmamızda öncelikle *Nepeta meyeri* Benth. bitkisinin esansiyel yağı (EY) elde edilmiştir. Bu yağ GC-MS yöntemiyle analiz edildiğinde, 4 α ,7 α ,7 α -nepetalacton (%71.68), 4 α , 7 β , 7 α -nepetalacton (%71.34) ve 4 α , 7 α , 7 β -nepetalacton (%70.17) ana bileşenler tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). *N. meyeri* bitkisinde nepetalacton bileşiklerinin yüksek oranda bulunduğu birçok araştırmacı tarafından da rapor edilmiştir (Sefidkon and Shaabani 2004; Esmaeili *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2011; Kordali *et al.* 2013). Bazı araştırmacılar bitkinin allelopatik olmasının en önemli nedenleri arasında uçucu yağlardan olan bu laktonların sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir (Mothana 2012). Biz de bu görüşe katılmaktayız. Çünkü elde edilen EY karışımına dikkat edilirse, nepetalaktonlar karışımın neredeyse %70'ni oluşturduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Çalışmamızda EY, asma yaprağı ve patojen mantara çok düşük konsantrasyonlarda (literatürdeki benzer çalışmalara göre) uygulanmış olmasına rağmen, yüksek etkiler görülmüştür. Çok düşük konsantrasyonda etki eden bir karışım içinde etkili olan bileşik, oransal olarak diğer bileşiklere göre genelde daha yüksek olmalıdır. *N. meyeri* EY karışımında da en fazla nepatalaktonlar bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda elde edilen bitkilerin allelopatik etkilerinden EY içinde en fazla bulunan nepetalactonların sorumlu olduğunu düşünmekteyiz. Ancak yine de bu etkilerden nepetalactonların sorumlu olup olmadığının tam olarak belirlenmesi için bu bileşiğin saf olarak elde edilmesi ve kullanılması gerekmektedir. Ancak bazı çalışmalarda allelopatik etkinin, esansiyel yağlar içerisinde bulunan tek bir bileşiğin değil, birkaç bileşiğin ortak bir etkisiyle olduğu da gösterilmiştir (Sefidkon and Shaabani 2004; Kordali *et al.* 2013). *N. meyeri* bitkisinin EY, su ve metanol özütleri, *B. cinerea*'nın miseliyal, çim tüpü uzunluğu, spor çimlenmesi üzerine etkileri kendi aralarında karşılaştırıldığında, EY'nin

hastalık üzerinde daha etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.26 ve Şekil 4.32). Yöntemler bölümünden de hatırlanacağı gibi asma yapraklarına EY üç farklı şekilde uygulanmıştır. Bunlar, EY ile fungus aynı anda (EY+F), enfeksiyonundan 1 gün önce (EY+F1G) ve enfeksiyondan 2 gün önce (EY+F2G). Bu uygulamalar içerisinde hemen hemen tüm parametrelerde etkili uygulamanın, EY+F1G olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda EY'nin 3 farklı (600, 800 ve 1000 µl) konsantrasyonu kullanılmıştır. EY'nin bu 3 konsantrasyonu, *B. cinerea*'nin miseliyal gelişim inhibisyonu üzerinde güçlü bir etki yapmıştır (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Bu antifungal etki EY dozlarının artışına paralel olarak artmıştır. En yüksek engelleme oranı %80.72 oranıyla 1000 µl'lik dozda belirlenmiştir (Çizelge 4.2). EY'nin 600 ve 800 µl dozlarında inhibisyon oranı ise kontrole göre, sırasıyla %25.3 ve %49.39 olmuştur (Çizelge 4.2). Çalışmamızda ayrıca EY'nin 1200 µl'lik dozunda %100 inhibisyon belirlenmiştir (çalışmada sunulmamıştır). Görüldüğü gibi *N. meyeri* EY yağları *B. cinerea*'nin miseliyal gelişimi üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi yapmıştır. Burada çalışılan EY'nin etkili olduğu konsantrasyonların, literatürde farklı bitkilerden elde edilen EY'lerin etkili oldukları konsantrasyonlara göre çok düşük olması, *N. meyeri*'den elde edilen EY'nin *B. cinera* üzerinde güçlü bir inhibisyona sahip olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan EY'nin *B. cinera* spor çimlenmesi üzerinde de önemli bir inhibisyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.7). Spor çimlenmesi çalışmalarında, kontrol grubuna ait sporlar %100 çimlenirken, 600 µl dozda sporların %66'sı, 800 µl de %55'i, 1000 µl de ise %18'i çimlenmiştir (Şekil 4.7). 1200 µl'lik dozda ise sporların %100'ü çimlenmemiştir (çalışmada sunulmamıştır). Bu etki sporların çim tüpü uzunluğuna da etki etmiştir. Örneğin çim tüpü uzunluğuna bakıldığında, kontrol grubunda 134.26 µm iken, 600 µl de 81.04 µm, 800 µl de 59.67 µm ve 1000 µl de ise 38.15 µm olduğu tespit edilmiştir. Görüldüğü gibi uygulamalarda EY konsantrasyonu artışına paralel olarak çim tüpü uzunlukları önemli oranlarda azalmıştır. Bu veriler, *N. meyeri*'den elde EY'nin *B. cinerea*'nin spor çimlenmesini önemli seviyede inhibe ettiğini göstermektedir. Sonuçlara göre, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğunu engelleyerek en yüksek antifungal etkiyi 1000 µl'lik doz göstermiştir. Literatürde *N. meyeri* ile yapılan bir çalışmada elde edilen EY'nin antifungal etkisi *in vitro*'da 16 fitopatojenik fungusun büyümesinde denenmiştir (Kordali *et al.* 2013). Bu çalışmada araştırmacılar, *N. meyeri* EY'sini 16 fitopatojenik fungusun misel büyümesini 0.25, 0.50 ve 1.0 mg/ml

konsantrasyonlarında tamamen inhibe ettiğini belirlemişlerdir. EY'nin antifungal etkisi ticari olarak kullanılan benomil fungusitten daha yüksek olduğu görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan esansiyel yağ (0.25, 0.50 ve 1.0 mg/ml) önemli ölçüde çalışılan bitki patojen mantarların gelişmesini önlemiştir (Kordali *et al.* 2013). Bu çalışmanın bulguları bizim çalışmamızı desteklemektedir. Bizim çalışmamızda buna ilave olarak *N. meyeri* EY'sinin hem misel hem de spor gelişimini önlediği gösterilmiştir. *Nepeta*'nın diğer türleri ile yapılan çalışmalar, *N. meyeri* dışındaki türlerin de antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin, *Nepeta*'nın farklı bir türü olan *Nepeta rtanjensis* bitkisiyle yapılan çalışmada EY analizleri sonucunda ana bileşenin yine 4aa,7a,7aβ –Nepetalacton olduğu tespit edilmiştir (Grbić *et al.* 2011). *N. rtanjensis*'ten izole edilmiş uçucu yağların incelenen tüm micromyceteslere karşı güçlü bir antifungal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Grbić *et al.* 2008). *In vitro* şartlarda *N. rtanjensis*'in uçucu yağının *Alternaria* türlerinde de etkili olduğu bulunmuştur (Grbić *et al.* 2008). EY'lerin özellikle 0.6–0.8 µg ml⁻¹ konsantrasyonları *Alternaria* türlerinin misel büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir. *N. rtanjensis* bitkisinin esansiyel yağının funguslarda konidiumların çimlenmesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Grbić *et al.* 2008). *Cladosporium cladosporioides*'in konidiumlarının *N. rtanjensis*'in esansiyel yağına çok duyarlı olduğu saptanmıştır (Grbić *et al.* 2011). En küçük dozlarda (0.1 µg ml⁻¹) bile konidiumların çimlenmesini inhibe ettiği görülmüştür. Her iki çalışmada da bu etkinin ana unsurunun nepetalacton olması bizim çalışmamızın literatür ile paralel olduğunu göstermektedir. Çalışmamız, uçucu yağların düşük toksite ve biyolojik parçalanmalarının kolay olmasından dolayı, *N. meyeri* EY'sinin biyofungusit olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğunu desteklemiştir.

EY dozlarının (600, 800 ve 1000 µl) antifungal etkileri Petri şartlarının yanında canlı yaprak denemeleriyle de belirlenmiştir. Yapraklara çalışılan EY dozları 3 farklı şekilde uygulanmıştır. Bunlar, (1) EY ile fungus aynı anda (E+F); (2) EY uygulamasından 1 gün sonra fungus uygulaması (E+F(1G)) ve (3) EY uygulamasından 2 gün sonra fungus uygulaması (E+F(2G)). Değerlendirmeler yapraklar üzerindeki lezyon çapları ölçülerek yapılmıştır. Değerlendirme sonuçlarına göre, tüm konsantrasyonlarda esansiyel yağ uygulamasından bir gün sonra fungusun yapraklara inokule (E+F(1G)) edilerek yapılan uygulamada, lezyon oluşumunu kontrol grubuna göre daha fazla etki göstererek

azalttığı görülmüştür (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12). Çalışmada 600 µl'lik doz yaprak miselyum gelişim oranı (MGO) Şekil 4.10'da, 800 µl'lik doz MGO Şekil 4.11'de ve 1000 µl'lik doz MGO Şekil 4.12'de verilmiştir. Örneğin fungus uygulanan yapraklarda misel gelişimi alanı 600'de 20.24 mm iken, 800'de 21.60 mm ve 1000'de 19.78 mm olmuştur. E+F uygulanan yapraklarda misel gelişimi alanı 600'de 17.45 mm iken, 800'de 16.64 mm ve 1000'de 14.56 mm olmuştur. E+F(1G) uygulanan yapraklarda misel gelişimi alanı 600'de 16.64 mm iken, 800'de 14.8 mm ve 1000'de 11.16 mm olmuştur. E+F(2G) uygulanan yapraklarda ise misel gelişimi alanı 600'de 17.2 mm iken, 800'de 15.54 mm ve 1000'de 12.4 mm olmuştur (Çizelge 4.4). Literatürde, bizim çalışmamıza benzer bir araştırma deseninde *in vivo* etkisine bakılmadığından dolayı, bu sonucu önceki araştırma sonuçlarıyla tam olarak karşılaştırmalı kıyaslamak mümkün olmamıştır.

