

**BAZI TIBBİ VE AROMATİK BİTKİLERDE TOHUM
KAYNAKLI FUNGAL HASTALIKLARIN TESPİTİ**

Tuğçe KAYGUSUZ

Yüksek Lisans Tezi

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arzu COŞKUNTUNA

2019

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI TIBBİ VE AROMATİK BİTKİLERDE TOHUM KAYNAKLI
FUNGAL HASTALIKLARIN TESPİTİ

Tuğçe KAYGUSUZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Arzu COŞKUNTUNA

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır

Dr. Öğr. Üyesi Arzu COŞKUNTUNA danışmanlığında, Tuğçe KAYGUSUZ tarafından ‘‘Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Tohum Kaynaklı Fungal Hastalıkların Tespiti’’ isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nuray ÖZER

İmza:

Üye: Doç. Dr. Oktay ERDOĞAN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Arzu COŞKUNTUNA

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI TIBBİ VE AROMATİK BİTKİLERDE TOHUM KAYNAKLI FUNGAL HASTALIKLARIN TESPİTİ

Tuğçe KAYGUSUZ

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arzu COŞKUNTUNA

Bu çalışmada Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nün yetiştirmiş olduğu tıbbi ve aromatik bitkilerden; keten (*Linum usitatissimum* L.), kişniş (*Coriandrum sativum* L.), çemen (*Trigonella foenumgraecum* L.), rezene (*Foeniculum vulgare* L.), anason (*Pimpinella anisum* L.), melisa (*Melissa officinalis* L.) bitkilerine ait tohumlar kullanılmıştır. Bu araştırmanın amacı tohumların yüzeyinde taşınan fungusları tespit etmek ve bu fungal etmenlerin patojen olup olmadıklarını araştırmaktır. Tohum yüzeyinde taşınan fungusların izole edilmesinde agar yöntemi kullanılmıştır. İzolasyonlar sonucunda çemen tohumlarından; *Alternaria*; kişniş tohumlarından *Aspergillus* ve *Arthrinium*; rezene tohumlarından *Penicillium*. ve *Cladosporium*; anason tohumlarından *Penicillium*; keten tohumlarından *Penicillium* ve *Cladosporium*; melisa tohumlarından *Alternaria*, *Arthrinium*, *Botrytis* ve *Epicoccum* cinsleri teşhis edilmiştir. Melisa ve çemen tohumlarının funguslarla en fazla bulaşık tohumlar olduğu belirlenmiştir. Fungus izolatlarından kültür gelişimleri farklı ve patojen olan dört fungus izolatının moleküler analizleri yapılmıştır. Melisa ve çemende gelişen patojen fungusların türleri *Alternaria alternata*, *Arthrinium arundinis* olarak teşhis edilmiştir. Rezene ve ketende ise patojen olarak bulunan fungus türü *Cladosporium sphaerospermum* olarak kaydedilmiştir. Melisa tohumlarından izole edilen *Epicoccum* cinsine ait fungus türünün *E. nigrum* olduğu moleküler tanı ile doğrulanmıştır. Yapılan patojenisite testleri sonucunda; melisa ve çemende *A. alternata* sırası ile %70 ile %75, *Botrytis cinerea* izolatu melisada %35, *A. arundinis* izolatu melisa ve kişnişte sırası ile %96 ile %66, *A. niger* izolatu kişnişte %100, *Cladosporium sphaerospermum* izolatları ise rezene ve ketende sırası ile %90 ile %86 oranlarında patojen bulunmuşlardır. Araştırmamızda melisa tohumlarından izole edilen A.

alternata, *B. cinerea* ve *A. arundinis*; rezene ve ketende *C. sphaerospermum*; çemende *A. alternata*; kişniş tohumlarında *A. niger* ve *A. arundinis* lkemiz için ilk kayıttır.

Anahtar Kelimeler: Tıbbi ve aromatik bitkiler, tohum, tohum kökenli funguslar, patojenisite.

ABSTRACT

Msc. Thesis

DETERMINATION OF SEED-BORNE FUNGI IN SOME MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS

Tuğçe KAYGUSUZ

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Arzu COŞKUNTUNA

Tekirdağ Namık Kemal University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops of medicinal and aromatic plants; flax (*Linum usitatissimum*), coriander (*Coriandrum sativum*), fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*), fennel (*Foeniculum vulgare*), anise (*Pimpinella anisum*), lemon balm (*Melissa officinalis*) seeds of the plants were used. The aim of this study is to determine of fungi on the surface of seeds, and whether these fungal agents are pathogenic. Isolation of the fungi on seeds was examined by the agar method. Consequently, the fungi isolated from fenugreek seeds; *Alternaria*; from coriander seeds; *Aspergillus* and *Arthrinium*; from fennel seeds; *Penicillium* and *Cladosporium*; *Penicillium* from anise seeds; *Penicillium*, from flax seeds; *Penicillium* and *Cladosporium*; from lemon balm seeds; *Alternaria*, *Arthrinium*, *Botrytis* and *Epicoccum*, fungi belonging to genus were identified. Lemon balm and fenugreek seeds are the most infested seeds with fungi. Molecular analyzes of four fungus isolates with different and pathogenic cultures were made from the fungal isolates and their DNA sequences were realised. The species of pathogenic fungi that develop in lemon balm and in the garden have been identified as *Alternaria alternata*, *Arthrinium arundinis*. In the fennel and flax, the fungus species found as a pathogen was recorded as *Cladosporium sphaerospermum*. The fungal species of the genus *Epicoccum* isolated from lemon balm seeds were confirmed by molecular diagnosis as *E. nigrum*. As a result of the pathogenicity tests *A. alternata* was detected in lemon balm and fenugreek at the rates of 70% to 75%, respectively. *Botrytis cinerea* was determined in lemon balm at the rate of 35%. *A. arundinis* isolates were detected in lemon balm and coriander at the rates of 96% and %66, respectively. *Aspergillus*

niger was determined in coriander at the rate of %100. *Cladosporium sphaerospermum* was found in fennel and flax seeds at the rates of %90 to %86, respectively. In our study, *A. alternata*, *B. cinerea* and *A. arundinis* isolated from melissa seeds; *C. sphaerospermum* on flax seeds and fennel seeds; *A. alternata* on fenugreek seeds; *A. niger* and *A. arundinis* on coriander are the first record for our country.

Keywords: Medicinal and aromatic plants, seeds, seed –borne fungi, pathogenicity.

2019, 47 Pages

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGE DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1. Melisa (<i>Melissa officinalis</i> L.) (Oğulotu).....	4
1.2. Anason (<i>Pimpinella anisum</i> L.).....	5
1.3. Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i> L.).....	5
1.4. Keten (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	6
1.5. Çemen (<i>Trigonella foenumgraecum</i> L.)	7
1.6. Kişniş (<i>Coriandrum sativum</i> L.).....	7
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Materyal.....	15
3.2. Yöntem	15
3.2.1. Fungal Floranın Tespiti	15
3.2.1.1 PDA Besi Yerinin Hazırlanması.....	16
3.2.1.2 PCA Besi Yerinin Hazırlanması.....	16
3.2.1.3 Yulaf Unu Agar Besi Ortamı Hazırlanması	16
3.2.2. Tek spor izolasyonu.....	17
3.2.3. Patojenisite testleri.....	17
3.2.4. Tohumlarda Fungal Floraya Ait Bulaşıklık Oranının Belirlenmesi	18
3.2.5. Fungusların DNA izolasyonu ve moleküler olarak teşhisi	18
3.2.6. İstatistiksel Analiz	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	21
4.1. Bazı Tıbbi Aromatik Bitkilerin Funguslar ile Enfekteli Tohum Oranları	21
4.1.1. <i>Alternaria alternata</i>	22
4.1.2. <i>Aspergillus niger</i>	23
4.1.3. <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	24
4.1.4. <i>Botrytis cinerea</i>	26
4.1.5. <i>Penicillium</i> spp.	27

4.1.6. <i>Epicoccum nigrum</i>	28
4.1.7. <i>Arthrimum arundinis</i>	30
4.2. Bazı Tıbbi Aromatik Bitki Tohumları Yüzeyinde Taşınan Funguslar ve Patojenisite Oranları	32
5.TARTIŞMA.....	38
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	39
7.KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ	45
TEŞEKKÜR.....	46

Çizelge 1.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Dünya İhracat Verileri.....	2
Çizelge 1.2. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Dünya İthalat Verileri.....	3
Çizelge 1.3. Denemeye alınan tıbbi ve aromatik bitkilerin yıllara göre üretim (ton) miktarları	4
Çizelge 4.1. Tohumlarda Tespit Edilen Fungal Mikroorganizmaların Bulaşıklık Oranları(%)	21
Çizelge 4.2. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitki Tohumlarında Teşhis Edilen Fungal Etmenlerin Bulunma Oranları (%).....	32
Çizelge 4.3. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitki Tohumlarında Gelişen Fungus Türlerinin Patojenisite Oranları(%).....	33

Şekil 3.1. Petri kaplarına yerleştirilen steril tohumlar	16
Şekil 4.1. <i>A. alternata</i> 'nın konidileri (x40)	22
Şekil 4.2. <i>A. alternata</i> 'nın PDA besi ortamındaki gelişimi.....	23
Şekil 4.3. <i>A. niger</i> 'in konidileri (x40)	24
Şekil 4.4. <i>A. niger</i> 'in PDA besi ortamındaki koloni gelişimi.....	24
Şekil 4.5. <i>C. sphaerospermum</i> 'un karakteristik conidiofor yapısı (x40)	25
Şekil 4.6 <i>C. sphaerospermum</i> 'un PDA besi ortamındaki koloni gelişimi	26
Şekil 4.7. <i>B. cinerea</i> 'nın a. konidileri ve b. üzüm salkımı şeklindeki konidiofor yapısı (x40)	27
Şekil 4.8. <i>B. cinerea</i> 'nın PDA besi ortamında koloni gelişimi	27
Şekil 4.9. a. <i>Penicillium</i> sp.'nin a. konidi ve b. konidioforun penisillat dallanması (x40)	28
Şekil 4.10. <i>Penicillium</i> spp.'nin PDA besi ortamında koloni gelişimi.....	28
Şekil 4.11. <i>E. nigrum</i> 'un (a) konidi ve (b) konidiofor yapısı (x40)	29
Şekil 4.12. <i>E. nigrum</i> 'un PDA besi ortamında koloni gelişimi.....	30
Şekil 4.13. <i>A. arundinis</i> 'in PDA besi ortamındaki a.konidiofor yapısı ve b. konidileri (x40).	31
Şekil 4.14. <i>A. arundinis</i> 'in PDA besi ortamında koloni gelişimi.....	31
Şekil 4.15. Rezene tohumlarında <i>C. sphaerospermum</i> 'un patojenisite test sonucu.....	34
Şekil 4.16. Kışniş tohumlarında <i>A. arundinis</i> 'nin patojenisite test sonucu.....	34
Şekil 4.17. Melisa tohumlarında <i>A. alternata</i> 'nın patojenisite test sonucu.....	35
Şekil 4.18. Melisa tohumlarında <i>B. cinerea</i> 'nın patojenisite test sonucu.....	35
Şekil 4.19. Kışniş tohumunda <i>A. niger</i> 'in patojenisite test sonucu	36
Şekil 4.20. Melisa tohumlarında <i>A. arundinis</i> 'in patojenisite test sonucu	36
Şekil 4.21. Keten tohumunda <i>C. sphaerospermum</i> 'un patojenisite test sonucu.....	37
Şekil 4.22. Çemen tohumunda <i>A. alternata</i> 'nın patojenisite test sonucu.....	37

SİMGELER DİZİNİ

bp	: Baz çifti (base pair)
°C	: santigrat derece
CTAB	: hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide
DNA	: deoxyribonucleic acid
dNTP	: deoxynucleotide 5' triphosphate
EDTA	: ethylene diamine tetra acetic acid
ITS	: Internal transcribed spacer
Kb	: kilo baz
M	: molar
mg	: miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: mililitre
mM	: milimolar
µg	: mikrogram
µl	: mikrolitre
µM	: mikromolar
MP-PCR	: Microsatellite-primed PCR
ng	: nanogram
NTSYS	: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PDA	: Patates Dekstroz Agar
rDNA	: ribosomal DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
Rpm	: dakikada devir
SDS	: Sodium dodecyl sulphate

TAE	: Tris-acetate-EDTA
Ta	: annealing temperature
Tm	: melting temperature Tris-HCl Tris-hydroxymethyl amino methane
U	: Ünite
V	: Volt
gr	: gram
PCA	: Patates havuç agar
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
cm	: Santimetre

1.GİRİŞ

İnsanlığın yerleşik hayata geçmesiyle birlikte, birçok uygarlığa ev sahipliği yapan Anadolu'nun zengin bitki varlığı ve kültürel zenginliği günümüze kadar gelmiştir. İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için bitkilerin tedavi edici gücünü tanımış ve sağlıklı yaşayabilmek için tıbbi aromatik bitkilerden faydalanmışlardır. Geçtiğimiz son yıllar içinde dünyada geleneksel tıbbın kullanımına ilgi giderek artmıştır. Bunların başlıca sebepleri, tedavide kullanılan sentetik ilaç hammaddelerinin bazılarında tehlikeli yan etkilerin görülmesi, bazı doğal ilaç hammaddelerinin sentetik olarak yapılamaması ve bunların yarı sentez ürünlerde başlangıç maddesi kaynağı olması, bu artışın başlıca sebepleri arasında yer almaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011). Ayrıca modern tıpta kullanılmakta olan pek çok ilaç da bitkilerden elde edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre gelişmemiş olan ülkelerde nüfusun % 80'i tedavi amaçlı geleneksel ilaçlar kullanırken, bu oran gelişmiş ülkelerde % 40 civarında olup gelecekte tıbbi bitkilerden yararlanma oranının tüm dünyada artış göstermesi beklenmektedir(Acıbuca ve Bostan 2018). İlaç olarak kullanılmalarının yanında; temizlik ürünlerinin kokusunda, diş macunu, sakız ve bitki çaylarının ferahlatıcı etkisinde, kozmetiklerin doğallığında da tıbbi ve aromatik bitki varlığının önemi oldukça büyüktür.

Tıbbi aromatik bitkilerin dünya ticaret hacmi ve değeri konusunda en sağlıklı ve güvenilir veriler Cenevre'deki Uluslararası Ticaret Merkezi (ITC) bilgi bankasından elde edilebilmektedir. Verilen bilgilere göre Türkiye florasında 174 familyaya ait 1.251 cins ve 12.000'den fazla tür barınmaktadır (Özdemir ve Kültür 2016). Bu durum, ülkemizin çeşitli iklim ve ekolojik koşullara sahip olmasından, içerisinde Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan olmak üzere üç bitki coğrafyası bölgesi bulundurmasından kaynaklanmaktadır Türkiye florasının zengin ve çeşitli olması nedeniyle, doğadan toplanan ve kültürü yapılan tıbbi ve aromatik bitkiler açısından büyük bir ekonomik potansiyele sahiptir. Doğadan toplanarak iç ve dış ticareti yapılan 347 tür bulunmakla birlikte bunların sadece %30'unun ihracatı yapılmaktadır (Özhatay ve ark., 1997). Bu ihracatın büyük bir kısmı Kuzey Amerika, Avrupa Birliği, Latin Amerika, Uzak Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerine yapılmaktadır. Ülkemizin ihraç ettiği önemli aromatik ve tıbbi bitkiler olarak kekik, defne yaprağı, kimyon, anason, rezene tohumu, ardiç kabuğu, çemen, biberiye, meyan kökü, nane, sumak, adaçayı ve ıhlamur çiçeği yer almaktadır (Bayram ve ark. 2010) (Çizelge 1.1).

