

Rezene ve Defne Uçucu Yağ Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin ve *Pestalotiopsis funerea*'ya Karşı Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi

Merve KARA¹, Musa TÜRKMEN², Soner SOYLU³

^{1,3}Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü 31034 Antakya-HATAY, ²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü 31034 Antakya-HATAY

¹<https://orcid.org/0000-0001-7320-3376>, ²<https://orcid.org/0000-0001-9914-9523>, ³<https://orcid.org/0000-0003-1002-8958>

✉: soylu@mku.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, farklı oranlarda harmanlanmış rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.) ve defne (*Laurus nobilis* L.) uçucu yağ karışımlarının kimyasal bileşimleri ve *P. funerea*'ya karşı antifungal etkileri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Uçucu yağların kimyasal bileşimleri, GC-MS analizi kullanılarak belirlenmiştir. Uçucu yağların buhar fazındaki farklı konsantrasyonların misel gelişimi ve konidi çimlenmesinin engellemesi üzerine antifungal etkileri *in vitro* koşullarda belirlenmiştir. Uçucu yağ karışımlarının en etkili olduğu konsantrasyonlarda fungus hifi ve konidi morfolojisinde neden olduğu etkileri ışık mikroskobu altında incelenmiştir. GC-MS ile yapılan kimyasal analizler sonucunda eucalyptol (%52.88) ve *trans*-anethole (%81.55)'ün defne ve rezene uçucu yağlarının ana bileşenleri olduğu belirlenmiştir. Tek başlarına kullanıldığında rezene ve defne uçucu yağları *P. funerea*'nın misel gelişimini 20.0 ve 25.0 µl petri⁻¹ konsantrasyonlarında tamamen engellemiştir. Rezene/defne uçucu yağlarının harmanlanması ile misel gelişimi ve konidi çimlenmesinin engellenmesinde sinerjik antifungal etki görülmüştür. Rezene: defne uçucu yağların 3:1 oranında harmanlanması antifungal etkinliği önemli düzeyde artırmış olup, nispeten düşük konsantrasyonda (10 µl petri⁻¹) daha yüksek düzeyde antifungal etkinlik göstermiştir. Işık mikroskobu ile yapılan gözlemlerde uçucu yağ harmanlarının en etkili konsantrasyonuna maruz kalan hifler ve konidilerde, sitoplazmik pıhtılaşma, vakuolleşme ve protoplazmik içeriğin hücre dışına akıntısı şeklinde gerçekleşen önemli yapısal deformasyonları gözlenmiştir. Sonuçlar, sinerjik antifungal etki gösteren rezene ve defne uçucu yağ karışımının bitki fungal hastalık etmenlerle mücadelede etkili bir biyofungisit olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 29.03.2021

Kabul Tarihi : 06.05.2021

Anahtar Kelimeler

Uçucu yağ karışımı

Antifungal etkinlik

Sinerjik etki

Pestalotiopsis funerea

Determination of Chemical Composition and Antifungal Activities of Fennel and Laurel Essential Oil Mixtures Against *Pestalotiopsis funerea*

ABSTRACT

In this study, chemical compositions and antifungal activities of different blended essential oils obtained from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and laurel (*Laurus nobilis* L.) were investigated against *P. funerea* *in vitro* conditions. Chemical compositions of essential oils were determined using GC-MS analysis. Antifungal volatile phase effects of different concentrations of essential oils mixtures were determined on inhibition of mycelial growth and conidial germination *in vitro* conditions. The effect of most effective concentrations of essential oil mixtures on the morphology of fungal hypha and conidia were also investigated using light microscope. GC-MS analysis of essential oils revealed that eucalyptol (52.88%) and *trans*-anethole (81.55%) were the major components of laurel and fennel essential oils. Individual use of fennel and laurel essential oils were found to completely inhibit mycelial growth at 20.0 and 25.0 µl petri⁻¹ concentrations, respectively. Dual blending fennel/laurel essential oil

Research Article

Article History

Received : 29.03.2021

Accepted : 06.05.2021

Keywords

Blended essential oil

Antifungal activity

Synergistic effect

Pestalotiopsis funerea

mixtures showed synergistic antifungal activity on inhibition of mycelial growth and conidial germination. By blending fennel and laurel essential oils at proportion of 3:1, antifungal activities were significantly increased that complete mycelial growth and conidial inhibition were recorded at relatively lower concentration (10 µl petri⁻¹). Microscopic observations on hyphae, exposed to volatile phase of the most efficient concentrations of essential oil mixtures, revealed considerable structural deformations such as cytoplasmic coagulation, vacuolization and protoplast leakage from fungal hyphae and conidia. The results showed that blending of fennel and laurel essential oils, which have synergistic antifungal effects, might be used as an effective bio fungicide in management of fungal plant disease agents.

Atıf İçin: Kara M, Türkmen M, Soyulu S 2022. Rezene ve Defne Uçucu Yağ Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin ve *Pestalotiopsis funerea*'ya Karşı Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 113-126. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.904966.

To Cite: Kara M, Türkmen M, Soyulu S 2022. Determination of Chemical Composition and Antifungal Activities of Fennel and Laurel Essential Oil Mixtures Against *Pestalotiopsis funerea*. KSU J. Agric Nat 25 (1): 113-126. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.904966.

GİRİŞ

Monteri servi'si olarakta bilinen limoni servi ağacı (*Cupressus macrocarpa* L.) *Cupressaceae* (Servigiller) familyasında yer alan Kuzey Amerika orijinli, yaprakları limon kokusuna sahip, Akdeniz Bölgesi'nden Himalaya'lara kadar olan bölgede doğal olarak yetişen bir orman ağacıdır. Son yıllarda, park bahçe düzenlemelerinde kozalaklı ağaç türlerinin önem kazanmasıyla limoni servi ağaçlarının şehir park, bahçe, refüj düzenlemelerinin yanı sıra, yazlık siteler, tatil köyleri ve otellerin peyzaj düzenlenmelerinde de kullanımı ciddi düzeyde artış göstermiştir (Salem ve ark., 2018). Kültür bitkilerinde olduğu gibi orman ağaçlarında yaprak, kök, kök boğazı ve gövdelerde farklı fungal türler tarafından çeşitli hastalıklar oluşturmaktadır (Gordon ve ark., 2015). Bu hastalıklardan biride *Pestalotiopsis* spp.'nin sebep olduğu yapraklarda ve sürgün uçlarında kurumalara neden olan fungal hastalıktır (Uysal ve ark., 2021). Söz konusu hastalıklar, özellikle orman fidanlıklarında kozalaklı ağaç türleri ve servi ağacı üretimini sınırlandıran faktörlerin başında gelir. *Pestalotiopsis* spp. arasında yer alan *Pestalotiopsis funerea*, konukçusu olduğu kozalaklı ağaç türlerinde kök çürüklüğü, sürgün ya da sürgün uç yanıklığı, geriye doğru ölüm ve gövde kanseri olarak adlandırılan hastalıklara sebep olmaktadır (Sinclair ve ark., 1993; Bajo ve ark., 2008). Hastalık etmeninin kompleks yapısının yanı sıra, farklı fungal türler ile etkileşime girmesi nedeniyle hastalığın görüldüğü ülkelerde hastalıkla mücadelede etkili olabilecek herhangi bir fungusit tavsiyesi bulunmamaktadır. Orman ağaçlarında sorun olan diğer hastalık etmenlerinin mücadelesinde kullanılan fungusitlerin sınırlı etkinliği, kullanılan fungusitlere karşı etmenlerin dayanıklı izolatlarının gelişimi, fungusitlerin hedef dışı yararlı mikroorganizmalara olan yan etkileri bu tür hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Staub, 1991).

Hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerden biride antifungal etkinlik gösteren bitki ekstrakt ve uçucu yağlarının kullanılmasıdır (Bakkali ve ark., 2008; Nazzaro ve ark., 2017). Günümüzde bu konuda yapılan çalışmalar daha çok uçucu yağların kimyasal bileşenleri ve antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılması üzerine kurgulanmıştır. Farklı türlere ait uçucu yağların antimikrobiyal etkinlikleri farklılık gösterebilir. Bazı bitkilerden elde edilen uçucu yağ verimleri (birim miktardaki bitki materyalinden elde edilen uçucu yağ miktarı) yüksek olmasına rağmen uçucu yağların antimikrobiyal etkinlikleri düşük olabilirken, bazı bitkilerin uçucu yağlarının yüksek antimikrobiyal etkinliklerine kıyasla uçucu yağ verimleri oldukça düşük olabilir. Lauraceae familyasına dahil olan defne (*Laurus nobilis* L.) her daim yeşil kalan, yaprak ve meyveleri ilaç ve parfümeri sanayisinde yoğun olarak kullanılan bir ağaç türü olup (Chahal ve ark., 2017), ülke genelinde özellikle Akdeniz, Ege ve Karadeniz sahil kesimlerinde yoğun şekilde yetişmektedir (Demir ve ark., 2004). Rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.) Umbellifera famiyasına dahil tıbbi, aromatik ve mutfaklarda baharat olarak yoğun şekilde kullanılan bitkidir. Yakın zamanda yapılmış olan çalışmada, rezene ve defne uçucu yağlarının kimyasal bileşenleri belirlenmiş olup, uçucu yağların hastalık etmeni *P. funerea*'nın misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan etkinlikleri arasında önemli farklılığın olduğu ortaya konulmuştur (Kara ve ark., 2020). Uçucu yağlar veya ana bileşenleri tek başına kullanıldığı durumlarda test edildikleri mikroorganizmalara karşı düşük antimikrobiyal etkinlik gösterirken, başka uçucu yağlar veya bileşenler ile karışım şeklinde kullanıldıklarında etkinliklerinde büyük oranda farklılık görülebilir. Antimikrobiyal etkinlikte gözlenen bu değişim genellikle etkinliği düşük olan bileşen(ler)'in başka bir bileşen(ler)'le birlikte sinerjik etkileşime girmesinden kaynaklandığı bilinir. Yapılan