5.2. Su Özütünün Miseliyal Gelişimi ve Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada *N. meyeri*'den elde edilen su özütünün (2, 5 ve 10 ml), *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerindeki antifungal etkisi de araştırılmıştır. Literatürde *Nepeta* türlerinin su özütlerinin antifungal etkilerine ait her hangi bir veri bulunamamıştır. Yapılan çalışmalarda su özütü uygulamasının *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerinde anlamlı bir antifungal etki yapmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.26). Çalışılan su özütü dozları arasında da anlamlı bir sonuç belirlenememiştir. Petri uygulamasında etkili olmayan dozların patojenin yaprak enfeksiyonu esnasında etkili olup olmayacağı da çalışılmıştır (Çizelge 4.20). Petri deneylerinde kullanılan su özütü konsantrasyonları yaprak uygulamasında denenmiş ve Petri uygulamalarına benzer olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda bazı bitkilerin su özütünün antifungal etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi (Özcan and Boyraz 2000), etkili olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Türküsay ve Onoğur 1998). Örneğin *Mutisia acuminata*'nın antimikrobiyal aktivitesi araştırılırken (Catalano *et al.* 1998) *Aspergillus niger*, *B. cinerea* ve *Pyricularia oryzae*'nin de içinde bulunduğu sekiz mikroorganizma üzerinde *M. acuminata*'nın metanol ve su ekstraktları kullanılmıştır.

Sonuç olarak *M. acuminata* ekstraktlarının, *B. cinerea*'nin miseliyal gelişimi ve spor çimlenmesine karşı en iyi antifungal aktiviteyi gösterdiği belirtilmiştir (Catalano *et al.* 1998). Türküsay ve Onoğur'un (1998) yaptıkları çalışmada da bazı kültür bitkilerinin yapraklarından su özütü ekstraktların bitki patojeni *Alternaria alternata*, *A. solani*, *B. cinerea* ve *Drechslera sorokiniana*'ya karşı *in vitro* antifungal etkileri araştırılmıştır. *Hedera helix* yaprak ekstraktının spor çimlenmesini en yüksek oranda engellediği, bundan sonra en etkili olanın *Datura stramonium* olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada da *Peganum harmala*'nın tohumları kullanılarak elde edilen su özütü *Phytophthora drechsleri*, *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cladosporium cucumerinum*, *Corynespora cassiicola* (Berk. et M. A. Curtis), *Alternaria* sp., *B. cinerea*, *Monosporascus cannonballus*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* ve *Rhizoctonia solani* patojenlerinin miseliyal gelişimini engellediği bulunmuştur (Sarpeleh *et al.* 2009). Farklı bitkilerin su özütleriyle yapılan çalışmalarda fungus gelişimini bizim çalışmamızdan farklı olarak engelledikleri belirtilmiştir. Bu farklılığın kullanılan bitki türlerinin değişikliğinden kaynaklandığı düşünülebilir. *N. meyeri* ile yapılan daha önceki çalışmalarda bu bitkinin kök ve gövdesinden elde edilen su ekstraktlarının bazı kültür bitkileri üzerinde allelopatik etkileri ortaya konmuştur (Mutlu ve Atıcı 2009). Görüldüğü gibi *N. meyeri*'nin su özütünün bitkiler üzerinde allelopatik etkiye sahip etkili olduğunu belirlenmiştir. Ama aynı bitkinin su özütü *B. cinerea* üzerinde etkili olmamıştır. Bu sonuçlar bize ekstraktların etki mekanizmasının gerek içerdiği etkili maddenin çeşidine gerekse hedef organizmaya göre farklı olabileceğini göstermektedir. Bazen aynı bitkiden elde edilen ekstraktın antifungal etkisi, uçucu yağa göre düşük olmaktadır. Bunun, ekstraktın içerdiği etkili madde miktarı, stabilitesi ve etki seviyesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ekstrakt içeriğinin farklı fungusların beslenmesi için iyi bir karbon ve enerji kaynağı olması canlının üremesini teşvik etmektedir. Yapılan bir araştırmada bazı bitki ekstraktlarının belirli mikroorganizmaların gelişmesini engellediği, belirli mikroorganizmalar üzerinde hiçbir etki yapmadığı ve hatta gelişmelerini teşvik ettiği belirtilmiştir (Singh *et al.* 1980). Ayrıca birçok araştırmacıya göre de bitki ekstraktlarının hastalık engelleyici özellikleri bünyelerinde bulundurdukları uçucu yağlardan kaynaklanmaktadır (Tripathi *et al.* 1985).

5.3. Metanolik Özütün Miseliyal Gelişimi ve Spor Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Mevcut çalışmada, *N. meyeri* bitkisinin metanolik özütü uygulamaları *B. cinerea*'nın miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine olumlu veya olumsuz bir etki yapmamıştır (Çizelge 4.21). Petri uygulamasında kullanılan konsantrasyonlar yaprak uygulamasında da etkili olmamıştır. Diğer taraftan metanolik özüt uygulanması asma yaprakları üzerinde olumsuz etki yapmış ve bozulma ile deformasyonlara neden olmuştur (Şekil 4.35). Literatürde buna benzer sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin, *Ephedra breana*, *Fabiana imbricata*, ve *Nolana sedifolia* bitkilerinin metanolik ve etanolik ekstraktlarının antifungal aktivitelerini belirlemek için çalışılan mantar bitki ekstraktları ile aynı ortama bırakılmış ve bunların antifungal bir etkiye sahip olduğu görülmüştür (Vio-Michaelis *et al.* 2012). Çalışılan üç bitkinin metanolik fraksiyonu ile *F. imbricata*'nın etanolik fraksiyonun antifungal etki göstermediği rapo edilmiştir. Fitopatojen *B. cinerea*'yı kontrol etmek için *E. breana* ve *N. sedifolia*'nın etanolik özlerinin *in vitro* da antifungal aktiviteye sahip olduğundan etmenle mücadelede alternatif olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Vio-Michaelis *et al.* 2012). Yapılan başka bir çalışmada da *Vitis vinifera* sürgünlerinin metanolik ve etanolik ekstraktlarının asmaları etkileyen başlıca üç mantar patojene (*Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* ve *B. cinerea*) karşı önemli antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Tanımlanan altı bileşik (ampelopsin A, hopeaphenol, trans-resveratrol, ampelopsin H, ε-viniferin, and Evitisin B), *P. viticola*'ya karşı antifungal aktivite göstermiştir. ε-Viniferin de *B. cinerea*'ya karşı düşük bir antifungal aktivite göstermiştir. Tespit edilen bileşiklerin hiçbirisi, *E. necator* çimlenmesini önlememiştir (Schnee *et al.* 2013). Bu çalışmalarda olduğu gibi her bitkinin metanolik özütü her fungusu etkileyemeyebilir. Sunulan çalışmada *B. cinerea*'ya metanolik özüt antifungal etki göstermemiştir. Tüm bu bilgiler ışığındaki çalışmalarda farklı bitkilerin metanolik özütlerinin fungusların hepsine etkili olamayacağı göstermiştir. Çalışmamızda *N. meyeri* bitkisinin su ve metanolik ekstraktlarının *B. cinerea* üzerinde etkili olmadığı bulunmuştur. Su ve metanolik özüt içerisinde antifungal etkinin gerçekleşmesini sağlayacak kimyasal bileşiklerin olmadığı düşünülmektedir. Bitki ekstraktlarının önemli fungal bitki patojenlerinin miseliyal gelişimi, spor çimlenmesi ve çim tüpü uzunluğu üzerine antifungal etkilerinin

araştırıldığı bu çalışmada; esansiyel yağ kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında patojen üzerinde antifungal etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni olarak esansiyel yağ elde edilen bitkinin içeriğinde var olan fungitoksik bileşiklerin patojeni baskılaması ve bitkilerde fitoaleksinin oluşumunu teşvik etmesi gösterilebilir. Bitki ekstraktlarındaki etkinin, aynı bitkinin sadece uçucu yağları sonucunda ortaya çıkan etkiden düşük olmasına sebep olarak ekstrakt içindeki toplam uçucu yağ miktarının düşük olması gösterilmiştir. Uçucu yağların suda çözünürlüğünün düşük olması, bitki ekstraktlarındaki etkinin düşük olmasına sebep olduğu düşünülmektedir (Kaçar 2000). Qasem and Abu-Blan (1995) tarafından, farklı bitkilerin su içerisinde çözünürlükleri, ekstraktların antifungal aktiviteleri farklılıklarının nedeni olabileceği belirtilmiştir. Bu sonuçlar bize ekstraktların etki mekanizmasının gerek içerdiği etkili maddenin çeşidine gerekse hedef organizmaya göre farklı olabileceğini göstermektedir.

5.4. Klorofil *a*, Klorofil *b*, Toplam Klorofil ve Karotenoid Miktarlarının Değerlendirilmesi

Stres faktörlerinin bitkiler üzerine etkilerini anlamak için başvurulacak yollardan biri organizmada fotosentetik pigmentlerin içeriğinin belirlenmesidir (Akbulak *et al.* 2006). Çalışmamızda asma yapraklarına *B. cinerea* uygulaması klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarını tüm gruplarda kontrole göre düşürmüştür (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 16). Ancak EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamaları, tek başına fungus uygulamasına göre, tüm konsantrasyonlarda klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil miktarını artırırken, karotenoid miktarı ise tüm konsantrasyonlarda doz oranına bağlı olmayan artış ve azalış göstermiştir (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 16). Şekil 4.13, 14 ve 16'ya dikkat edilirse, tek başına EY uygulamasının klorofil ve karotenoid içerikleri üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki yapmadığı görülmektedir. Ancak özellikle enfeksiyondan önce uygulanan EY, yapraklarda aynı pigmentlerin içeriğini önemli oranlarda artırmıştır. Bu durum, EY'nin bitkide doğrudan klorofil veya karotenoid sentezini uyararak değil, fungus enfeksiyonunu baskılayarak pigmentlerin içeriğini artırdığına işaret eder. Fotosentetik pigmentlerin, biyotik stres etkisiyle değişimini gösteren literatür bilgisi yetersizdir.

Akbudak *et al.* (2006) biber çeşitlerine *B. cinerea* uygulamasıyla yapraklarda pigment miktarının azaldığını, ancak *B. cinerea*'ya karşı harpin uygulamasının pigment miktarını artırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışma bizim pigmentlerle ilgili bulgularımızı desteklemektedir. Başka bir çalışmada ise *B. cinerea* ile enfekte olmuş domates yapraklarının kloroplastlarında klorofil kaybı gözlenmiştir (Kuz'niak and Sklodowska 2001). Rustioni *et al.* (2015), aşırı oksidatif stres sonucu üzüm dokularının ve fotosentetik pigmentlerin geri dönüşümü olmayan zararlara uğradığını belirtmiştir. Biyolojik bir stres olan *Erwinia amylovora* kaynaklı bir oksidatif stres elma fidanlarında nisbi klorofil miktarı artırdığı rapor edilmiştir (Karacif 2012). Yine başka bir çalışmada *Erwinia amylovora* kaynaklı stresin armut bitkilerinde nisbi klorofil miktarını arttırdığı belirtilmiştir (Bauerve and Beer 1991). Araştırmamızda elde edilen sonuçlara göre klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarları üzerinde *B. cinerea* stresinin oluşturduğu olumsuz etki, *N. meyeri*'den elde edilen EY ile önemli ölçüde iyileştirilmiştir. Bu etki özellikle EY'lerin mantar enfeksiyonunu azaltmasına dayandırılabilir. EY uygulanan yapraklarda (Şekil 4.9) canlılığın daha iyi olmasının buna bağlı olduğu düşünülmektedir.