FAO 2011 verilerine göre dünyada tıbbi ve aromatik bitki ihracatını yapan ülkeler arasında ilk sırada yer alan Çin'dir. Çin'i Hindistan, ABD, İspanya, Almanya, Fransa, Hollanda, Arjantin, İran, Brezilya ve Türkiye takip etmektedir. Tıbbi ve aromatik bitki bakımından zengin olan ülkemiz açısından yüksek miktarda ihracatın yapılmadığı görülmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Dünya İhracat Verileri

TIBBİ AROMATİK BİTKİLERİN DÜNYA İHRACAT VERİLERİ		
İHRACAT YAPAN ÜLKELER	MİKTAR (TON)	DEĞER (1.000\$)
ÇİN	1.910.282	3.242.388
HİNDİSTAN	624.954	1.663.940
ABD	98.039	655.322
İSPANYA	119.644	515.587
ALMANYA	50.880	507.235
FRANSA	32.819	447.636
HOLLANDA	103.762	397.132
ARJANTİN	103.166	390.488
İRAN	28.796	339.040
BREZİLYA	71.696	295.080
TÜRKİYE(19. SIRADA)	59.978	177.888
TOPLAM	3.204.016	8.631.736
DİĞER	825.727	3.304.916
DÜNYA TOPLAM	4.029.743	11.936.652

Son yıllarda gelişmiş ülkelerde gıda katkı maddelerinde aromatik bitkilerin kullanımları yaklaşık iki kat artmış olup, ithalatta da ilk sıralarda yer almaktadırlar (Bayram ve ark.,2010, Kırıcı, 2010). FAO 2011 verilerine göre dünyada tıbbi ve aromatik bitki ithalatını yapan ülkeler içerisinde ABD ve Endonezya en fazla tıbbi ve aromatik bitki ithal eden ülkelerdir. Onları sırasıyla, Almanya, Fransa, İngiltere, Hollanda, Çin, Hindistan ve 39. sırada olan Türkiye izlemektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Dünya İthalat Verileri

TIBBİ AROMATİK BİTKİLERİN DÜNYA İTHALAT VERİLERİ		
İTHALAT YAPAN ÜLKELER	MİKTAR (TON)	DEĞER (1.000\$)
ABD	374.343	1.472.995
ENDENOZYA	507.585	726.987
ALMANYA	119.055	661.797
JAPONYA	186.137	624.734
FRANSA	64.074	567.480
İNGİLTERE	110.099	530.787
HOLLANDA	137.569	419.520
SİNGAPUR	64.708	405.182
BREZİLYA	181.279	366.079
MALEZYA	219.165	337.795
TÜRKİYE (39.SIRADA)	13.106	43.341
TOPLAM	1.977.111	6.156.697
DİĞER	6.156.697	5.610.443
DÜNYA TOPLAM	4.326.431	11.767.140

Dünya çapında önemli bir yere sahip olan tıbbi aromatik bitki tohumlarından elde edilen verilere göre fungal hastalık etmenleri için uygun ortama sahip olduğu belirtilmiştir. Diğer birçok bitkide olduğu gibi tıbbi aromatik bitki tohumlarında da verimi ve kaliteyi sınırlayan en önemli faktörler içerisinde bir çok fungus türünün meydana getirdiği hastalıklar yer almaktadır. Tohum kaynaklı fungal patojenler tohum kalitesinin, çimlenme yeteneğinin düşmesine ve bitkiden alınacak ürün miktarının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu patojenlerin gelişimi, tohumda renk, şekil ve biyokimyasal değişmelere bundan dolayı tohumların çürümesine neden olmaktadır. Dünyada bitki hastalıkları sebebiyle meydana gelen toplam kayıplar, potansiyel üretimin %12’lik bir kısmına denk geldiği ve bu değer üretici düzeyindeki parasal değeri, 50 milyar \$ kadar olduğu belirtilmektedir (Erkan, 1998).

Tıbbi ve aromatik bitkiler içerisinde çemen bitkisi ülkemizde yaygın bir floraya sahiptir. Fakat günümüzde hala çemen ihracat ve ithalatında istenilen duruma gelinmediği ve çemen üretimi üzerinde daha fazla üzerinde durulması gerektiği bildirilmektedir (Kurt ve İmren 2018). TÜİK 2018 verilerine göre ülkemizde 2012 yılından sonra keten üretimi durmuştur (Çizelge 1.3) (Anonim 2018 c).

Çizelge 1.3. Denemeye alınan tıbbi ve aromatik bitkilerin yıllara göre üretim (ton) miktarları

	2012 (ton)	2013 (ton)	2014 (ton)	2015 (ton)	2016 (ton)	2017 (ton)
Anason	11.023	10 046	9 309	9 050	9 491	8 418
Melisa	238	238	238	242	108	106
Keten	13	0	0	0	0	0
Kışniş	1	1	1	11	42	29
Rezene	1.862	1 994	2 289	1 461	2 464	2 022
Çemen	67	195	219	491	914	1.521

Anonim (2018c)

Araştırmamızda bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin tohumlarında taşınan fungal hastalıkların etmenlerinin tespit ve teşhis edildiği bitkilere ait bilgiler aşağıda verilmektedir.

1.1. Melisa (*Melissa officinalis* L.) (Oğulotu)

Takım: *Tubiflorales*

Familya: *Lamiaceae*

Cins: *Melissa*

Tür: *Melissa officinalis* L.

Akdeniz Bölgesi ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde doğal olarak yetişen bir bitkidir. Melisa antik zamanlardan beri bilinen değerli bir biyomedikal bitki olarak birçok uygarlık tarafından kullanılmıştır. 10. Yüzyılda Araplar, kalp kuvvetlendirici, kişi gücünü kuvvetlendirici olarak kullanmıştır. Türkiye'de İstanbul, Bursa, Ege ve Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetiştirilmektedir.

Çok yıllık otsu bir bitkidir. Çok lifli, rengi beyazımsıdan açık kahverengiye kadar değişen ve çok sayıda yan kökleri kapsayan bir kök hacmine sahiptir. Yaprakları oval veya kalp şeklinde olup, uç kısmı sivridir. Genellikle alt yapraklar, üst yapraklardan büyüktür. Alt yüzü çıplak, üst yüzü ise genellikle fırça tüylerle kaplıdır.

Melisa bitkisi sindirimi, kilo vermeyi kolaylaştırır, stres ve kaygıyı azaltır, sakinleştirir, regl dönemindeki ağrıları azaltır ve cilt problemlerini tedavi edicidir (Anonim 2016b).

1.2. Anason (*Pimpinella anisum* L.)

Takım: *Apiales*

Familya: *Apiaceae* (Maydonozgiller)

Cins: *Pimpinella*

Tür: *Pimpinella anisum* L.

Anason çok eski bir kültür bitkisidir. Bugün anason değişik iklim bölgelerinde yayılmıştır. Ancak sıcak iklim bölgelerindeki yaygınlığı daha fazladır. Türkiye’de en fazla anason üretimi Burdur, Denizli ve Antalya illerinde yapılmaktadır.

Gövde dik, silindir biçiminde, içi boş, çok dallı, tüylü ve üstü çizgilidir. Meyveleri armut şeklinde küçük, üzeri tüylü, yeşilimsi sarı renklidir.

Anason, anason bitkisinin tohumlarından elde edilir. Rakı gibi alkollü içkilere çeşni katmak için kullanılır.

İnsan sağlığına faydaları, iştahsızlığı ve yemeklere karşı duyulan tiksintiyi giderir. Mide ve bağırsak gazlarını söktürür, idrarı artırır, kusmaları ve ishali keser. Ayrıca kedi köpek mamalarına tat vermek için de kullanılır (Anonim 2017). Sinirleri yatıştırır, migren ağrılarını keser, beyin yorgunluğunu giderir, uyku verir, kalbi kuvvetlendirir, kan dolaşımının düzenli olmasını sağlar. Astım, nefes darlığı ve bronşitte görülen şikayetleri giderir ve öksürüğü keser. Fazla miktarda kullanıldığı zaman uyuşukluk vermektedir (Anonim 2017).

1.3. Rezene (*Foeniculum vulgare* L.)

Takım: *Apiales*

Familya: *Apiaceae* (Maydanozgiller)

Cins: *Foeniculum*

Tür: *Foeniculum vulgare* L.

Rezenenin anavatanı Akdenizdir. Eski çağlardan beri medikal amaçlı ve baharat bitkisi olarak tanınır (Liebster,1991). Sebze rezenenin atası yabani rezene (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*) ilk çağlarda Çin, Hindistan, Yunan ve Roma'da baharat bitkisi ve tıbbi bitki olarak kullanılmıştır. Ülkemizde ise daha çok Akdeniz, Karadeniz ve Ege Bölgelerinde yetiştirilmektedir. Örneğin Plinius (M.S 23–79) 22 farklı hastalığın tedavisinde rezeneyi tavsiye etmiştir (Liebster,1991).

Rezene maydanozgiller familyasından iki yıllık bir bitki türüdür. Bitki iki metre boyuna kadar uzayabilir. Bitkinin çiçekleri altın sarısı bir renge sahiptir. Tohumlar yeşil-kahverengi renktedir. Biraz büyüdükçe, anasona benzer bir tat alırlar (Liebster 1991).

Rezene eskiden beri sinir sistemi, görme, solunum ve hazım problemlerine karşı tedavi amaçlı kullanılmıştır. Gaz giderici, süt salgısını çoğaltıcı, idrar ve balgam söktürücü, kasılma ve kramplara karşı da etkilidir. Meyveleri parfümeride, aynı zamanda günlük yiyeceklerin korunmasında kullanılır. Tohumları balığa ve diğer yemeklere katılır (Anonim 2018a).

1.4. Keten (*Linum usitatissimum* L.)

Takım: *Malpighiales*

Familiya: : *Linaceae*

Cins: *Linum*

Tür: *Linum usitatissimum* L.

Keten en eski kültür bitkilerinden olup, keten 4000-5000 yıldan beri Yakın Doğu ve Akdeniz Bölgelerinde lifi ve tohumları için yetiştirilmekte ve dünyanın çok bölgesinde üretilmektedir. Mısır'da M.Ö. 4. yüzyılda keten yetiştirildiği, mabetler ve mezarlar üzerine yapılan resimlerden anlaşılmıştır. Dünya'da keten üretiminde ilk sırayı Rusya ikinci sırayı Polonya almaktadır. Ülkemizde bazı keten türleri doğal olarak yetişmektedir. Türkiye de keten bitkisinin doğal florasının bulunduğu bölgeler; Batı, İç Anadolu ve Karadeniz'de daha fazla olmak üzere Anadolu'nun çoğu yeridir (Anonim 2008).

Lif ketenlerinin uzun boylu olanları makbuldür ve gübreli toprakta yetişir. Yağ ketenleri, iyice olgunlaştıktan sonra toplandığı halde, lif ketenleri olgunlaşmadan toplanır. Tohumları %40-45 yağ içerir ve yağ eldesinde kullanılır. Keten yağı omega 3 yağ asitleri, bakır, fosfor bakımından zengindir ve "bezir yağı" olarak bilinen bu yağ boyacılıkta da kullanılır. Yağı alınan tohumlar hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kanser önleyici ve kolesterol düzeyini koruyucu özelliklere sahiptir (Anonim 2018b).

1.5. Çemen (*Trigonella foenumgraecum* L.)

Takım: *Fabales*

Familiya: *Fabaceae* (Baklagiller)

Cins: *Trigonella*

Tür: *Trigonella foenumgraecum* L.

Eski Mısır'da yaklaşık olarak M.Ö. 2000 yıllarda tarımda kullanılmaya başlanılmıştır. Eski Mısır filozofları tarafından çemen otu için 'inek boynuzu' ve 'keçi boynuzu' isimleri kullanılmıştır. Çemen Mısır'ın en eski kültür bitkisi olduğu gibi Hint uygarlığı döneminde de tarımının yapıldığı bilinmektedir. Çemen otunun tarımı günümüzde ülkemizde Kayseri, Çankırı, Konya, Ankara, Gaziantep, Kahramanmaraş, Hatay ve Şanlıurfa gibi illerimizde tarımı yapılmaktadır.

Türkiye koşullarına göre, 30 ile 60 cm arasında boylanabilen tek yıllık ve otsu bir yapıda olan çemen bitkisinin saplarının biçimi yuvarlağa yakın ve içleri boştur. Gelişme döneminde iken tüylü bir yapıya sahip olup daha sonra tüyler dökülür ve koyu yeşil bir renk alır. Bitkinin üst yaprakları tüylü ve daha kalındır. Çemen tohumları ezilerek baharat olarak özellikle de çeşni üretiminde yaygın olarak kullanıldığı gibi tıpta, gıda sanayi de, ilaç sanayi de ve kozmetik sanayi de yaygın kullanımı vardır (Gökçe ve Efe 2016).

1.6. Kişniş (*Coriandrum sativum* L.)

Takım: *Apiales*

Familiya: *Apiaceae* (Maydonozgiller)

Cins: *Coriandrum*

Tür: *Coriandrum sativum* L.

Kişniş, maydanozgiller familyasından bir bitkidir ve genellikle 25-60cm boylarında tüysüz tek yıllık otsu bir bitkidir. Meyveleri küre şeklinde, sert ve tüsüzdür. Tıbbi ve besin olarak kullanımı M.Ö. 1500'lere dayanmaktadır. Ortaçağdan bu yana, bitki ile hazırlanan ekstraktlar yaygın olarak antibakteriyel, virüsit, fungusit, parazitisit, insektisit olarak tıbbi ve kozmetik uygulamalarda yer almaktadır (Ulutaş ve ark. 2017).

Bitkinin taze yaprakları salata olarak meyveleri ise baharat olarak kullanılmaktadır. Ferahlatıcı bir kokuya sahip olmakla birlikte meyvemsi bir tadı da vardır. Kişniş içerdiği B vitamini ile sinir sistemine destek sağlar, kalsiyum açısından zengin olan kişniş, kemiklerin uzun yıllar boyunca sağlıklı kalmasını sağlar, uykusuzluk ve stres gibi durumların azalmasına

yardımcı olur ve bağışıklık sistemini güçlendirmektedir. Günümüzde halk arasında ilaç olarak kullanımı oldukça yaygındır (Anonim 2016a).

Tıbbi ve aromatik bitki tohumlarının, her geçen gün sağlık, gıda ve endüstri alanlarında giderek artan talebe yönelik olarak bir çok hastalıktan arı bir şekilde yetiştirilmesi önem arz etmektedir. Bu duruma istinaden yaptığımız araştırmada, öncelikle tohum ile üretimi yapılan melisa (*M. officinalis*), keten (*L. usitatissimum*), kişniş (*C. sativum*), çemen (*T. foenumgraecum*), rezene (*F. vulgare*) ve anason (*P. anisum*) gibi bitkilerin tohumlarında taşınan fungal hastalık etmenlerinin tespit ve teşhis edilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle üretim materyali olarak kullanılan bu tohumların sağlıklı olup olmadıkları ve üretimde verim kaybına yol açabilme olasılıklarının tahmin edilebileceği düşünülmektedir (Yazdani ve ark. 2009).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tohumlarda taşınan hastalıkların tespiti üzerine ülkemizde yapılmış olan çalışmalara bakıldığında da tıbbi ve aromatik bitki tohumlarından daha çok buğday, çeltik gibi tahıllar ve sebze tohumlarında yapılmış araştırmalara rastlanmaktadır.