literatür araştırmasında uçucu yağların karışım halinde kullanılması durumunda antimikrobiyal etkinliklerinde olası değişimlerin belirlenmesi üzerine oldukça kısıtlı sayıda çalışmanın bulunduğu görülmüştür. Uçucu yağların karıştırılmalarıyla elde edilen bileşiklerin sinerjik etkileşimleri sonucunda hastalık etmenlerinin fungusitlere karşı olan direncin önlediği, maliyet ve/veya toksik yan etkilerinin azaldığı, farklı mikrobiyal türlere karşı antifungal etki ve etki spektrumlarının arttığı, yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarla bildirilmiştir (Nazzaro ve ark., 2013; Türkmen, 2015; Swamy ve ark., 2016; Hongratanaworakit ve ark., 2017). Rezene ve defne uçucu yağlarının birçok bitki fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı antimikrobiyal etkinliği önceden yapılmış olan çalışmalarda bildirilmiş olup, bitkilerden karışım şeklinde elde edilmiş uçucu yağların limoni servi ağacında sorun hastalık etmeni *P. funerea*'ya karşı antifungal etkinliğinin belirlenmesine yönelik yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, defne (*L. nobilis*) ve rezene (*F. vulgare*) bitkilerinden farklı yöntemler kullanılmak suretiyle elde edilen uçucu yağ karışımlarının kimyasal bileşenleri belirlenmiş ve *in vitro* koşullarda limoni servi sürgün uç yanıklık hastalığı etmeni *P. funerea*'nın misel gelişimi ve konidi çimlenmesi üzerine olan antifungal etkinliği araştırılmıştır. Uçucu yağların fungal etmenin konidi ve misellerinde sebep olduğu morfolojik ve sitoyapısal değişiklikler ayrıca ışık mikroskobu altında araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Uçucu Yağların Elde Edilmesi

Çalışmalarda kullanılan rezene tohumları Antakya ilçesindeki aktarlardan satın alınmış olup, defne yaprakları Samandağ ilçesinde (36°07'56"N 35°56'48"E) doğal olarak yetişen bitkilerden 2019 yılı Haziran ayında toplanmıştır. Her iki bitki materyali oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 200 gr tartılarak 500 ml damıtılmış su (çözücü) içeren cam balonlar içerisine ayrı ayrı konulmuş ve yaklaşık 3-4 saat kaynatılarak Neo-Clevenger aparatı sistemin yan kolunda uçucu yağın toplanması sağlanmıştır (Türkmen ve Mert, 2020). Elde edilen uçucu yağ koyu renkli (amber) cam şişelere konularak; GC-MS analizine kadar buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir.

Uçucu Yağ Karışımlarının Hazırlanması

Su buharı distilasyon yönteminin kullanıldığı uçucu yağ karışımlarında elde edilmesinde iki farklı yöntem uygulanmıştır. İlk yöntemde (Mix-1), rezene tohumları ve defne yaprakları tartılarak sırasıyla % 75:25, % 50:50 ve % 25:75 oranlarında karıştırılmış ve cam balon içerisinde birlikte kaynatılarak uçucu yağları çıkarılmıştır. İkinci yöntemde (Mix-2), ayrı ayrı elde

edilen rezene ve defne uçucu yağları sırasıyla % 75:25, % 50:50 ve % 25:75 oranlarında Eppendorf tüpler içinde doğrudan karıştırılmak suretiyle ayrı ayrı hazırlanmıştır.

Uçucu Yağ ve Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin Belirlenmesi

Uçucu yağlar Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresinde (Thermo Scientific Focus) otomatik örnekleyici (TR-5MS, 5% phenyl-polisilfenilenesiloxan, 60 m x 0.25 mm iç çapı, film kalınlığı 0.25) kullanılarak analiz edilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dakika akış hızına sahip Helyum (99.9%) kullanılmış; iyonlaşma enerjisi 70 eV ve kütle aralığı m/z 50-650 amu olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometresinin transfer hattı ve enjeksiyon bloğu giriş sıcaklığı 220 °C olarak belirlenmiş ve örneklerin enjeksiyonu 250 split oranı ile gerçekleştirilmiştir. Örneklerin enjeksiyon hacmi 1 µL'dir. Fırın sıcaklığı 3 °C dak.⁻¹ artışla 50 °C'den 220 °C'ye kadar artacak şekilde programlanmıştır. Her bir bileşenin oluşturduğu spektrumlar, GC-MS'te Wiley 9 kütüphanesi ile eşleştirilmeleri sonucu tanımlanmıştır (Adam, 2007). Veriler Xcalibur yazılımı kullanılarak işlenmiştir.

Fungal Hastalık Etmeninin İzolasyonu

Fungal hastalık etmeni *P. funerea*, Hatay orman fidalıklarında yetişen enfekteli *C. macrocarpa* fidanlarının gövdelerinden izole edilmiştir. Kurumaların gözlemlendiği dallarda sağlıklı/hastalıklı noktalardan alınan sürgün dokuları öncelikle sodyum hipoklorit (NaOCl) ile 2 dakika süreyle yüzey dezenfeksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Dezenfekte edilen bu doku parçaları, steril saf suda birkaç dakika durulandıktan sonra steril kurutma kağıtlarında kurumaya bırakılmıştır. Dezenfekte edilen bitki dokuları, streptomisin sülfat (100 mg mL⁻¹) içeren Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren petri kaplarına aktarılmış, daha sonra 25 °C'de 5 gün süreyle inkübe edilerek gelişen kolonilerden PDA'ya saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Tür teşhisi, koloni ve sporlarının morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır (Mordue, 1976). Denemelerde tek spordan geliştirmiş fungus izolatu kullanılmıştır.

Uçucu Yağların *P. funerea*'nın Misel Gelişimi ve Konidi Çimlenmesi Üzerine Antifungal Etkisi

Defne ve rezene uçucu yağ karışımlarının *P. funerea*'nın misel gelişimi üzerine buhar fazında antifungal etkileri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır (Soylu ve ark., 2010). Etmeninin tek spor kültürü, 3-5 gün boyunca 25°C'de Potato Dextrose Agar (PDA) ortamında geliştirilmiştir. PDA besi ortamları, steril 90 mm'lik cam petri kaplarına (20 ml petri⁻¹) dökülmüştür. Uçucu yağ karışımlarının farklı konsantrasyonları (0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 µl

petri⁻¹) her bir petri kapağının iç kısmına mikropipet yardımıyla konulmuştur. Hastalık etmeninin 5 günlük kültüründen diskler (6 mm) alınarak PDA besi yeri içeren her bir petri kapının ortasına yerleştirilmiştir. Kontrol olarak uçucu yağ uygulanmayan PDA içeren petri kapları kullanılmıştır.

Uçucu yağ ve karışımların fungal konidilerin çimlenmeleri üzerine olan etkinliği benzer şekilde yapılmıştır. PDA besi ortamları üzerine fungusun steril distile su içinde 10⁴ konidi ml⁻¹ konsantrasyonunda hazırlanmış spor süspansiyonlarından 100 µl alınarak PDA besi yeri üzerine steril cam baget ile yayılmıştır. Uçucu yağ karışımlarının farklı konsantrasyonları (0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 µl petri⁻¹) her bir petri kapağının iç kısmına mikropipet yardımıyla konulmuştur. Kontrol olarak uçucu yağ uygulanmayan PDA içeren petri kapları kullanılmıştır.

Gerek misel gelişimi gerekse konidi çimlenmesinin engellenmesi üzerine olan etkinlik çalışmalarında uygulama yapılan petri kaplarının etrafı parafilm ile sarılarak inkübatörde 25°C'de inkübe edilmiştir. Her bir uçucu yağ ve karışımların farklı konsantrasyonlarının bulunduğu petrilere misel gelişimi günlük takip edilmiş, misel gelişim çapları ölçülmüş ve kontrol uygulamasına göre misel gelişiminin engellenme oranı MGI (%)=((MGc-MGt)/MGc)x100 formülüyle belirlenmiştir. Uçucu yağ ve karışımlarının misel gelişimi üzerine olan etkinliği uygulamadan 4-5 gün sonra, konidi çimlenmeleri üzerine olan etkinlikleri uygulamadan 24 saat sonra yapılan gözlemlerle değerlendirilmiştir. Her uygulamada 100 adet konidi, çim borucuğu oluşturup oluşturmaması yönünden değerlendirilmiştir. Konidi boyu kadar çim borucuğu oluşturan konidilerin çimlendiği kabul edilmiştir.