5.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile Lipid Peroksidasyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Yapılan literatür incelemelerine göre, asma bitkisinde *B. cinerea* 'dan kaynaklı oksidatif stresle ilgili yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu yönü ile orijinal bir çalışma niteliğinde olan araştırmamızdan elde edilen veriler, literatür için önemli bir kaynak olacaktır. Bitkilerde herhangi bir çevresel stres altında ROS üretiminin uyarıldığı bilinmektedir (Sgherri *et al.* 1996). ROS, süperoksit (O_2^-) ve hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$) ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijeni (1O_2) içermekte olup, lipid peroksidasyonu, proteinlerin denatürasyonu, DNA'nın mutasyonu gibi etkilerin yanı sıra, çeşitli hücrel oksidatif hasarlara da neden olmaktadır (Sharma and Dubey 2005). Çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığı için radikal olarak adlandırılmayan H_2O_2 , süperoksit ile reaksiyona girdiğinde, serbest oksijen radikalleri içinde en yüksek toksisiteye sahip olan ($OH^\cdot$) radikalini oluşturmaktadır (Baker and Orlandi 1995). $OH^\cdot$

radikalinin hücrelerdeki birikimi, özellikle membran lipidlerinin peroksidasyonu ve enzim aktivitelerinin inaktivasyonu gibi pek çok yapısal ve fizyolojik hasara yol açtığı bilinmektedir (Halliwell and Gutteridge 1998). Bitki stres derecesinin belirlenmesinde biyolojik bir işaret olarak kullanılan bu bileşiklerin düşük miktarları, bitki savunma sisteminin aktive edilmesine pozitif bir etki gösterebilirken, antioksidan enzim aktivitelerinin yeterince aktive edilemediği veya yetersiz kaldığı durumlarda hücrede yüksek miktarlarda bulunduğu zaman dokularda oksidatif hasara yani strese neden olmaktadır (Liu *et al.* 2010).

Süperoksit anyon radikali lipid peroksidasyonunu direk başlatan oksijen merkezli radikallerdir. Lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara sebep olan hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumunda da önemli rol oynamaktadır (Prasad *et al.* 2009). Bizim çalışmamızda, asma bitkisinde tek başına *B. cinerea* uygulamasının, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında $O_2^{\cdot-}$ miktarını artırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.18). Ancak EY uygulamalarının tümünde (600 μ l, 800 μ l ve 1000 μ l) $O_2^{\cdot-}$ miktarı kontrollerine göre önemli seviyede düşük bulunmuştur (Şekil 4.18). Bu sonuç hem EY+F(1G) hem de EY+F(2G) uygulamalarında görülmektedir. Bu sonuçlara göre, EY uygulamasından 1 gün veya 2 gün sonra gelişen mantar enfeksiyonlarının her ikisinde de $O_2^{\cdot-}$ miktarının düştüğü görülmektedir (Şekil 4.18). Hücrelerde $O_2^{\cdot-}$ miktarının düşmesi, diğer radikallerden H_2O_2 seviyesinin de düşmesine neden olur. Çünkü H_2O_2 üretiminde ana substrat $O_2^{\cdot-}$ anyonudur. SOD enzimi $O_2^{\cdot-}$ anyonunu substrat olarak kullanarak H_2O_2 'ya dönüştürür. Literatürde bizim bulgularımızı destekleyen bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Perkoz ve Corindo domates çeşitlerinde *B. cinerea* enfeksiyonunda her iki çeşitte $O_2^{\cdot-}$ miktarı arttığı belirlenmiştir (Pietrowska *et al.* 2015). *B. cinerea* ile enfekte edilen domates bitkisinde yapılan başka bir çalışmada enfeksiyona karşı metil jasmonat uygulandığında, bitkilerde uygulama yapılmayanlara göre $O_2^{\cdot-}$ miktarı azaldığı belirtilmiştir (Zhu and Tian 2012). Çalışmamızın sonuçları bu çalışmalar ile uyum sağlamaktadır. Stres şartlarında artan $O_2^{\cdot-}$ miktarı özellikle membran hasarlarına neden olmaktadır. Uygulanan esansiyel yağ ile azaltılmış $O_2^{\cdot-}$ miktarı aktivitesi artan SOD enzimi ile dismutasyona uğramış olabilir. Azalmış olan $O_2^{\cdot-}$ miktarı membran yapısına zarar veremeyeceğinden hücre bütünlüğünü korunmuş olur. Bunun sonucunda hücre

canlılığını koruyabilir ve bitki bir bütün olarak strese karşı tolerans gösterebilir. Çalışmamızın sonuçları esansiyel yağın patojen stresine karşı asma bitkisinin yapraklarında O_2^- miktarını azaltarak oksidatif stres zararından korunmaya önemli bir katkı yaptığını göstermektedir.

Bizim çalışmamızda, asma bitkisinde tek başına *B. cinerea* uygulamasının, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında H_2O_2 miktarını artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.9). EY uygulamalarının tümünde (600 μ l, 800 μ l ve 1000 μ l) H_2O_2 miktarı kontrollerine göre önemli seviyede düşük bulunmuştur (Çizelge 4.9). Bu sonuç tek başına fungus uygulamasına göre hem EY+F(1G) hem de EY+F(2G) uygulamalarında da görülmektedir. Bu sonuçlara göre, EY uygulamasından 1 gün veya 2 gün sonra gelişen mantar enfeksiyonlarının her ikisinde de H_2O_2 miktarının düştüğü görülmektedir. Bu durum önceki çalışmamalarla iyi bir uyum göstermektedir. Örneğin iki çeşit domates kültürlerinde *B. cinerea* enfeksiyonunda her iki bitkinin sitosolünde H_2O_2 miktarı artmıştır (Patykowski and Urbanek 2005). *B. cinerea* ile enfekte edilen domates bitkisine O-hidroksietil uygulanmıştır. O-hidroksietil uygulanan bitkilerde enfekte edilip O-hidroksietille muamele edilenlere göre hidrojen peroksit miktarının iki kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan *in vitro* testler *B. cinerea* konidyumların çimlenmesinin H_2O_2 tarafından inhibe edildiği saptanmıştır (Małolepsza and Urbanek 2000). Yüksek H_2O_2 konsantrasyonu misel büyümesini engellemek için gereklidir. Sonuçlar O-hidroksietilin domates bitkilerinde H_2O_2 üretimini tetiklediğini ve *B. cinerea* enfeksiyonun da H_2O_2 'yu sınırladığını göstermektedir (Małolepsza and Urbanek 2000). *B. cinerea* ile enfekte edilen domates bitkisinin (*Lycopersicon esculentum*) yapraklarında uygulamadan 2, 6, 24 ve 48 saat sonra günlere paralel olarak H_2O_2 miktarlarında artış saptanmıştır (Małolepsza ve Rozalska 2005). Asma fidelerine uygulanan 10 günlük kuraklık stresinin, iki çeşitte önemli derecede hidrojen peroksit artışına neden olduğu bulunmuştur (Yağmur 2008). Gunes *et al.* (2006) yaptıkları çalışmada, 0, 10, 20 ve 30 mg kg⁻¹ dozlarında asma'ya (*Vitis vinifera* L. cv. Kalecik Karası) bitkisine bor uygulamış ve B konsantrasyonun H_2O_2 miktarını artırdığı belirtilmiştir. Bitki hücrelerinde H_2O_2 konsantrasyonunun stres koşullarında hücresel membranlardaki bozulmaların bir sonucu olarak arttığı da rapor edilmiştir (Prochazkova *et al.* 2001, Sairam and Srivastava 2002, Sairam *et al.* 2002). Fungal patojen olan ve

oksidatif stres oluşturan *B. cinerea* pers. ile enfekte edilmiş domates bitkisinin yaprak peroksizomlarında H_2O_2 miktarını artırdığı saptanmıştır (Kuzniak ve Sklodowska 2005). Bir kök paraziti olan *Fusarium verticillioides* uygulanmış mısır bitkisinde H_2O_2 miktarını artış tespit edilmiştir (Kumar *et al.* 2009). Biber (*Capsicum annuum* – *Ancho chili* plants) bitkisinde *Phytophthora capsici*'ye karşı mikorizal koruma ile ilgili çalışmada mikoriza olmayan bitkilerin yapraklarında H_2O_2 birikimi olduğu gözlemlenmiştir (Alejo-Iturvide *et al.* 2008). Bizim bulgularımız, *B. cinerea* uygulaması ile artan H_2O_2 miktarının, bitki enfekte olmadan önce uygulanan esansiyel yağ önemli derecede azalttığı ve bu nedenle de oksidatif strese karşı bitki toleransının artırılmasına önemli bir katkı sağladığı anlamına gelmektedir.