Demirci ve Hancıoğlu (1994) tarafından kişniş tohumlarında bulunan fungal hastalıkların varlığını tespit etmek ve bu hastalıkla mücadele etmek amacıyla yürütülen çalışma da kişniş'in en önemli hastalıklarından biri olan *Alternaria* sp. tanılanmış ve bu fungusun kişniş tohumlarıyla taşınabildiği belirtilmiştir. Tespit edilmiş olan fungus için en etkili mücadelenin prochloroz, captan ve iprodione fungisitleri olduğu bildirilmiştir.

Antalya, Burdur ve Denizli illerinde anason bitkilerinde *Cercospora malkoffii* hastalık etmeni tespit edilmiştir. Daha sonra Burdur ve Denizli illerinden alınan 27 anason tohum örneği incelenmiş ve bu tohumların 19'nun *C. malkoffii* (*Passalora malkoffii*) hastalık etmeninin sporları ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Hastalık etmenleri ile bulaşık olan bu tohumlarda siyah renk değişiklikleri gözlenmiştir (Erzurum ve ark. 2004).

Alternaria linicola'nın konukçu bitkisi olan keten (*Linum usitatissimum*) bitkisi arasındaki etkileşimi hakkında daha fazla bilgi edinmek için *A. linicola*'nın 7 izolatu ile 4 farklı keten çeşidi arasındaki etkileşim gözlenmiş ve yapılan çalışma sonucu hastalık skorları arasında farklılıkların gözlemlendiği fakat önemli bir fark saptanmadığı belirtilmiştir (Evans ve ark.1996).

Sırbistan'da birçok ticari *Apiaceae* familyasından bitki türünün fidelerinin önemli ölçüde solduğunun gözlenmesi üzerine 44'ü sebze geri kalanı kişniş, rezene, kimyon ve anason tohumu olmak üzere toplam 48 tohum örneği toplanmıştır. Bazı tohumların *Alternaria* spp. ile bulaşık olduğunu tespit edilmiş. Elde edilen *Alternaria* izolatlarının morfolojik karakterlerine ve moleküler (PCR yöntemi) teşhislerine bakılarak *Alternaria*'nın dört farklı patojen türü; *A. dauci*, *A. radicina*, *A. petroselini* ve *A. alternata* olarak tespit edilmiştir. *A. alternata* kişnişte %92.75, rezenede %61.75, anasonda %25,25 ve kimyonda %0.50 oranlarında saptanmıştır. Tohumlarda *Alternaria* türlerinin tespit edilmesiyle patojen içermeyen tohum elde etmek için *Apiaceae* tohumlarının iyileştirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Bulajic ve ark. 2009).

Bhadauria ve ark. (2013) 2006-2009 yılları arasında Agra Bölgesinden toplanan hardal otu (*Brassica juncea*), kişniş (*Coriander sativum*), kimyon (*Cumin cymium*) ve rezene (*Foeniculum vulgare*) tohumları üzerinde blotter yöntemi ve patates dekstroz agarı, havuç,

patates agarı, malt ekstrat agar ve yulaf agar vb. besi ortamları kullanılarak yapılan incelemeler sonucu 400 hardal otu tohumunda; *Absidia glauca* (%05,75), *Aspergillus flavus* (%8,75), *Aspergillus niger* (%7,55), *Aspergillus fumigatus* (16,25), *Aspergillus oryzae* (%10), *Cladosporium cladosporio* (%6,25), *Chaetomium indicum* (%5,50), *Fusarium chlamyosporu* (%6,25), *Phoma exigua* (%8), *Rhizoctonia solani* (%3,75), *Sclerotium rolfsii* (%1,25), *Trichoderma viride* (%7), *Emericella nidulanse* (%5,75), *Epicoccum purpurascence* (%4,75), *Glomerella cingulata* (%3,25). 400 kişniş tohumunda; *Aspergillus flavus* (%8,75), *Aspergillus niger* (%5,50), *Aspergillus parasiticus* (%7,75), *Chaetomium globosum* (%3,70), *Curvularia pallescence* (%5,75), *Cladosporium oxysporum* (%3,75), *Colletotrichum gloeosporioides* (%2,50), *Cunninghamella echinulata* (%4,00), *Drechslera specifer* (%04,25), *Fusarium moniliforme* (%10) *Memnoniella echinulata* (%11,25), *Microascus cinereous* (%5,25), *Myrothecium roridrum* (%3), *Nigrospora oryzae* (%3,75), *Penicillium citrinum* (%5,25), *Phoma glomerata* (%8), *Rhizoctonia solani* (%3,70), *Rhizopus stolonifer* (%4), *Trichothecium roseum* (%3). kimyon tohumunda; *Absidia corymbifera* (%04,25), *Acremonium kiliense* (%8,25), *Alternaria alternata* (%8,75), *Aspergillus clavatus* (%5), *Aspergillus flavus* (%07,5), *Aspergillus terreus* (%8,75), *Botryodiplodia theobrome* (%6,25), *Cunninghamella echinulata* (%3), *Fusarium oxysporum* (%4,25), *Fusarium solani* (%6,75), *Neosartoria fischeri* (%5,5), *Penicillium citrinum* (%7,1), *Penicillium italicum* (%6,75), *Trichoderma virens* (%5,5), *Trichoderma viride* (%09,5), rezene tohumunda; *Acremonium strictum* (%4,5), *Aspergillus flavus* (%08,75), *Aspergillus oryzae* (%6,5), *Chaetomium bostrychoides* (%6,75), *Curvularia lunata* (%3,75), *Drechslera rostrata* (%5), *Fusarium oxysporum* (%7,5), *Fusarium pallidroseum* (%4,75), *Microascus cinereous* (%7), *Mucor circinelloides* (%4,25), *Paecilomyces variotii* (%5,5), *Penicillium chrysogenum* (%8), *Periconia byssoides* (%2,5), *Phoma glomerata* (%4,25), *Rhizopus stolonifer* (%3,5), *Nigrospora oryzae* (%3), *Trichoderma harzianum* (%6,25), *Verticillium alboatrum* (%8,25)'un varlığı belirlenmiştir.

Seyyedi ve Rezvani (2015) tarafından 2010 yılında İran'nın Meşhed Üniversitesi'nin Ziraat Fakültesi tarafından gerçekleştirilen araştırmada, hasat sonrası domateslerin depo koşullarındaki kalitesini kontrol edebilmek amacıyla bazı tıbbi bitkilerden (kekik, nane, okoliptüs ve yaban fesleğeni) ve bu bitkilerden elde edilen biyo-ürünlerden yararlanarak domates bitkisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre bu tıbbi bitkilerin depo koşullarındaki domates bitkisi üzerinde *Rhizopus stolonifer* ve *A. alternata* (siyah çürüklük)'nin etkisini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Ayrıca nane ve yaban fesleğeni

bitkilerinin kullanımlarının sert ve sağlıklı bitkilerin arttırılmasında en etkili tıbbi bitkiler olarak kabul edildiğini bildirmişlerdir.

Pavlović ve ark. (2016)'nın yaptıkları bir araştırmada 2012-2013 yıllarında Sırbistan'ın Voyvodina eyaletinde üç bölgeden anason tohumları toplanmış ve bu anason tohumlarında görülen hastalıklar tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda anason tohumlarında görülen en yaygın fungusun *Fusarium* spp. olduğu ve bulunma oranının %3.75-13.75 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Morfolojik, mikroskobik ve moleküler tanılamalar sonucunda tür bazında anason tohumlarında; *F. tricinctum*, *F. proliferatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichoides*, *F. incarnatum* ve *F. Verticillioides*'in varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda dünyada anason tohumlarında patojen fungus olarak *F. tricinctum* ve *F. sporotrichoides* ilk kayıt olarak belirtilmiş olup, *Fusarium* türlerinin yedi izolatının da anason fidelerinde patojenik olduğu fakat en virulent türlerin *F. oxysporum*, *F. tricinctum* ve *F. incarnatum* olduğu ileri sürülmüştür.

Singh ve ark. (2016) tarafından dünya çapında tıbbi ve aromatik bitkilere ihtiyacın ve talebin arttığı gözlenmesiyle bu bitkiler üzerinde önemli ekonomik kayıplara yol açan fungal hastalıkların tespiti için bir çalışma yürütülmüştür. Çalışma sonucunda alınan tohum örneklerinden; *Alternaria* spp., *Cercospora* spp., *Colletotrichum* spp., *Cornyespora* spp., *Curvalaria* spp., *Diplocarpon* spp., *Drechslera* spp., *Macrophomina* spp. ve *Myrothecium* spp.'nin tespit edildiği bildirilmiştir.

Akhdar ve ark. (2017) Hindistan'da koruma altına alınan bazı tıbbi ve aromatik bitki tohumlarında tohum kaynaklı patojenleri tespit etmek amacıyla 2011-2015 yılları arasında bir araştırma yürütülmüştür. Çalışmada araştırmacılar 60'tan fazla tıbbi ve aromatik bitki örneği almış, alınan her bir tohum örneğine tohum sağlığı testi yapılmış ve araştırma sonucunda 17 fungus türü tespit edilmiştir. Yaptıkları mikroskobik incelemeler sonucunda tohum örneklerinde en yüksek oranda ilk olarak %44.4 oranında *Ustilago coicis* tespit etmişler, bunu %19.4 oranında *Phoma sorghina* ve %11.1 oranında *Botrytis cinerea* takip etmiştir.

Mangwende ve ark. (2018) Güney Afrika'da toplanan bazı kişniş tohumu örneklerinde tohum kaynaklı fungusları tespit etmek için agar plakası yöntemini kullanılmıştır ve sırasıyla *A. alternata*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Rhizopus* dahil olmak üzere 4 fungus türünü kişniş tohumuna inoküle etmişlerdir. Yapılan patojenisite testleri sonucu kişniş tohumu

üzerinde *A. alternata*'nın patojenik olduğu tespit etmişlerdir. Kışniş bitkisinde yaprak lekesine neden olan fungusun *A. alternata* olduğunu bildirilmişlerdir.

Gahukar (2018) yaptığı derlemede son yıllarda bazı tıbbi ve aromatik bitkilerden; limon otu (*Lemon grass*)'nda *Glomeria graminis* ve *Pythium* sp., arap yasemini (*Jasminum sambac*)'ninde *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria* sp., *Fusarium moniliforme*, İtır'da *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Macrophomina phaseolina*, Japon gülü'nde *Phytophthora* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotina* sp., *Pythium* sp. ve *Botrytis cinerea*, kutsal fesleğen de *Alternaria* sp., aleo vera da *Penicillium* sp. ve *Fusarium oxysporum* türlerinin tespit edildiğini bildirmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Yapılan çalışmada, tohum materyali olarak Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü'nün yetiştirmiş olduğu tıbbi ve aromatik bitki tohumlarında; Keten (*Linum usitatissimum*), kişniş (*Coriandrum sativum*), çemen (*Trigonella foenumgraecum*), rezene (*Foeniculum vulgare*), anason (*Pimpinella anisum*), melisa (*Melissa officinalis*) kullanılmıştır. Tohumlar 50'şer gr'lık kâğıt torbalarda izolasyon için +4°C'de buz dolabında muhafaza edilmiştir. İzolasyon işlemleri için laboratuvarında incelemeye alınmıştır. Tohumda taşınan fungusların izolasyon işlemi için cam petri, steril kurutma kağıdı, kimyasal malzemeler (PDA, PCA, Su Agarı, Yulaf Unu Agar) makine ve teçhizat olarak; mikroskop, inkubator, otoklav, hassas terazi, tüp karıştırıcı, steril kabin kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fungal Floranın Tespiti

Fungal floranın tespiti amacıyla tıbbi ve aromatik bitki tohumlarına %2'lik sodyum hipoklorit ile 3 dakika süre ile yüzey sterilizasyon işlemi uygulanmış ve daha sonra 2 defa steril saf sudan geçirilerek steril kurutma kağıtlarında steril kabinde kurutma işlemi yapılmıştır. Steril pens yardımıyla tohumlar, patates dekstroza agar (PDA) besi yerlerine ve antibiyotik (sterptomisin ve chloramphenicol) içeren petrilere yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Denemeler 1 petride 10 adet tohum bulunacak şekilde 40 tekerrürlü olarak tesadüf parselleri deneme deseninde yürütülmüş, toplamda her bir tohumdan 400'er adet tohum kültüre alınmıştır. Tohum ekilen petrilere 23°C'de 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda 7-10 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda fungusların besi ortamlarındaki fungal gelişimleri, morfolojik yapılarının tespiti için kültür renkleri, konidiofor ve konidi yapıları x 40 büyütme ışık mikroskobu altında ayrı ayrı incelenmiş ve daha sonra trinoküler araştırma mikroskobunda resimleri çekilerek cins veya tür düzeyinde tanımlamaları (Domsch ve ark.,1980'e göre) gerçekleştirilmiştir.

Tanımlama sırasında PDA dışında patates havuç agar (PCA), su agar ve yulaf unu agar kullanılmıştır. Tür veya cins düzeyinde gruplandırılan izolatlar patojenisite testleri için her grubu temsil eden izolatlar seçilerek tek spor izolasyonları yapılmıştır.

3.2.1.1 PDA Besi Yerinin Hazırlanması

1000 ml saf su

39 g PDA

1000 ml saf suya 39 g PDA karıştırılmıştır. Besi yeri 20 dakika 121 °C 'de ki otoklavda 1.1 atm. basınçta, sterilize edilmiştir. Steril kabin içerisinde besiy ortamı steril petrilere dökülmüştür.



Şekil 3.1. Petri kaplarına yerleştirilen steril tohumlar

3.2.1.2 PCA Besi Yerinin Hazırlanması

1000 ml saf suya 23.5gr Plate Count Agar (PCA) konur ve kaynatılarak elde edilen besiy yeri otoklavda 120° C'de bir saat sterilize edilir. Petrilere taksim edilir.

3.2.1.3 Yulaf Unu Agar Besi Ortamı Hazırlanması

Yulaf unu	30.0 g.
Agar	15.0 g.
Saf su	1000.0 ml

Yulaf unu 500 ml. Saf suya konur kaynatılarak eritilir ve süzülür. Su ilâvesiyle 1 litreye tamamlanır. Otoklavda 120° C'de bir saat sterilize edilir. Sonra agar ilave edilir ve 120° C'de tekrar otoklavda 20 dakika sterilize edilir. Petrilere taksim edilir.

