

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PROPOLİS EKSTRAKTININ PAMUK SOLGUNLUK HASTALIĞI
(*VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB.)'NA KARŞI ANTİFUNGAL
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELİKE MUTLU YILMAZ

DENİZLİ, NİSAN 2022

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



PROPOLİS EKSTRAKTININ PAMUK SOLGUNLUK HASTALIĞI
(*VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB.)'NA KARŞI ANTİFUNGAL
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELİKE MUTLU YILMAZ

DENİZLİ, NİSAN 2022

Bu tez alışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2020FEBE012 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Melike Mutlu YILMAZ

ÖZET

**PROPOLİS EKSTRAKTININ PAMUK SOLGUNLUK HASTALIĞI
(*VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB.)'NA KARŞI ANTİFUNGAL ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MELİKE MUTLU YILMAZ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. YEŞİM KARA)
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. OKTAY ERDOĞAN)
DENİZLİ, NİSAN 2022**

Propolis, bitkilerin bütün yapılarından ve bitki salgılarından bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından birleştirilen, fenolik asitler, flavonoidler gibi çok çeşitli aktif bileşik içeren, anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral, anti-tumor ve anti-inflamatuvar gibi pek çok biyolojik ve farmakolojik özellikler gösteren yapışkan bir apiterapik maddedir. Pamuk (*Gossypium* spp.), dünya da sıcak iklimin görüldüğü hem tropik hem de subtropik bölgelerde geniş alanlarda tarımı yapılan bir endüstri bitkisidir. Pamuk tarımında üretimin yanı sıra verim ve kaliteyi etkileyen birçok stres faktörü bulunmaktadır. Bu faktörlerin başında toprak kökenli bir fungus olan *Verticillium dahliae* Kleb.'in sebep olduğu solgunluk hastalığı gelmektedir. Etkin ve ekonomik bir kimyasal mücadelesi olmayan bu hastalığa karşı en etkili yol dayanıklı/tolerant çeşitlerin geliştirilmesidir. Bu tez çalışmasında ilk aşamada ham propolisin etil alkol ekstraktı (PEE)'nin *V. dahliae*'nin yaprak dökken (PHCVd47 izolatı) ve yaprak dökmeyen (PHCVd3 izolatı) patotipleri üzerine etkileri, *in-vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlarda (0,003, 0,06, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 ppm/ml) PEE içeren Patates Dextroz Agar (PDA-Difco) besiyerlerindeki miseliyal gelişme ölçülerek belirlenmiştir. İkinci aşamada *in-vitro*'da en etkili bulunan PEE dozu (1 ppm/ml) Giza 45 (dayanıklı), Carmen (tolerant) ve Acala SJ2 (duyarlı) pamuk çeşitlerine uygulanmış ve patojenin yaprak dökmeyen (PHCVd3 izolatı) ile yaprak dökken patotiplerine (PHCVd47 izolatı) karşı bitki büyütme odasında saksı denemesinde bu çeşitlerin duyarlılıkları belirlenmiştir. *In vitro* denemeler tesadüf parselleri deneme deseninde üç tekerrürlü olarak, *In-vivo*'da saksı denemesi ise beş tekerrürlü olarak yürütülmüştür. *In vitro*'da engelleme test sonuçlarına bakıldığında, PEE'nin en etkili dozu 1 ppm/mL olarak belirlenmiş ve bu doz yaprak dökmeyen patotipe (PHCVd3 izolatı) karşı % 75,2 oranında etkili bulunurken, yaprak dökken (PHCVd47 izolatı) patotipe karşı ise % 74,4 oranında etkili bulunmuştur. Saksı denemesinde PEE (1 ppm/ml) uygulanan pamuk çeşitlerinde yaprak dökmeyen (PHCVd3 izolatı) ve yaprak dökken (PHCVd47 izolatı) patotiplerine karşı en düşük hastalık şiddeti indeks değerleri dayanıklı Giza 45 çeşidinde sırasıyla 1,34 ve 1,64 olarak saptanırken, en yüksek hastalık şiddeti indeks değerleri sırasıyla duyarlı Acala SJ2 çeşidinde 3,80 ve 3,90 olarak saptanmıştır. Çalışmada PEE'nin *V. dahliae* üzerine antifungal etkiye sahip olduğu ve biyopestisit olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Propolis, *Verticillium dahliae*, Patotip, Apiterapi, Anti-fungal, Tolerant, Pamuk

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIFUNGAL EFFECT OF PROPOLIS EXTRACT AGAINST COTTON WILT DISEASE (*VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB.)

MSc THESIS

MELİKE MUTLU YILMAZ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. YEŞİM KARA)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. OKTAY ERDOĞAN)

DENİZLİ, APRİL 2022

Propolis is a sticky apitherapy substance that is combined by honeybees (*Apis mellifera*) from all structures and plant secretions of plants, contains a wide range of active compounds such as phenolic acids, flavonoids, and shows many biological and pharmacological properties such as anti-bacterial, anti-fungal, anti-viral, anti-tumor and anti-inflammatory. Cotton (*Gossypium* spp.) is an industrial plant that is farmed in large areas in both tropical and subtropical regions where the warm climate is seen in the world. In cotton farming, there are many stress factors that affect production as well as yield and quality. One of these factors is wilt disease caused by *Verticillium dahliae* Kleb., a fungus of soil-borne origin. The most effective way against this disease, which does not have an effective and economical chemical control, is the development of resistant/tolerant varieties. In the first stage of this thesis study, the effects of raw propolis on the pathotypes of ethyl alcohol extract (PEE) on the defoliating (PHCVd47 isolate) and non-defoliating (PHCVd3 isolate) pathotypes of *V. dahliae*, *In-vitro* conditions, different concentrations (0.003, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 ppm/ml) were determined by measuring the mycelial development in Potato Dextrose Agar medium (PDA-Difco) containing PEE. In the second stage, the most effective PEE dose (1 ppm/ml) in *in-vitro* was applied to Giza 45 (resistant), Carmen (tolerant) and Acala SJ2 (susceptible) cotton varieties and the susceptibility of these varieties was determined in the pot trial in the plant growth room against the pathogen's non-defoliating (PHCVd3 isolate) and defoliating pathotypes (PHCVd47 isolate). *In vitro* trials were carry out in a randomized plot design with three replications, and the pot trial was conducted with five replications *in-vivo*. When looking at the inhibition test results in *in-vitro*, the most effective dose of PEE was determined as 1 ppm/ml and this dose was found to be 75.2% effective against non-defoliating pathotype (PHCVd3 isolate), while it was found to be 74.4% effective against defoliating pathotype (PHCVd47 isolate). In the pot trial, the lowest disease severity index values against non-defoliating (PHCVd3 isolate) and defoliating (PHCVd47 isolate) pathotypes in cotton varieties applied to PEE (1 ppm/ml) were determined as 1.34 and 1.64 respectively in the resistant Giza 45 variety, The highest disease severity index values were 3.80 and 3.90 in the susceptible Acala SJ2 variety, respectively. The study concluded that PEE has antifungal effect on *V. dahliae* and can be used as a biopesticide.

KEYWORDS: Propolis, *Verticillium dahliae*, Pathotype, Apitherapy, Anti-fungal, Tolerant, Cotton

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 Propolis.....	6
2.1.1 Propolisin Fizikokimyasal Özellikleri	7
2.1.2 Propolisin Kullanım Alanları.....	9
2.2 Pamuk Yetiştiriciliği	10
2.3 Pamukta <i>Verticillium</i> Solgunluk (<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.) Hastalığı Etmeni	11
2.4 Literatür Özeti	13
2.5 Tezin Amacı	14
3. YÖNTEM	16
3.1 Materyal	16
3.2 Yöntem.....	17
3.2.1 Propolis Etanol Ekstrakt (PEE)'nin Hazırlanması	17
3.2.1.1 Propolis Etanol Ekstraktı (PEE)'nin Toplam Fenolik Madde Miktarı Hesaplama Yöntemi.....	18
3.2.1.2 PEE'nin Toplam Antioksidan Aktivite Tayinin Hesaplama Yöntemi	18
3.2.1.3 PEE'nin Toplam Flavanoid Madde Miktarı Hesaplama Yöntemi	18
3.2.2 <i>Verticillium dahliae</i> Kültürlerinin Geliştirilmesi	19
3.2.3 PEE'nin <i>V. dahliae</i> Kültürleri Üzerine Anti-fungal Etkisinin <i>In-vitro</i> Koşullarda Belirlenmesi	20
3.2.4 <i>In-vivo</i> Çalışmalar.....	22
3.2.4.1 Pamuk Çeşitlerinin Yetiştirilmesi.....	22
3.2.4.2 PEE ile Kaplama Yapılmış Pamuk Çeşitlerinin <i>V. dahliae</i> 'ya karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	23
3.2.5 İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	27
4.1 PEE Konsantrasyonlarının PHCVd3 İzolatı (Yaprak Dökmeyen Patotip) ve PHCVd47 İzolatı (Yaprak Döken Patotip)'nin Misel Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi	27
4.2 PEE'nin Saksı Koşullarında PHCVd3 İzolatı (Yaprak Dökmeyen Patotip) ve PHCVd47 İzolatı (Yaprak Döken Patotip)'na Etkileri	28
4.3 Propolisin Toplam Fenolik Analiz Değerleri	29
4.4 Propolisin Toplam Antioksidan Analiz Değerleri.....	30
5. TARTIŞMA ve KANI	31
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	34