ROS'lar membran lipidlerinin peroksidasyonuna yol açarak membran hasarına neden olmaktadır (Ye *et al.* 2000). Lipid peroksidasyonu (LPO) oksidatif zararın en basit göstergesi olarak kullanılmaktadır (Zhang and Kirkham 1996). Bitkiler strese maruz kaldıklarında, doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak oluşan malondialdehid (MDA) miktarındaki artış, hücrelerde zarların yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk *et al.* 2005). Hücre için LPO çok tehlikeli olup kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Literatürde biyotik streslerin LPO üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Örneğin *B. cinerea* ile enfekte olan fasulye yapraklarında LPO seviyesinin arttığı rapor edilmiştir (Kan 2005). Domates kültürlerinde *B. cinerea* enfeksiyonu sonucunda MDA miktarı kontrol grubuna göre arttığı rapor edilmiştir (Pietrowska *et al.* 2015). Buna benzer olarak asma anaçlarında kuraklık stresinin, MDA miktarında artışa neden olduğu ve MDA seviyesinin çalışılan anaçlarına göre %10'dan %90'a kadar arttığı belirtilmiştir (Yağmur 2008). *Fusarium oxysporium* f. sp. *ciceris* ile enfekte edilen nohut bitkisinin gövdelerinde patojen enfeksiyonundan sonra lipid peroksidasyonun artırdığı rapor edilmiştir (Limonas *et al.* 2002). *B. cinerea* ile enfekte edilen domates yapraklarında uygulamadan 2, 6, 24 ve 48 saat sonra günlere bağlı olarak lipid peroksidasyonunda artma saptanmıştır (Malolepsza and Rozalska 2005). Diğer stres koşullarında da lipid peroksidasyonunda arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Özden *et al.* 2009; Sivritepe *et al.* 2009; Yang *et al.* 2011). Bu çalışmada elde edilen bulgularda da EY uygulamasının *B. cinerea*

enfeksiyonunun neden olduğu yüksek MDA seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Bulgularımıza göre, asma bitkisine tek başına *B. cinerea* uygulaması, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında MDA miktarını artırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.19). Örneğin kontrol yapraklarında MDA miktarı yaklaşık 1.70 nmol iken, *B. cinera* uygulanmış yapraklarda yaklaşık 2.50 nmol olmuştur. EY uygulamalarının tümünde (600 µl, 800 µl ve 1000 µl) MDA miktarı tek başına fungus uygulamasına göre önemli seviyede düşük bulunmuştur (Çizelge 4.11). Bu sonuç özellikle hem EY+F(1G) hem de EY+F(2G) uygulamalarında görülmektedir. Bu sonuçlara göre, EY uygulamasından 1 gün veya 2 gün sonra gelişen mantar enfeksiyonlarının her ikisinde de MDA miktarının düştüğü görülmektedir (Şekil 4.19). Çalışmamızda, uygulanan esansiyel yağın hücrelerde oluşan oksidatif hasarların önemli bir göstergesi olan LPO seviyesini düşürmesi, bitki canlılığı için son derece önemlidir. Hücrenin membranın korunması, hücre bütünlüğünün korunması anlamına gelir. Kısaca hücrelerinin bütünlüğü sağlanmış olan bir bitki, stres şartlarına adapte olmak için avantaj sağlamış olur. Bu yüzden esansiyel yağın LPO seviyesini düşürmesi, *B. cinerea*'nın asmada neden olduğu biyotik strese direnç için kullanılması gerektiği hipotezimizi destekler nitelikte bir bulgudur.

5.6. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Bitkiler stressiz koşullar altında ROS üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki dengeyi kontrol etmek zorundadırlar (Apel and Hirt 2004). Düşük seviyelerde ROS; gelişme, abiyotik stres faktörlerine patojenlere ve hücre ölümüne yanıt mekanizmalarında sinyal olarak görev alır (Miller *et al.* 2010). Optimal koşullar altında bile birçok metabolik yolda ROS üretilir. Bitkiler kendilerini oksidatif reaksiyonların olumsuz etkilerinden koruyan ve ROS süpürmede etkili sistemlere sahiptirler. Bu sistemin bir parçası olan antioksidan enzimler savunma mekanizmasının anahtar bir parçasıdır (Zhu *et al.* 2007).

Bu çalışmada SOD aktivitesi fungus ve EY uygulamalarında tüm gruplar arasında değişkenlik göstermiştir (Şekil 4.20). Tek başına fungus uygulaması SOD aktivitesini kontrolüne göre genelde artırmıştır (Şekil 4.20). Özellikle 1000 µl EY uygulamasında EY+F, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulamalarının tümü tek başına fungus uygulamasına

göre SOD aktivitesini düşürmüştür. Örneğin, EY+F(1G) ve EY+F(2G) uygulaması da tek başına fungus uygulamasına göre sırasıyla %1.58 ve %1.84 oranında azaltmıştır (Çizelge 4.12). Bu verilere göre fungus uygulamasıyla yapraklarda SOD aktivitesinin genelde arttığı görülmektedir. Bu bitkinin strese bir cevabı olarak değerlendirilebilir. Çünkü dikkat edilirse fungus uygulamasıyla ROS miktarının arttığı belirlenmiştir. ROS miktarının artışına cevap olarak hücrelerde SOD aktivitesinin artması beklenebilir. EY uygulamalarının ROS ve SOD aktivitesinin düşmesine yol açması, bitkide stres cevabının arttığının bir delili olduğu gösterebilir. Domates yapraklarına *B. cinerea* gelişimini kısıtlamak için O-hidroksietil uygulaması 2 gün sonra yapılan testlerde yapraklarda SOD aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Małolepsza and Urbanek 2000). Patykowski (2006) domates dokularının ve *B. cinerea* sporlarına karşı eksojenik H₂O₂ uygulamasının SOD aktivitesine etki etmediğini belirtmiştir. Başka bir çalışmada ise *Erwinia amylovora*'dan kaynaklı oksidatif stres koşullarında elma çeşitlerinde (Breaburn, Gala, Golden, Skarlet) kontrolle kıyaslandığında zamana bağlı olarak SOD aktivitesi azaldığı belirtilmiştir (Karacif 2012). Fungal patojen olan ve oksidatif stres oluşturan *B. cinerea* ile enfekte edilmiş domates bitkisinin yaprak peroksizomlarında reaktif oksijen türevlerinin meydana geldiği ve bunların antioksidan aktivite değişimleri ile detoksifiye edildiği saptanmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda SOD enzim aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir (Kuzniak ve Sklodowska 2005). *Fusarium oxysporium* f. sp. *ciceris* ile enfekte edilen nohut bitkisinin gövdelerinde patojen enfeksiyonundan sonra SOD enzim aktivitesinde artış belirlenmiştir (Limonas *et al.* 2002). Bir kök paraziti olan *Fusarium verticillioides* uygulanmış mısır bitkisinde antioksidan enzimlerin aktiviteleri incelenmiş ve kontrol bitkilerine göre hastalıklı fidelerde SOD aktivitesinde artış tespit edilmiştir (Kumar *et al.* 2009). Kang (2008) yaptığı çalışmada, bir küf olan *Sphaerotheca fuliginea* Pollacci ile enfekte edilen hıyar fidelerinin yapraklarında inokulasyon süresindeki artışa bağlı olarak hastalanma şiddetinin de artmasıyla SOD aktivitesinin arttığını belirtmiştir. Sonuçta SOD'un, streslerin tipine ve derecesine göre bir davranış sergilediği görülmektedir.

H₂O₂, kloroplastlardaki peroksidazlar (POD) tarafından substrat olarak kullanılır ve POD'larla hücrelerden süpürülür. Peroksidazların bu süpürücü görevinin dışında büyüme gelişme ve lignifikasyonda da görevi vardır (Asada and Takashi 1987). Bu

çalışmada H_2O_2 içeriği ölçülmüş ve fungus uygulamasıyla arttığı belirlenmiştir. Hücrelerde H_2O_2 seviyesinin içsel değişimini kontrol etmek için POD aktivitesinin değerlendirilmesi önemlidir. Çalışmamızda yapraklara tek başına fungus uygulaması POD aktivitesini tüm dozlarda kontrole göre artırmıştır. EY uygulaması tek başına fungus uygulamasına göre tüm konsantrasyonlarda POD aktivitesini düşürmüştür. EY uygulamaları arasında 1000 μ l dozun EY+F(1G) uygulamasının tüm gruplarda en etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.21). POD aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda stres şartlarındaki bitkilerde genelde aktivitenin arttığı rapor edilmiştir. Domates bitkileri patojenle muamele edildiğinde, apoplastik POD aktivitesinin yükseldiği belirlenmiştir (Patykowski *et al.* 2003). *B. cinerea* ile enfekte edilen domates bitkisinin (*Lycopersicon esculentum*) yapraklarında uygulamadan 2, 6, 24 ve 48 saat sonra günlere paralel olarak POD aktivitesinde artış tespit edilmiştir (Malolepsza and Rozalska 2005). Perkoz ve Corindo domates çeşitlerinin *B. cinerea* enfeksiyonunda peroksidaz aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Perkoz'da diğer çeşide göre POD aktivitesinin daha önce artış gösterdiğini belirtmiştir. Perkoz ve Corindo domates çeşitlerinin *B. cinerea* enfeksiyonuna karşı farklı direnç gösterdiği belirtilmiştir. Bu dirençte apoplastik POD'un hücre duvarının sertleşmesinde anahtar rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2005). Yapılan başka bir çalışmada *B. cinerea* sporlarının eksojen H_2O_2 'ya karşı duyarlılığı araştırılmıştır. Dokulardaki zararlı H_2O_2 konsantrasyonu POD aktivitesini uyardığı rapor edilmiştir. POD enziminin hücre duvarının sertleşmesinde ve lignifikasyonunda etkili olduğu fakat fungal gelişimini inhibe etmede yeterli olmadığı belirtilmiştir (Patykowski 2006). Bizim verilerimize göre fungus uygulamasıyla asma yapraklarında POD aktivitesinin arttığı görülmektedir. Çalışmamızda fungus uygulamasıyla H_2O_2 miktarının da arttığı belirlenmişti. Hücrelerin ise bu duruma POD aktivitesini artırarak cevap verdiği görülmektedir. Ancak çalışmamızda *N. meyeri*'den elde edilen EY uygulamaları fungus uygulamaları ile artan H_2O_2 ve POD aktivitesinin düşmesine neden olmuş ve bu durumun bitkinin strese cevabının arttığının bir delili olduğu değerlendirilmiştir.