3.2.2. Tek spor izolasyonu

Farklı besi ortamlarındaki koloni gelişimleri ve sporulasyon şekilleri mikroskop altında incelenerek, seçilen her bir cins veya türe ait izolatların tek spor izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla izolatlar, konidiospor üretiminin en fazla olduğu PCA ve PDA besi ortamı içeren petrilere 23°C'de 7-10 gün boyunca geliştirilmiş olup, daha sonra üzerine petrinin yüzeyini kaplayacak şekilde steril su (20ml) ilave edilerek spor süspansiyon haline getirilmiştir. Elde edilen spor süspansiyonundan lam ve lamel ile preparat hazırlanıp mikroskop altında plastik öze yardımı ile alınan inokulum su agarı üzerine yoğunluğu azaltılmış bir şekilde çizilmiştir. Çizimi tamamlanmış petrilere 23°C'de bir gün olmak üzere karanlıkta bekletilmiştir. İnkübasyon sonucunda petrilere mikroskopta gözlemlenmiş mevcut tek sporlar PDA besi ortamı içeren petrilere aktarılmış ve ardından geliştirilmiş saf kültürler eğik besi ortamında +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Patojenisite testleri

Patojenisite testleri gerçekleştirilirken fungus cinslerine ait her bir grubun tek spor izolatlarının spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Spor süspansiyonları hazırlanırken Fungal floranın tanımlanması kısmında anlatıldığı gibi steril edilmiş tohumlar, patojenisite testi için her patojen için ayrı ayrı tohum lamı yardımıyla *Alternaria* için; 1×10^5 , *Arthrinium* için; 1×10^4 , *Aspergillus* için; 1×10^4 , *Botrytis* için; 1×10^4 , *Cladosporium* için; 1×10^5 oranlarında hazırlanmıştır. (Bhadauria ve ark 2013; Akhdar ve ark. 2017, Noelting ve ark. 2012). Tohumlar konidi süspansiyonları içine daldırılarak, üzerine 10 µl Tween 20 ilave edilmiş ve 1 saat boyunca rotary shaker ile çalkalanmıştır. Karıştırma sonucunda tohumlar steril kurutma kağıtları üzerine alınmış ve 30 dakika süre ile kuruması beklenmiştir. Kurutulan tohumlar, Blotter yöntemi, içleri steril su ile ıslatılmış 4 kat kurutma kağıdı bulunan petrilere (90mm), her bir petriye 10'ar adet tohum gelmek koşuluyla yerleştirilmiştir. Denemeler 4 tekerrürlü olarak, her bir tekerrürde 10 petri olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür.

İnokule edilmiş tohumlar bir hafta boyunca 24°C de inkübasyon periyodu sonucunda gözlemlenerek tohumların her biri hasta-sağlam olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. Tohumlarda Fungal Floraya Ait Bulaşıklık Oranının Belirlenmesi

Denemeye alınan tıbbi ve aromatik bitki tohumlarının ne kadarının sağlıklı, ne kadarının ise hastalıklı olduğunu belirlemek amacıyla aşağıda verilen formüle göre hesaplamalar yapılmıştır. Daha sonra, bu formüle göre enfekteli olarak sayılan tohumların fungal patojenlerle bulaşıklılık oranları kaydedilmiştir.

$$\text{Bulaşıklık oranı} = \frac{\text{Fungal Mikroorganizma ile Bulaşık Tohum Sayısı}}{\text{İncelenen Tohum Sayısı}} \times 100$$

3.2.5. Fungusların DNA izolasyonu ve moleküler olarak teşhisi

Tohumlardan izole edilen fungus gruplarını temsil eden izolatların morfolojik ve kültürel özellikleri belirlendikten sonra, patojen oldukları tespit edilen bazı izolatlar Namık Kemal Üniversitesi NABİLTEM laboratuvarlarında (hizmet alımı şeklinde) aşağıda belirtilen yöntemle göre DNA'ları saflaştırılmıştır. İzolatların baz dizilimleri göz önünde bulundurularak BLASTLAMA yapılmış ve yakınlık derecelerine göre tür teşhişleri gerçekleştirilmiştir.

DNA'nın saflaştırılma işleminde öncelikle, petri yüzeyinde gelişen fungus hiflerinden steril pipet ucu yardımıyla toplanan örnekler önceden etiketlenmiş 1,5ml'lik santrifüj tüplerine (eppendorf) aktarılır.

- 1,5ml'lik santrifüj tüplerine 250µl CTAB tampon çözeltisi eklenir.
- %70'lik alkole batırılan pestle, silis kumuna batırılarak üzerine bir miktar kum alması sağlanır. Kumlu pestle, örneğin bulunduğu mikrosantrifüj tüpüne batırılarak aşağı yukarı hareketlerle ve dibinde döndürülerek örneğin homojen bir görüntü alması sağlanır.
- Üzerine 250 µl CTAB tampon çözeltisi ilave edilerek alt-üst edilerek karıştırılır.
- Üzerine 500µl Kloroform ilave edilir. Alt-üst edilerek iyice çalkalanır ve karıştırılır.
- 16000 x g' de 10 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası üst faz yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarılır.
- Üzerine 500 µl soğuk isopropanol eklenir.
- 4°C'de 13500 x g'de 10 dakika santrifüj edilir.

- Santrifüj sonrası üst faz alınıp atılır.
- Taze hazırlanmış 250 µl %70'lik soğuk ethanol eklenir.
- 13500 x g'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası üst faz alınıp atılır.
- Örnekler 37°C'de etüvde yarım saat kurutulur.
- Pelletin büyüklüğüne göre 50 – 100 µl Strl dH2O eklenir ve Pellet çözülür.
- Agaroz jelde ve gerekirse spektrofotometrede gDNA'lar kontrol edilir.

ITS 1F- ITS4 primerleri ile PCR

	<u>1X için</u>
10 x buffer	2.5 µl
MgCl	1.66 µl
PrimerITS 1F (10pmol)	1µl
PrimerITS 4 (10pmol)	1µl
dNTP	0.5 µl
TaqPol	0,2 µl
gDNA	0,5-1µl
dH2O	<u>18,65µl</u>
	25 µl

PCR ürününün beklenen boyutu yaklaşık 610bp.

PCR sonucu %2'lik agaroz jelde kontrol edildi.

PEG pürifikasyonunu takiben sekans reaksiyonu kuruldu.

Sekans reaksiyonu;

	<u>1X için</u>
Enzim mix.	1.5µl
Primer (1pmol)	2.5µl
PCR ürünü	3 µl

dH2O	3 µl
	10µl

Yukarıda anlatılan prosedüre göre DNA'ları saflaştırılma işlemi gerçekleştirildikten sonra PCR sonuçlarına göre baz dizilimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda, teşhisi yapılan fungus türlerinin tohumlar üzerinde yapılan patojenisite testleri sonucunda elde edilen değerler Varyans analizine tabii tutulmuş, ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma testine ($P \leq 0.01$) göre karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bazı Tıbbi Aromatik Bitkilerin Funguslar ile Enfekteli Tohum Oranları

Deneme Sonunda Tıbbi ve Aromatik Bitki Tohumlarında Tespit Edilen Funguslar Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü'nün Endüstri Bitkileri Anabilim dalının 2016-2017 yılında yetiştirmiş oldukları tıbbi aromatik bitkilerden her bir bitki için 25 gr tohum örneği temin edilmiştir. Tohumlardan gelişen tüm fungal etmenler saprofit ayrımı yapılmaksızın öncelikle funguslar ile bulaşıklık açısından değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1.). Tıbbi aromatik bitkilerden; melisa, kişniş, rezene, anason, çemen ve keten tohumlarına ait örneklerden bazıları tür düzeyinde olmak üzere, 7 farklı fungus cinsi tespit edilmiştir (Şekil 4.1- 4.13).

Çizelge 4.1. Tohumlarda Tespit Edilen Fungal Mikroorganizmaların Bulaşıklık Oranları(%)

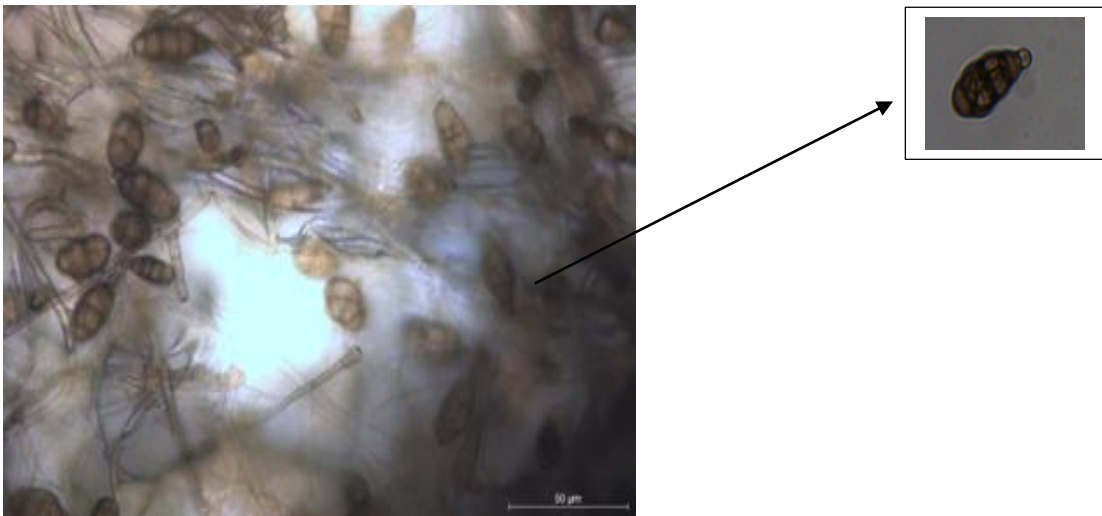
Sıra No	Tohumlar	İncelenen Tohum Sayısı (adet)	Fungal Mikroorganizmalar ile Bulaşık Tohum Sayısı (adet)	Bulaşıklık Oranı (%)
1	Anason	400	20	5
2	Kişniş	400	3	0.75
3	Melisa	400	97	24.25
4	Rezene	400	39	9.75
5	Çemen	400	100	25
6	Keten	400	34	8.5

Çizelge 4.1'e bakıldığında en çok sayıda fungus gelişimi olan tohum, çemen tohumu (%25) olarak ilk sırada yer almaktadır. İkinci sırada melisa tohumunun (%24.25), üçüncü sırada rezene tohumunun (%9.75), dördüncü sırada keten tohumunun (%8.5) beşinci sırada anason tohumunun (%5) ve altıncı sırada kişniş tohumunun (%0.75) oranlarında bazı fungal hastalık etmenleri ile bulaşık oldukları belirlenmiştir.

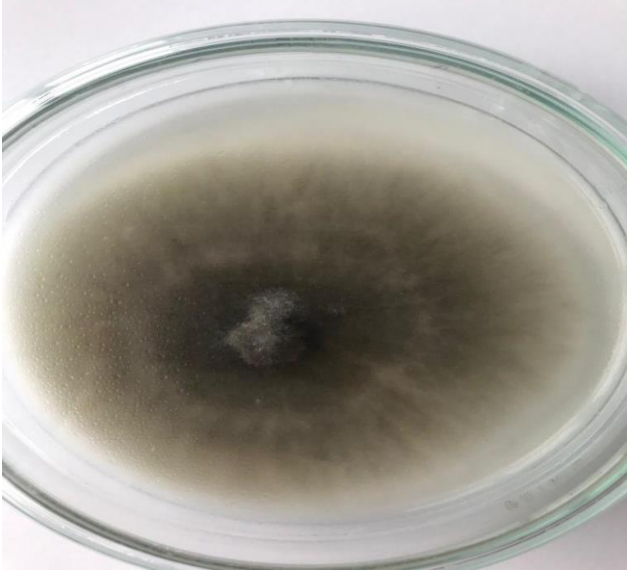
Farklı tıbbi ve aromatik bitki tohumlarından izole edilen fungal patojenlerin saf kültürlerindeki koloni gelişimi ve mikroskopik özellikleri dikkate alınmak suretiyle tanımlanmış olan fungal patojene ait bilgiler, her tür ve genus için ayrı ayrı aşağıda açıklanmıştır.

4.1.1. *Alternaria alternata*

Çalışmamızda tespit edilen *Alternaria* sp. geniş bir konukçu listesine sahip olmakla beraber melisa, rezene, keten ve çemen bitkileri üzerinde önemli ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir. *Alternaria alternata*'nın konidileri gri, kahverengi bir renkte olduğu ve etmenin konidi boyutları 10-22x45–70 µm çaplarında (ortalama boyu; 27,15 µm) (ortalama en;12,42 µm) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). PDA besi ortamında koloni yüzeysel ve kahverengimsi bir renkte gelişme göstermiştir (Şekil 4.2) (Neergaard, 1945). *Alternaria alternata* TR MeAa3 izolatu BLAST analizinde alt ünite ribozomal RNA geni kısmi sekans, iç transcribed spacer 1,5.8S ribozomal RNA geni ve iç transcribed spacer 2, tam sekans, ve büyük alt ünite ribozomal RNA geni kısmi sekans ile kıyaslamasında *Alternaria alternata* FP-027-D2 izolatu (MH102093 Patyshakuliyeva ve ark. 2018) ile %99.31, *Alternaria* sp. IR1 izolatu (MK461065 Furtado 2019) ile %99.14, *Alternaria alternata* AC82 izolatu (LC440583 Nishikawa ve ark. 2013) ile %99.31, *Alternaria alternata* PM11 izolatu (MF281325 Hafez ve ark. 2017) ile %99.31, *Alternaria alternata* AE1 (KY676196 Ruocco 2017) ile %99.31 oranında benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.1. *A. alternata*'nın konidileri (x40)



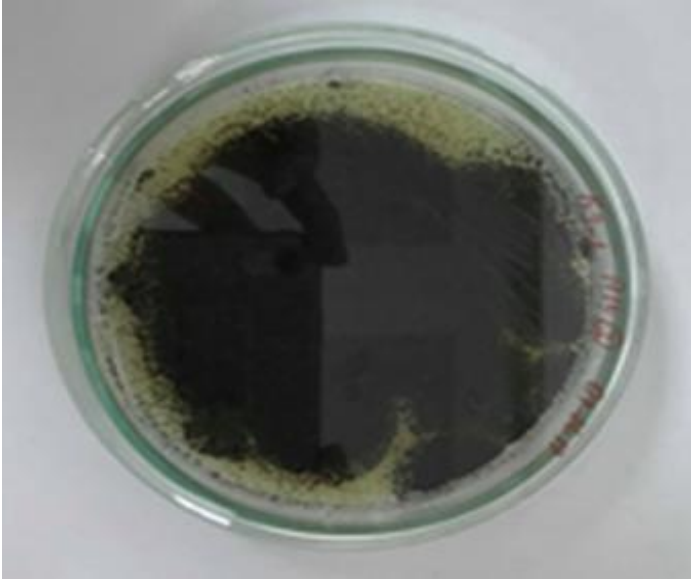
Şekil 4.2. *A. alternata*'nın PDA besi ortamındaki gelişimi
(Koloni Çapı: 90 mm 23°C de 7gün)

4.1.2. *Aspergillus niger*

Çalışmamızda tespit edilen etmen geniş bir konukçu listesine sahip olmakla birlikte kişniş tohumlarında da belirlenmiştir (Bhadoria ve ark. 2013). Dik konidioforlara sahip olup, uçlarında vesiküllerinin bulunduğu gözlenmiştir. En karakteristik özelliği hifin herhangi bir hücresinin ayak hücresi konumunu alarak, bu hücreye dik açı yapacak şekilde konidiofor bulunması, onun ucunda çok sayıda *phialid* ve üstünde *phialospore*'lerle kaplı bir vecisle oluşmasıdır (Thom ve ark.,1945) (Şekil 4.3). Etmenin konidi boyutları ise 2.5-2.8 µm çapındadır (Domsch ve ark. 1980; Raper ve Fennell 1965). Fungusun PDA besi ortamında koloni gelişimi siyah havai şekildedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. *A. niger*'in konidileri (x40)