Uçucu Yağ Karışımlarının Misel ve Konidi Morfolojileri Üzerine Etkisi

Uçucu yağ karışımlarının en etkili konsantrasyonlarının hif morfolojisi üzerindeki etkisi de ışık mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir (Soylu ve ark., 2010; Kara ve ark., 2020). Taze kültürden alınan misel diskleri PDA besi yerine yerleştirildikten sonra herhangi bir yağ karışım uygulaması yapılmaksızın 2-3 gün ön gelişime bırakılmış ve misellerin 20-30 mm çapında gelişimi sağlanmıştır. Benzer şekilde inkübasyondan 24 saat sonra çimlenen konidilerin yer aldığı petrilere, 2-3 gün ön gelişime bırakılmış misellerin yer aldığı petrilere, *in vitro* etkinlik çalışmalarında fungus gelişimini tamamen engelleyen uçucu yağ karışımlarına ait konsantrasyonlar mikropipet yardımıyla petri kapaklarına konulmuş ve kapaklar parafilm ile sarıldıktan sonra tekrar 2 gün 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda PDA besi yerleri üzerinde daha önceden gelişmiş olan misel ve

çimlenmiş konidiler üzerindeki morfolojik değişiklikler Nomarski/DIC ataçmanlı ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japonya) altında değerlendirilmiştir.

İstatistik Analiz

In vitro koşullarda yapılan antifungal etkinlik çalışmalarında, her bir uçucu yağ ve karışım konsantrasyonunun antifungal etkinlikleri üç farklı petride ölçülmüştür. Denemeler 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Antifungal etkinliğinin belirlendiği petrilere misel gelişim çapları ve çimlenen konidi sayıları % engellenme oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı (Versiyon 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve uygulamalar ve konsantrasyonlar arasındaki farklılık Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır (P≤0.05). Uçucu yağların farklı konsantrasyonlarda misel gelişimini ve konidi çimlenmesini %50 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyonları (EC₅₀) SPSS istatistik programı (Versiyon 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Uçucu Yağ ve Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin Belirlenmesi

Defne yapraklarından ve rezene tohumlarından elde edilen uçucu yağları ile bu bitkilerden elde edilen uçucu yağ karışımlarının (Mix-1 ve Mix-2) kimyasal bileşenleri GC-MS ile belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 1 ve Çizelge 2'de gösterilmiştir. Defne yaprağı uçucu yağında toplam 41 bileşen belirlenmiş olup, en yüksek oranda bulunan ana (temel) bileşenlerin sırasıyla aynı zamanda 1,8 cineole olarakta bilinen eucalyptol (%52.88), α-terpinyl acetate (%11.77) ve sabinene (%8.05) olduğu belirlenmiştir. Rezene uçucu yağında toplam 14 farklı kimyasal bileşen belirlenmiş olup, en yüksek oranda tespit edilen ana bileşenler sırasıyla *trans*-anethole (%81.55), estragole (%4.75) ve limonene (%5.88) olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Çalışmada kullanılan defne ve rezene uçucu yağlarında belirlenen ana bileşenler daha önceden yapılmış bir çok farklı çalışmalarda da bildirilmiştir. Elkiran ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada defne tohum ve yapraklarından elde edilen uçucu yağ içeriğinin ana bileşenlerinin eucalyptol ve α-terpinyl acetate olduğu bildirilmiştir. Benzer ana bileşenlerin Türkiye'nin farklı bölgelerinde yetişen defne uçucu yağında bulunduğu dair yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (Ozcan ve Chalchat, 2005; Soylu ve ark., 2006; Türkmen, 2015; Yılmaz ve Deniz, 2017; Taban ve ark., 2018; Kara ve ark., 2020). Önceden yapılmış olan çalışmalarla bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, bileşenlerin oranlarında küçük değişiklikler görülmekle birlikte büyük oranda benzerliğin olduğu görülmüştür. Diğer ana bileşen

Çizelge 1. Mix-1 karışımlarına ait uçucu yağlarda belirlenen kimyasal bileşenlerin oranları (%)

Table 1. Chemical compounds (%) determined in Mix-1 essential oil mixtures

RT	Bileşenler	Uçucu Yağ		Mix-1		
		Rezene* %	Defne* %	R ₇₅ D ₂₅ %	R ₅₀ D ₅₀ %	R ₂₅ D ₇₅ %
3.87	α-Pinene	0.53	5.32	2.22	3.30	4.10
4.64	Camphene	-	0.22	0.10	0.14	0.18
5.49	β-Pinene	0.16	3.65	1.40	2.28	3.05
5.8	Sabinene	0.20	8.05	3.63	5.54	7.98
6.91	β-Myrcene	-	0.67	0.30	0.49	-
7.33	α-Terpinene	-	0.35	0.14	0.32	0.29
7.59	1.8-Epoxy-p-menth-2-ene	-	0.29	0.06	0.10	0.12
7.88	Limonene	5.88	1.33	3.26	2.45	2.39
8.08	Eucalyptol	0.30	52.88	15.25	34.15	42.33
9.35	γ-Terpinene	0.09	0.31	0.27	0.54	0.49
9.59	cis-Ocimene	0.26	0.09	0.11	-	-
10.21	o-Cymene	0.26	1.99	0.46	0.67	0.80
10.58	α-Terpinolene	-	0.14	-	-	0.23
14.65	Fenchone	1.53	-	0.84	0.46	0.26
17.26	trans Sabinene hydrate	-	0.28	0.24	0.31	0.58
20.45	cis-Sabinene hydrate	-	0.19	0.18	0.20	0.40
20.6	Linalool	-	0.79	0.52	0.75	1.34
21.03	Terpineol	-	0.15	0.08	0.09	0.13
21.15	Pinocarvone	-	0.12	0.06	0.06	-
21.62	Endobornyl acetate	-	0.15	0.07	0.09	0.14
21.99	β-Elementene	-	0.58	0.15	0.19	0.28
22.12	trans-Caryophyllene	-	0.92	0.07	0.10	0.17
22.54	Terpinen-4-ol	0.05	2.83	0.68	1.71	1.46
23.43	Myrtenal	-	0.20	-	-	-
23.55	Verbenol	-	0.28	0.19	0.20	0.36
24.31	β-Fenchyl alcohol	-	0.55	0.21	-	0.37
24.46	trans-Pinocarveol	-	0.20	0.06	0.09	0.10
25.23	Estragole	4.75	-	2.87	1.80	-
26.03	α-Terpinyl acetate	-	11.77	4.38	6.95	9.44
26.3	Germacrene -D	-	0.29	-	-	-
26.64	β-Chamigrene	-	0.15	-	-	-
26.85	α-Selinene	-	0.11	-	-	-
27.22	γ-Elementene	-	0.38	0.07	0.09	-
27.38	Carvone	0.94	-	0.59	0.37	0.17
27.5	Limonene oxide	-	0.14	-	0.08	0.17
28.22	Germacrene A	-	0.56	-	-	-
28.84	α-Humulene	-	0.23	-	-	-
29.51	Myrtenol	-	0.13	-	-	0.08
30.9	trans-Anethole	81.55	-	59.32	34.42	18.36
35.72	Caryophyllene oxide	-	0.28	0.09	0.11	0.18
37.24	Methyleugenol	-	0.71	0.46	0.54	1.22
37.51	P-Anisaldehyde	1.76	-	0.26	0.55	-
40.4	Spathulenol	-	0.13	0.08	0.15	0.20
41.49	Cinnamyl Acetate	-	0.08	0.1	-	0.21
41.99	Eugenol	-	0.32	0.23	0.28	-
43.56	β-Eudesmol	-	0.13	0.13	0.11	0.15
Toplam bileşen sayısı		14	41	37	35	33
Toplam bileşen %		98.26	97.94	99.13	99.68	97.73

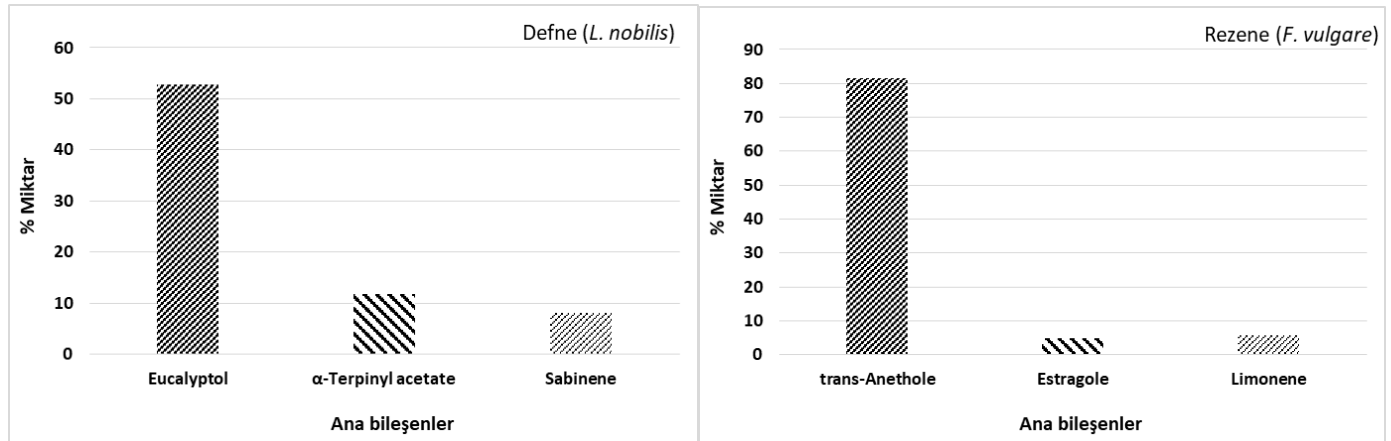
RT: alıkonma zamanı (dak.), *: Kara ve ark., (2020)