7. KAYNAKLAR	37
8. EKLER	48
Ek A. PEE'nın Yaprak Dökmeyen Patotipi (PHCVd3 izolatu)'ne Anti-fungal Etkisi ve Varyans Analizi	48
Ek B. PEE'nın Yaprak Döken Patotipi (PHCVd47 izolatu)'ne Anti-fungal Etkisi ve Varyans Analizi.....	49
Ek C. Saksı Denemesinde PEE'nın Yaprak Dökmeyen Patotipinde (PHCVd3 izolatu) Yüzde Hastalık Şiddeti İndeks Değerleri ve Varyans Analizi.....	50
Ek D. Saksı Denemesinde PEE'nın Yaprak Döken Patotipinde (PHCVd47 izolatu) Yüzde Hastalık Şiddeti İndeks Değerleri ve Varyans Analizi.....	51
9. ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1: <i>V. dahliae</i> 'nin yaşam döngüsü (Schnathorst 1981)	3
Şekil 1. 2: Pamuk yaprağında <i>Verticillium</i> solgunluğu belirtisi	4
Şekil 1. 3: Ham Propolis Örneği	5
Şekil 3. 1: <i>V.dahliae</i> 'nin PHCVd47(yaprak döken patotip) izolatı (A); PHVd3 (yaprak dökmeyen patotip) izolatı (B)	16
Şekil 3. 2: Rotary Evaporatör	17
Şekil 3. 3: <i>V.dahliae</i> kültürkerinin soğutmalı inkübatörde geliştirilmesi	19
Şekil 3. 4: <i>V.dahliae</i> 'nin sıvı kültürde geliştirilmesi	20
Şekil 3. 5: Farklı konsantrasyonlardaki propolisli PDA besiyerinin petrilere aktarılması	20
Şekil 3. 6: <i>V.dahliae</i> 'nin miselyum disklerinin propolisli PDA besi ortamına inoküle edilmesi	21
Şekil 3. 7: PEE'nin etkili dozuyla kaplanmış Carmen (a), Giza 45 (b), Acala SJ2 (c) pamuk tohumları	22
Şekil 3. 8: Bitki büyütme kabinde Giza 45, Carmen ve Acala SJ2 pamuk çeşitlerinin 4-6 yapraklı dönemi	23
Şekil 3. 9: Işık mikroskopunda Thoma lamı yardımıyla spor konsantrasyonunun ayarlanması	24
Şekil 3. 10: 4-6 yapraklı dönemdeki pamu fidelerine <i>V.dahliae</i> 'nin PHCVd47 ve PHCVd3 patotipinin konidi süspansiyon tekniği ile inokulasyonu	24
Şekil 3. 11: Bitki büyütme kabinde saksı denemesinin genel görünümü	25
Şekil 3. 12: Saksı denemesinde kullanılan 0-5 solgunluk skalası	26

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2. 1: Propolisin genel yapısında bulunan bileşenler, ana maddeler ve miktarı ..	8
Tablo 2. 2: Propoliste belirlenen bileşikler ve sayıları	9
Tablo 3. 1: 0-5 solgunluk skalası.....	25
Tablo 4. 1: PEE'nın <i>V. dahliae</i> 'nin patotiplerinin misel gelişimine antifungal etkisi.	27
Tablo 4. 2: Saksı denemesinde PEE uygulanan pamuk bitkilerinde PHCVd3 ve PHVd47 inokulasyon sonrası hastalık şiddeti indeks değerleri.....	28
Tablo 4. 3: Propolisin HPLC-DAD analiz sonuçları.....	29
Tablo 4. 4: Propolisin toplam antioksidan kapasitesi	30
Tablo 4. 5: Propolisin toplam flavanoid madde miktarı.....	30
Tablo A.1: PEE'nın yaprak dökmeleyen patotipi (PHCVd3 izolatu)'ne anti-fungal etkisi ve varyans analiz tablosu	48
Tablo B.1: PEE'nın yaprak dökmeleyen patotipi (PHCVd47 izolatu)'ne anti-fungal etkisi ve varyans analiz tablosu.....	49
Tablo C.1: Saksı denemesinde PEE'nın yaprak dökmeleyen patotipinde (PHCVd3 izolatu) yüzde hastalık şiddeti indeks değerleri ve varyans analiz tablosu.....	50
Tablo D.1: Saksı denemesinde PEE'nın yaprak dökmeleyen patotipinde (PHCVd47 izolatu) yüzde hastalık şiddeti indeks değerleri ve varyans analiz tablosu.....	51

SEMBOL LİSTESİ

°C:	Santigrat derece
cm:	Santimetre
dak:	Dakika
Fe:	Demir
FeSO₄.7H₂O:	Demir (II) Sülfat Heptahidrat
g:	Gram
ha:	Hektar
HPLC:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HŞ:	Hastalık Şiddeti
KCl:	Potasyum Klorür
K₂HPO₄:	Dipotasyum Fosfat
L:	Litre
MgSO₄.7H₂O:	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mg:	Miligram
µg:	Mikrogram
µL:	Mikrolitre
ml:	Mililitre
mm:	Milimetre
mmol:	Milimol
NaNO₃:	Sodyum Nitrat
nm:	Nanometre
Ort:	Ortalama
PDA:	Patates Dekstroz Agar
PEE:	Propolis Etanol Ekstraktı
ppm:	Milyonda Bir
spp.:	Türler

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde her daim yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Yeşim KARA'ya ve çalışmamızın her aşamasında bize yardımcı olan ve yol gösteren eş danışman hocam Prof. Dr. Oktay ERDOĞAN'a, çalışmalarımızdaki yardımları için Prof. Dr. Gürkan SEMİZ ve Doç. Dr. Fatma TAŞKIN EKİCİ'ye, fungal izolatları temin eden Prof. Dr. Şener KURT'a, ve Arş. Gör. Batıkan GÜNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda ellerinden gelen tüm manevi desteklerini esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Pamuk (*Gossypium* spp.), dünya da sıcak iklimin görüldüğü hem tropik hem de subtropik bölgelerde tarımı yapılan bir endüstri bitkisidir. Pamuk lifi tekstil sektörüne hammadde sağlarken, yağı alınmış pamuk tohumu küspe ve tohum kabuğu hayvan yemi olarak kullanılmakta, lifler alındıktan sonra tohum üzerinde kalan linter yatak ve dolgu endüstrisi, savaş endüstrisi ile selüloz ve kimya endüstrisi tarafından kullanılmaktadır (Bölek ve diğ. 2016).

Pamuk bitkisinin yaklaşık 70 ülkede, 35 milyon ha alanda ekimi yapılmakta ve yaklaşık 180 milyon insanın geçimini sağlamaktadır (Tokel 2021). Ülkemizde 4 ana bölgede (Güneydoğu Anadolu, Ege, Çukurova ve Antalya) toplam 477 bin ha alanda pamuk ekimi yapılmakta ve bu alanlardan 2.2 milyon ton kütlü pamuk üretilmektedir (TÜİK 2021). Türkiye pamuk üretimi, lif ithalatı ve tekstil ürünleri ihracatı açısından dünyada önemli ülkeler arasında yer almakta; bu sebeple de pamuk ülkemizde yetiştirilen ürünler arasında stratejik öneme sahip bir bitkidir.

Pamuk tarımında üretimin yanı sıra verim ve kalite unsurlarını etkileyen birçok stres faktörü bulunmaktadır. Bu stres faktörlerinin başında toprak kökenli bir fungus olan *V. dahliae*'in sebep olduğu solgunluk hastalığı ilk sırada gelmektedir (El-Zik 1985). Solgunluk hastalığının etkin ve ekonomik bir kimyasal mücadelesi olmamakla beraber, hastalığa neden olan fungus toprakta uzun yıllar boyunca canlı kalabilmekte (Erdoğan 2009) ve hastalık pamuk ekimi yapılan bütün ülkelerde önemli oranda verim kayıplarına sebep olabilmektedir (Zhang ve diğ. 2017).

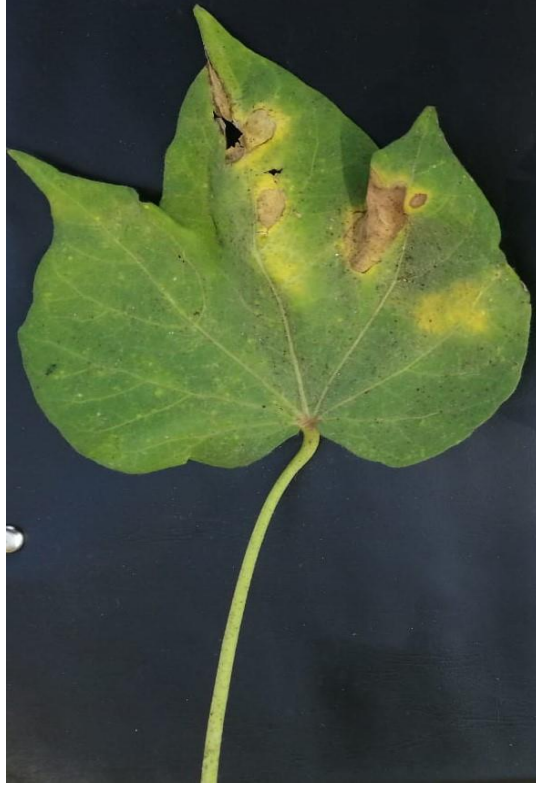
Pamukta *Verticillium* solgunluk hastalığı ilk defa 1914 yılında, Amerika Birleşik Devletleri'nde sera koşullarında, 1927 yılında Tennessee ve 1930 yılında Kaliforniya'da tarla koşullarında sırasıyla tespit edilmiştir (Watkins 1981). Hastalık ülkemizde Manisa Kırkağaç'ta İyriboz (1941) tarafından ilk kez tespit edilmiş ve hastalık etmeninin *V. dahliae* olduğu, Karaca ve diğ. (1971) tarafından belirlenmiştir. *Verticillium* cinsi 1816 yılında tanımlanmış ve *Deuteromycotina* alt bölümü, *Hypomycetes* sınıfına dahil edilmiştir (Melouk 1992). Toprak kökenli fungus olan *V. dahliae*'in yaklaşık 40 farklı familya'dan 400 bitki türünü enfekte ettiği

bilinmektedir (Hui-Fang 2013). *V. dahliae* 20 kadar önemli hastalığa sahip olan pamukta en yıkıcı ve tahripkâr olanıdır (Erdoğan ve diğ. 2005). *V. dahliae*'in yaprak dökmeyen patotipi ve yaprak dökken patotipi olmak üzere iki farklı patotipi mevcuttur. Yaprak dökken patotip oldukça virulent olup, yaprakların tamamen dökülmesine ve bitkinin ölmesine sebep olurken, yaprak dökmeyen patotip ise orta derecede virulent olup, solgunluk meydana getirerek az miktarda yaprak dökülmesine sebep olmaktadır (Göre ve diğ. 2007; Erdoğan ve diğ. 2014).