Şekil 4.4. *A. niger*'in PDA besi ortamındaki koloni gelişimi (Koloni Çapı: 90 mm 23°C de 3-4 gün)

4.1.3. *Cladosporium sphaerospermum*

Çalışmamızda rezene ve keten tohumlarında tespit edilen *Cladosporium sphaerospermum*'un konidi gelişiminin oldukça yavaş olduğu ve konidioforlarının uzun veya kısa dallı olup, dirsekli yapıda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Hem konidioforları hem de konidilerinin yüzeyi düz veya dikenli görünümündedir (Zalar ve ark. 2007). *C. sphaerospermum*'un konidi boyutları ise 5,01-13,29 µm'dır (ortalama boy; 11,93 µm), eni ise 3,45-9,23 µm (ortalama eni; 7,65 µm) (Şekil 4.5) (Ellis 1976). PDA besi ortamında kültür

gelişimi zeytin yeşilinden yeşilimsi kahverengiye dönen renkte olup, bol konidili olduğu için tozlu kümeler şeklinde olduğu görülmektedir. Konidileri limon şeklinde tek hücreli yapılara sahip olduğu yapmış olduğumuz mikroskobik incelemelerde görülmüştür (Şekil 4.5). *Cladosporium sphaerospermum* TR-ReCs13 izolatu izolatı BLAST analizinde altünite ribozonal RNA geni kısmi sekans, iç transcribed spacer 1,5.8S ribozonal RNA geni ve iç transcribed spacer 2, tam sekans, ve büyük alt ünite ribzanal RNA geni kısmi sekans ile kıyaslamasında *Cladosporium sphaerospermum* GN-GS-1-5 izolatu (MG554272 Yun ve ark. 2018) ile %99.62, *Cladosporium sphaerospermum* WL5-1A izolatu (MF422149 Coronado ve ark. 2018) ile %99.62, *Cladosporium sphaerospermum* DTO:153-C1 izolatu (MF473265 Bensch 2018) ile %99.62, *Cladosporium sphaerospermum* NIHHS509 izolatu (KY929280 Park ve ark. 2017) ile %99.62, *Cladosporium sphaerospermum* DTO 255-H7 izolatu (KP701988 Segers ve ark. 2015) ile %99.62 oranında benzerlik göstermektedir.



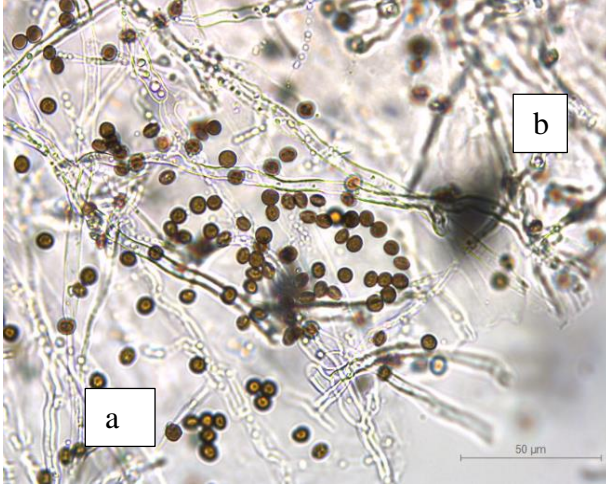
Şekil 4.5. *C. sphaerospermum*'un karakteristik konidiofor yapısı (x40)



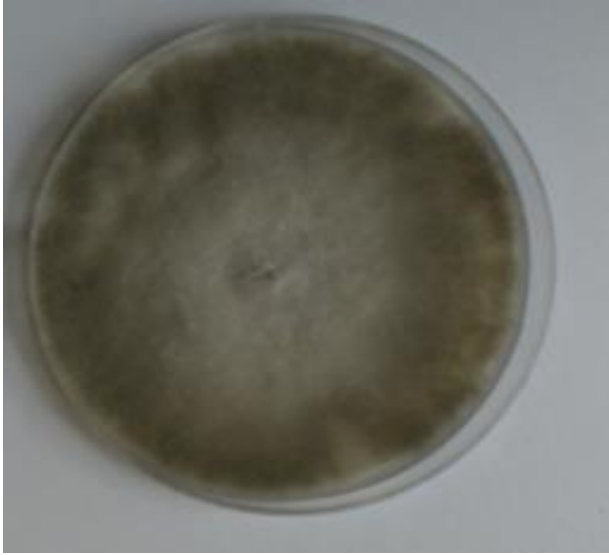
Şekil 4.6 *C. sphaerospermum*'un PDA besi ortamındaki koloni gelişimi
(Koloni Çapı: 70-75 mm 23°C de 10 günde)

4.1.4. *Botrytis cinerea*

Araştırmamızda teşhis edilen *Botrytis cinerea* dünya genelinde geniş bir konukçu yelpazesine sahip olup, kurşuni küfe neden olduğu bilinmektedir (Akhdar ve ark. 2017). İncelemeler sonucunda konidioforları uzun ve dik yapılı, seyrek dallanmış ve bölmeli olup ve konidioforların ucunda renksiz veya açık tonda tek hücreli konidiler bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7 a.) Şekilleri küreselden silindiriğe kadar değişim gösterebildiği gibi konidiler toplu üzüm salkımı şeklinde dallanmış yapıdadır (Şekil 4.7 b.). Etmenin konidi boyutları ise 6-18 x 4-11 µm olduğu tespit edilmiştir (Ellis 1976). Etmenin PDA besi ortamında grimsi kahverengi pamuksu görünümde bir koloni gelişimi göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. *B. cinerea*'nın a. konidileri ve b. üzüm salkımı şeklindeki konidiofor yapısı (x40)

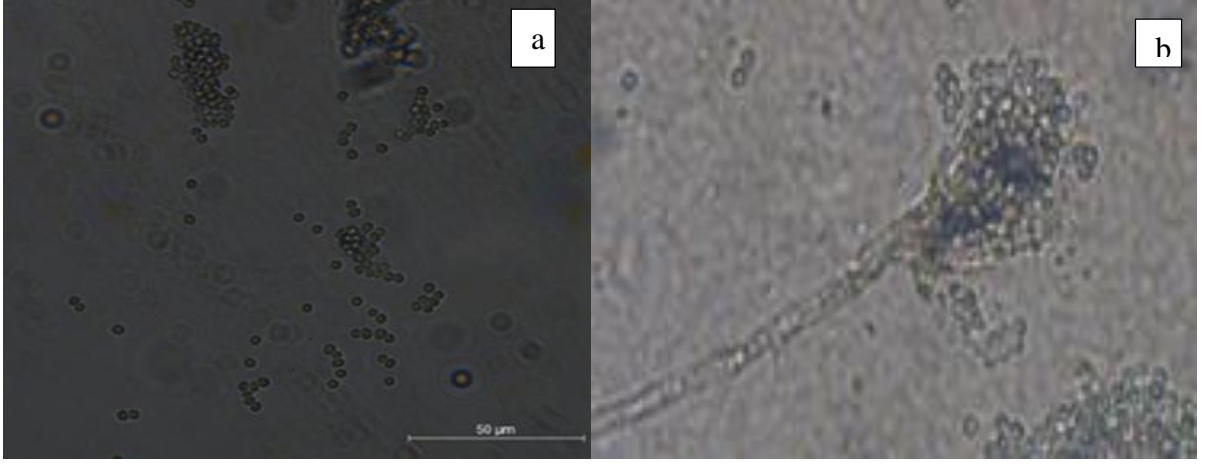


Şekil 4.8. *B. cinerea*'nin PDA besi ortamında koloni gelişimi (Koloni Çapı: 90 mm 23°C de 10gün)

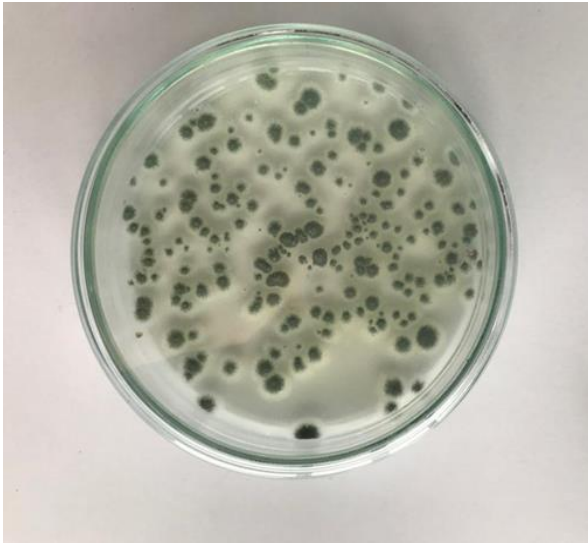
4.1.5. *Penicillium* spp.

Araştırmamızda anason, melisa, keten ve rezene tohumlarında saprofit olarak tespit edilen bu fungusun konidioforları az veya dik pozisyonda, nispeten dar ve ince çeperli, genellikle 1-2 bölmeye sahip olduğu görülmüştür. İncelemeler sonucunda görüldüğü gibi bu fungusun en karakteristik özelliği fırça görünümünde olması ve konidilerin şişe tipindeki fialidler tarafından meydana gelmesidir. Fialidler tipik şişe şeklinde ve şeffaftır, uzun zincirler halinde küremsi, yumurta tipinde, şeffaf veya koyu renkli düz veya pürüzlü konidileri taşıdığı

görülmüştür (Şekil 4.9). Konidi boyutları 2-4 µm çapındadır. (Pitt, 1979) (Ellis 1976; Watanabe ve ark. 2002).



Şekil 4.9. a. *Penicillium* sp.'nin a. konidi ve b. konidioforun penisillat dallanması (x40)



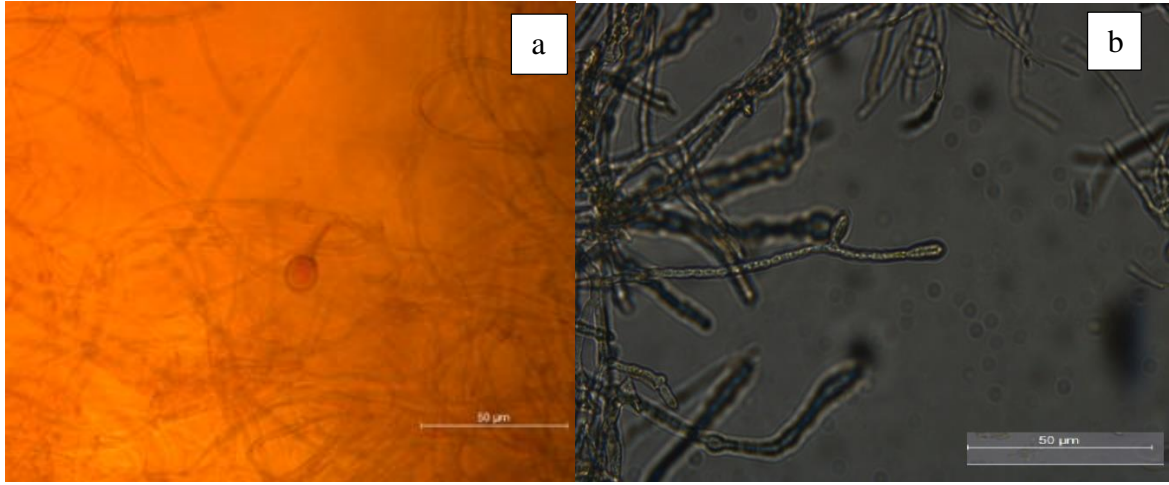
Şekil 4.10. *Penicillium* spp.'nin PDA besi ortamında koloni gelişimi (Koloni Çapı: 90mm 23°C de 3-4 gün)

Fungus PDA besi ortamında kitle halinde gelişme gösteren gri-yeşil, gri-mavi veya gri renkte gelişen kolonilere sahiptir (Şekil 4.10).

4.1.6. *Epicoccum nigrum*

Çalışmamızda tespit edilen fungus PDA besi ortamında sarı, turuncu ve kırmızı parlak tonlarında (PCA besi ortamında), hızlı gelişen kolonileri olduğu, sklerot yapılarının içinde

piknidler bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.12). Konidioforların ise bazen dallı, düz veya eğimli, soluk kahverengi ve genellikle ucunda siğilimsi bir yapıları mevcuttur. Konidilerinin yapısı küremsi olup, etmenin konidi boyutları ise 6.93-13.83 µm (ortalama boy 15,46 µm), eni ise 5.90-11.96 µm (ortalama 8.93 µm) (Şekil 4.11)'dir (Schol ve Schwarz, 1959; Ellis, 1976; Domsch ve ark. 1980; Samson, 1993). *Epicoccum nigrum* TR MeEn16 izolatu BLAST analizinde altünite ribozomal RNA geni kısmi sekans, iç transcribed spacer 1,5.8S ribozomal RNA geni ve iç transcribed spacer 2, tam sekans, ve büyük alt ünite ribozomal RNA geni kısmi sekans ile kıyaslamasında *E. nigrum* m11 izolatu (MH931271, Schlegel ve ark. 2018) ile %99,28, *Epicoccum nigrum* G392 izolatu (KR094461, Kaur ve ark. 2016) ile %99,28, *Epicoccum nigrum* 18S (FJ904918 Njuguna ve ark. 2009) ile %99,10, *Epicoccum nigrum* RM205 izolatu (MG602568 Mwesigwa ve ark. 2019) ile %99,27, *Epicoccum nigrum* Eu185B izolatu ile (FJ904828 Njuguna ve ark. 2011) %99,27 oranında benzerlik göstermiştir.