Çizelge 2. Mix-2 karışımlarına ait uçucu yağlarda belirlenen kimyasal bileşenler (%)

Table 2. Chemical compounds (%) determined in Mix-2 essential oil mixtures

RT	Bileşenler	Uçucu Yağ		Mix-2		
		Rezene*	Defne*	R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅
		%	%	%	%	%
3.87	α-Pinene	0.53	5.32	1.49	2.10	4.22
4.64	Camphene	-	0.22	0.10	-	0.16
5.49	β-Pinene	0.16	3.65	1.02	1.59	2.64
5.8	Sabinene	0.20	8.05	1.82	3.15	4.15
6.91	β-Myrcene	-	0.67	-	0.32	0.52
7.33	α-Terpinene	-	0.35	0.11	0.13	0.25
7.59	1.8-Epoxy-p-menth-2-ene	-	0.29	0.10	-	-
7.88	Limonene	5.88	1.33	4.97	3.27	2.72
8.08	Eucalyptol	0.30	52.88	11.58	25.23	38.50
9.35	γ-Terpinene	0.09	0.31	0.22	0.26	0.41
9.59	cis-Ocimene	0.26	0.09	0.22	0.14	-
10.21	o-Cymene	0.26	1.99	0.63	1.03	1.52
10.58	α-Terpinolene	-	0.14	-	-	-
14.65	Fenchone	1.53	-	1.19	0.87	0.45
17.26	trans Sabinene hydrate	-	0.28	0.08	0.10	0.20
20.45	cis-Sabinene hydrate	-	0.19	-	-	-
20.6	Linalool	-	0.79	0.19	0.37	0.58
21.03	Terpineol	-	0.15	0.60	-	0.08
21.15	Pinocarvone	-	0.12	-	-	-
21.62	Endobornyl acetate	-	0.15	-	-	-
21.99	β-Elementene	-	0.58	0.16	0.25	0.41
22.12	trans-Caryophyllene	-	0.92	0.18	0.42	0.64
22.54	Terpinen-4-ol	0.05	2.83	-	1.23	1.66
23.43	Myrtenal	-	0.20	0.07	-	-
23.55	Verbenol	-	0.28	0.11	0.14	0.19
24.31	β-Fenchyl alcohol	-	0.55	0.14	0.25	0.41
24.46	trans-Pinocarveol	-	0.20	0.07	0.08	0.18
25.23	Estragole	4.75	-	2.80	2.08	1.57
26.03	α-Terpineneyl acetate	-	11.77	2.43	6.57	9.24
26.3	Germacrene -D	-	0.29	0.08	0.17	0.22
26.64	β-Chamigrene	-	0.15	0.06	-	-
26.85	α-Selinene	-	0.11	-	-	-
27.22	γ-Elementene	-	0.38	-	0.16	0.23
27.38	Carvone	0.94	-	0.73	0.51	0.25
27.5	Limonene oxide	-	0.14	-	-	-
28.22	Germacrene A	-	0.56	-	-	-
28.84	α-Humulene	-	0.23	0.07	0.12	0.17
29.51	Myrtenol	-	0.13	-	-	-
30.9	trans-Anethole	81.55	-	66.86	47.80	26.56
35.72	Caryophyllene oxide	-	0.28	-	0.13	0.19
37.24	Methyleugenol	-	0.71	0.16	0.34	0.50
37.51	P-Anisaldehyde	1.76	-	1.38	0.97	0.50
40.4	Spathulenol	-	0.13	-	-	-
41.49	Cinnamyl Acetate	-	0.08	-	-	-
41.99	Eugenol	-	0.32	-	-	0.23
43.56	β-Eudesmol	-	0.13	-	-	-
Toplam bileşen sayısı		14	41	30	29	31
Toplam bileşen %		98.26	97.94	99.62	99.78	99.55

RT: alıkonma zamanı (dak.), *: Kara ve ark., (2020)

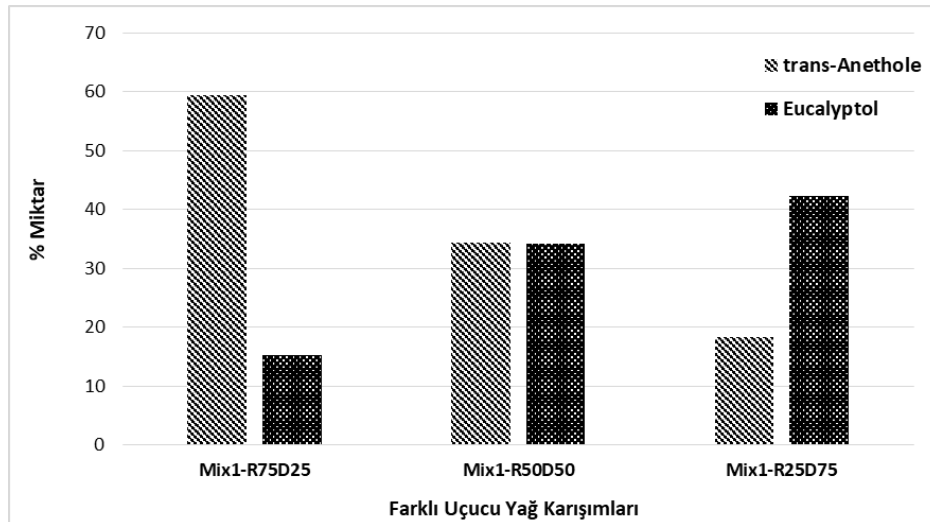


Şekil 1. Defne ve rezene bitki uçucu yağlarında tespit edilen temel bileşenler (%)

Figure 1. Major compounds (%) determined in fennel and laurel essential oils

olan *trans*-anethole'un rezene, yıldız anason ve anason gibi tıbbi, baharat ve aromatik bitkilerin ana bileşeni olduğu önceden yapılmış çalışmalarda da bildirilmiştir (Mimica-Dukic ve ark., 2003; Soylu ve ark., 2006; Acimovic ve ark., 2015; Ahmed ve ark., 2019; Wodnicka ve ark., 2019; Kara ve ark., 2020). Çalışmada elde edilen uçucu yağlar içinde yer alan kimyasal bileşenler ve % oranlarında tespit edilen farklılıkların, uçucu yağın çıkartıldığı bitkilerin genetik özelliklerinin yanı sıra, bu bitkilerin yetiştiği bölge ve iklim koşulları, ekstraksiyon yöntemleri ve bitki materyallerinin toplandığı zaman ile bitkinin fenolojik döneminin önemli düzeyde rol oynadığı bildirilmiştir (Woolf, 1999; Türkmen ve ark., 2021).

Aynı cam balon içerisinde farklı oranlarda (%) karıştırılıp birlikte kaynatılmak suretiyle elde edilen rezene (R) ve defne (D) uçucu yağ ($R_{75}:D_{25}$, $R_{50}:D_{50}$, $R_{25}:D_{75}$) karışımlardaki (Mix-1) kimyasal bileşenler benzer şekilde GC-MS'te belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de gösterilmiştir. Yapılan GC-MS analiz sonucunda Mix-1 karışımları içerisinde toplam 33-37 farklı kimyasal bileşen belirlenmiştir. Farklı oranda hazırlanan ($R_{75}:D_{25}$, $R_{50}:D_{50}$, $R_{25}:D_{75}$) Mix-1 karışımları içerisinde rezene ve defne uçucu yağların ana bileşenlerinden olan *trans*-anethole ve eucalyptol'un % bulunuş oranları; $R_{75}:D_{25}$ için %59.32:15.25, $R_{50}:D_{50}$ için %34.42:34.15, $R_{25}:D_{75}$ için %18.36:42.33 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1, Şekil 2).

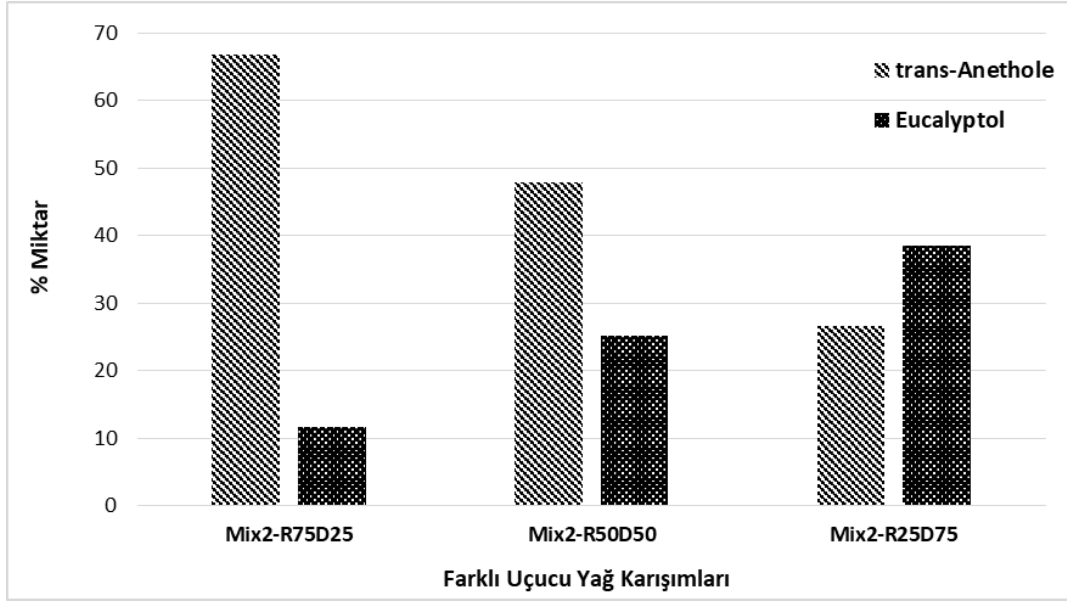


Şekil 2. Mix-1 uçucu yağ karışımında belirlenen ana bileşenler

Figure 2. Major compounds determined in Mix-1 essential oil mixtures

Uçucu yağların ayrı ayrı çıkartılarak, farklı oranlarda ($R_{75}:D_{25}$, $R_{50}:D_{50}$, $R_{25}:D_{75}$) karıştırılmasıyla elde edilen karışımlarının (Mix-2) GC-MS ile analizi sonucu belirlenen bileşenleri Çizelge 2'de verilmiştir. Yapılan GC-MS analiz sonucunda Mix-2 karışımları içerisinde toplam 29-31 farklı kimyasal bileşen belirlenmiştir.