Etmenin yaşam döngüsü dormant, saprofitik ve parazitik olmak üzere üç evrede tamamlanmaktadır (Şekil 1.1). Genellikle kışı toprakta veya bitki artıklarının arasında mikrosklerot şeklinde dormansi halinde geçirmektedir. Hava ve toprak sıcaklığının uygun seviyeye gelmesi ile mikrosklerot yapıdan çıkarak bitkiyi hasta edebilecek seviyede parazitik hale gelmektedir. Patojen uygun şartlar oluştuğunda bitkiye ya kökten ya da kökte bulunan açık yaralardan girmeye başlamaktadır (Schnathorst 1981; Land 2017). Hastalık sebebiyle dünyada yıllık tahmini ürün kaybının 1,5 milyon balya, Nemli (2003) ve ABD'de 1990-2014 yılları arasında ürün kaybının 480 milyon balya olduğu bildirilmiştir (Lawrence ve diğ. 2016).

Verticillium solgunluğunun Antalya'da %4, Ege Bölgesinde %11,8, ürün kaybına sebep olduğunu bildirmiştir (Esentepe 1979). Adıyaman, Diyarbakır, Batman, Siirt ve Şanlıurfa illerinde hastalığa yakalanma oranının % 16,27, hastalığın görülme oranının ise % 79,28 olduğu belirtilmiş ve yapılan çalışmalarda bu oranın % 86'ya kadar çıktığı ve münavebe uygulanmayan ekim alanlarında zararın yüksek olduğu bildirilmiştir (Sağır ve diğ. 1992).

sebebiyet veren etmenin konukçu ile etkileşiminin bilinmesi, hastalık mücadele çalışmalarında önemli yer tutmaktadır (Koral ve Türkteş 2018).



Şekil 1. 2: Pamuk yaprağında *Verticillium* solgunluğu belirtisi

Apiterapi ile tedavi yöntemi, insanlığın geçmişten günümüze kadar arı ürünleri ile hastalıklardan korunmaya veya hastalıkların tedavi edilmesi aşamasında kullandığı yöntemlerin başında gelmektedir. Başlıca kullanılan arı ürünleri, bal mumu, bal, arı sütü, polen, arı larvası, arı zehri ve propolisdir. Propolis eski yunanca da şehrin korunması anlamına gelen bir kelime olup, arı kovanının tehlikeye karşı korunması anlamına gelmektedir. Propolis, “bee glue” arının kimyasal silahı olup, arı yapışkanı olarak adlandırılmaktadır. Bal arıları (*Apis mellifera*) propolisi, tomurcukların ve çiçeklerin reçinelerini alt çeneleriyle sıyırarak toplar, ağızda nemlendirme ve yumuşatma işlemi esnasında arılar, reçinelere enzimler ekleyerek propolisi pelet haline getirir ve arka bacaklarındaki polen sepetine peleti aktarırlar (Ghisalberti 1979; Krell 1996). Yapışkan ve kendine has bir aroması olan propolis kovanın aralarındaki boşlukların kapatılmasında, dezenfeksiyonunda, korunmasında ve hijyeninin sağlanmasında kullanılan tek etken doğal karışımdır (Sarıkaya ve diğ. 2009; Laskar ve diğ. 2010).

Propolis fazla sayıda aktif bileşik içermekte olup, bu sayede anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral, anti-tümör ve anti-inflamatuar gibi farklı biyolojik ve farmakolojik özellikler göstermektedir. Propolisin fiziksel yapısı ve kimyasal içeriği toplandığı bölgenin coğrafik yapısına, iklimine bağlı değişim göstermektedir. Propolisin kimyasal bileşik kompozisyonu ziyaret edilen bitkilerin çeşitliliğinin fazla olmasına bağlı olarak oldukça değişkendir. Balmumunun içerik çeşitliliği ham propolisin kimyasal kompozisyonunu etkilemektedir (Crane 1990). Genelde propolis koyu kahverengi, koyu sarı, yeşil ve siyaha doğru değişen renklerde bulunabilir ve yaşı artan propolisin rengi korunmamakta ve renk koyulaşmaktadır (Şekil 1.3). Yaklaşık olarak 60-70°C arasında erime noktasına sahip olan propolis düşük sıcaklık değerlerinde sert veya donmuş olabilirken, 0°C'de ise propolis kırılğan özelliğe sahiptir (Banskota ve diğ. 2002). Propolisin kalitesinde toplandığı coğrafyanın bitki örtüsüne bağlı olduğu kadar, propolisin toplanma tekniği de oldukça önem arz etmektedir. Propolis üretimi her koloni için yıllık 10 g'dan 300 g'a kadar değişebilir. Bu üretim miktarları arılara, iklime, coğrafyaya, orman çeşitliliğine ve tuzaklama mekanizmalarına bağlı olarak farklılıklar gösterebilir (Krell 1996).



Şekil 1. 3: Ham Propolis Örneği

Propolisin çözünürlüğü alkollerde yüksek oranda iken, su ve organik çözücülerde düşük orandadır (Campos ve diğ. 2003). Son yıllarda propolisin biyoaktif özelliklerinden daha iyi yararlanabilmek için değişik kritik ekstraksiyon yöntemleri ile sulu çözeltileri elde edilebilmektedir (Pietta ve diğ. 2002). Son on yıllık zaman diliminde ise bilim insanları propolisin sadece insanlar ve hayvanlar

üstündeki etkilerini değil, aynı zamanda bitkilerde var olan veya gelişen hastalık etmenleri ve bunların tedavisinde anti-fungal ve anti-bakteriyel çalışmalarda, bitki patojenlerinin sebep olduğu enfeksiyonları ve hastalık etmenlerini, ürünün kalite ve verimini düşüren etmenlere karşı kullanılabilecek etkili bir madde olduğunu kanıtlamıştır. Bitkilerde bazı fungal ve bakteriyel hastalıklar yaprak lekesi, sap ve kök çürüklüğü, meyvelerde leke ve çürüklük veya yumuşak çürüklükler şeklinde ortaya çıkan hastalıklara neden olmaktadır.

Yapılan araştırmalar sonucunda propolis bünyesindeki sekonder maddeler olarak bilinen etken maddelerin bu hastalıkların önlenmesinde veya depo koşullarında bitkilerin sağlıklı bir şekilde muhafaza edilmesinde kullanıldığı belirlenmiştir. Günümüzde sürdürülebilir tarımda bitki koruma etmenlerine karşı mücadelede kimyasal mücadele yerine biyolojik mücadelenin kullanılması hem çevre hem de insan sağlığı açısından önem arz etmektedir. Çalışmada herhangi bir yan etkisi olmayan propolisin bitkilerde hastalık oluşturan mikroorganizmalara karşı kullanılması tarımsal çalışmalara apiterapik düzeyde destek sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Propolis

Propolis, Yunanca kökenli bir kelime olup, pro-savunma anlamına gelirken polis ise şehir anlamına gelmektedir ve buradan da kovanın korunması anlamı çıkarılmaktadır (Ghisalberti 1979). Propolis, bal arıları tarafından özellikle çiçekli ve tomurcuklu bitkilerden toplanan balmumu, reçine karışımı içeren ve kovan içerisinde birçok amaca uygun olarak kullanılan doğal bir arı ürünüdür.

Arılar propolisi, yaşam alanları ve kovan iç duvarlarında, delik ve çatlakların kapatılmasın da peteklerin tamir edilmesinde, peteklerin birbirine yapıştırılmasında, savunmada ve kovan ağız girişinin daraltılmasında kullanılmaktadırlar. Propolis, kovana dışardan gelecek olan zararlı fungal, viral ve bakteriyel etmenlere karşı da korunmaktadır (Ghisalberti 1979; Kumova ve diğ. 2002)

2.1.1 Propolisin Fizikokimyasal Özellikleri

Propolisin 1960 yıllarından başlayarak bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve bu sebepten dolayı son 60 yılda pek çok araştırmacı tarafından propolisin bileşik kompozisyonu, farmakolojik ve tedavi edici özellikleri, biyolojik aktivitesi üzerine araştırmalar yürütülmüştür. İlk çalışma Ghisalberti (1979), tarafından yayınlanmış olup, bu çalışmalardan 20 yıl sonra ise bilim insanları propolisin biyolojik aktivitesi ve kimyasal yapısına ait değerli bilgileri ortaya koymuşlardır. Farklı orijin özelliklerine sahip propolis örneklerinin, biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış ve farklı biyolojik aktiviteleri tespit edilmiştir. Türk propolisinin ise anti-bakteriyal, anti-fungal, anti-oksidan, anti-karsinojenik, yara iyileştirici, hücre yenileyici gibi bazı biyolojik aktiviteleri incelenmiştir (Silici 2003).

Propolis, toplandığı bölge veya bitki çeşidine göre değişkenlik göstermekle birlikte zamkısı bir yapıya sahiptir. Propolisin renk değişimleri iklim koşullarından da etkilenmektedir. Bu etkenlerden dolayı propolis renk açısından kahverengi, sarı, kırmızı tonlarında değişkenlik gösterebilmektedir (Karakaş 2012). Genel anlamda propolise fiziksel açıdan bakıldığında 10°C altında sert ve kırılğan bir yapıya sahip olduğu, 15-25°C civarında daha elastik bir yapıya sahip olduğu ve 35-40°C arasında ise propolisin reçinemsı bir durumda olduğu belirlenmiştir (Kutluca ve diğ. 2008).

Propolisin erime sıcaklığı 60-69°C civarında olduğu bildirilerek aynı zamanda bu süreçlerde propolisin her geçen gün renk yapısında değişimler gözlenmiştir (Çakıroğlu 2010). Propolisin depolama koşullarına bakılacak olursak zamanla kararmakta ve güneş ışığına maruz kalırsa esnekliğini kaybetmektedir. Propolis % 95'lik alkolde, eter veya kloroform maddelerinde çözünebilmekte ve sıcaklık unsuru da propolisin fiziksel yapısını etkilemektedir (Özan 2006).

Hasadı yapılmak istenen propolisler için tropikal iklimlerde, yağış mevsimi ile beraber üretiminin daha aktif olabileceği bildirilmektedir (Donadieu 1979). Ham Propolis % 50 resin (polifenolik madde), % 35 balmumu, % 10 uçucu yağ, % 5 polen ve % çeşitli organik ve inorganik bileşiklerden oluştuğu belirtilmiştir (Bancova ve Marcucci 2000). Propolisin içeriğinde bulunan reçine, mumlar ve yağ asitleri, esansiyel yağlar, polenler incelendiğinde bu maddelerin içerdiği bileşenler Tablo 2.1'de verilmiştir (Çakıroğlu 2010).