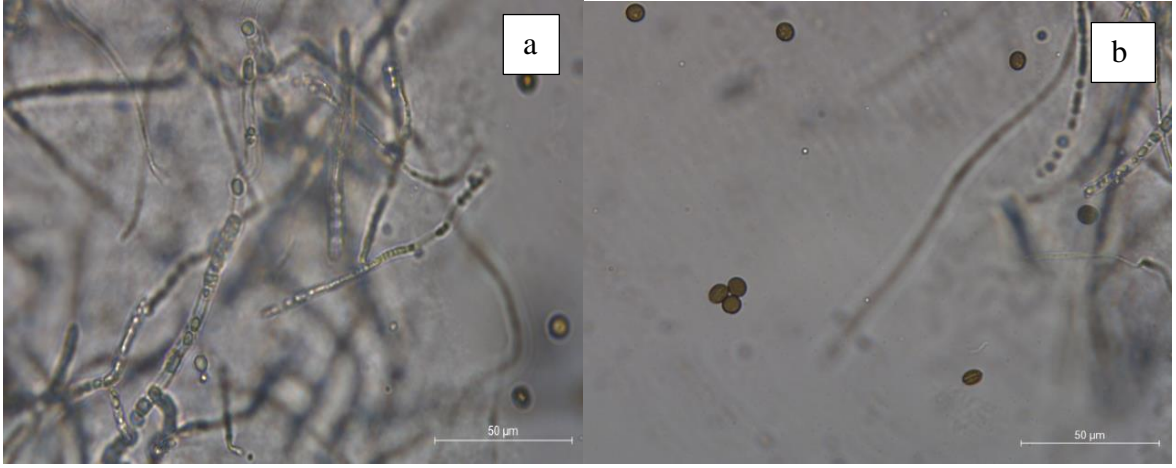
Şekil 4.11. *E. nigrum*'un (a) konidi ve (b) konidiofor yapısı (x40)



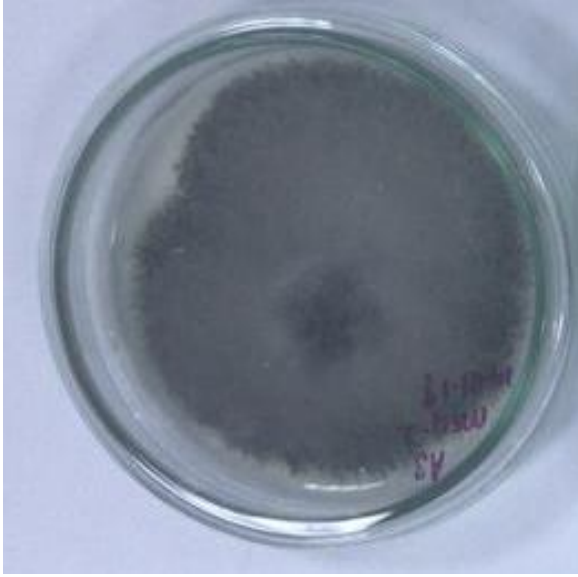
Şekil 4.12. *E. nigrum*'un PDA besi ortamında koloni gelişimi (Koloni Çapı: 80-85 mm 23°C de 10 günde)

4.1.7. *Arthrinium arundinis*

Miselyumları kısmen yüzeysel kısmen gömülmüş şekildedir. Konidioforları üzerinde basit bir veya birkaç konidi taşımaktadırlar. Konidileri bölmesiz, yuvarlak bir şekilde ve koyu kahverengi bir renktedir. (Şekil 4.13) (Crous ve Groenewald 2013). Konidi boyutları ise 5.08-10.02 μm (ortalama 7.55 μm), eni ise 3.45-7.99 μm (ortalama 5.72 μm)'dir. *Arthrinium arundinis* TR-Me ArtA5 izolatu BLAST analizinde altünite ribozomal RNA geni kısmi sekans, iç transcribed spacer 1,5.8S ribozomal RNA geni ve iç transcribed spacer 2, tam sekans, ve büyük alt ünite ribozomal RNA geni kısmi sekans ile kıyaslamasında *Arthrinium arundinis* 2 izolatu (KJ702044 Linnakoski ve ark. 2018) ile %99.83, *Arthrinium arundinis* G41 izolatu (GU566268 Bukovska ve ark.2010) ile %99.31, *Arthrinium arundinis* CBA:732.71 izolatu (KF144889 Crous ve ark. 2013) ile %99.66, *Arthrinium arundinis* CBS:464.83 izolatu (KF144888 Crous ve ark. 2013) ile %99.66, *Arthrinium arundinis* Sp-IV izolatu (MF476025 Paiva de Carvalho ve ark. 2018) ile %99.48, *Arthrinium arundinis* Poll-1 izolatu (KX533933 Dylag ve ark. 2016) ile %100 benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.13. *A. arundinis*'in PDA besi ortamındaki a.konidiofor yapısı ve b. konidileri (x40)



Şekil 4.14. *A. arundinis*'in PDA besi ortamında koloni gelişimi (Koloni Çapı: 85 mm 23°C de 10gün)

Araştırmalarımızda tespit edilen fungus PDA besi ortamında grimsi siyahımsı renkte havai bir gelişim göstermiştir (Şekil 4.14). Etmen ile yapılan BLAST analizi sonuçlarında *Arthrinium arundinis*'in (Örnek No Accession no: MK806696) %99 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14) (Ellis 1976; Watanabe ve ark. 2002).

4.2. Bazı Tıbbi Aromatik Bitki Tohumları Yüzeyinde Taşınan Funguslar ve Patojenisite Oranları

Çizelge 4.2’de ise bazı tıbbi ve aromatik bitki tohumlarında bulunan fungal mikroorganizmalar saptanmış ve tohumda bulunma oranları yüzde olarak belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitki Tohumlarında Teşhis Edilen Fungal Etmenlerin Bulunma Oranları (%)

Tohumlar	İzole Edilen Fungal Mikroorganizmalar(%)						
	<i>A. alternata</i>	<i>A. niger</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Arthrimum arundinis</i>
Anason	0.0	0.0	0.0	5	0.0	0.0	0.0
Kışniş	0.0	0,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0,25
Melisa	19	0.0	1	1,25	0.0	0,75	2,25
Rezene	0.0	0.0	0.0	7,5	2,25	0.0	0.0
Çemen	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Keten	0.0	0.0	0.0	5	1,75	0.0	0.0

*Her bir değer dört tekrarın ortalamasıdır.

Tıbbi ve aromatik bitki tohumlarından tespit edilen veya tanımlanan fungus cins veya tür sayısı 7 adettir. Örneklerde tespit edilen funguslar, çemen tohumlarında *Alternaria alternata* %25, melisa tohumlarında *A. alternata* %19, *A. arundinis* %2.25, *Penicillium spp.* %1.25, *B. cinerea* %1 ve *E. nigrum* %0.75 oranında tespit edilmiştir. Rezene tohumlarında *Penicillium sp.* %7.5, *C. sphaerospermum* %2.25 oranlarında bulunmuştur. Keten tohumunda *Penicillium spp.* %5 ve *C. sphaerospermum* %1.75’dir. Anason tohumunda *Penicillium spp.* %5’dir. Kışniş tohumlarında *A. niger* %0.5 ve *A. arundinis* %25 oranında olarak tespit edilmiştir. Fungal flora açısından incelemeye alınan tıbbi ve aromatik bitki tohumlarından melisa farklı tür ve cinslere ait fungusları barındırma açısından en yüksek bulaşıklılık oranına sahiptir.

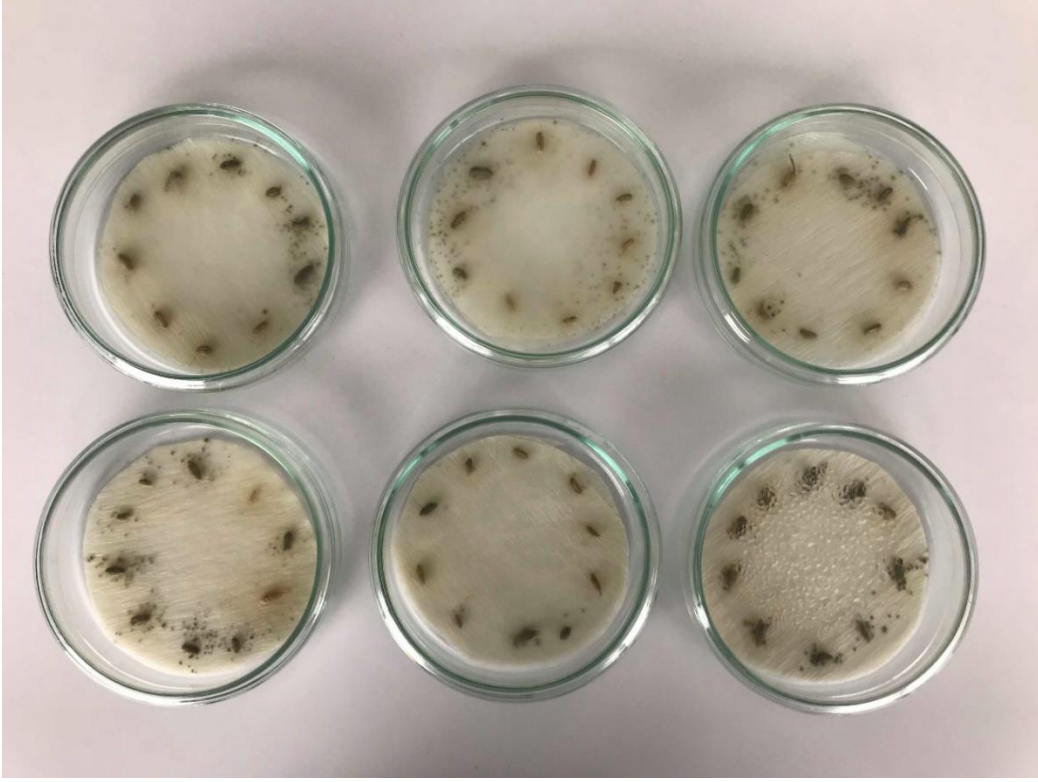
Tohum örneklerinden tespit edilen fungal mikroorganizmalardan en çok bulunan türlere patojenisite testi yapılmıştır (Çizelge 4.3). Yalnızca melisa tohumlarından izole edilen *E. nigrum*'un denemeler esnasında sporulasyonunda sorun yaşandığı için bu türün patojenisite testi gerçekleştirilememiştir.

Çizelge 4.3. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitki Tohumlarında Gelişen Fungus Türlerinin Patojenisite Oranları(%)

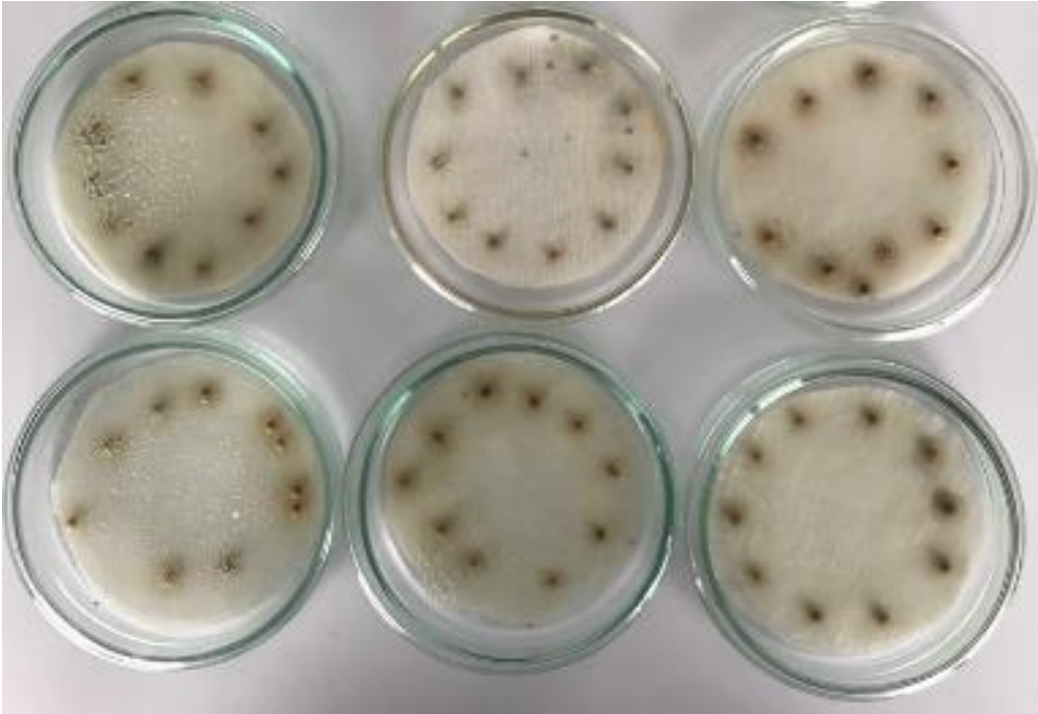
Tohumlar	Patojenisite oranları(%)				
	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>A. arundinis</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
Rezene	0.00 ± 0.00**b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b	86.00 ± 2.16a
Melisa	70.00 ± 2.54a	35.00 ± 2.04a	67.00 ± 6.04b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
Çemen	75.00 ± 3.53a	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b
Keten	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b	90.00 ± 2.16a
Kişniş	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	96.00 ± 2.16a	100 ± 0.00a	0.00 ± 0.00b

*: Aynı sütunda yer alan her bir değer dört tekrarın ortalaması olup ve birbirinden farklı harfler ile gösterilen değerler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre önemlidir ($P \leq 0.01$).

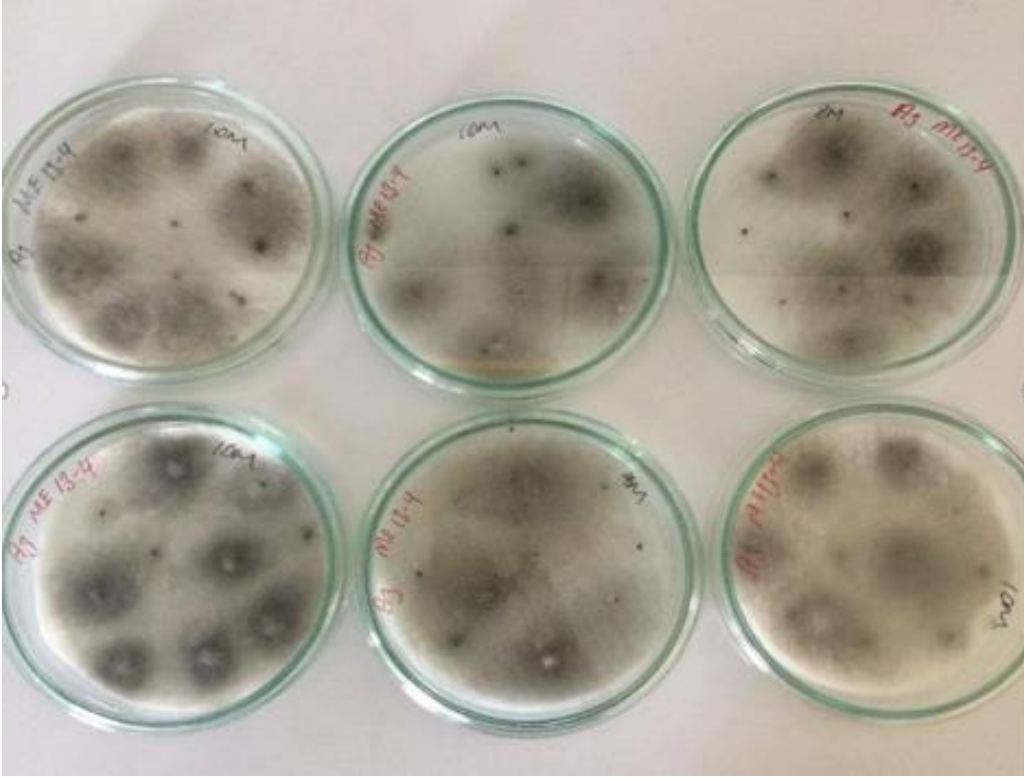
Yapılan patojenisite testi sonuçlarına göre çemen tohumlarında gelişen tek fungus türü *A. alternaria* olup, bu türün %75.00 ± 3.53 oranında patojen olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.). *A. alternata* aynı zamanda melisa tohumlarından da izole edilmiş ve patojenisitesi %70.00 ± 2.54 olarak hesaplanmıştır. Çemen ve melisada gelişen hastalık şiddeti arasında istatistiki olarak fark bulunmamaktadır ($P \leq 0.01$). *A. alternata* rezene, keten ve kişnişte patojen bulunmamıştır. *B. cinerea*'nin yalnızca melisa tohumlarında geliştiği ve %35 ± 2.04 oranında hastalık şiddeti gösterdiği kaydedilmiştir. Melisa tohumlarında ayrıca *A. arundinis*'in %67 ± 6.04 oranında patojen olduğu görülmüştür. Bu tür kişniş tohumlarında da patojen olup, %96 ± 2.16 oranında istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($P \leq 0.01$). *A. niger*'in (%100 ± 0.00) yalnızca kişniş tohumlarından izole edildiği oldukça yüksek oranda patojen olduğu gözlenmiştir. Rezene tohumlarında *C. sphaerospermum*'un %86 ± 2.16 oranında patojen olduğu, keten tohumlarında ise *C. sphaerospermum*'un %90 oranında patojen olduğu kaydedilmiştir. İstatistiki olarak aralarındaki fark önemli değildir (Çizelge 4.3).