Farklı oranda hazırlanan ($R_{75}:D_{25}$, $R_{50}:D_{50}$, $R_{25}:D_{75}$) Mix-2 karışımları içerisinde rezene ve defne uçucu yağların ana bileşenlerinden olan *trans*-anethole ve eucalyptol'un % bulunuş oranları; $R_{75}:D_{25}$ için %66.86:11.58, $R_{50}:D_{50}$ için %47.80:25.23, $R_{25}:D_{75}$ için %26.56:38.50 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2, Şekil 3).



Şekil 3. Mix-2 uçucu yağ karışımında belirlenen ana bileşenler

Figure 3. Major compounds determined in Mix-2 essential oil mixtures

Farklı yöntemlerle hazırlanan karışımlar içerisinde tespit edilen kimyasal bileşenler ve bulunuş oranları birlikte değerlendirildiğinde, Mix-1 karışımında bulunan bileşen sayısının Mix-2 karışımına kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Birlikte kaynatılarak elde edilen Mix-1 karışım yağında rezene uçucu yağının ana bileşeni olan *trans*-anethole %18.36-59.32 oranları arasında bulunurken, elle karıştırılarak elde edilen Mix-2 karışım yağında *trans*-anethole'un %26.56-66.86 arasında değişen nispeten daha yüksek oranlarda olduğu tespit edilmiştir. Defne yağının ana bileşeni olan eucalyptol'un Mix-1 deki bulunuş oranı %15.25-42.33 oranında değişirken, Mix-2 karışımında eucalyptol'un bulunuş oranı %11.58-38.50 arasında değişmiştir. Mix-2 yağında *trans*-anethole oranı Mix-1 yağına kıyasla daha yüksek düzeyde bulunurken, eucalyptol oranı Mix-1 karışımında Mix-2 karışımına kıyasla biraz daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Karışımlar içerisinde bulunan bileşenlerin sayı ve oranlarında tespit edilen farklılıkların karışım esnasında kimyasallar arasında ortaya çıkan reaksiyonların yanı sıra, oldukça düşük oranlarda (<%0.6) bulunan bazı minör bileşenlerin karışım oranlarındaki miktarlarında olan azalmalar sonucunda GC-MS yöntemi ile belirlenebilme sınırları altında kalabildiği düşünülmektedir.

Uçucu Yağ ve Karışımların *P. funerea*'nın Misel Gelişi ve Konidi Çimlenmesi Üzerine Antifungal Etkisi

Uçucu yağların tekse ve karışımlarının farklı konsantrasyonlarının buhar fazında fungal hastalık etmeni *P. funerea*'nın misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği *in vitro* koşullarda belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Şekil 4, Çizelge 3 ve 4'te verilmiştir. *P. funerea*'ya karşı rezene ve defne

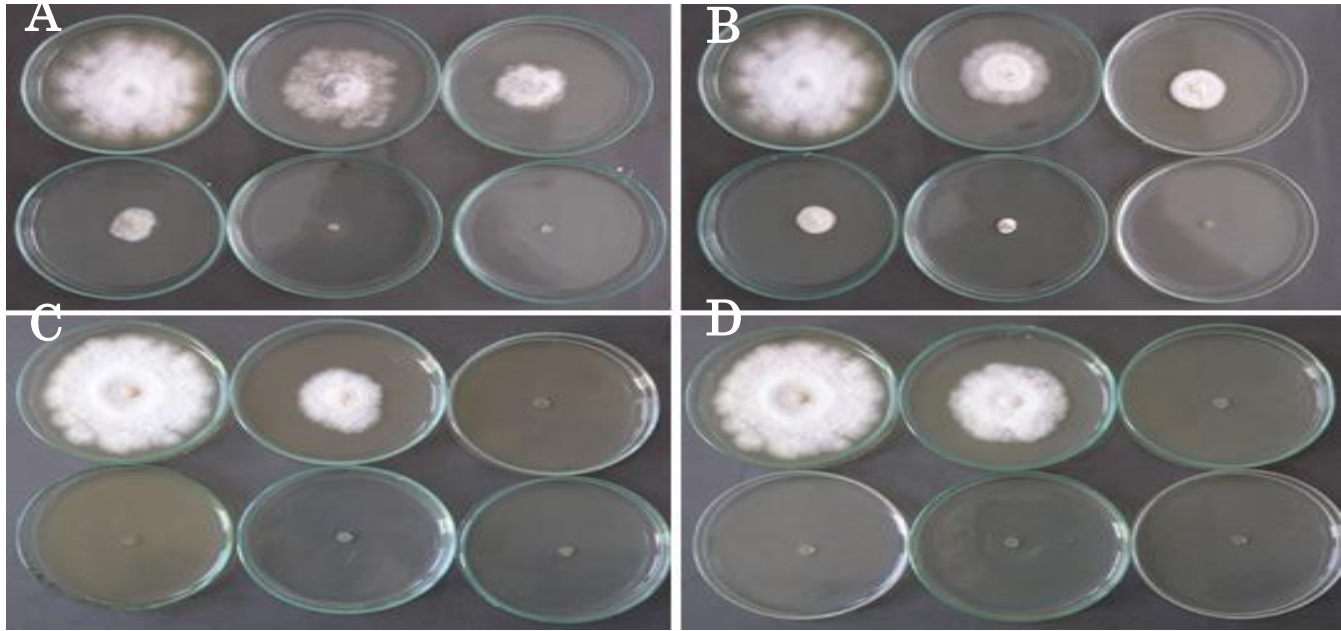
yağlarının tek başlarına kullanıldıklarında miselyal gelişimini tamamen engelleyen konsantrasyonlar sırasıyla 20 ve 25 µl petri⁻¹ olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuç daha önceden yapılmış çalışma sonucuna paralellik göstermiştir (Kara ve ark., 2020).

İki farklı şekilde elde edilen uçucu yağ karışımları, kullanılan karışımın içerisindeki *trans*-anethole:eucalyptol oranları ve konsantrasyonlarına bağlı olarak miselyal gelişimini değişen oranlarda engellemiştir. Rezene yağı tek başına kullanıldığında fungal etmenin misel gelişimini 20 µl petri⁻¹ konsantrasyonda tamamen engellerken, kaynatılarak hazırlanan Mix-1 olarak adlandırılan karışımındaki KR₇₅D₂₅ konsantrasyonunda misel gelişimi 15 µl petri⁻¹ konsantrasyonda engellenmiştir. Uçucu yağların elle karıştırılmak suretiyle hazırlanan ve Mix-2 olarak adlandırılan diğer karışım ise %100 engellemeyi gördüğü antifungal etkinliğin 10 µl petri⁻¹ gibi nispeten daha düşük konsantrasyonda gözlenmiştir (Çizelge 3 ve Çizelge 4).

Antifungal etkinliğin defne uçucu yağı yönünden değerlendirildiğinde daha önemli olduğu, defne yağının tek başına uygulandığında 25 µl petri⁻¹ konsantrasyonunda gösterilen %100 engelleme etkinliğinin karışımlarla 10 µl petri⁻¹ konsantrasyonuna çekildiği tespit edilmiştir (Çizelge 3). Rezene ve defne uçucu yağlarının tek başına kullanıldığı uygulamalardaki misel gelişimini %50 engelleyen en düşük etkili konsantrasyonun (EC₅₀) yapılan Probit analizinde 5.66 ve 4.31 µl petri⁻¹ olarak belirlenmiş olup, bu değerlerin en düşük olduğu uygulamanın 4.82 µl petri⁻¹ ile Mix-2 formülasyonundaki R₇₅D₂₅ karışımının olduğu belirlenmiştir.

Fungal etmenin konidi çimlenmesinin engellenmesi üzerine yapılan çalışmada misel gelişimi üzerine olan etkilere benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Konidilerin çimlenmesini azaltan konsantrasyonlar ile misel gelişimini azaltan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, uçucu yağ ve karışımlarının spor çimlenmesinin engelleyici etkisinin, misel gelişiminin engellenmesinde gözlenen değerlere nispeten daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5 ve Çizelge 6).