CAT, bitkide stres nedeniyle ortaya çıkan H_2O_2 'in süpürülmesinde görevli diğer antioksidan enzimlerden biridir (Antunes *et al.* 2002). Oksidatif stres toleransında diğer antioksidan enzimlerle birlikte anahtar rol oynar (Apel and Hirt 2004). Literatürde,

biyotik stres esnasında CAT aktivitesinin hem arttığı hem de düştüğü ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Malolepsza and Urbanek 2000; Kuzniak and Slodowska 2005; Patykowski 2006). Çalışmamızda yapraklara tek başına fungus uygulaması CAT aktivitesini artırmıştır (Şekil 4.22). EY uygulaması ise tek başına fungus uygulamasına göre, tüm konsantrasyonlarda CAT aktivitesini düşürmüştür (Şekil 4.22). Literatürde bizim bulgularımıza uygun veriler bulmak mümkündür. Örneğin Kuzniak ve Slodowska (2005) tarafından yapılan çalışmada *B. cinerea* ile enfekte edilen domates bitkisinin yapraklarında CAT aktivitesinin kontrollere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Uygulamanın 1. ve 2. günlerinde kontrollerine göre aktivitede önemli bir artış belirlenirken, 4. günden sonra aktivitenin düştüğü görülmüştür. Ayrıca diğer bir çalışmada domates yapraklarında *B. cinerea* enfeksiyonunu önlemek için O-hidroksietil uygulanması kontrol grubuna göre CAT aktivitesi azalmıştır (Malolepsza and Urbanek 2000). Başka bir çalışmada ise domates yaprakları *B. cinerea* enfekte edilip H_2O_2 uygulandığında, apoplastlarda CAT aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Patykowski 2006). Bu bulguların bizim elde ettiğimiz sonuçlarla uyum içinde olduğu görülmektedir. Farklı bir çalışmada ise *B. cinerea* ile enfekte edilen domates yapraklarında uygulamadan 2, 6, 24 ve 48 saat sonra günlere bağlı olarak CAT aktivitesinde bir azalma saptanmıştır (Malolepsza and Rozalska 2005). Bizim çalışmamızda fungus uygulamasıyla CAT aktivitesinin artması, enfeksiyon esnasında hücrelerde H_2O_2 seviyesinin yükseltildiğini gösterir. Metabolizmada artan H_2O_2 seviyesinin düşürülmesi için CAT aktivitesi artmaktadır. Ancak yapraklara enfeksiyondan önce uygulanan EY, mantar enfeksiyonunu baskıladığından dolayı H_2O_2 seviyesi düşürmekte (Çizelge 4.14) ve bu düşüşe bağlı olarak da CAT aktivitesin de düşmekte olduğu görülmektedir. Bu verilere göre, asma yapraklarına enfeksiyondan önce EY uygulamasının antioksidan sistemi düzenlendiği ve enfeksiyona karşı cevap mekanizmalarını harekete geçirdiği ileri sürülebilir.

APX, sitoplazmada, glioksizom ve peroksizomlarda ve mitokondride bulunur. Bitkinin kloroplastında meydana gelen H_2O_2 'nin süpürülmesini ve kloroplastın oksidatif hasara karşı korunmasını sağlar. APX, askorbatı elektron vericisi olarak kullanarak H_2O_2 'i suya indirger (Demiral 2003). Çalışmamızda yapraklara tek başına fungus uygulaması APX aktivitesini kontrole göre önemli seviyede artırmıştır (Şekil 4.23). EY uygulaması

tek başına fungus uygulamasına göre, tüm konsantrasyonlarda APX aktivitesini düşürmüştür (Şekil 4.23). Bir çalışmada *B. cinerea* enfeksiyonu sonucunda domates yapraklarında hem sitosolik hem de kloroplastlardaki APX aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Kuz'niak and Sklodowska 2001). Bu çalışma bizim bulgularımızı desteklemektedir. Ancak başka bir çalışmada *B. cinerea*'ya duyarlı Perkoz ve Corindo domates çeşitlerinin yapraklarında APX aktivitesinde önemli bir fark gözlenmemiştir (Patykowski and Urbanek 2005). Domates yapraklarında *B. cinerea* gelişimini kısıtlamak için O-hidroksietil uygulandığında, fungus enfekte edilip O-hidroksietil ile tedavi edilen grupta APX aktivitesi kontrol grubuna göre düşmüş iken, tek başına fungus uygulamasına göre arttığı belirtilmiştir (Małolepsza and Urbanek 2000). Tüm bu sonuçlar stres altında APX aktivitesinin, birçok bitki türü ve hatta aynı türün iki çeşidi arasında bile oldukça değişkenlik olduğunu göstermektedir. Tepkinin derecesi, stresin yoğunluğuna ve süresine bağlı olduğu kadar bitki türüne, gelişim dönemine ve metabolik durumuna bağlı da olabilmektedir. Bizim çalışmamızda fungus uygulamasıyla APX aktivitesi artmış, ancak EY uygulamasıyla düşmüştür. Bu verilere göre, asma yapraklarına enfeksiyondan önce EY uygulamasının antioksidan sistem enzimlerinden APX aktivitesini düzenlendiği ve enfeksiyona karşı cevap mekanizmalarını harekete geçirdiği ileri sürülebilir.

Glutasyon redüktaz (GR), GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder. GR bitki, hayvan ve bakterilerde yaygın şekilde bulunur. NADPH varlığında Glutasyonun rejenerasyonunu sağlamak için askorbat-glutasyon döngüsünde anahtar bir enzimdir (Hou *et al.* 2004). GR aktivitesi üzerine *B. cinerea*'nın etkisi ile ilgili literatürde iki çalışma bulunmaktadır. Kuz'niak and Sklodowska (2001) yaptıkları çalışmada, *B. cinerea* enfeksiyonundan sonra domates yapraklarında GSH içeriğinde bir azalma, GR aktivitesinde ise artış olduğunu belirtmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise *B. cinerea* ile enfekte edilen domates bitkisinde enfeksiyonu önlemek için kullanılan metil jasmonat'ın, GR aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Zhu and Tian 2012). Bizim çalışmamızda da literatürdeki çalışmalara benzer olarak asma yapraklarına tek başına *B. cinerea* uygulaması GR aktivitesini önemli seviyede artırmıştır (Şekil 4.24). Ancak, özellikle enfeksiyondan önce yapılan EY uygulamaları, tek başına fungus uygulamasına

göre, tüm konsantrasyonlarda GR aktivitesini azaltmış ve EY+F(1G) uygulamasının tüm gruplarda en etkili uygulama olduğu bulunmuştur (Şekil 4.24). Sonuç olarak asma bitkisine enfeksiyondan önce EY uygulamasının GR aktivitesini düzenleyerek, strese karşı antioksidatif cevabın düzenlenmesine katkı sağladığı ve bu yolla da bitkinin stresten korunmasında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bu araştırmadan elde edilen önemli sonuçlar ve öneriler:

1. Bu çalışmada *Vitis vinifera* cv. Karaerik bitkisinde *B. cinerea* enfeksiyonuna karşı *N. meyeri* bitkisinden elde edilen allelokimyasal özütlerin kullanılması ilk olması yönünden oldukça önem taşımaktadır. Türkiye’de ekimi yapılan ve ekonomik değeri yüksek olan asmada bu alanda yeterli çalışma olmadığı da göz önüne alınırsa, literatüre önemli bir katkıda bulunacağı düşünülmektedir.
2. *Nepeta meyeri* bitkisinden elde edilen esansiyel yağ (EY), *Botrytis cinerea*’nın miseliyal gelişimi ve spor çimlenmesi üzerinde hem *in vitro* da hem de *in vivo* da güçlü bir antifungal etki yapmıştır. Ancak su ve metanolik özütler herhangi bir antifungal etki yapmamıştır.
3. *N. meyeri* bitkisinden elde edilen EY bileşimi içerisinde en yüksek oranda nepetalactonlar belirlenmiştir. EY’nin antifungal etkisinden nepetalactonların sorumlu olduğu düşünülmektedir.
4. Kullanılan aynı EY, asma yapraklarında *B. cinerea* enfeksiyonuyla seviyeleri düşen fotosentetik pigmentlerin (klorofil ve karotenoid) miktarlarını artırmış ve yaprak canlılığın düzelmesine katkı yapmıştır.
5. EY, asma yapraklarında enfeksiyonla seviyeleri artan ROS bileşiklerinden O_2^- ve H_2O_2 miktarlarını düşürmüştür. Bunun sonucu olarak artan membran hasarı da EY uygulamasıyla (LPO seviyesini) düşmüştür.
6. EY, asma yapraklarında enfeksiyonla seviyeleri artan antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, POD, APX ve GR) aktivitelerini önemli seviyede düşürmüştür. Bu EY uygulamasının antioksidan kapasite dışında bir yolla hasarı düşürdüğünü göstermiştir.

7. *N. meyeri*'den elde edilen EY, *B. cinerea* üzerinde antifungal etki göstermesi sebebiyle ileride yapılacak araştırmalarla fungusit olarak kullanılma potansiyeline sahip olabileceği düşünölmektedir.

Bu sonuçların ışığı altında bitkilerden elde edilen ekstraktların doğal olmaları, insan sağılığını ve doğayı tehdit etmemeleri nedeniyle sentetik pestisitlere alternatif olacağını ve gelecek açısından ümit verici olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenlerden dolayı, *N. meyeri*'den elde edilen doğal kaynaklı allelokimyasalların kullanımı üzerine yapılan çalışmaların artırılması ve yaptığımız bu çalışmanın gelecekte yapılacak yeni çalışmalara ışık tutması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Abdolahi, A., Hassani, A., Ghosta, Y., Bernousi, I., Meshkatsabad, M., H., 2009a. Use of thyme and sweet bacil essential oil to increase of storage of table grape cv. Tabarze. 6th International Postharvest Symposium, Antalya.
- Abdolahi, A., Hassani, A., Ghosta, Y., Bernousi, I., Meshkatsadat, MH., 2009b. Control of postharvest decay of 'Thompson Seedless' table grape by natural products. 6th International Postharvest Symposium, Antalya.
- Abdolahi, A., Hassani, A., Ghosta, Y., Bernousi, I., Meshkatsadat, M.H., 2010. Study on the potential use of essential oils for decay control and quality preservation of Tabarzeh table grape. Journal of Plant Protection Research, 50(1), 45-52.
- Adongo, J. O., Njue, A. W., Omolo, J. O., Cheplogoi, P. K. and Otaye, D. O., 2012. In vitro inhibition of *Botrytis Cinerea* - causative agent for Grey Mold by crude extracts of basidiomycetes fungi. Science Journal of Biotechnology, doi: 10.7237/sjbt/175.
- Agarwal, S. and Pandey V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. Biologia Plantarum, 48(4), 555-560.
- Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology, Fifth Edition. Elsevier Academic Press., 510-514.
- Akbudak, N., Tezcan, H., Akbudak B., Seniz V., 2006. The effect of harpin protein on plant growth parameters, leaf chlorophyll, leaf colour and percentage rotten fruit of pepper plants inoculated with *Botrytis cinerea*. Scientia Horticulturae, 109, 107-112.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimoza Yayınları*, Konya, 68.
- Albayrak, S., Turak, S., Gökçe, Y., Bozbek, Ö., 2002. Erzincan ili bağlarında fungal hastalık etmenlerinin belirlenmesi üzerinde ön çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 42 (1-4), 81-90.
- Albayrak, A., 2006. Ceviz yaprak özütleri ve juglonun bazı miroorganizmalar üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Albayrak, S., Karadoğan, B., Bozbek, Ö., Tuncer, S., Kalkan, N. N., 2011. Erzincan ili bağlarında Bağ küllemesi [*Erysiphe necator* Schw. (*Uncinula necator* Schw.) Burr.] hastalığının mücadelesinde tahmin-uyarı modellerinden yararlanma olanakları üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 51(2), 101-117.
- Alejo-Iturdiva, F., Marquez-Lucio, M.A., Morales- Ramirez, I., Vazquez Garciduenas, M.O., Olalde-Portugal, V., 2008. Mycorrhizal protection of chili plants challenged by *Phytophthora capsici*. Eur. J. Plant Pathology, 120, 13-20.
- Alexieva, V., Ivanov, S., Sergiev, I., Karanov, E., 2003. Interaction between stresses. Bulg. J. Plant Physiol., Special Issue, 1-17.
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P., 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. J. Plant Physiol., 159, 685-693.
- Angelini, R., Manes, F. and Federico, R., 1990. Spatial and functional correlation between daimine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon deetilation and wounding in chick-pea. Planta, 182, 89-96.