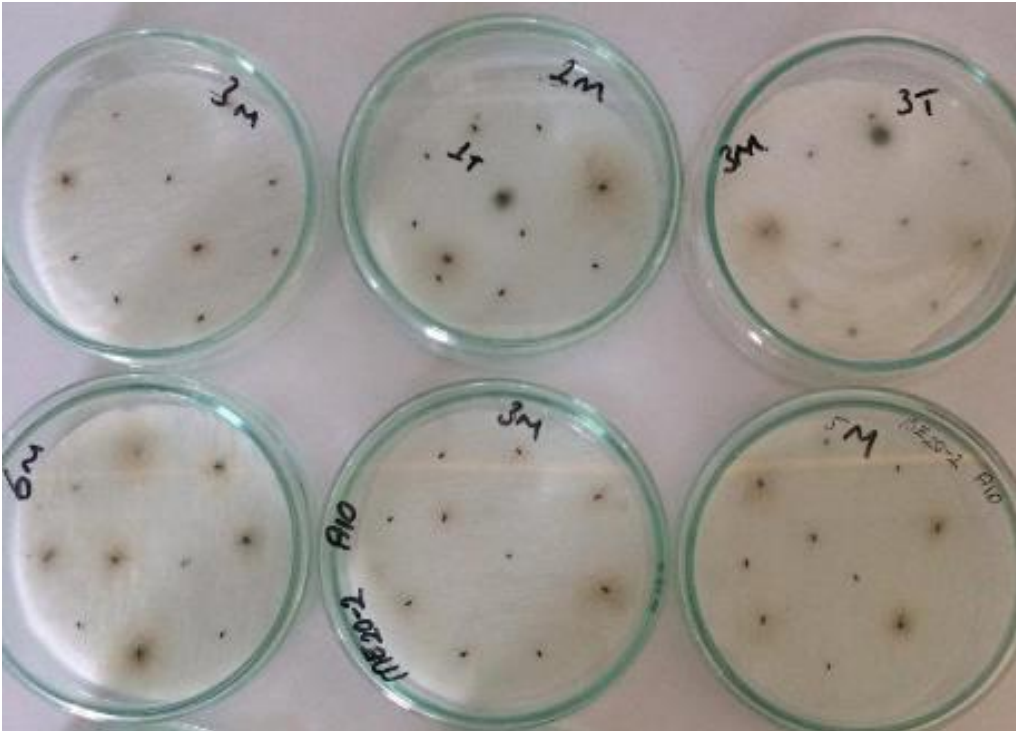
Şekil 4.15. Rezene tohumlarında *C. sphaerospermum*'un patojenisite test sonucu



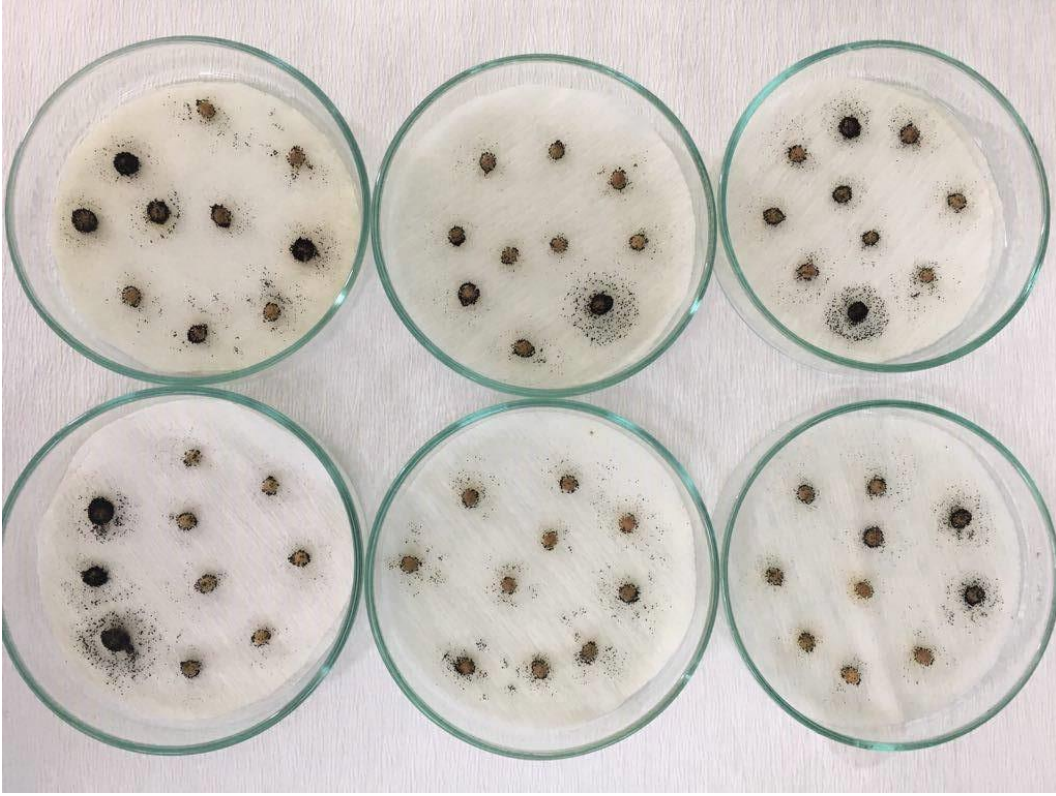
Şekil 4.16. Kışniş tohumlarında *A. arundinis*'nin patojenisite test sonucu



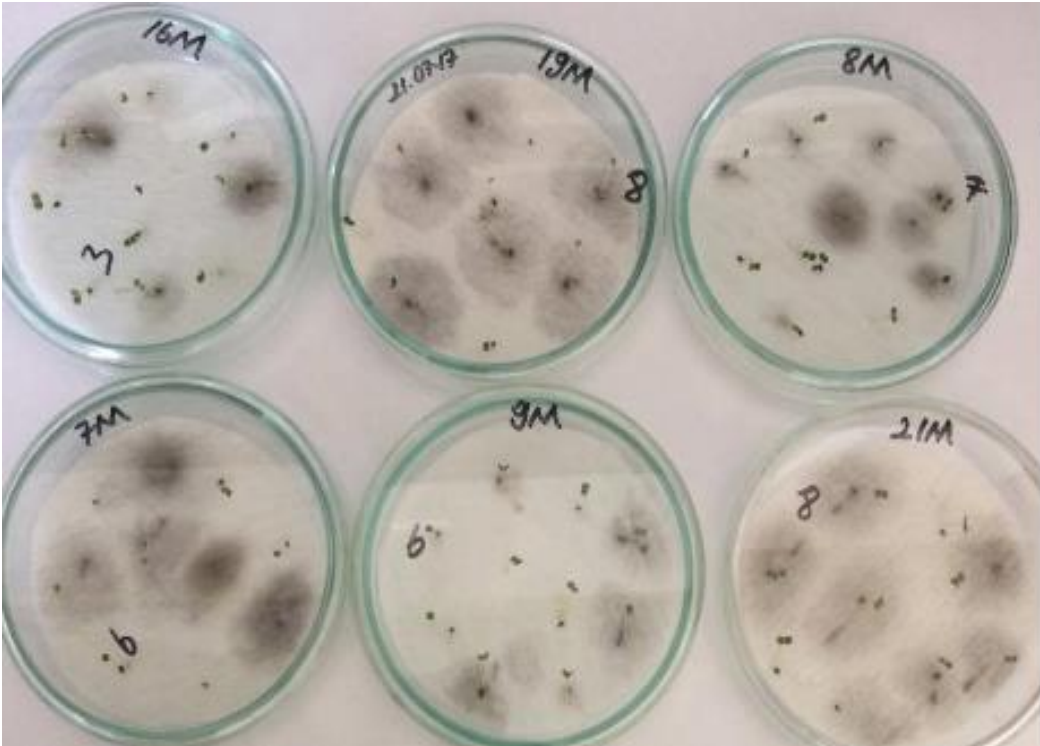
Şekil 4.17. Melisa tohumlarında *A. alternata*'nın patojenisite test sonucu



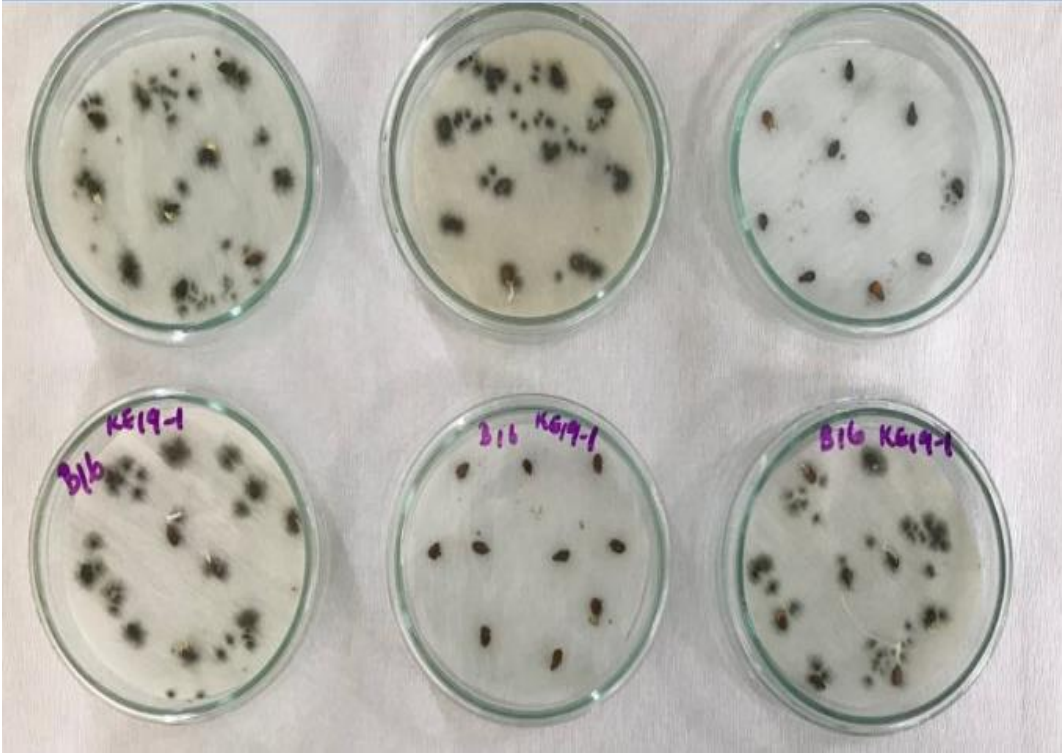
Şekil 4.18. Melisa tohumlarında *B. cinerea*'nin patojenisite test sonucu



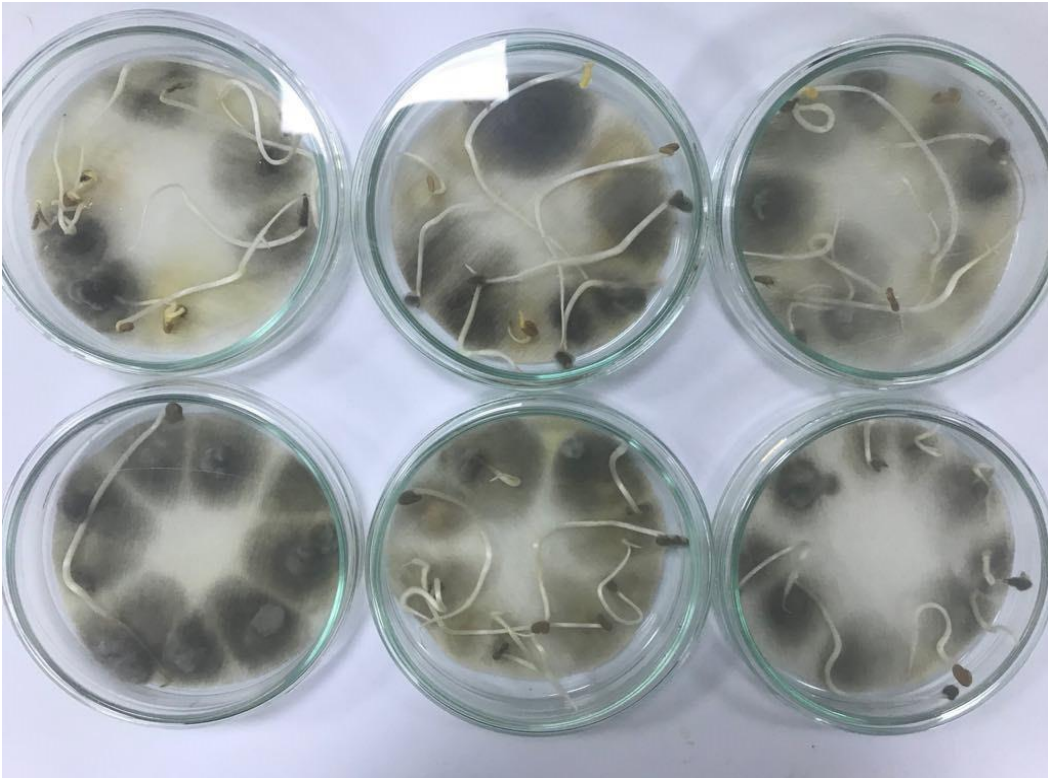
Şekil 4.19. Kışniş tohumunda *A. niger*'in patojenisite test sonucu



Şekil 4.20. Melisa tohumlarında *A. arundinis*'in patojenisite test sonucu



Şekil 4.21. Keten tohumunda *C. sphaerospermum*'un patojenisite test sonucu



Şekil 4.22. Çemen tohumunda *A. alternata*'nın patojenisite test sonucu

5. TARTIŞMA

Bazı tıbbi ve aromatik bitki tohumlarında fungal flora tespitine yönelik yapılan bu çalışmada tohumların saprofit ve patojen bazı fungal etmenler ile bulaşık oldukları tespit edilmiştir. Çalışmamızda incelemeye alınan tohumlar içerisinde melisa ve çemen tohumlarının enfekteli tohum sayısı açısından en yüksek bulaşıklılık oranlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda melisa tohumlarının en çok farklı fungus türlerini barındıran tohum olduğu gözlenmiştir.

Keten, melisa, kişniş, çemen, anason, rezene tohumlarından gelişen *A. niger* ve *B. cinerea*, *C. sphaerospermum*, *A. alternata*, *A. arundinis* farklı oranlarda patojen oldukları gözlenmiştir. Ayrıca çemen (%25) ve melisa (%19) tohumlarının her ikisinde de yüksek oranda patojen (%75) olduğu tespit edilen *A. alternata*'nın yurt yurtdışında yapılan çalışmalarda tıbbi ve aromatik bitki tohumlarından en yüksek oranda izole edilen fungus cinsi olduğu moleküler tanılamalar ile de saptanmıştır (Bulajic ve ark. 2009; Seyyedi ve Rezvani 2015; Mangwende ve ark. 2018). *A. alternata* melisa ve çemen tohumlarında benzer oranlarda patojenisite göstermiş olup, aralarında istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($P \geq 0.01$).