Rezene ve defne uçucu yağlarının teksele olarak kullanıldığında konidi çimlenmesini tamamen engelleyen konsantrasyonlar sırasıyla 15 ve 20 µl/petri olarak belirlenmiştir. Rezene ve defne uçucu yağları tek başına kullanıldığında fungal etmenin konidi çimlenmesini sırasıyla 15 µl petri⁻¹ ve 20 µl petri⁻¹ konsantrasyonda tamamen engellerken, Mix-2



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda defne (A) ile rezene (B) uçucu yağlarının teksele, Mix2-R₇₅D₂₅ (C) ve Mix2-R₂₅D₇₅ (D) karışım uygulamalarında görülen misel gelişimlerinin engellenmeleri

Figure 4. Inhibition of mycelial growth by different concentrations of fennel (A), laurel (B), Mix2-R₇₅D₂₅ (C) and Mix2-R₂₅D₇₅ (D) blended essential oil treatments

Çizelge 3. Rezene (R) ve Defne (D) uçucu yağ ve karışımlarının *P. funerea*'nın misel gelişimi (mm) üzerine antifungal etkisi

Table 3. Antifungal effect of fennel and laurel essential oils and blended mixtures on mycelial growth (mm) of *P. funerea*

Farklı uçucu yağ ve karışımların misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği								
Dozlar (µl petri ⁻¹)	Rezene	Defne	Mix-1			Mix-2		
			R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅	R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅
0.0	81.00d	81.00f	80.33d	80.33e	80.33e	79.00c	79.00c	79.00c
5.0	41.33cB	33.33eA	56.67cC	70.33dD	66.00dD	36.00bAB	42.66bB	53.00bC
10.0	21.66bB	20.67dB	36.33bC	35.33cC	52.00cD	0.00aA	0.00aA	0.00aA
15.0	18.00bB	14.66cB	0.00aA	31.00cC	42.33bD	0.00aA	0.00aA	0.00aA
20.0	0.00aA	10.00bB	0.00aA	23.33bC	0.00aA	0.00aA	0.00aA	0.00aA
25.0	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
EC ₅₀	5.66	4.31	7.25	10.52	10.66	4.82	5.08	5.48
EC ₉₀	16.34	19.96	13.79	26.41	22.79	6.86	6.97	7.44

Elde edilen değerler 3 farklı petride gelişen fungus koloni çap (mm) değerlerinin ortalamasıdır. Aynı sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler veya satır içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer büyük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P<0.05). EC₅₀ ve EC₉₀, Probit analiz sonucunda fungusun misel gelişimini %50 ve %90 oranında engellediği tahmin edilen etkili konsantrasyon değerini gösterir.

Çizelge 4. Rezene (R) ve Defne (D) uçucu yağ ve karışımlarının *P. funerea*'nın misel gelişiminin engellenmesi (%) üzerine antifungal etkisi

Table 4. Antifungal effect of fennel and laurel essential oils and blended mixtures on inhibition of mycelial growth (%) of *P. funerea*

Dozlar (μ l petri ⁻¹)	Farklı uçucu yağ ve karışımların misel gelişiminin engellenmesi (%) üzerine etkinliği							
	Uçucu Yağlar		Uçucu Yağ Karışımları					
	Rezene	Defne	Mix-1			Mix-2		
			R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅	R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅
0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	48.98	58.85	29.45	12.45	17.84	54.43	46.00	32.91
10.0	73.26	74.48	54.77	56.02	35.27	100.00	100.00	100.00
15.0	77.78	81.90	100.00	61.41	47.30	100.00	100.00	100.00
20.0	100.00	87.65	100.00	70.96	100.00	100.00	100.00	100.00
25.0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Çizelge 5. Rezene (R) ve Defne (D) uçucu yağ ve karışımlarının *P. funerea*'nın konidi çimlenmesi üzerine antifungal etkisi

Table 5. Antifungal effect of fennel and laurel essential oils and blended mixtures on conidial germination of *P. funerea*

Dozlar (μ l petri ⁻¹)	Farklı uçucu yağ ve karışımların bulunduğu petride çimlenen konidi sayısı							
	Uçucu Yağlar		Uçucu Yağ Karışımları					
	Rezene	Defne	Mix-1			Mix-2		
			R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅	R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅
0.0	94.33d	94.33e	93.67d	93.67f	93.67e	92.33c	92.33c	92.33c
5.0	31.33cC	48.67dD	54.33cD	78.67eE	74.33dE	11.33bA	20.33bB	22.33bB
10.0	14.00bB	34.33cD	21.67bC	32.67dD	36.67cD	0.00aA	0.00aA	0.00aA
15.0	0.00aA	19.33bB	0.00aA	24.67cC	22.00bBC	0.00aA	0.00aA	0.00aA
20.0	0.00aA	0.00aA	0.00aA	13.67bB	0.00aA	0.00aA	0.00aA	0.00aA
25.0	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
EC ₅₀	4.02	6.07	5.82	8.94	8.33	3.17	3.76	3.85
EC ₉₀	9.60	17.04	11.92	20.45	17.05	5.36	6.16	6.33

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

EC₅₀ ve EC₉₀, Probit analizi sonucunda fungusun konidi çimlenmesini %50 ve %90 oranında engellediği tahmin edilen etkili konsantrasyon (μ l petri⁻¹) değerini gösterir.

Çizelge 6. Rezene (R) ve Defne (D) uçucu yağ ve karışımlarının *P. funerea*'nın konidi çimlenmesinin engellenmesi (%) üzerine antifungal etkisi

Table 6. Antifungal effect of fennel and laurel essential oils and blended mixtures on % inhibition of conidial germination of *P. funerea*

Dozlar (μ l petri ⁻¹)	Farklı uçucu yağ ve karışımlarının konidi çimlenmesini % engelleme oranları							
	Uçucu Yağlar		Uçucu Yağ Karışımları					
	Rezene	Defne	Mix-1			Mix-2		
			R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅	R ₇₅ D ₂₅	R ₅₀ D ₅₀	R ₂₅ D ₇₅
0.0	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	66.78	48.41	41.99	16.02	20.64	87.73	77.98	75.81
10.0	85.16	63.60	76.87	65.13	60.86	100.00	100.00	100.00
15.0	100.00	79.50	100.00	73.67	76.51	100.00	100.00	100.00
20.0	100.00	100.00	100.00	85.41	100.00	100.00	100.00	100.00
25.0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

karışımındaki uygulamaların tamamında konidi çimlenmesinin engellenmesi 10 µl petri⁻¹ konsantrasyonlarında görülmüştür (Çizelge 5 ve Çizelge 6). Elde edilen sonuçlara göre antifungal etkinliğin defne uçucu yağı yönünden değerlendirildiğinde daha önemli olduğu, normalde 20 µl petri⁻¹ konsantrasyonunda gösterilen %100 engelleme etkinliğinin karışımlarla 10 µl petri⁻¹ konsantrasyonuna çekildiği tespit edilmiştir (Çizelge 5 ve Çizelge 6). Rezene ve defne uçucu yağlarının tek başına kullanıldığı uygulamalarda konidi çimlenmesini %50 engelleyen en düşük etkili konsantrasyonlar (EC₅₀) rezene için 4.02 µl petri⁻¹, defne içinse 6.07 µl petri⁻¹ olarak belirlenmiştir. Karışımlar içinde en düşük EC₅₀ değeri ise 3.17 µl petri⁻¹ konsantrasyon ile Mix-2 formülasyonundaki R₇₅D₂₅ karışımında belirlenmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında limoni servi ağacında sorun olan sürgün uç yanıklık hastalığı etmeni *P. funerea*'ya karşı bitki uçucu yağlarının antifungal etkinliğinin araştırıldığı oldukça sınırlı sayıda yapılmış çalışma bulunmaktadır. Cheng ve ark. (2011) servi ailesine dahil bir ağaç olan *Cunninghamia konishii* uçucu yağının ana bileşenlerini GC-MS analizleri ile araştırdıkları çalışmalarında, uçucu yağın aralarında *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* ve *Pestalotiopsis funerea*'nında bulunduğu fungal hastalık etmenlerine karşı oldukça yüksek düzeyde antifungal etkinliğinin olduğunu bildirmişlerdir. Ho ve ark. (2012) Tayvan'a özgü endemik bir ağaç türü olan yalancı servi (*Chamaecyparis formosensis* Matsum) uçucu yağının ana bileşenin β-eudesmol (%25.1) olduğunu, uçucu yağın 500 µg ml⁻¹ konsantrasyonunda *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis funerea* ve *Ganoderma austral*, hastalık etmenlerine karşı sırasıyla %92.7, 71.1, ve 87.7 engelleme oranlarıyla yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. *Sequoia sempervirens* uçucu yağın antifungal etkinliğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise *Pestalotiopsis funerea* misel gelişimin 0.417 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda %73 oranında engellendiğini bildirmişlerdir (Espinosa-garcia ve ark., 1993).