- Antunes, F., Han, D., Cadenas, E., 2002. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.*, 33,1260.
- Amaya, I., Botella, MA., Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, MA., Valpuesta, V., 1999. Improved germination under osmotic stress or tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* (457), 80-84.
- Aminifard, M. H., and Mohammadi, S., 2013. Essential oils to control *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo* on plum fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (93), 348–353.
- Anonim, 2014. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Apel, K., and Hirt H., 2004. Reactive oxygen species; metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Asada, K. and Takahashi M., 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, Amsterdam: Elsevier/North Holland, Hotoinhibition, 227–287.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, (85), 235-241.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (55), 373–399.
- Bajpai, V. K., Shukla, S., Kang, S. C., 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technol.*, (99), 8903-8908.
- Bakardjieva, N. and Christov, K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to hight temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W., 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 33, 299-321.
- Bal, E. ve Kök, D., 2011. Kozak Siyahı üzüm çeşidi üzerine hasat sonrası bazı uygulamaların etkisi. *Namık Kemal Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8 (2), 65-76.
- Bauer, D.W. and Beer, S.V., 1991. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 4, 493-499.
- Bayer, R.E., 1994. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26(4), 349.
- Benjlalı, B., Tantadı-Elarakı, A., Ayadı, A., Ihlal, M., 1984. Method to study antimicrobial effects of essential oils: Application to the Antifungal Activity of Six Moroccan Essences. *J. Food Protect.* 47, 748-752.
- Bergmeyer, J. and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* (Third Edition), 190-302, Germany.
- Bhaskara Reddey, M.V., Angers, P., Gosselin, A., Arul, J., 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 8, (47), 1515-1520.
- Bisht, D. S., Joshi, S. C., Padalia, R. C., Mathela, C. S., 2012. Isoiridomyrmecin rich essential oil from *Nepeta erecta* Benth. and its antioxidant activity. *Natural Product Research*, 26 (1), 29–35.
- Bouchra C., Achouri M., Hassani L.M. I. and Hmamouchi M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: *Fr. Journal of Ethnopharmacology*, 89, 165–169.

- Bourrel, C., Perineau, F., Michel, G., Bessiere, J.M., 1993. Catnip (*Nepeta cataria* L.) essential oil analysis of chemical constituents, bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal Essent Oil Research*, 5(2), 159–167.
- Bowler, C., Montagu, M.V., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 83–116.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000. Responses to abiotic stresses, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, W. Gruissem, B. Buchanan, R.Jones (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 158–1249.
- Bunkelmann, J.R. and Trelease, R.N., 1996. Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes, *Plant Physiol.*, (110), 589–598.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 1999. Tietz textbook of clinical chemistry. W.B. Saunders Company, 3rd ed., Philadelphia, 1838.
- Caillot, S., Rat, S., Tavernier, M-L., Michaud, P., Kovensky, J., Wadouachi, A., Clément, C., Baillieul, F., Petit, E., 2012. Native and sulfated oligoglucuronans as elicitors of defence-related responses inducing protection against *Botrytis cinerea* of *Vitis vinifera*. *Carbohydrate Polymers*, (87), 1728–1736.
- Cappellini, R.A., Ceponis, M.J., Lightner, G.W., 1986. Disorders in table grape shipments to the New York market 1972–1984. *Plant Disease*, (70), 1075–1079.
- Catalano, S., Cioni, P. L., Panizzi L., Moelli I., 1998. Antimicrobial activity of extracts of *Mutisia acuminata* var. *acuminata*. *J. Ethnopharmacol*, (59), 207–209.
- Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949–962.
- Cicerali N. I., 2004. Effect of stress on antioxidant defense systems of sensitive and resistant cultivars of lentil (*Lens culinaris* M), Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara.
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R., 1980. The Biology of *Botrytis*. Academic Pres., 318.
- Çalmasur, O., Aslan, I., Sahin, F., 2006. Insecticidal and acaricidal effect of three *Lamiaceae* plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Industrial Crops and Products*, 23,140–146.
- Çelik, H., Ağaoğlu, Y. S., Fidan, Y., Maraslı, B., Söylemezoğlu, G., 1998. Genel bağcılık. Ankara.
- Daferera, D. J., Basil, N. Z., Polissiou, M. G., 2002. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* sub sp. *Michiganensis*, *Crop Protection*, (22), 39–44.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, R., Linssen, JPH., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science of Food and Agriculture* 77, 140–146.
- Deans, S., G. and Svoboda, K. P., 1990. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. *Flavour Frag. J*, 5, 187–190.
- Delen, N., Yıldız, M., Maraite, H. 1984. Benzimidazole and Dithiocarbamate resistance of *Botrytis cinerea* on greenhouse crops in Turkey. *Mededelingen in Viticulture ed Enologia Universita Torino*, (9), 278–279.

- Delen, N., 2001. Başlarda fungal kaynaklı salkım çürüklükleri konusunda çalışmalar. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, Tekirdaē.
- Delen, N. ve Koplay, C., 2002. Başlarda kurşuni küf hastalıēı etmeni *Botrytis cinerea* ile kimyasal savaşım konusunda çalışmalar. Türkiye V. Baēcılık ve şarapçılık Sempozyumu, Bildiriler, Nevşehir.
- Deliere L., Miclot A. S., Sauris P., Rey P., Calonnec A., 2010. Efficacy of fungicides with various modes of action in controlling the early stages of an *Erysiphe necator*-induced epidemic. Society of Chemical Industry, 66, 1367–1373.
- Demir, M., 2009. Marulda *Botrytis cinerea*'ya karşı in vitro koşullarda biyolojik savaşım olanakları üzerine bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdaē.
- Demiral, T., 2003. Genç prinç fidelerine dışarıdan glisinbetain uygulamasıyla, tuza toleransının artırılmasında antioksidant enzim aktivitelerinin rolünün araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Demirci, E., 1996. Fungisitlere karşı dayanıklılıēın gelişimi ve yönetimi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27 (4), 576-588.
- Demiryürek, İ., 2006. *Vitis Vinifera* L. Çekirdek Yaēının Fitoterapide Deēerlendirilmesi. Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Ankara Üniversitesi Saēlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Bright, J., Harrison, J., Weir, I., Hooley, R., Neill, S.J., 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. Plant Physiol., (137), 831–834.
- Dinler, O., Yavuz, O., 2010. Repellent compounds used for protection from ticks and their toxicological evaluation. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 67 (4), 199 -212.
- Dirmenci, T., 2003. Türkiye'de yetişen *Nepeta* L. (Lamiaceae) türleri üzerinde taksonomik araştırmalar. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Dolar, F. S., Demirci, E., Basım, H., Demirci, F., Elibüyük, İ. Ö., 2011. Fitopatoloji. Eskişehir.
- Dulger, B. and Hacıoēlu, N., 2008 a. Antifungal activity of endemic *Satureja icarica*. Asian J. Chem., (20), 6505-6508.
- Dulger, B. and Hacıoēlu, N., 2008 b. Antifungal activity of endemic *Salvia tigrina* in Turkey. Tropical J. Pharm. Res., (7), 1051-1054.
- Durmuş, N., 2003. Büyüme yi düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., 2004. *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Springer, The Netherlands.
- Elstner, E.F. and Heupel, A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish. Planta, 130, 175-180.
- Erdei, S., Hegedüs, A., Hauptmann, G., Szalai, J., Horvath, G., 2002. Heavy metal induced physiological changes in the antioxidative response system, Acta Biol Szeged, 46 3–4, 89–90.
- Erkan, M., Ataç, Ö., Altındışlı, M. A., Göven, L., Erkılıç, S., Tokgönül, C., Kaplan, A., 2002. Baē entegre mücadele teknik talimatı, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüēü, Bitki Saēlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı. 96.