Tablo 2. 1: Propolisin genel yapısında bulunan bileşenler, ana maddeler ve miktarı

Bileşenler	Ana Madde	Miktar
Reçine	Flavonoidler	% 45-50
	Terpenler	
	Fenolik asitler ve Esterler	
	Kumarinler	
	Serbest aminoasitler	
Mumlar ve Yağ Asitleri	Arılar ve Bitkilerden	% 25-30
	Poliansatüre Yağ Asitleri	
Esansiyel Yağlar	Uçucu Bileşenler	% 10
Polenler	Proteinler	% 5
	Serbest Aminoasitler	
Polenler	Vitaminler (A, B, C, E, P vs)	% 5
Diğer Maddeler	Elementler (Cu, Mn, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co)	% 5

Propolisin fiziki yapısı ve içerdiği maddeler arıların kullandığı bitkilerin çeşitliliğine göre değişiklik göstermektedir. Koku ve renk bakımından değişkenlik gösterirken, muhtemel ilaç olarak özü de, kaynaklara ve mevsime bağlı olarak da değişmektedir. Propolisin kimyasal yapısı üzerine 20. yüzyılın başlarından bu yana çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucu propolisde sağlık için alınması gereken 22 besini bünyesinde taşıdığı ve içinde bulunduğumuz yüzyılda keşfedilen mükemmel bileşik grupları içer için doğal ilaç özelliği olarak önem kazanmıştır (Kumazawa 1994). Bu özellikleri çoğu ilacın hammaddesi olarak bilinen flavonoidler, anti-oksidanlar, antibiyotikler ve anti-viral gibi önemli yapıları içeriğinde bulundurmaktadır (Moreno ve diğ. 2000). Propolis içeriğinde bugüne kadar yaklaşık 180 farklı bileşik tespit edilebilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2. 2: Propoliste belirlenen bileşikler ve sayıları

Bileşikler	Tanımlanan Bileşik Sayısı
Flavanoidler	38
Hidroksiflavonlar	27
Hidroksiflavononlar	11
Kalkonlar	2
Asitler	8
Benzoik asit ve türevleri	13
Esterler	4
Benzaldehit Türevleri	2
Sinamik ve Sinamik asit ile Türevleri	14
Alkoller, Ketonlar, Kenonlar	8
Heteroaromatik Bileşikler	12
Türpen, Sekuterpen ve Türevleri	7
Alifatik Hidrokarbonlar	6
Sekuterpen ve Triterpen Hidrokarbonlar	11
Steroller ve Steroid Hidrokarbonlar	6
Mineraller	22
Şekerler	7
Aminoasitler	24

Propolisin elde edilme aşamasında arıların kullanmış olduğu bitkilerin yanı sıra, balmumu içeriğinde etkili olan çeşitliliklerde ham propolisin kimyasal kompozisyonunu da etkilemektedir (Crane 1990).

2.1.2 Propolisin Kullanım Alanları

Propolisin içinde bulunun birçok bileşikten en önemli aktivite gösteren farmakolojik bileşenler flavanoidler, flavonlar, çeşitli felonikler ve aromatikler (Krell 1996). Fenolik maddelerin farmakolojik kullanımda yaygın olmasının yanı sıra gıda sanayisinde de önemli bir yere sahiptir. Fenolik maddelerin ilaç sanayisinde çok fazla kullanılmasının sebebi antimikrobiyal özelliklerinin ön planda olmasıdır.

Hücre yenileme ve onarma özelliği propolisin, dermatolojik ve kozmetik alanlarında kullanımını artırmakta ve aynı zaman da bu alanlara yönelik çalışmaların ön plana çıkmasına sebep vermektedir. Propolisin bakterisit ve mantar öldürücü özellikleri kozmetik alanında birçok uygulamada yarar sağlamıştır (Lejeune ve diğ. 1988). Apiterapik ürünlerdeki arı sütü ve propolisten elde edilmiş bitki ekstrarının E vitamin ile birlikte kozmetik sanayi de cildi besleyen ve cildi temizleyici ürünlerin elde edilmesi aşamasında kullanım alanları mevcuttur. Ülkemizde ise propolis ilk olarak diş macunu içeriğinde kullanılmaya başlanmıştır (Erdem 2002). Kuzey Amerika ve Avrupa'da apiterapik ürünler bitkisel ilaç sınıfında, arı ürünü olmayan başka maddeler ile karıştırılarak kapsül, pastil veya ciklet şeklinde satılmaktadır (Doğan ve Hayoğlu 2012). Propolisin içinde bulunan birçok bileşen sebebi ile ülkemizde de son yıllarda bal firmalarının arı ürünlerine farklı oranda propolis miktarı eklemeye başladığını görmek mümkündür. Propolisin diğer bir özelliği de sakinleştirici etkiye sahip olmasıdır. (Münstedt ve Zygmunt 2001). Propolisin antimikrobiyal aktivitesi, gıda ürünlerinin dayanıklılığı konusunda katkı sağlama sebebi ile en çok araştırılan ve önem verilen özelliklerindedir. Bakteri, mantar ve virüs gibi diğer mikroorganizmalara olan etkisi ise birçok bilimsel çalışmanın hazırlanmasına etken olmuştur (Katırcıoğlu ve Mercan 2006).

Sentetik antibiyotiklerin yerine alternatif olarak sunulan bitkisel ekstratlar önem kazanmaya başlamıştır. Organik tarımın yaygınlaşması ve organik ürünlere olan talebin artması sebebi ile doğal ürün ve ekstratlarının insan, hayvan ve bitkiler üzerindeki etkileri belirlenmesi önem arz ederken, yapılan çalışmalarda görülmüş ki propolisin kullanım prosedürlerinde başarı sağlanmıştır.

2.2 Pamuk Yetiştiriciliği

Pamuk bitkisi dünyada çok fazla talep edilen, üretilen ve ticareti yapılan stratejik tarım ürünlerinden birisidir (Küçük ve Issı 2019). Bitkinin boyu 80-120 cm aralığında ve koza dalları ayrı olan pamuk uzun bir hasat ve çiçeklenme dönemine sahiptir. Pamuk, sıcak koşullarda yetişebilen, toprak seçiciliği çok fazla olmamasına rağmen, fazla suya ihtiyaç duyan tek yıllık bir bitkidir (Aydoğdu ve diğ. 2018).

Pamuk üretici ülkeler için, gıda ve tekstil endüstrilerinde oluşturduğu değer piyasasıyla istihdam imkânı ve ekonomik güç sağlayan stratejik bir üründür (Guitchounts 2014). Pamuğun yetiştirilmesi ve işlenmesi gelişmekte olan ülkelerde olur iken, pamuğun kullanım miktarı gelişmiş ülkelerde daha fazladır (Anonim 2015). Artan nüfus, tekstil ve hazır giyim ürünlerin talebini arttırırken üretiminde ise sentetik elyaf kullanımının artması pamuğa olan talebi azaltmaktadır (Küçük 2015).

Ülkemizde tekstil sanayisi iç piyasa ve dış piyasa da sağlamış olduğu ekonomik kazanç, döviz hacmi ve istihdama yönelik talebi ile vazgeçilmez bir sektördür. Türkiye’de ekonominin kalkınması için önemli olan giyim sektörünün ham maddesi pamuk olup, sektörün devamı için ise ülkemiz pamuk lifi üretiminin artırılması gerekmektedir. Ülkemizde her yıl pamuk üretiminin azalması ile birlikte iç piyasadaki pamuk lifi tüketimine yetmediği için pamuk ithalat miktarı artmış ve halen artmaya devam etmektedir. Bu denli önemli bir yere sahip olan pamuk “beyaz altın” olarak nitelendirilmekte ve lifiyle dokuma ve iplik, çiğiti ile yağ sanayisine ve küspesi ile de hayvancılık sektörüne ham madde sağlaması ile stratejik öneme sahiptir. Pamuk üreticileri verim kaybını telafi edebilmek için ilaçlamanın yanı sıra gereğinden fazla tohum ve gübre kullanmaktadır. Bu nedenle masrafların yükselmesi ve geç ekimden dolayı verim kaybının artması ekonomik zarar oluşturmaktadır.

2.3 Pamukta *Verticillium* Solgunluk (*Verticillium dahliae* Kleb.) Hastalığı Etmeni

Pamuk bitkisinin 20’den fazla hastalığı bulunmaktadır, ancak bunların içerisinde en önemlisi *V. dahliae* fungusunun neden olduğu solgunluk hastalığıdır. *Verticillium*, Hyphomycetes sınıfına dahil, renksiz hiflerin baskın olduğu, vasat bir gelişim gösteren, koloniler oluşturan bir toprak fungusudur. Çoğunlukla tek hücreli olan renksiz veya parlak renkli konidiumları fialidler üzerinde ıslak başçıklı bazen ise zincir formu bulunur (Domsch ve diğ. 1980). *Verticillium* cinsi çok sayıda saprofitik tür ile birçok vasküler solgunluk etmeni bitki patojeni türü içine alır. Birçok bitki için *V. dahliae* en çok bilinen solgunluk etmeni fungusudur.

Öncelik olarak hastalık yapraklarda pörsüme veya renk değişimi bunun devamında ise artan solgunluk olarak ortaya çıkmaktadır (Domsch ve diğ. 1980). Dağılımı tipik olarak kuzey iklimlerinden aşağıya, subtropiklere doğrudur (Karaca 1974; Harris 1998). Topraktaki populasyon yoğunluğu *V. dahliae* için özellikle 6-8°C'ler arasında düşüktür. Yaşam döngüsünde birçok aşamaya sahip olmaktadır. Bunlar; konukçu bitkinin iletim sisteminin kolonizasyonu, yayılma ve konukçu bitkide belirti gelişimi olarak sıralanabilir. *V. dahliae* ve diğer solgunluk patojenlerinin hastalık sendromunda su iletiminin engellenmesinin rol oynadığı düşünülmektedir (Van Alfen 1989; DeVay 1989).