Uçucu yağların teksele olarak antifungal etkinliklerinin araştırıldığı birçok çalışma olmasına rağmen, karışımların antifungal etkinliklerinin araştırıldığı oldukça sınırlı sayıda yapılmış çalışma bulunmaktadır. Tadtong ve ark. (2012) lavanta, petigrain, misk adaçayı, ylang ylang ve yasemin uçucu yağlarından harmanlanmış iki farklı uçucu yağ karışımlarının bakteriyel *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* ile fungal etmen *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarında, uçucu yağların karışım halinde kullanıldıklarında teksele olarak kullanıldıklarına kıyasla daha güçlü antimikrobiyal

etkinlik gösterdiklerini belirlemişlerdir. Daha önceden yapılmış olan çalışmalarda farklı yöntemlerle elde ettiği rezene defne uçucu yağ karışımlarının beyaz çürüklük hastalığı etmeni *Sclerotinia sclerotiorum*'un misel gelişimini tek tek kullanılan dozlarından %50 daha az dozlarda engellediğini belirlemiştir (Türkmen, 2015; Türkmen ve Kaya, 2021). Söz konusu çalışmalardan elde edilen sonuçların mevcut çalışmada elde edilen sonuçları destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

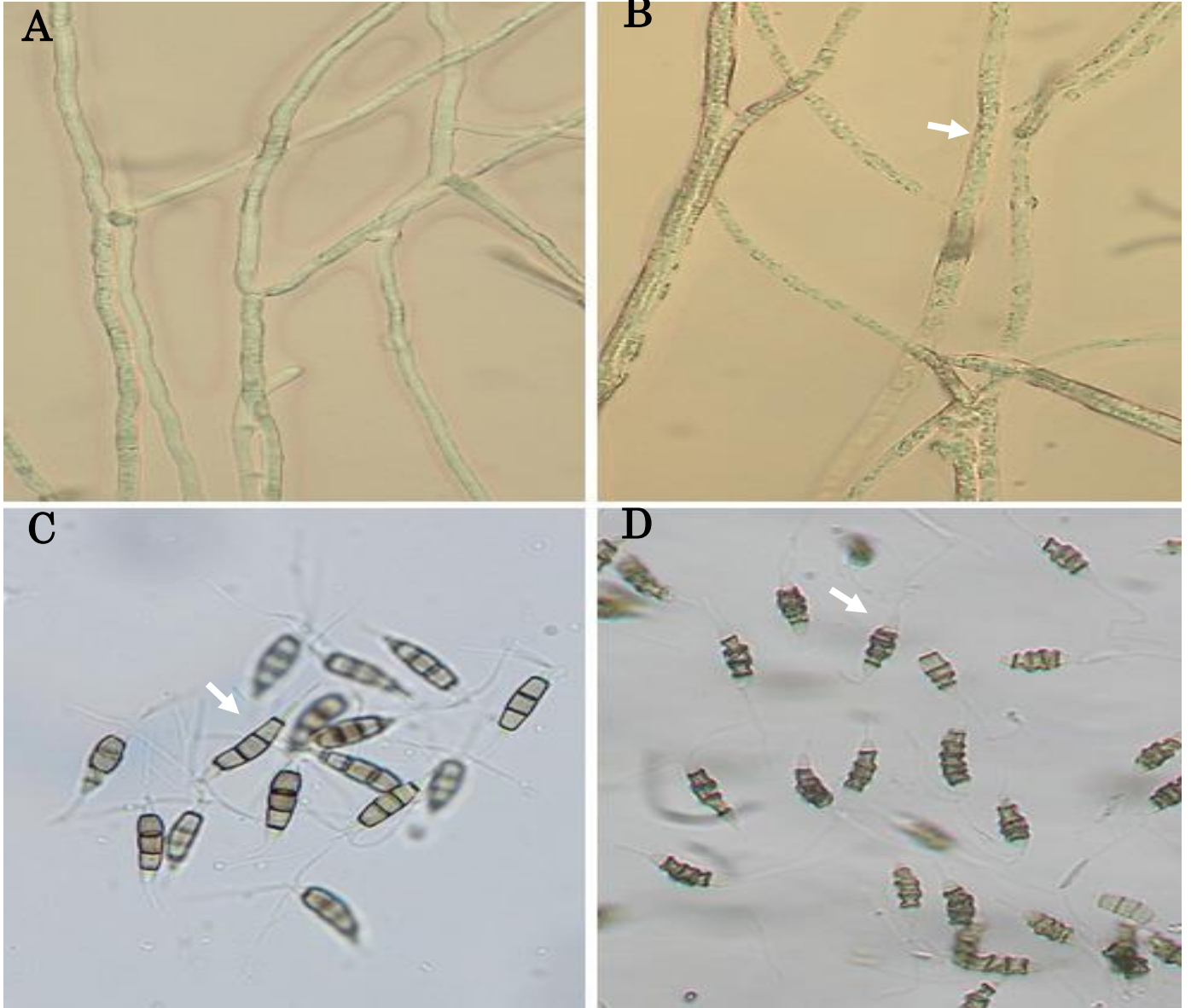
Uçucu yağlar içerisinde yer alan ana bileşenlerin, gösterilen biyoetkinliklerden sorumlu olduğu yaygın olarak bilinen bir durumdur. Yapılan literatür araştırmasında, defne ve rezene uçucu yağının ana bileşenleri olan eucalyptol ve *trans*-anethole bileşenlerin sinerjik antifungal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, karışımlarda değişen *trans*-anethole ve eucalyptol oranlarının uçucu yağlarının antifungal etkinlikleri üzerinde önemli düzeyde etkisinin bulunduğu açıkça görülmüştür. Söz konusu antifungal etkinliğin artışında, *trans*-anethole'ün daha belirgin bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda *trans*-anethole ve eucalyptol'ün ana bileşen olarak tek başlarına antifungal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Mimica-Dukic ve ark., 2003). Fujita ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, *trans*-anethole'ün polygodial ve (2E)-undecenal'in fungusitatik olan etkinliğini sinerjik olarak artırmak suretiyle *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*'a karşı fungusidal etkilere çevirdiğini bildirmişlerdir. Huang ve ark. (2010) star anason bitkisinin uçucu yağı ve ana bileşeni *trans*-anethole'ün fungal hastalık etmenlerinden *A. solani*, *B. maydis*, *F. graminearum*, *P. aphanidermatum* ve *R. solani*'ye karşı yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösterdiğini, uçucu yağın antifungal etkinliğinin sahip olduğu %99.5 gibi yüksek orandaki *trans*-anethol'den kaynaklandığını bildirmişlerdir. Morcia ve Terzi (2012) terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) ve thymol'ün ana bileşen olarak *in vitro* antifungal etkinliğini fungal hastalık etmenlerinden *Fusarium subglutinans*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus carbonarius*, *Alternaria alternata* ve *Penicillium* sp. karşı araştırdıkları çalışmalarında tüm ana bileşenlerin antifungal etkilere sahip olduğunu, antifungal etkinlik sıralamasının thymol > eugenol > carvone > terpinen-4-ol > 1,8-cineole şeklinde gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Uçucu Yağ Karışımlarının Misel ve Konidi Morfolojileri Üzerine Antifungal Etkisi

Uçucu yağ karışımları uygulanan petrilerde fungus

hiflerinde ve konidiler üzerinde yapılan mikroskopik gözlemler sonucunda, karışımların %100 engelleyen konsantrasyonlarında fungus hifleri ve konidilerin morfolojik yapılarında önemli yapısal değişimlere neden olduğu görülmüştür (Şekil 5). Karışımlar içerisinde bulunan uçucu bileşik(ler)in plazma membranına zarar vererek sitoplazmik pıhtılaşma, hif

çapının daralması ve hif çeperinin parçalanması gibi deformasyonlara sebep olmuştur. Yakın zamanda yapılmış olan çalışmada rezene ve defne uçucu yağının fungal etmenin misel yapısında benzer deformasyonlara neden olduğu belirlenmiş olup (Kara ve ark., 2020), mevcut çalışmada farklı olarak uçucu yağların teksele kullanımlarının yanı sıra uçucu yağ



Şekil 5. Fungal etmenin hif ve konidilerin morfolojik yapıları üzerine uçucu yağ karışımlarının etkileri. (A) Kontrol petrisinde gelişen fungus hifi, (B) karışım (Mix2-R75D25) uygulaması yapılan petride gelişen hiflerin sitoplazmalarında pıhtılaşma (ok) şeklinde görülen morfolojik değişiklikler. (C) Uçucu yağ karışımı (Mix2-R75D25) konulmadan önce petride çimlenen sağlıklı konidiler (ok). (D) Uçucu yağ karışımı (Mix2-R75D25) eklendikten sonra önceden çimlenmiş konidilerde gözlenen morfolojik değişiklikler ve büzüşmeler (ok)

Figure 5. Effect of essential oil mixtures on morphological structures of hyphae and conidia of fungal agent. (A) Hyphae on control petri. (B) Morphological deformations such as cytoplasmic coagulation (arrow) occurring on hyphae developed in essential oil blend (Mix2-R75D25) treated petri. (C) Healthy germinated conidia on petri plate before adding essential oil blend (Mix2-R75D25). (D) Morphological deformations and shrinkage observed in pre-germinated conidia after the addition of essential oil blend (Mix2-R75D25)

karışımlarında sadece misel yapısında değil aynı zamanda konidilerin morfolojisi üzerinde önemli yapısal bozulmalara neden olduğu tespit edilmiştir.