- Esmaeili, A., Rustaiyan, A., Masoudi, S., Nadji, K., 2006. Composition of the essential oils of *Mentha aquatica* L. and *Nepeta meyeri* Benth. from Iran. J Essent Oil Res., 18, 263–265.
- Eşiz Dereboylu, A., Tort, N., 2010. Bazı aktivatör ve fungusit uygulamalarının *Cucumis sativus* L. (hıyar) bitkisinde verim-kalite üzerine etkisi. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 31(1), 30-42.
- Foyer, C. H. and Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta. 133, 21-25.
- Foyer, C.H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., Pruvost, C., Jouanin, L., 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. Plant Physiol, (109), 1047–1057.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M., 1997. Hydrogen Peroxide and Glutathione Associated Mechanisms of Acclimatory Stress Tolerance and Signalling. Physiol. Plant., (100), 241-254.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical. Arch. Biochem. Biophys.,(247), 1-11.
- Gara, D.L., Pinto, M.C. and Tommasi, F., 2003. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. Plant Physiology and Biochemistry, 41, 863–870.
- Gayosa, C., Pomar, F., Merino, F., Bernal, M.A., 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. Scientia Horticultures, 102 (1), 1-13.
- Gechev, T., Gadjev, I., Breusegem, F. V., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. CMLS, (59), 708-714.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L. and Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in ‘Braeburn’ apple in related to its browning disorder. Bot. Bull. Acad. Sin., 42, 259- 264.
- Göktaş, A., 2008. Üzüm yetiştiriciliği. Eğridir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, (18), 1-22.
- Gözener, B., Kaya, Y., Sayılı, M., 2014. Erzincan İli Üzümlü İlçesinde Cimin Üzümlü Üretimi ve Pazarlama Durumu, Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi(9), 74-80.
- Grbić, M. L., Stupar, M., Vukojević, J., Soković, M., Mišić, D., Grubišić, D., Ristić, M., 2008. Antifungal activity of *Nepeta rtanjensis* essential oil. Journal of the Serbian Chemical Society,. 73 (10), 961–965.
- Grbić, M. L., Stupar, M., Vukojević, J., Grubišić, D., 2011. Inhibitory effect of essential oil from *Nepeta rtanjensis* on fungal spore germination. Central European Journal of Biology, 6(4), 583-586.
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E. G., Coban, S. and Sahin, O. 2006. Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. Scientia Horticulturae, 110, 279-284.
- Güler, N.S., 2008. *Ctenanthe setosa*’da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Hadacek, F. and Harald, G., 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice, *Phytochemical Analysis*, 11, 137-147.
- Halliwell, B., 1984. Toxic effects of oxygen on plant tissues, in: *Chloroplast metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*. Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutri. Rev.*, (52), 253-265.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1998. Mechanisms of damage to cellular targets by oxidative stress: lipid peroxidation, In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Editors, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Science Publication.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, (141), 312-322.
- He, Y.L., Liu, Y.L., Cao, W.X., Huai, M.F., Xu, B.G., Huang, B.G., 2005. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. *Crop Sci.*, 45, 988-995.
- Hou, W., Liang, H., Wang, C., Liu, D., 2004. Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, (25), 2926-2931.
- İşcan, G., Köse, Y. B., Demirci, B., Can Başer, K. H., 2011. Anticandidal activity of the essential oil of *Nepeta transcaucasica* Grossh.. *Chemistry & Biodiversity*, (8), 2144-2148.
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk. J. Biol.*, (32), 79-83.
- Jones, H.G. and Jones, M.B., 1989. Introduction: some terminology and common mechanisms, *Plants Under Stress*, H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones (eds), Cambridge University Press, Cambridge, 1-10.
- Kaçar, Ö., 2000. Soğanda tohumla ve toprakla taşınan funguslar üzerine bazı bitki ekstraktları ve kompost ekstraktları uygulamalarının etkinliği. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı.
- Kan, J. A.L. V., 2005. Infection Strategies of *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae*, 77-90.
- Kang, N.M., 2008. Inhibition of powdery mildew development and activation of antioxidant enzymes by induction of oxidative stress with foliar application of a mixture of riboflavin and methionine in cucumber . *Scientia Horticulturae*, 118(3), 181.
- Karacif, E., 2012. *Erwinia amylovora* enfeksiyonundan sonra elma ve armut çeşitlerindeki bazı antioksidatif enzim seviyelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı.
- Kaya, D., Günç Ergönül, P., 2015. Uçucu yağları elde etme yöntemleri. *Gıda*, 40 (5), 303-310.
- Kısmalı İ., 1996. Genel Bağcılık. İzmir.
- Kocaçalışkan İ., 2004. Bitkilerde Allelopati. Kütahya.
- Koçak, R., 2004. Bitki patojenlerine karşı bazı bitki ekstrakt ve uçucu yağlarının antifungal etkileri. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Koplay, C., 2003. Sofralık sultani üzümde fungal kaynaklı çürüklük patojenlerinin saptanması ve *in-vitro* koşullarda etkili fungusitlerle önlenmesi üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Kordali, S., Usanmaz, A., Cakir, A., Cavusoğlu, A., Ercisli, S., 2013. In vitro antifungal effect of essential oils from *Nepeta meyeri* Benth. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 23(2), 209-213.
- Kordali, S., Tazegul, A., Cakir, A., 2015. Phytotoxic effects of *Nepeta meyeri* Benth. extracts and essential oil on seed germinations and seedling growths of four weed species. Rec. Nat. Prod., 9 (3), 404-418.
- Kökçil, G., Tanker, M., Kurucu, S., Topçu, G., 1997. Essential oil analysis of *Nepeta cilicia* Boiss.. Flavour and Fragrance Journal, (12), 99-101.
- Köycü, N. D., Özer, N., Özer, C., 2005. Önemli şaraplık üzüm çeşitlerinin Tekirdağ ili ekolojik koşullarında kurşuni küf hastalığına karşı reaksiyonları. Türkiye 6. Bağcılık Sempozyumu. Tekirdağ.
- Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., Johri, A.K. 2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. Microbiology, 155, 780-790.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Kuz'niak, E. and Sklodowska, M., 2001. Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. Plant Science, 160, 723-731.
- Kuzniak, E. and Sklodowska, M., 2005. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. Planta, 222 (1), 192-200.
- Lee, J. P., Lee, S-W., Kim, C. S., Son, J. H., Song, J. H., Lee, K. Y., Kim, H. J., Jung, S. J., Moon, B. J., 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Biological control, 37 (3), 329-337.
- Lee, S.H., Chang, K. S., Su, M. S., Huang Y. S., Jang, H. D., 2007. Effects of some chinese medicinal plant extracts on five different fungi. Food Control, (18), 1547-1554.
- Lichtenthaller, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology. 148, 350-382.
- Limones, C.G., Hervas, A., Cortes, J.A.N., Diaz, R.M.J., Tena, M., 2002. Induction of antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions chickpea and *Fusarium oxysporium* f.sp. *ciceris*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 61, 325-337.
- Liu, Y., Jiang, H., Zhao, Z., An, L., 2010. Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. Plant physiology and Biochemistry. 48, 936-944.
- Małolepsza, U., Urbanek, H., 2000. The oxidants and antioxidant enzymes in tomato leaves treated with o-hydroxyethylrutin and infected with *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology, (106), 657-665.

- Małolepsza, U. and Rozalska, S., 2005. Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance. Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in ohydroxyethylrutin- induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol Biochemistry*, 43(6), 623-635.
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J.M., Bailén, G., Zapata, P., Serrano, M., Castillo, S., Valero, D., 2007. Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology*, (115), 144-148.
- Mayer, A. M., Staples, R. C., Gil-ad, N. L., 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in host expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, (58), 33-41.
- McClellan, D.W. and Hewitt, W.B., 1973. Early *Botrytis* rot of grapes: Time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera*. *Phytopathology*, (63), 1151-1157.
- McClung, C.R., 1997. Regulation of catalases in Arabidopsis. *Free Radical Bio. Med.*, (23), 489-496.
- Mermer Doğu, D., Zobar, D., 2014. Effects of Some Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea* and *Tetranychus urticae* on Grapevine. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 1, 1268-1273.
- Miclea, R., Puia, C., 2010. In vitro Control of the Fungus *Botrytis cinerea* Pers. with Plant Extracts. *Bulletin UASVM Agriculture*, 67(1), 181-186.
- Mohammi, M. and Kazemi, H., 2002. Changes in peroxidase and polyphenol activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162, 491-498.
- Miller, G., Suzuki, N., Çiftci-Yılmaz, S., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses, *Plant, Cell and Environment*, 33, 453-467.
- Mojaba, F., Nickavara, B., Tehrania, H. H., 2009. Essential oil analysis of *Nepeta crispa* and *N. menthoides* from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 43-46.
- Moret, A., Nadal, M., Munoz, Z. 2003. Assay of the fungicidal action of acetylsalicylic acid on *Botrytis cinerea*. XIII. International *Botrytis* Symposium, New York.
- Mothana, R. A., 2012. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *nepeta deflersiana* growing in Yemen. *Records of naturel products*, 6 (2), 189-193.
- Mutlu, S., 2009. Salisilik asidin arpada(*Hordeum vulgare* L.) soğuk toleransını sağlama ve apoplastik ile simplastik proteinler üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., Atici O., 2009. Allelopathic effect of *Nepeta meyeri* Benth. extracts on seed germination and seedling growth of some crop plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, (31), 89-93.
- Mutlu, S., Atıcı, Ö., Esim, N., Mete, E., 2010a. Essential oil of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stres in early seedlings of various weed species.
- Mutlu, S., Atici O., Esim N., 2010b. Bioherbicidal effects of essential oils of *Nepeta meyeri* Benth.on weed spp.. *Allelopathy Journal*, 26(2), 291-300.

- Mutlu, S., Atici, O., Esim, N., Mete, E., 2011. Essential oils of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stress in early seedlings of various weed species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 943-951.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.*, 22(5), 867-880.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, (53), 1237-1242.
- Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2002. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol.*, 348, 260-270.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative stress is related to exercise tolerance in patients with heart failure. *Am. Heart. J.*, (135), 115.
- Neuenschwander, U., Vernoloci, B., Friderich, L., Uknes, S., Kessman, H. and Ryals, J., 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? . *Plant Journal*, (8), 227-233.
- Noctor, G. 1998. Ascorbate and glutathione : Keeping active oxygen under control. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, (49), 249-279.
- Nostro, A., Cannatelli, M.A., Crisafi, G., Alonzo, V., 2001. The effect of *Nepeta cataria* extract on enzyme production of *Staphylococcus aureus*. *International Journal Antimicrobial Agents* 18, 583-585.
- Özcan, M. and Boyraz, N., 2000. Antifungal properties of some herb decoctions. *Eur Food Res Technol.*, 212, 86-88.
- Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001. Genetik mühendisliği ve uygulamaları. *Bitki Biyoteknolojisi II*, S. Ü. Vakfı Yayınları, Konya, 261.
- Özden, M., Vardin, H., Şimşek, M., Karaaslan, M., 2010. Effects of rootstock and irrigation levels on grape quality of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *African Journal of Biotechnology*, 9(25), 3801-3807.
- Patykowski, J., and Urbanek, H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153-161.
- Patykowski, j., Urbanek, H., 2005. The activity of antioxidative enzymes, contents of H₂O₂ and of ascorbate in tomato leaves of cultivars more or less sensitive to infection with *Botrytis cinerea*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2 (27), 193-203.
- Patykowski, J., 2006. Role of hydrogen peroxide and apoplastic peroxidase in tomato - *Botrytis cinerea* interaction. *Acta Physiologiae Plantarum*, 6 (28), 589-598.
- Paulitz, T C, Bélanger, R R, 2001. Biological control in Greenhouse Systems. *Annual Review of Phytopathology*, (39), 103-133.
- Pietrowska, E., Różalska, S., Kaźmierczak, A., Nawrocka, J., Małolepsza, U., 2015. Reactive oxygen and nitrogen (ROS and RNS) species generation and cell death in tomato suspension cultures—*Botrytis cinerea* interaction. *Protoplasma*, 252, 307-319.
- Posmyk, M.M., Bailly C., Szafranska K., Janas K.M., Corbineau F., 2005, Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings, *J. Plant Physiol.*, (162), 403-412.
- Prasad, K.N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., Jiang, Y., 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 627-632.