Fungus bitkiyi enfekte ederek ksilem borularını tıkamaktadır. Bu iletim demetinin tıkanması sonucunda bitkide bir siyahlaşma ve kahverengileşme yaprak kısımlarında ise solma ve pörsüme belirtileri ortaya çıkmaktadır. *V. dahliae* hifleri pamukta, kök kını ve epidermal hücrelerden giriş yaparmakta ve ilerleyerek korteksi geçmektedir. Endodermise ulaşan hif, inokulasyondan üç gün sonra ksilem borularına girmektedir (Garber ve Houston 1966). Hastalığın pamuk bitkisi için lif verimini azalttığı ve ayrıca lif kalitesini düşürdüğü bildirilmektedir. Pamuk ekimi tarlaya geç yapılmış ya da hastalık tarlada erken başlamış ise bitkinin boyu kısa kalırken kozalar küçük ve koza sayıları az olmaktadır. Hastalık son aşamalarda ise bitkiyi öldürmektedir. Hastalık için en uygun pH değerinin 6-9 arası olan topraklar olduğu asit karakterli toprakların hastalığın gelişimini engellediği, fazla azotlu gübrelerin hastalığın şiddetini ve çıkışını arttırırken topraktaki nemin ise uygun ortam oluşturduğu bildirilmiştir (Nemli 2003).

Verticillium solgunluğu 1941 yılında ülkemizde ilk kez Manisa Kırkağaç'ta saptanmış İyriboz (1941), ancak etmeninin *Verticillium dahliae* olduğu daha sonra yürütülen bir çalışmada belirlenmiştir (Karaca ve diğ. 1971). Hastalığın biyolojisi ve zarar şekli sebebi yüzünden mücadelesinde etkili ve ekonomik bir yöntem uygulanamamaktadır. Zararı azaltma boyutunda yapılan çalışmalarda ürün rotasyonu, bitki sıklığını artırma, toprak sıcaklığını arttırarak fungusun yaşama ortamını daraltma ve sulama sıklığını miktarını ayarlamak gibi kültürel önlemlerin yanı sıra bu hastalığa dayanıklı çeşitler kullanılmaktadır (Sezgin ve diğ. 1985).

2.4 Literatür Özeti

Propolis ve ekstratlarının içinde bulundurduğu galangin, kafeik asit gibi biyolojik aktivitesinde etkili olan flavonoidler ve aromatik asitler bulunmaktadır. Propolisde 38 farklı bileşeni bulunan flavonoidler farmakolojik ve antimikrobiyal olarak yüksek etkiye sahiptir (Yücel ve diğ. 2014). Farklı kaynaklardan toplanarak hazırlanan propolis ekstratlarının, antibakteriyel özellik yönünden test edildiği çalışmalarda, bakteriler için propolisin engelleyici etki özelliği sonucu ortaya çıkarılmıştır (Linderfelleri 1967). Laboratuvar çalışma ortamlarında çeşitli bakteri suşlarına karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Marcucci 1995). Araştırmalar sonucunda birçok araştırmacı propolisin, gram pozitif çubuk bakterilere karşı geniş etkiye sahip olduğunu fakat gram negatif basillere karşı ise kısıtlı etkiye sahip olduğunu belirtmiştir (Hegazi 1998).

Propolis etanol ekstraktının gram negatif bakterilere (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) karşı düşük etkiye ancak gram pozitif koklara (*Staphylococcus aureus*) karşı yüksek antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Silici ve diğ. 2005) Antifungal aktivitesi en yüksek olan arı ürünü kavak propolisi 40 farklı fungusa karşı test edilmiş, meyve sularının bozulma sebebi olan mantar türlerine fungusit etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Bogdanov 2012). Propolis etanol ekstraktının 38 fungus suşu ve 60 maya suşu üzerinde engelleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Lisa ve diğ. 1989). Ayrıca propolis kronik fungal sinüzit hastalarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Cizmarik ve Trupl 1976).

V. dahliae toprak kökenli bir fungus olup, yaşamı parazitik, saprobik ve dormant dönemlere ayrılmaktadır. Patojeninin hastalığa sebep olan hifleri ve mikrosklerotları, kötü çevre koşullarında bitki ve toprak artıklarında 14 yıl gibi uzun bir zaman canlı kalabilmektedir (Isaac 1967). *Verticillium solgunluğuna Verticillium dahliae* Kleb. ve *Verticillium albo-atrum* olmak üzere iki türü sebep olurken, pamuk bitkisinin yetiştirilmesinde ve kaliteli ürün elde edilmesinde de en önemli kısıtlayıcı unsurların başında gelmektedirler (Far ve diğ. 1989).

20-24°C'de sıcaklıkta *Verticillium albo-atrum* solgunluk hastalığına sebep olduğu için pamuk bitkisinin tarla koşullarında yetiştirilmesinde 25°C'nin üstünde sıcaklıklarda hastalık oluşturma yeteneği yoktur. Tarla koşullarında sıcaklıktan çok fazla etkilenmeyen *Verticillium* türlerinden sadece *Verticillium dahliae* solgunluk hastalığına sebep olmaktadır (Domsch ve diğ. 1980).

Ülkemizde, Ege ve Akdeniz Bölgeleri başta olmak üzere pamuk yetiştirilen alanların tamamında *Verticillium* solgunluk hastalığı yaygın olarak görülürken, solgunluğunun ürün kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Esentepe 1979). Ekim nöbeti uygulanmayan alanlarda pamukta kalite kaybının ve verimdeki zararın daha da yüksek olduğu bildirilmiştir (Sağır ve diğ. 1992). *Verticillium* solgunluğu, pamuğun teknolojik ve lif özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir (Schnathorst ve Mathe 1966). Pamukta hastalık olgunlaşmayan lif yüzdesini artırmakta aynı zamanda lif kalitesi, lif uzunluğu azalmaktadır. Bu sebeplerden dolayı liflerin işlem sırasında artıkları çok fazla olmaktadır (Watkins 1981).

Hastalığın mücadelesi için dayanıklı çeşitler kullanılmalı ve bulaşık olmayan toprakta pamuk tarımının yapılması gerekmektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda hastalığın etkin mücadelesine yönelik bir yöntem tespit edilememiştir. Fakat dayanıklı pamuk çeşitlerinin üretimde kullanılmasıyla verim ve kaliteyi arttırarak kayıpların önemli ölçüde azalacağı belirtilmektedir (Çelik ve diğ. 2010).

2.5 Tezin Amacı

Bitkilerde bazı fungal ve bakteriyel hastalıklar, yanıklık, kanser, meyvelerde ve yapraklarda leke ve çürüklük, antraknoz, sap ve kök çürüklüğü veya yumuşak çürüklükler şeklinde ortaya çıkan bitki hastalıklarına neden olmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda propolis bünyesindeki sekonder maddeler olarak bilinen etken maddelerin bu hastalıkların önlenmesinde veya depo koşullarında saklamada bitkilerin sağlıklı bir şekilde muhafaza edilmesinde kullanıldığı belirlenmiştir.

Tez çalışmamıza bitkilerde hastalık oluşturan etmenlere karşı propolisin kullanıldığı çalışmalar ışık tutacaktır. Pamuk, birçok sanayi kolunun hammaddesini karşılayan en önemli tarımsal ürünlerimizden birisidir. Türkiye, pamuk üretimi, lif

ithalatı ve tekstil ürünleri ihracatı açısından dünyada sayılı ülkeler arasında yer almaktadır Ülkemizde dört ana bölgede (Güneydoğu Anadolu, Ege, Çukurova ve Antalya) pamuk üretimi yapılırken, dünyada pamuk üretiminin yaklaşık % 80'i ülkemizin de içinde yer aldığı belirli sayıda ki ülkeler tarafından gerçekleştirilmektedir.

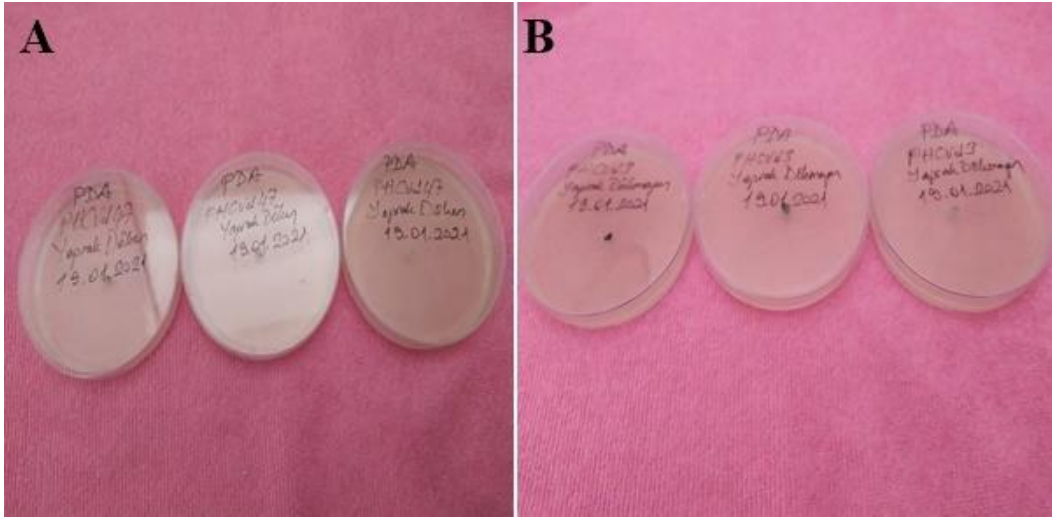
Günümüzde en önemli endüstri bitkisi olan beyaz altın olarak anılan pamukta verim ve kaliteyi düşüren *Verticillium* solgunluğu etmeni (*Verticillium dahliae* Kleb.)'nin etkin ve ekonomik bir kimyasal mücadelesi bulunmadığı gibi mücadelede başarı şansı da düşük olduğundan *V. dahliae*'e karşı propolisin etkinliğinin araştırılması planlanmıştır. Bu bağlamda propolis ekstraktının patojene karşı etkinliği *in-vitro* ve *in-vivo* testler yardımıyla ortaya konularak, çalışmada propolisin solgunluk hastalığına karşı alternatif mücadele olanağı araştırılmıştır. Sürdürülebilir tarımda bitki koruma etmenlerine (hastalık, zararlı, yabancı ot vs) karşı mücadelede kimyasal mücadele yerine biyolojik mücadelenin kullanılması hem çevre hem de insan sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Çalışmada herhangi bir yan etkisi olmayan propolisin bitkilerde hastalık oluşturan mikroorganizmalara karşı kullanılmasıyla tarımsal çalışmalara apiterapik düzeyde destek sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile Muğla yöresinden elde edilen propolis ekstraktının pamukta ekonomik kayıplara neden olan *Verticillium* solgunluğu hastalığı (*Verticillium dahliae* Kleb.)'nin yaprak dökme ve yaprak dökmeyen patotiplerine karşı *in-vitro* ve *in-vivo* koşullarda antifungal etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmanın bitkisel materyalini *Verticillium* solgunluğuna dayanıklı Giza 45 (*Gossypium barbadense* L.), tolerant Carmen (*Gossypium hirsutum* L.) (Bölek ve diğ. 2005) ve duyarlı Acala SJ2 (*G. hirsutum* L.) (Erdoğan ve diğ. 2014) pamuk çeşitleri oluşturmuştur. Muğla yöresinden 2021 yılında temin edilen propolis örnekleri kullanılmıştır. Pamuktan izole edilen ve virülenslikleri bilinen PHCVd3 (yaprak dökmeyen patotip) ve PHCVd47 (yaprak dökken patotip) izolatları (Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Şener KURT'tan temin edilmiştir) hastalık testlemelerinde canlı materyal olarak kullanılmıştır. (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1: *V.dahlie*'nin PHCVd47(yaprak dökken patotip) izolatı (A); PHVd3 (yaprak dökme patotip) izolatı (B)