Yapılmış olan önceki çalışmalarda da özellikle *Thymra* spp., *Thymus* spp., *Origanum* spp., ve *Foeniculum* spp. ait bitki uçucu yağların fungal ve

bakteriyel hastalık etmenlerin morfolojik yapılarında bu tür modifikasyonlara neden olduğu, söz konusu yapısal bozulmaların uçucu yağlardaki ana bileşenlerin mikroorganizmanın hücre membranına zarar vermek suretiyle hücre duvar sentezini düzenleyen enzimatik reaksiyonlar üzerine etkisiyle ilgili olabileceği bildirilmiştir (Soylu ve ark., 2007; Soylu ve ark., 2010; Lucas ve ark., 2012; Yong ve ark., 2015; da Silva ve ark., 2019; Kachur ve Suntres, 2020, Türkmen ve ark., 2021).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak rezene / defne uçucu yağ karışımlarının teksele kullanılmalarına kıyasla nispeten daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek antifungal etkinlik göstermiş olmaları, gelecekte planlanacak olan etkili, doğal yeni biyofungisit(ler)in tasarlanmasına katkı sağlayacağı şüphesizdir. Çalışma sonuçları, bu alanda çalışan araştırmacılara uçucu yağların ve/veya ana bileşenlerinin kombinasyon halinde kullanılması halinde sinerjik etkinlik göstereceğini, uygulamanın sadece bitki koruma alanında değil mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için gıda alanında da kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

Acimovic M, Tesevic V, Todosijevec M, Djisalov J, Oljaca S 2015. Compositional characteristics of the essential oil of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* grown in Serbia. *Botanica Serbica*, 39: 9-14.

Adams RP 2007. Identification of Essential Oils by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. Allured Publ. Corp., Carol Stream.

Ahmed AF, Shi MJ, Liu CY, Kang WY 2019. Comparative Analysis of Antioxidant Activities of Essential Oils and Extracts of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Seeds From Egypt and China. *Food Science and Human Wellness*, 8: 67-72.

Bajo J, Santamaria O, Diez JJ 2008. Cultural Characteristics and Pathogenicity of *Pestalotiopsis funerea* on *Cupressus arizonica*. *Forest Pathology*, 38: 263-274.

Bakkali F, Averbek S, Averbek D, Waomar M 2008. Biological Effects of Essential Oils-A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.

Chahal KK, Kaur M, Bhardwaj U, Singla N, Kaur A 2017. A Review on Chemistry and Biological Activities of *Laurus nobilis* L. Essential Oil. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6: 1153-

1161.

Cheng SS, Lin CY, Gu HJ, Chang ST 2011. Antifungal Activities and Chemical Composition of Wood and Leaf Essential Oils from *Cunninghamia konishii*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 31:204-217.

Demir V, Gunhan T, Yagcioglu AK, Degirmencioglu A 2004. Mathematical Modelling and the Determination of Some Quality Parameters of Air-Dried Bay Leaves. *Biosystems Engineering*, 88: 325-335.

Elkiran O, Akbaba E, Bagcı E 2018. Constituents of Essential Oils from Leaves and Seeds of *Laurus nobilis* L.: A Chemotaxonomic Approach. *Bangladesh Journal of Botany*, 47(4): 893-901.

Espinosagarcia FJ, Saldivargarcia P, Langenheim, JH 1993. Dose-Dependent Effects In vitro Of Essential Oils on the Growth of 2 Endophytic Fungi in Coastal Redwood Leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21:185-194.

Fujita K, Fujita T, Kubo I 2007. Anethole, a Potential Antimicrobial Synergist, Converts a Fungistatic Dodecanol to a Fungicidal Agent. *Phytotherapy Research*, 21:47-51

Gordon TR, Swett CL, Wingfield MJ 2015. Management of Fusarium Diseases Affecting Conifers. *Crop Protection*, 73: 28-39.

Ho CL, Hua KF, Hsu KP, Wang EIC, Su YC 2012. Composition and Antipathogenic Activities of the Twig Essential Oil of *Chamaecyparis formosensis* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 7:933-936.

Hongratanaworakit T, Srimuang P, Wichanpreechar A, Akarapattaranithi T, Taorang B, Rawdlaurh P 2017. Chemical Composition and Effects of Blended Essential Oil on Humans. *Journal of Applied Pharmacy Science*, 7 (01): 165-170.

Huang Y, Zhao J, Zhou L, Wang J, Gong Y, Chen X, Sun Z-X, Wang Q, Jiang W 2010. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component *trans*-Anethole. *Molecules*, 15(11):7558-7569.

Kachur K, Suntres Z 2020. The Antibacterial Properties of Phenolic Isomers, Carvacrol and Thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60:3042-3053.

Kara M, Soylu S, Türkmen M, Kaya DA 2020. Determination and Antifungal Activities of Laurel and Fennel Essential Oils Against Fungal Disease Agents of Cypress Seedlings. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 17: 264-275.

Lucas GC, Alves E, Pereira RB, Perina FJ, de Souza RM 2012. Antibacterial Activity of Essential Oils on *Xanthomonas vesicatoria* and Control of Bacterial Spot in Tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(39): 351-359.

Morcia C, Terzi V 2012. *In vitro* Antifungal Activity of Terpinen-4-ol, Eugenol, Carvone, 1,8-Cineole

- (Eucalyptol) and Thymol Against Mycotoxigenic Plant Pathogens. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 29(3):415-22
- Mordue JEM 1976. *Pestalotiopsis funerea*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 514: 1-2.
- Nazzaro F, Fratianni F, Martino LD, Coppola R, Feo VD 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals, 6: 1451-1474.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo VD 2017. Essential Oils and Antifungal Activity. Pharmaceuticals, 10: 86.
- Ozcan MM, Chalchat JC, Arslan D, Ates A, Unver A 2006. Comparative Essential Oil Composition and Antifungal Effect of Bitter Fennel (*Foeniculum vulgare* ssp. *piperitum*) Fruit Oils Obtained During Different Vegetation. Journal of Medicinal Food, 9: 552-561.
- Ozcan M, Chalchat JC 2005. Effect of Different Locations on the Chemical Composition of Essential Oils of Laurel (*Laurus nobilis* L.) Leaves Growing Wild in Turkey. Journal of Medical Food, 8 (3): 408-411.
- Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L 2009. Antifungal Activity of the Clove Essential Oil From *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species. Journal of Medical Microbiology, 58: 1454-1462.
- Salem MZM, Elansary HO, Ali HM, El-Settawy AA, Elshikh MS, Abdel-Salam EM, Sklacka-Wozniak K 2018. Bioactivity of Essential Oils Extracted From *Cupressus macrocarpa* Branchlets and *Corymbia citriodora* Leaves Grown in Egypt. BMC Complementary and Alternative Medicine, 18:23
- Sinclair WA, Lyon HH, Johnson WT 1993. Diseases of Trees and Shrubs. New York: Cornell University Press.
- Soylu EM, Soylu S, Kurt Ş 2006. Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Various Plants Against Tomato Late Blight Disease Agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia, 161: 119-128.
- Soylu S, Yigitbas H, Soylu EM, Kurt S 2007. Antifungal Effects of Essential Oils from Oregano and Fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology, 103(4): 1021-1030.
- Soylu EM, Kurt S, Soylu S 2010. *In vitro* and *in vivo* Antifungal Activity of Essential Oils of Various Plants Against Tomato Grey Mould Disease Agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 143(3): 183-189.
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils Against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016: 3012462.
- Staub T 1991. Fungicide Resistance: Practical Experience with Antiresistance Strategies and the Role of Integrated Use. Annual Review of Phytopathology, 29:421-442.
- Taban A, Saharkhiza MJ, Niakousaric M 2018. Sweet Bay (*Laurus nobilis* L.) Essential Oil and Its Chemical Composition, Antioxidant Activity and Leaf Micromorphology Under Different Extraction Methods. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 9:12-18.
- Tadtong S, Suppawat S, Tintawee A, Saramas P 2012. Antimicrobial Activity of Blended Essential Oil Preparation. Natural Product Communications, 7(10):1401-1404.
- Türkmen M 2015. Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Uçucu Yağ Karışımlarının Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 55 sayfa.
- Türkmen M, Mert A 2020. Farklı Azot Dozlarının Kişniş (*Coriandrum sativum* L.) Yaş Herba Uçucu Yağ Bileşenleri Üzerine Etkisi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 25(3):309-315.
- Türkmen M, Kaya DA 2021. Antifungal effect of some essential oil combinations. International Journal of Chemistry and Technology, 5(1): 6-10.
- Türkmen M, Kara M, Maral, H, Soylu S 2021. Determination of chemical component of essential oil of *Origanum dubium* plants grown at different altitudes and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Food Processing and Preservation, 45: e15787.
- Uysal A, Kurt Ş, Kara M, Soylu S, Soylu EM 2021. Bazı Fidanlıklarda Görülen Toprak Kökenli Fungusların Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 31: 142-149.
- Wodnicka A, Huzar E, Dzieciol M, Krawczyk M 2019. Comparison of the Composition and Fungicidal Activity of Essential Oils from Fennel Fruits Cultivated in Poland and Egypt. Polish Journal of Chemical Technology, 21: 38-42.
- Woolf A 1999. Essential Oil Poisoning. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 37: 721-727.
- Yılmaz B, Deniz İ 2017. The Effects of Cultivation Area and Altitude Variation on the Composition of Essential Oil of *Laurus nobilis* L. Grown in Eastern, Western and Central Karadeniz Region. International Journal Secondary Metabolite, 4: 187-194.
- Yong AL, Ooh KF, Ong HC, Chai TT, Wong FC 2015. Investigation of Antibacterial Mechanism and Identification of Bacterial Protein Targets Mediated by Antibacterial Medicinal Plant Extracts. Food Chemistry, 186: 32-36.