- Prochazkova, D., Sairam R. K., Srivastava, G. C., Singh D. V., 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161, 765-771.
- Qasem, J. R., Abu-Blan, H. A., 1995. Antifungal activity of aqueous extract from some common weed species. *Annals of Applied Biology*, (127), 215-219.
- Qin, G., Zong, Y., Chen, Q., Hua D. and Tian, S., 2010. Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, (138), 145–150.
- Raychaudhuri, S. S., 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *Botanical Review*, 66(1), 89-98.
- Reigosa, MJ., Pedrol Nuria, and Gonzales Luis., 2006. Allelopathy, A Physiological Process with Ecological Implication. Published by Springer, AA Dordrecht, The Netherlands.
- Rigano, D., Nelly, A. A., Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Piozzi, F., Senatore, F., 2011. Characterisation of the essential oil of *Nepeta glomerata* montbret et Aucher ex Benthham from Lebanon and its biological activities. *Natural Product Research*, 6(25), 614-626.
- Rosslenbroich, H. J., Stuebler, D., 2000. *Botrytis cinerea* history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, (19), 557-561.
- Rossi, F. R., Gárriz, A., Marina, M., Romero, F. M., Gonzalez M. E., Collado I. G. and Pieckenstein F.L., 2011. The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *The American Phytopathological Society*, 24 (8), 888-896.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 2000. *In vitro* rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker, *Plant Growth Regul.*, (305), 215–219.
- Rustioni, L., Milani, C., Parisi, S., Failla O., 2015. Chlorophyll role in berry sunburn symptoms studied in different grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 185, 145–150.
- Sairam, R. K. and Srivastava, G. C., 2002. Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162, 897-904.
- Sairam, R. K., Rao, K. V., Srivastava, G. C., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163, 103.
- Sajjadi, S. E., Eskandari, B., 2005a. Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta oxyodonta*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(2), 175-177.
- Sajjadi, S. E., Mehregan, I., 2005b. Chemical constituents of the essential oil of *Nepeta daenensis* Boiss.. *Journal of Essential Oil Research*, (17), 563-564.
- Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., Cháfer, M., 2011. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, (60), 57–63.
- Sarpeleh, A., Sharifi, K., Sonbolkar, A., 2009. Evidence of antifungal activity of wild rue (*Peganum harmala* L.) on Phytopathogenic Fungi. *J. Plant Dis. Protect.*, (116), 208-213.

- Satyajit, D.S., Zahid, L., Alexander, I.G., 2006. Natural products isolation. 2nd ed. / edited by Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, Alexander I. Gray. Methods in Biotechnology, 20, Humana Press Inc.
- Schnee, S., Queiroz, E. F., Voinesco, F., Marcourt, L., Dubuis, P. H., Wolfender, J. L., Gindro, K., 2013. *Vitis vinifera* Canes, a New Source of Antifungal Compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 5459–5467.
- Seçkin, B. 2005. Mannitolün tuz stresine maruz bırakılan buğday fidelerinin antioksidant enzim düzeyleri üzerindeki etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Sefidkon, F., Shaabani, A., 2004. Essential oil composition from *Nepeta meyeri* Benth from Iran. Flavour Fragr J., 19, 236–238.
- Serrano, M., Miguel Valverde, J., Guilleán, F., Castillo, S., Martiánez-Romero, D., Valero D., 2006. Use of Aloe vera gel coating preserves the functional properties of table grapes. J. Agric. Food Chem., (54), 3882-3886.
- Sgherry, C.L.M., Pinzino C., Navari-Izzo, F., 1996. Sunflower seedlings subjected to increasing water stress by water deficit: changes in O_2^- production related to the composition of thylakoid membranes. Physiol. Plant, 96, 446-452.
- Sharma, P., Dubey R.S., 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation, 46, 209-221.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, V., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. Journal of Experimental Botany, 53(372), 1305-1319.
- Singh, A.K., Dikshit, A., Sharma, M. L., Dixit, S. N., 1980. Fungitoxic activity of some essential oils. Econ. Bot., 34, 186-190.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2003. Allelopathic interactions and allelochemicals. Critical Reviews in Plant Sciences, (22), 239-311.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, S., Arora, K., Kohli, R.K., 2006. α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. Annals of Botany, (98), 1261-1269.
- Singh, H.P., Kaur, S., Mittal, S., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2009. Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibits plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. Journal of Chemical Ecology, (35), 154-162.
- Sıstı, M., Santi, M. D., Fraternali, D., Ninfalı, P., Scoccianti V., Brandi, G., 2008. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized *in vitro* Culture. LWT- Food Sci. Technol., (41), 946–950.
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Basalah, M.O., 2010. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. Protoplasma, 248(3), 447-55.
- Sivritepe, N., Kumral, N.A., Ertürk, U., Yerlikaya, C., Kumral, A., 2009. Responses of grapevine to two spotted spider mite mediated biotic stress. Journal of Biological Sciences, 9 (4), 311-318.
- Skaltsa, H. D., Lazari, D. M., Loukis, A. E., Constantinidis, T., 2000. Essential oil analysis of *Nepeta argolica* Bory & Chaub. subsp. *argolica* (Lamiaceae) growing wild in Greece. Flavour and Fragrance Journal, (15), 96-99.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. Mechanisms of Ageing and Development, (122), 617-657.

- Stadtman, E.R., 2002, Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597-604.
- Stahl, W. and Sies, H., 2002. Introduction: Reactive oxygen species, research monographs, 1-2.
- Tazegül Çavuşoğlu A., 2012. *Nepeta meyeri* Benth. (Kedi nanesi) uçucu yağ ve ekstraktlarının herbisidal etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tegegne, G. and Pretorius, J. C., 2007. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of crude extracts and powdered dry material from ethiopian wild plants against economically important plant pathogens. *BioControl*, (52), 877-888.
- Tehrani, A., Selahvarzia, Y., Kharrazia, M., Jahan Bakhsh V., 2011. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances. *Industrial Crops and Products*, (34), 1523- 1527.
- Topolovec-Pintarić, S., 2009. Resistance risk to new botryticides in *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in winegrowing areas in Croatia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116 (2), 73-77.
- Tosun, N., Akı, C., Karabay, N.Ü., Türküsay, H., 2001. Domateste kurşuni küfün (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr.) kontrolünde fungusitler ve biostimulantların etkileri. Türkiye IX. Fitopatoloji kongresi, Edirne.
- Tozlu, C., 2001. Sofralık üzüm çeşitlerinin muhafazası ve pazarlanması aşamalarında kükürt dioksit (SO₂) kalıntı düzeylerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Tripathi, S. C., Singh, S. P., Dube, S., 1985. Studies on antifungal properties of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. *Journal of phytopathology*, (116), 113-120.
- Tripathi, P., Dubey, N. K., and Shukla, A. K., 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J Microbiol Biotechnol*, (24), 39-46.
- Türküsay, H. ve Onoğur, E., 1998. Bazı bitki ekstraktlarının *in vitro* antifungal etkileri üzerine araştırmalar. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, (22), 267-271.
- Tzakou, O., Harvala, C., Galati, E. M., Sanogo, R., 2000. Essential oil composition of *Nepeta argolica* Bory et Chaub. subsp. *argolica*. *Flavour and Fragrance Journal*, (15), 115-118.
- Vallejo, I., Carbu, M., Rebordinos, L., Cantoral, J. M., 2003. Virulence of *Botrytis cinerea* strains on two grapevine varieties in South-Western Spain. *Biologia Bratislava*, 58, 1067-1074.
- Valverde, J.M., Valero, D., Martı́nez-Romero, D., Guilleán, F.N., Castillo, S., Serrano, M., 2005. Novel Edible Coating Based on Aloe vera Gel To Maintain Table Grape Quality and Safety. *J. Agric. Food Chem*, 53, 7807-7813.
- Van, Camp, W., Capiou, K., Van Montagu, M., Inze, D., and Slooten, L., 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe- superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiol*, (112), 1703-1714.

- Vio-Michaelis, S., Apablaza-Hidalgo, G., Gómez, M., Peña-Vera, R. and Montenegro, G., 2012. Antifungal activity of three Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. Botanical Sciences, 90 (2), 179-183.
- Vyvyan, J.R., 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. Tetrahedron, (58), 1631-1646.
- Walter, M., Jaspers, M.V., Eade, K., Frampton, C.M., Stewart, A., 2001. Control of *Botrytis cinerea* in grape using thyme oil. Australasian Plant Pathology, 30, 21-25.
- Weston, A.L., Duke, S.O., 2003. Weed and crop allelopathy. Critical Reviews in Plant Sciences, (22), 367-389.
- Willis, R.J., 2007. The History of Allelopathy, Published by Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Xu, W., Peng, X., Luo, Y., Wang, J., Guo, X., Huang, K., 2009. Physiological and biochemical responses of grapefruit seed extract dip on 'Redglobe' grape. LWT - Food Science and Technology, 42, 471-476.
- Yağmur, Y., 2008. Farklı asma (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerinin kuraklık stresine karşı bazı fizyolojik ve biyokimyasal tolerans parametrelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yang, Y., Sun, C., Yao, Y., Zhang, Y., Achal, V., 2011. Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* "Combier") to excess zinc. Acta Physiologiae Plantarum, 33 (4), 1483-1491.
- Yazar, K., 2013. Üzüm (*Vitis vinifera* L.) çekirdeği yağının sofralık üzüm muhafazasına etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Konya.
- Ye, Z., Rodriguez, R., Tran, A., Hoang, H., Los Santos, D. D., Brown, S. And Vellanoweth. 2000. The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci., 158, 115-127.
- Ye, S.F., Zhou, Y.H., Sun, Y., Zou, L.Y., Yu, J.Q., 2006. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt, Environmental and Experimental Botany, 56, 255-262.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. and Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. Environ. Exp. Bot., 1-13.
- Yılar, M., 2007. *Polygonum cognatum* Meissn. (madımak) 'un allelopatik potansiyelinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Tokat.
- Yıldız, F., 1991. In vitro investigations on the antagonistic effects of several isolates against *Botrytis cinerea*. The Journal of Turkish Phytopathology, 20 (1), 11-22.
- Yılmaz, S. and Ozan, T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki, Türk Biyokimya Dergisi, 28, (4), 252-256.
- Zhang, J. and Kirkham, M. B., 1996. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. J. Plant Physiol., 149, 489-493.

- Zhu, J., Dong, CH. and Zhu, J., 2007. Interplay between coldresponsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 290-295.
- Zhu, Z., Tian, S, 2012. Resistant responses of tomato fruit treated with exogenous methyl jasmonate to *Botrytis cinerea* infection. *Scientia Horticulturae*, 142, 38–43.



ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Erzincan'da doğdu. İlkokulu, ortaokulu ve liseyi Erzincan'da bitirdikten sonra 2003-2008 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitim gördü. 2008- 2009 yıllarında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitiminde Tezsiz Yüksek Lisanstan mezun oldu. 2011 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde Tezli Yüksek Lisansını tamamladı. 2011 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora öğrenimine devam etmektedir. Eylül 2012 de Hakkari Üniversitesine Öğretim Görevlisi olarak atandı, halen bu göreve devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.