3.2 Yöntem

3.2.1 Propolis Etanol Ekstrakt (PEE)'nin Hazırlanması

Ham propolis 2021 yılında Muğla'dan temin edilerek laboratuvar ortamında -18°C 'de dondurulmuş ve donan ham propolis bıçak yardımı ile kesilerek küçük parçalar haline getirilmiştir. % 80'lik etil alkol çözeltisi (80 ml etil alkol+20 ml saf su (Rios) =100 ml) hazırlanmış ve 1:3'lik propolis /etil alkol çözeltisi hazırlanarak, karışım blendır ile 2 dak. parçalandıktan sonra ultrasonik banyoda 2 gün boyunca homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş karışım günde en az 2 kez alt üst edip karıştırarak 5 gün boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen ekstrakt daha sonra filtre kağıdı (Whatman no 1) ile süzülerek propolis bileşenlerini balmumundan ayırmak suretiyle, propolisin etanol ekstraktı elde edilmiştir. Birleştirilen her süzüntüdeki alkol rotary evaporatör (IKA RV10-Germany) (Şekil 3.2) ile tamamen uçurularak konsantre edilmiş ve kullanılıncaya kadar buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ağzı sıkı bir şekilde kapatılmak suretiyle muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 2: Rotary Evaporatör

3.2.1.1 Propolis Etanol Ekstraktı (PEE)'nin Toplam Fenolik Madde Miktarı Hesaplama Yöntemi

Numunelerin içindeki faydalı bileşikler olan fenolik bileşiklerin ayrılması (ekstraksiyon) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde (HPLC) analizleri Oruç ve diğ. (2021) bildirdiği yönteme göre yapılmıştır. HPLC sistemi (Shimadzu, LC-20 AD/SPD-M20A) degazer, ikili pompa, otosampler ve diode-array detektöre (DAD) sahiptir. Numunelerin ayrılması için C18 kolon (Inertsil ODS-3, 5 mm, 4.6x150 mm) kullanılmıştır.

3.2.1.2 PEE'nin Toplam Antioksidan Aktivite Tayinin Hesaplama Yöntemi

Ferric reducing/antioxidant power olarak bilinen FRAP metodu (Fe (III)-TPTZ-2,4,6-tris(2-pyridlyl)-S-triazin) kompleksindeki demir (III) iyonunun antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks olan Fe (II)-TPTZ oluşturmasına dayanmaktadır. Bu amaçla 3 mL FRAP reaktifi [300 mM pH 3,6 asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl₃ (10: 1: 1)] ile 100 µL numune karıştırılmışı ve 4 dakika sonra oluşan bu kompleks 593 nm'de maksimum absorbans vermiştir (Benzie ve Strain 1999). Standart grafiğin hazırlanmasında ise FeSO₄.7H₂O'un farklı konsantrasyonları (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 µM) kullanılmıştır. Sonuçlar FeSO₄.7H₂O eşdeğeri antioksidan güç olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.3 PEE'nin Toplam Flavanoid Madde Miktarı Hesaplama Yöntemi

Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi olarak da adlandırılan Fukumoto ve Mazza (2000) metodun prensibi, alüminyum klorürün, flavonoidlerin 4-keto ve C-3 ya da C-5 (ya da her ikisi) hidroksil grubu ile kararlı bir asit kompleksinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Standart grafiğin hazırlanmasında kuersetinin farklı konsantrasyonları (1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 ve 0,015625 mg/ml) kullanılmıştır. Konsantrasyona karşı bulunan 415 nm'deki absorbans değerleri ile

grafik çizilip çizilen grafiğe göre kuersetin eşdeğeri flavonoid madde miktarı bulunmuştur.

3.2.2 *Verticillium dahliae* Kültürlerinin Geliştirilmesi

Stok kültürden alınan *V. dahliae*'in PHCVd3 izolatu (yaprak dökmeyen patotip) ile PHCVd47 izolatu (yaprak dökken patotip) Patates Dekstroz Agar (PDA-Difco) besi yerinde, $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de iki hafta süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3: *V.dahliae* kültürlerinin soğutmalı inkübatörde geliştirilmesi

Daha sonra *V. dahliae*'nın PHCVd3 ve PHCVd47 izolatlarına ait sporların çoğaltımı için patojenin hızlı bir şekilde geliştiği sıvı besiyeri (0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g NaNO_3 , 1 g K_2HPO_4 , 0.5 g KCl ve 7.5 g sukroz, 1 L saf su) hazırlanmıştır. Hazırlanan sıvı besiyerleri erlenmayerler (1 L) içerisinde 121°C 'de 15 dakika boyunca otoklav edilerek, daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Sıvı besiyerleri oda sıcaklığına geldiğinde, daha önce PDA besi yerinde geliştirilen 14 günlük PHCVd47 ve PHCVd3 izolatlarından 0,5 mm agar diskler alınarak 100 ml'ye 1 adet olacak biçimde sıvı besi yerine aktarılmış ve 14 gün boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak sıvı kültürler elde edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4: *V.dahliae*'nin sıvı kültürde geliştirilmesi

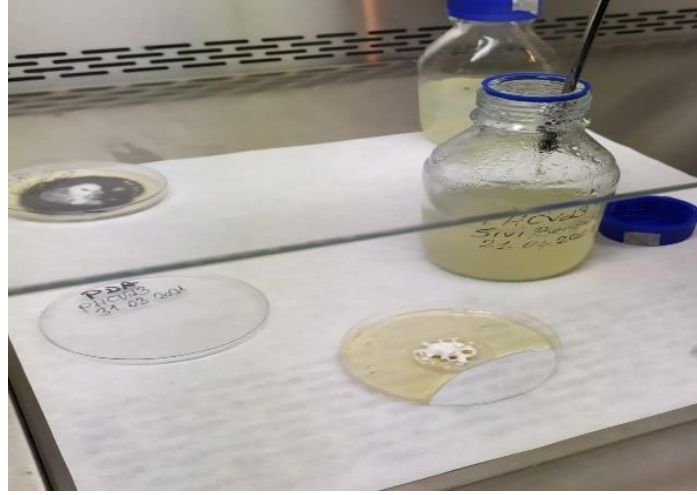
3.2.3 PEE'nın *V. dahliae* Kültürleri Üzerine Anti-fungal Etkisinin *In-vitro* Koşullarda Belirlenmesi

PEE'nın *V. dahliae*'nin her iki patotipi üzerine etkisi, *in-vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlarda (0,003, 0,06, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 ppm/ml) propolis içeren PDA ortamlarındaki miselyal gelişme ölçülerek belirlenmiştir (Kurt ve Şahinler 2003). Bu amaçla, otoklav edilen (121°C'de 15 dak.) PDA besiyerlerine propolis ekstraktının farklı konsantrasyonları ayrı ayrı eklenerek 100 mm çapındaki petri kaplarına aktarılmıştır (20 ml/petri) (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5: Farklı konsantrasyonlardaki propolisli PDA besiyerinin petrilere aktarılması

PEE'li PDA besiyeri oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiş ve PDA ortamında 7 gün geliştirilen *V. dahliae*'nin her iki patotipine ait kolonilerinin aktif olarak gelişen kenarlarından mantar delici ile alınan 5 mm çapındaki miselyum diskleri, propolisli PDA besi ortamının merkezine yerleştirilerek inokulasyon işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.6). Negatif kontrol olarak ise Propolis ekstraktı eklenmemiş PDA ortamı kullanılarak uygulama yapılmıştır (Yanar ve diğ. 2005).



Şekil 3. 6: *V.dahliae*'nin miselyum disklerinin propolisli PDA besi ortamına inoküle edilmesi

Uygulama yapılan petrilerin kapakları parafilm ile sarılmış ve karanlıkta 24°C'de 7-10 gün süre ile inkübe edilmiştir . Kontrol grubundaki gelişmelere bakılarak uygulama yapılan petrilerde gelişim engelleme oranları dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve iki kez tekrarlanmıştır. Anti-fungal çalışmada, patojenin miselyum radial gelişimleri, kontrol ile kıyaslanarak % engelleme oranları belirlenmiş ve engelleme oranı Deans ve Soboda (1990)'nın belirlediği formüle göre hesaplanmıştır.