A. arundinis'in melisa (%11.5) ve kişniş (%5) tohumlarının her ikisinde de varlığı tespit edilmiş ancak melisa tohumunda bu oranın daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı fungus türünün kişniş tohumlarında melisa tohumlarına oranla daha yüksek derecede patojen olduğu kaydedilmiştir. Kişniş tohumlarında %96 oranında patojenisite gösteren hastalık etmeni melisa tohumlarında %67 oranında patojen bulunmuştur. Aralarındaki fark istatistiki olarak da önemlidir ($P \leq 0.01$). *C. sphaerospermum*'un keten tohumlarında daha düşük oranlarda (%1.75) bulunmasına rağmen patojenisitesinin, daha yüksek (%90) olduğu, ancak rezenedeki patojenisitesi (%86) ile istatistiki olarak fark bulunmadığı görülmüştür ($P \geq 0.01$).

Kişniş tohumundan *A. arundinis* ve *A. niger*'in izole edildiği ve yapılan patojenisite denemesinde yüksek hastalık şiddeti oluşturdukları görülmektedir. Yapılmış olan diğer çalışmalarda da kişniş tohumlarından *A. alternata*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Rhizopus* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Mangwende ve ark. 2018). *A. niger* ise yalnızca kişniş tohumlarından izole edilerek, patojenisite testine tabii tutulduğu için istatistiki açıdan bu oran önemli olarak değerlendirilmiştir ($P \leq 0.01$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son on beş yıldaki sentetik bileşiklerdeki olağanüstü ilerlemeye rağmen, tıbbi ve aromatik bitkilerin, önemli ilaçların hammaddesi olarak kullanımı her geçen gün artmaktadır. Günümüzdeki bütün ilaçların yaklaşık %25 ile %30'unun doğrudan veya dolaylı olarak bitkilerden elde edildiği bilinmektedir. Bu tür bitkilerin fungal patojenler tarafından istila edilmesi, yüksek kalitede ve miktarda ürün elde edilmesinde önemli bir engel teşkil etmektedir. Bu yüzden üretimde kullanılacak tıbbi ve aromatik bitkilere ait tohum çeşitlerinin bu patojenlere karşı genetik dayanıklılığı incelenmeli, dayanıklı olmayan tohumların üretimine izin verilmemelidir.

Ülkemizde ve dünyada genel olarak yapılan çalışmalar dikkate alındığında tohum kaynaklı fungusların tespitine yönelik fazla bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu konu üzerinde yapılmış olan tez çalışmamız da melisa tohumlarından izole edilen *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* ve *A. arundinis*; keten tohumlarında *C. sphaerospermum*; çemende *A. alternata*; ülkemiz için ilk kayıttır. Çalışmamız tohumla taşınabilen hastalık etmenlerinin tespitine ve patojenisitelerinin belirlenmesine yönelik, yapılacak bir sonraki araştırmalar için aydınlatıcı bir nitelik taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Acıbuca V, Bostan Budak D (2018). Dünya’da ve Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yeri ve Önemi. Çukurova Tarım Gıda Bil. Dergisi, 33(1): 37-44, Adana.
- Akhtar J, Sing B, Kandan A, Kumar P, Maurya A K, Chand D, Gupta V, Dubey S C (2017). Status of seed-borne fungi in some indigenous medicinal and aromatic plants conserved in National gene Bank, India. Indian Pythopathology, Volume: 70;206-215.
- Anonim (2008). <http://www.agaclar.net/forum/tarla-bitkileri/10459.htm> (Erişim tarihi; 13.06.2018).
- Anonim (2016a). <https://www.acil.net/kisninin-faydalari-nelerdir/> (Erişim tarihi 12.10.2018).
- Anonim (2016b) <https://www.acil.net/melisanin-otunun-faydalari-nelerdir/> (Erişim tarihi; 12.10.2018).
- Anonim (2017). WHO.<http://who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/> (Erişim Tarihi: 27.05.2018).
- Anonim (2018a). Rezene Yetiştiriciliği. <https://bilgihanem.com/rezene-nedir-nasil-kullanilir/> (Erişim tarihi: 12.09.2018).
- Anonim (2018b). <https://www.tgrthaber.com.tr/saglik/keten-tohumu-nedir-keten-tohumunun-faydalari-nelerdir-232743> (Erişim tarihi 14.10.2018).
- Anonim (2018c). <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. (Erişim tarihi: 25.10.2018).
- Bayram E, Kırıcı, Tansı S, Yılmaz G, Arabacı O, Kızıl S ve Telci İ (2010). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimine Arttırılması Olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1, Ankara, 484-505.
- Bhadauria G, Bhadauria S, Singh B (2013). Prevalence of seed mycoflora from different seed of spices under field and storage conditions of Agra region. Pelagia Research Library, 3(2):93-98.
- Bukovska P, Jelinkova M, Hrselova H, Sykorova Z, Gryndler M 2010. Terminal restriction fragment length measurement errors are affected mainly by fragment length, G+C nucleotide content and secondary structure melting point J. Microbiol. Volume; 82 (3), 223-228.
- Bulajić A, Djekić I, Lakić N, Krstić B (2009). The Presence of *Alternaria* spp. on the Seed of *Apiaceae* Plants and Their Influence on Seed Emergence. Archives of Biological Sciences, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Belgrade-Zemun, Serbia. Volume; 61(4); 871-881.
- Crous P W, Groenewald J Z 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrrium*. IMA Fungus. Volume: 4(1):133-54.
- Crous P, Groenewald J (2013). A Phylogenetic Re-Evaluation of *Arthrrium*. International Mycological Association, Volume 4, No 1: 133–154.

- Davis, P H (1965-1985). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1-9. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- de Lima Fávaro L C, de Melo F L, -Vildoso C I A, Araújo W L (2011). Polyphasic Analysis of Intraspecific Diversity in *Epicoccum nigrum* Warrants Reclassification into Separate Species. PLoS ONE 6(8): e14828.
- Demirci, F, Hancıoğlu Ö (1994). Control of *Alternaria Blight* of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) by seed treatment. 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union-Kuşadası-Aydın TURKEY.
- Domsch, K H, Gams, W, Anderson, T H (1980). Compendium of soil fungi. Academic Press London, 860+406 pp.
- Dylag M, Jagielski T 2016. Onychomycosis Due to *Arthrrium arundinis*: A Case Report. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Volume: 6;97(7):860-861.
- Ellis M. B. 1976. Dematiaceous, Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 507 pp..
- Erkan S, (1998). Tohum Patolojisi. Gözdem Ofis, İzmir, 275 s.
- Erzurum K, Demirci F, Karakaya A, Çakır E, Tuncer G, Maden S (2005). Passalora Blight of Anise (*Pimpinella anisum*) and Its Control in Turkey. Phytoparasitica, 33: 261-266.
- Evans N, Maroberts N, HILL R A, Marsall G (1996). Phytotoxin production by *Alternaria linicola* and phytoalexin production by the linseed host. Annals of Applied Biology. Vol: 129, 415-431.
- Faydaoğlu E, Sürücüoğlu M (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi 11(1): 52-67.
- First report of brown leaf spot caused by *Alternaria alternata* on cast iron plant (*Aspidistra elatior*) in Italy (2018). Journal of Plant Pathology. Volume; 100, 117–117.
- Furtado B U, Hryniewicz K, Szymanska S (2016). Unpublished.
- Gahukar R T (2018). Management of pests and diseases of important tropical/subtropical medicinal and aromatic plants: A review, India. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, Volume:9;1-18.
- Gökçe Z Efe L, (2016). Çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.) Bitkisinin Kullanım Alanları ve Tıbbi Önemi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi Targid Özel Sayı, 355-363, Kahraman Maraş.
- Hafez M, Lang F (2018). Hydrocarbon-degrading microbes. Unpublished.
- Jackson, C R, Weber, G F (1959). Morphology and taxonomy of *Alternaria cucumerina* Mycologia 51: 401-408. Studies in Mycology, Volume: 58: 157–183.

- Kaur A, Oberhofer M, Juzumaite M, Raja H, Gullede T, Kao D, Faeth S, Laster S Oberlies N, Cech N (2016). Secondary Metabolites from Fungal Endophytes of *Echinacea purpurea* Suppress Cytokine Secretion by Macrophage-Type Cells. *Natural Product Communications*, Volume; 11(8):1143-1146.
- Kırıcı S (2010). Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Genel Durumu. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Adana.
- Kurt R, İmren E (2018). Türkiye’deki Önemli Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Endüstri İçi Ticaret Göstergeleri İle Statik ve Dinamik Analizi. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 20 (3): 548-557.
- Liebster G (1991). *Warenkunde Gemüse Band 2 (2. Auflage)*. Morion Verlag GmbH, 448s, Düsseldorf.
- Linnakoski R, Kasanen R, Lasarov I, Marttinen T, Oghenekaro A O, Sun H, Asiegbu F O, Wingfield M J, Hantula J. (2014). *Cadophora margaritata* sp. nov., and other fungi associated with the longhorn beetles *Anoplophora glabripennis* and *Saperda carcharias* in Finland. Unpublished.
- Linnakoski R, Kasanen R, Lasarov I, Marttinen T, Oghenekaro AO, Sun H, Asiegbu FO, Wingfield MJ7, Hantula J8, Heliövaara K4 (2018). *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. Volume;111(11):2195-2211.
- Mangwende E, Kritzinger Q, Aveling T A S (2018). *Alternaria alternata*: A new seed-transmitted disease of coriander in South Africa. Volume: 152:409-416.
- Marshall E. (2011) *Health and Wealth from Medicinal Aromatic Plants (FAO)*.
- Neergaard, P (1945). *Danish species of Alternaria and Stemphyllium. Taxonomy, parasitism and economic significance*. Einar Munksgaard, Copenhagen. London. 560 pp..
- Nishikawa J, Nakashima C (2013). Taxonomic Characterization and Experimental Host Ranges of Four Newly Recorded Species of *Alternaria* from Japan. *Journal of Phytopathology*. Volume; 61; 604–616.
- Njuguna J W, Barklund P, Ihrmark K, Stenlid J (2011). A canker and dieback disease threatening the cultivation of *Grevillea robusta* on small-scale farms in Kenya. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 6(3), pp. 748-75.
- Njuguna, Jane Wangu (2011). *Stem canker and dieback disease on Grevillea robusta Cunn ex R. Br. Diss. Sveriges lantbruksuniv Acta Universitatis agriculturae Sueciae*, Volume 23, 1652-6880.
- Noelting MC, Molina MC, Monaco CI, Sandoval MC, Perello A (2012). First report of *Alternaria infectoria* on amaranth (*Amaranthus caudatus* ssp. *mantegazzianus*) in Argentina. *New Disease Reports*, 25: 11.
- Özdemir Nath E, Kültür Ş (2016). Natural dye plants in Savaştepe. *İstanbul Ecz. Fak. Derg.*, 46(2) 2016 pp.89-95.

- Özhatay N, Koyuncu M, Atay S, Byfield A (1997). Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma. Wwfuk/Stanley Smith Horticultural Trust. Doğal Hayatı Koruma Derneği, İstanbul, Türkiye I.S.B.N. 975-96081-97.
- Paiva de Carvalho H, Mesquita N, Trovao J, Fernandez Rodriguez S, Pinheiro A C, Gomes V, Alcoforado A, Gil F, Portugal A (2018). Fungal contamination of paintings and wooden sculptures inside the storage room of a museum: Are current norms and reference values adequate. *Journal of Cultural Heritage*. Volume:34, 68-276.
- Patyshakuliyeva A, Falkoski D L, Wiebenga A, de Vries R (2018). Macroalgae derived fungi have high abilities to degrade algal polymers. Unpublished.
- Pavlovic S, Ristic D, Vucurovic I, Stevanovic M, Stojanovic S, Kuzmanovic S, Starovic M (2016). Morphology, Pathogenicity and Molecular Identification of *Fusarium* spp. Associated with Anise Seeds in Serbia, Belgrade. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, Volume: 44;411-417.
- Pitt J I, Samson R A (1993). Species names in current use in the Thrichocomaceae (Fungi, Eurotiales). *Regnum Vegetabile* 128, 13-57.
- Raper K B, Fennell D I (1965). The Genus *Aspergillus*. *Mycobank literature*, 686.
- Schlegel M, Queloz V, Sieber T N (2018). The endophytic mycobiome of European ash and sycamore maple leaves geographic patterns, host specificity and influence of ash dieback. *Frontiers in Microbiology*. Volume; 9: 2345.
- Schol and Schwarz, (1974). The genus *Epicoccum nigrum*, *Mycologia*, volume:66;1022-1029.
- Seyyedi ve Rezvani (2015). Evaluating the Ability of some Medicinal Plants for Controlling *Rhizopus (Rhizopus nigricans)* and Black Spot Rot (*Alternaria alternata*) as Postharvest Diseases in Tomato Produced under Conventional and Organic Cropping Systems, İnan. *Journal of Agroecology*, Vol:8: 318-328.
- Singh A, Gupta R, Saikia S, Pant A, Pandey R (2016). Diseases of medicinal and aromatic plants, their biological impact and management. *Plant Genetic Resources*. India, volume;14(4);370-38.
- Thom C, Raper K B (1945). A manual of the *Aspergilli*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Ulutaş Deniz E, Yeğenoğlu S, Sözen Şahne B, Gençler Özkan A (2017). Kişniş (*Coriandrum sativum* L.) üzerine bir derleme. *Marmara Pharmaceutical Journal*, Volume;22 (1) :15-28 Ankara.
- Watanabe T (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi, morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press, Florida, 486 pp.
- Yazdani D, Rezazadeh Sh, Amin Gh, Zainal Abidin M, Shahnazi S, Jamalifar H (2009). Antifungal Activity of Dried Extracts of Anise (*Pimpinella anisum* L.) and Star anise (*Illicium verum* Hook. f.) Against Dermatophyte and Saprophyte Fungi. *Journal of Medicinal Plants*, Volume 8;24-29.

Zalar P, Hoog G S, Schroers H-J, Crous P W, Groenewald J Z, Gunde-Cimerman N (2007). Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. Volume 58: 157–183.

ÖZGEÇMİŞ

02.11.1992 yılında Ankara da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Manisa, Diyarbakır ve Denizli de tamamladı. 2010 yılında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2014 yılı haziran ayında lisans öğrenimini başarıyla tamamlayıp Bitki Koruma Bölümünden mezun oldu. Yine aynı yılın güz döneminde Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrenimine başladı. B2 seviye İngilizce seviyesine sahiptir. Bekardır.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda bilgi ve birikimlerini benimle paylaőan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Arzu COŞKUNTUNA'ya, çalıőmalarım sırasında yardımlarını eksik etmeyen bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Nuray ÖZER'e, çalıőmamda kullandığım tohum örneklerinin teminini sağlayan Namık Kemal Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde çalıőmalarını yürüten hocamız Sayın Prof. Dr. Ayőe Canan SAğLAM'a, NABİLTEM de moleküler çalıőmaların gerçekleőmesinde yardımcı olan Duygu KORUCU'ya sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tezdeki fotoğrafların düzenlenmesinde bana yardımcı olan arkadaşım Fatih KURUT'a ve desteklerini esirgemeyen Ece SEVER'e ayrıca bana güvenen desteklerini sürekli hissettiğim aileme teşekkür ederim.