Kontrol Grubuna Göre Engelleme Yüzdesi Hesaplama

$$\text{MGI (\%)} = [\text{dc}-\text{dt} / \text{dc}] \times 100$$

$$\text{MGI} = \text{Engelleme yüzdesi (\%)}$$

dc= Kontrol petrideki radial büyüme (mm)

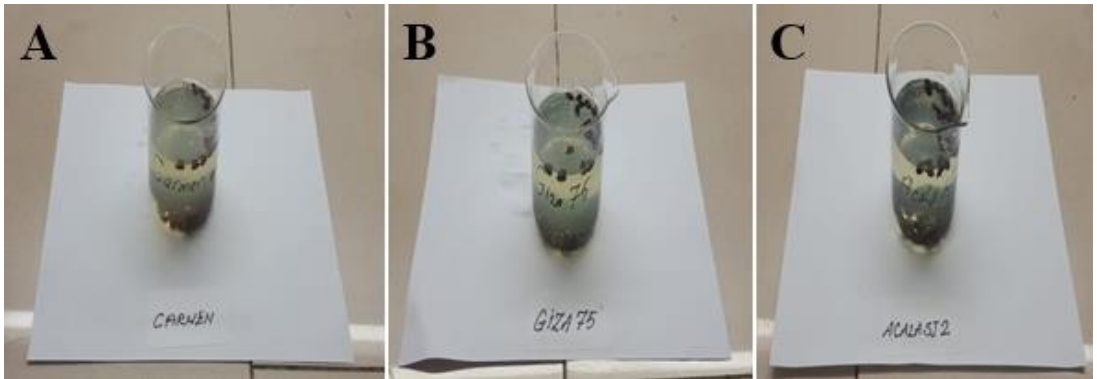
dt= Uygulamalı petrideki radial büyüme (mm)

İnkübasyon sonunda petrilerde gelişme göstermeyen fungusların misel parçaları, ekstraktan ari PDA besiyerlerine alınıp 1 hafta süreyle gözlemlenerek, bu süre sonunda aktarma yapılan besi yerlerinde fungal koloni gelişimi gözlenmemiş ise fungisidal etki, gelişim gözlemlenmiş ise fungisitativ etki olarak kaydedilmiştir (Tripathi ve diğ. 2004).

3.2.4 *In-vivo* Çalışmalar

3.2.4.1 Pamuk Çeşitlerinin Yetiştirilmesi

Saksı denemesinde dayanıklı Giza 45, tolerant Carmen ve duyarlı Acala SJ2 pamuk çeşitlerine ait sülfirik asit ile delinte edilmiş ilaçsız tohumlar kullanılmıştır. İlk olarak otoklavda 121°C'de 1 saat sterilize edilmiş toprak karışımı (1/3 toprak + 1/3 kum + 1/3 torf) steril plastik saksılara (10 cm çap) doldurulmuş, daha sonra her bir saksıya *in-vitro* çalışmada patojene karşı yüksek etki gösteren propolis ekstraktının etkili dozuyla kaplanmış (2 ml/tohum) 4'er adet pamuk tohumu ekilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7: PEE'nın etkili dozuyla kaplanmış Carmen (a), Giza 45 (b), Acala SJ2 (c) pamuk tohumları

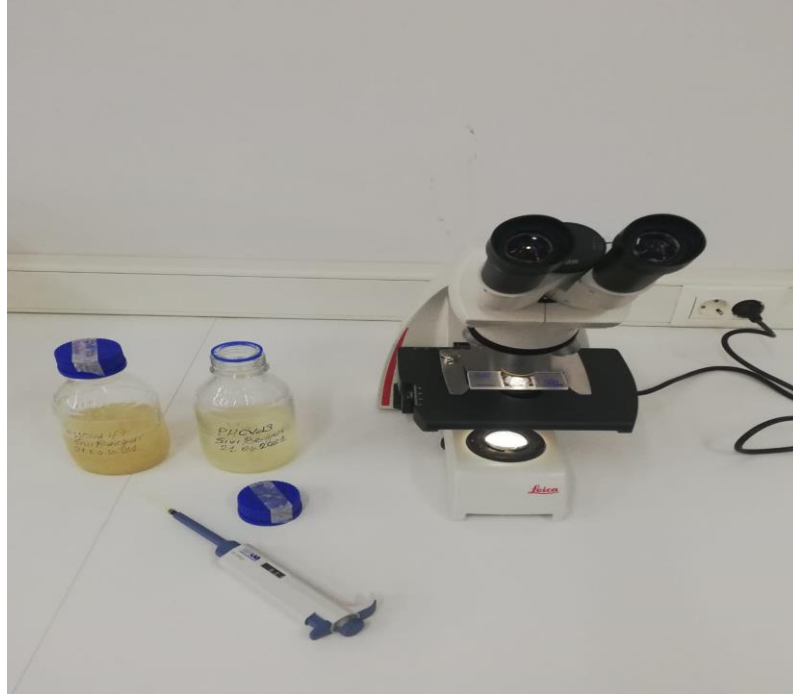
Pamuk tohumu ekilmiş saksılar kontrollü sera koşullarında ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık) yetiştirilmiş, pamuk fideleri kotiledon yapraklı döneme geldiğinde seyreltme yapılarak, her bir saksıda iki fide bırakılmış ve bu fideler 4-6 yapraklı döneme kadar saksılarda yetiştirilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3. 8: Bitki büyütme kabiniinde Giza 45, Carmen ve Acala SJ2 pamuk çeşitlerinin 4-6 yapraklı dönemi

3.2.4.2 PEE ile Kaplama Yapılmış Pamuk Çeşitlerinin *V. dahliae*'ya karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi

PEE ile kaplama yapılmış pamuk çeşitlerinin *V. dahliae*'e karşı duyarlılıklarını belirlemek amacıyla PHCVd3 izolatu (yaprak dökmeyen patotip) ve PHCVd47 izolatu (yaprak döken patotip)'nin inokulasyonunda konidi süspansiyon tekniği kullanılmıştır (Erdoğan ve diğ. 2014). İki haftalık PHCVd3 ve PHCVd47 izolatlarına ait sıvı besi yerinde geliştirilen sporlar 2 kat tülbentten süzülerek misel ve agar parçaları süspansiyondan uzaklaştırılmış, daha sonra ışık mikroskobunda (Leica) Thoma lamı yardımıyla sporların konsantrasyonu 4×10^6 spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9: Işık mikroskobunda Thoma lamı yardımıyla spor konsantrasyonunun ayarlanması

Alt kısmı delinmeyen steril plastik saksılara 10'er ml patojen süspansiyonu eklenmiş ve 4-6 yapraklı döneme gelen pamuk fideleri içinde spor süspansiyonu olan yeni plastik saksılara aktarılmıştır (Şekil 3.10). Kontrol olarak ise plastik saksıların dibine sadece steril saf su verilmiştir.



Şekil 3. 10: 4-6 yapraklı dönemdeki pamuk fidelerine *V.dahliae*'nin PHCVd47 ve PHCVd3 patotipinin konidi süspansiyon tekniği ile inokulasyonu

Şekil 3. 10: 4-6 yapraklı dönemdeki pamuk fidelerine *V. dahliae*'nin PHCVd47 ve PHCVd3 patotipinin konidi süspansiyon tekniği ile inokulasyonu

Bitki fizyoloji laboratuvarının yer alan bitki büyütme kabininde saksı denemesi, tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü olarak ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 12 saat aydınlık/12 saat karanlık) yürütülmüştür (Şekil 3.11).



Şekil 3. 11: Bitki büyütme kabininde saksı denemesinin genel görünümü

Bitki büyütme kabininde steril plastik saksılarda gelişen pamuk fideleri hastalığın seyrine takiben yaklaşık 3-5 hafta sonra Tsror ve diğ. (2001)'nin kullandığı 0-5 solgunluk skalasına göre değerlendirilmiştir (Tablo 3.1) (Şekil 3.12).

Tablo 3. 1: 0-5 solgunluk skalası

Skala değeri	Hastalık belirtisi
0	Belirti yok
1	Yapraklarda az düzeyde kloroz, %25'ten az solgunluk
2	Yaprakların %30-50'sinde orta düzeyde kloroz ve solgunluk
3	Orta düzeyde solgunluk, yapraklarda %50-75 solgunluk
4	Yaprakların %75'inden fazla kloroz veya solgunluk
5	Ölü bitki



Şekil 3. 12: Saksı denemesinde kullanılan 0-5 solgunluk skalası

Saksı denemesinde yapraktaki hastalık şiddeti indeks değeri aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır (Karman 1971).

$$\text{Yaprakta Hastalık Şiddeti İndeksi} = (a \times 0) + (b \times 1) + (c \times 2) + (d \times 3) + (e \times 4) + (f \times 5) / M$$

a, b, c, d, e, f= Her skala değerine giren bitki sayısı;

M= Toplam bitki sayısı

3.2.5 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen tüm veriler JMP IN bilgisayar programı (SAS Enstitüsü Cary, NC, 13,0 PC versiyonu) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve farklılıklar Duncan testiyle tespit edilmiştir ($P \leq 0.01$).

4. BULGULAR

4.1 PEE Konsantrasyonlarının PHCVd3 İzolatı (Yaprak Dökmeyen Patotip) ve PHCVd47 İzolatı (Yaprak Döken Patotip)'nin Misel Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada PEE konsantrasyonlarının *in vitro* koşullarda yaprak dökmeyen (PHCVd3 izolatı) ve yaprak döken (PHCVd47 izolatı) patotiplerinin misel gelişimine etkileri ve engelleme oranları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4. 1: PEE'nin *V. dahliae*'nin patotiplerinin misel gelişimine antifungal etkisi

Konsantrasyon (ppm/mL)	Yaprak Dökmeyen Patotip (PHCVd3 izolatı)		Yaprak Döken Patotip (PHCVd47 izolatı)	
	Ortalama misel çapı (mm)*	Kontrole göre % engelleme	Ortalama misel çapı (mm)*	Kontrole göre % engelleme
0,003	16,17 b	18,30	17,25 b	13,00
0,06	15,08 c	23,90	15,17 c	23,70
0,125	11,50 d	42,00	11,67 d	41,30
0,25	9,00 e	54,60	9,17 e	53,90
0,5	7,58 f	61,80	7,75 f	61,00
1	4,92 g	75,20	5,08 g	74,40
Kontrol	19,83 a	0,00	19,88 a	0,00

*3 tekerrür ortalamasıdır, aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur P<0.01.

PEE dozlarının *in vitro* engelleme oranları değerlendirildiğinde dozlar istatistiki olarak farklı bulunmuştur (Ek A ve B). Tablo 4.1 değerlendirildiğinde PEE'nin yaprak dökmeyen (PHCVd3 izolatı) ve yaprak döken patotipi (PHCVd47 izolatı)'nin misel gelişimini doza bağlı olarak değişen oranlarda engellediği belirlenmiştir. PEE dozlarının yaprak dökmeyen patotipi (PHCVd3 izolatı)'ni yüzde engelleme oranlarının % 18,30-%75,20 arasında değiştiği saptanmıştır. En yüksek antifungal etki 1 ppm/ml dozunda (% 75,20) gözlenirken, bu dozu 0,5 ppm/ml dozu (% 61,80) takip etmiştir. PEE dozlarının yaprak döken patotipi (PHCVd47 izolatı)'nin yüzde engelleme oranlarının % 13,00-% 74,40 arasında değiştiği saptanmıştır. En yüksek antifungal etki 1 ppm/ml dozunda (% 74,40) belirlenirken,

bu dozu 0,5 ppm/ml dozu (% 61,00) takip etmiştir. Dozların uygulanmadığı kontrol petrideki misel çapı diğer uygulama yapılan petrilerde istatistiki olarak farklı bulunmuştur.

4.2 PEE'nin Saksı Koşullarında PHCVd3 İzolatı (Yaprak Dökmeyen Patotip) ve PHCVd47 İzolatı (Yaprak Döken Patotip)'na Etkileri

In vitro'da *V. dahliae*'nin her iki patotipine karşı en etkili bulunan PEE dozu (1 ppm/ml)'nin saksı koşullarında hastalığa dayanıklı Giza 45, tolerant Carmen ve duyarlı Acala SJ2 çeşitlerinde *V. dahliae* Kleb.'in yaprak dökmeyen (PHCVd3 izolatu) ve yaprak döken (PHCVd47 izolatu) patotiplerine etkileri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4. 2: Saksı denemesinde PEE uygulanan pamuk bitkilerinde PHCVd3 ve PHVd47 inokulasyon sonrası hastalık şiddeti indeks değerleri

Çeşit	PHCVd3 izolatu HŞ*	PHCVd47 izolatu HŞ*
Acala SJ2 (Duyarlı)	3,80 a	3,90 a
Carmen (Tolerant)	1,82 b	2,32 ab
Giza 45 (Dayanıklı)	1,34 b	1,64 b

*5 tekrür ortalamasıdır, aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur P<0.01. HŞ: hastalık şiddeti.

Yapılan istatistiki analizlerde çeşitler önemli bulunmuştur (Ek C ve D). Saksı denemesinde PEE uygulanan pamuk çeşitlerinde yaprak dökmeyen (PHCVd3 izolatu) patotipinde ortalama hastalık şiddeti indeks değerleri 1,34-3,80 arasında saptanmıştır. En düşük hastalık şiddeti indeks değeri dayanıklı Giza 45 çeşidi (1,34) ile tolerant Carmen çeşidinde (1,82) gözlenirken istatistiki olarak aynı grupta yer almıştır. Yaprak döken (PHCVd47 izolatu) patotipinde çeşitlerde ortalama hastalık şiddeti indeks değerleri 1,64-3,90 arasında belirlenmiştir. En düşük hastalık şiddeti değeri dayanıklı Giza 45 çeşidinde (1,64) saptanırken bu çeşidi tolerant Carmen çeşidi (2,32) takip etmiştir. En yüksek hastalık şiddeti indeks değeri her iki patotipte duyarlı Acala SJ2 çeşidinde (3,80-3,90) saptanmıştır (Tablo 4.2).

4.3 Propolisin Toplam Fenolik Analiz Değerleri

Fenolik maddeler hücrelere zararlı olan serbest radikalleri nötralize edebilme özelliğine sahip antioksidanlardır. Çalışmada kullanılan propolis örneklerimizin HPLC-DAD analiz sonuçları Tablo 4.3’de verilmiştir. Türkiye propolisinde en çok bulunan etkin maddelerin başında apigenin, naringenin, pinosembrin, galangin, kafeik asit, kuersetin, kalkon ve krisin bulunmaktadır (Oruç ve diğ. 2017). Propolis analiz sonuçlarımız yapılan bu çalışmayı desteklemektedir.

Tablo 4. 3: Propolisin HPLC-DAD analiz sonuçları

Tespit Edilen Fenolik Bileşikler	Miktarları (µg/ml)*
Gallik asit	30,28
Epigallokateşin gallat	24,34
Kafeik asit	292,55
p-Kumarik asit	116,68
<i>trans</i> -Ferulik asit	86,00
<i>trans</i> -İsoferulik asit	225,25
3-4-Dimetoksisinamik asit	142,16
Kuarsetin	468,02
<i>trans</i> -Sinamik asit	44,29
Naringenin	367,28
Apigenin	287,01
Kaemferol	172,73
Krisin	419,76
Pinosembrin	958,08
Galangin	959,83
Kafeik asit fenetil ester	2102,26
<i>trans</i> -Kalkon	443,85

* Analiz sonuçları sıvı propolisin 1 mililitredeki µg g miktarlarını içermektedir.

4.4 Propolisin Toplam Antioksidan Analiz Değerleri

Çalışmada kullanılan Propolisin toplam antioksidan kapasitesi Tablo 4.4'de verilmiştir. Özdal ve diğ. (2018), çalışmalarında Türkiye'nin farklı 54 bölgesinden topladıkları propolis örneklerinin antioksidan aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışmamızdaki değer kullanım açısından etkili bir değere sahiptir.

Tablo 4. 4: Propolisin toplam antioksidan kapasitesi

Numune	Toplam antioksidan Kapasite (Ferric reducing/antioxidant Power) FRAP
Sıvı etanolik propolis (s)	222.85±1.67* Mmol FeSO ₄ .7H ₂ O/ml
Ham propolis (Katı)	197.79±2.593 (mmol FeSO ₄ .7H ₂ O/g)

4.5 Propolisin Toplam Flavanoid Madde Miktarı Değerleri

Antioksidanların başlıca kaynağını oluşturan flavonoidlerin, çalışmamızda kullanılan propolisdeki toplam madde miktarı sonuçları Tablo 4.5'de verilmiştir. Türk propolisinin Avrupa propolisi gibi yüksek flavonoid içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Celemlı ve diğ., 2013). Çalışmamızdaki propolisin analiz değerlerinin etkin bir içeriğe sahip olduğunu bildirmektedir.

Tablo 4. 5: Propolisin toplam flavanoid madde miktarı

Numune	Toplam Flavanoid madde miktarı mgQE/g
Sıvı etanolik propolis (s)	10.18±0.06* mgGAE/ ml
Ham propolis (Katı)	4.779±0.140 mgQE/g

5. TARTIŞMA ve KANI

Çalışmada PEE dozlarının *V. dahliae*'nin yaprak dökme (PHCVd3 izolatu) ve yaprak dökme (PHCVd47 izolatu) patotiplerinin misel gelişimine etkisini belirlemek amacıyla *in vitro*'da yürütülen petri denemeleri sonucunda, PEE dozları her iki patotipi değişen oranlarda engellemiş, en yüksek antifungal yaprak dökme (PHCVd3 izolatu) ve yaprak dökme (PHCVd47 izolatu) patotiplerinde sırasıyla % 75,20 -% 74,20 arasında 1 ppm/ml dozundan elde edilmiştir (Tablo 4.1). Bu çalışmaya benzer bir araştırmada Kurt ve Şahinler (2003), *In-vitro* koşullarda Propolis etanol ekstraktı (PEE)'nin yedi farklı konsantrasyonu (0,0, 0,003, 0,06, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 ppm)'nin *Verticillium dahliae*, *Fulvia fulva* (Cooke) Cif. Ve *Penicillium digitatum* (Pers.) Sac.'a karşı antifungal etkilerini araştırmış, deneme sonucunda PEE'nin artan konsantrasyonlarında, denemeye alınan patojenlerin misel gelişiminde azalma olduğunu, PEE'nin *V. dahliae* üzerine etkisinin 1,0 ve 0,5 ppm konsantrasyonlarında sırasıyla % 84,8 ve % 83,3, 0,06 ve 0,003 ppm'de % 2,1 ve % 33,9 olduğunu bildirmişlerdir. Yanar ve diğ. (2005), *In vitro*'da propolis metanol ekstraktı (PME)'nin on farklı konsantrasyonunun (10, 7, 5, 3, 1, 0,1, 0,07, 0,05, 0,03 ve 0,01 µg/ml) *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary., *P. capsici* ve *P. parasitica* Pers.'a karşı antifungal etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, PME'nin dört konsantrasyonu (10, 7, 5, 3 µg/ml)'nin üç *Phytophthora* türünün misel gelişimini tamamen engellediğini ve bu etkinin fungistatik olduğunu bildirmiştir. Depo koşullarında sorun olan *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* Pers. Ve *Penicillium expansum* Link. Küf etmenlerinin spor gelişimlerini engellemek için propolis metanol ekstraktı (PME)'nin farklı 8 konsantrasyonu (% 0,1, 0,3, 0,5, 1, 3, 5 ve 7)'nin uygulandığı başka bir çalışmada, PME'nin % 0.1 – 1 arası dozlarında önemli derecede etki görülmediği, % 3, 5 ve 7 propolis dozlarında yüksek oranda engelleme olduğu tespit edilmiştir (Yanar ve diğ. 2007). Curifuta ve diğ. (2012), Şili propolisini etanol içinde ekstrakte edilmiş (EEP) ticari preparatın kimyasal bileşenlerinin altı fungal patojen (*Alternaria alternata*, *Fusarium* sp., *Ulocladium* sp., *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* ve *Trichoderma reesei*)'e karşı *in-vitro* antifungal etkinliğini araştırdıkları çalışmada, EEP'in dört farklı dozu (% 0,5, 1, 2,5 ve 5)'nin antifungal etkinliğinde istatistiksel olarak farklılık görülmesine rağmen kullanılan dozların tamamının test edilen funguslara karşı antifungal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. (Temiz ve diğ. 2013). Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen

on farklı Propolis örneklerinin gıdalarda sorun olan *Penicillium aurantiogriseum* ve *Aspergillus versicolor*'a karşı % 1, % 5, % 10'luk dozlarının antifungal etkilerini belirledikleri çalışmada, % 1 ve % 5'lik dozlarda küf etmenlerinin miselyum gelişimleri farklı oranlarda engellenirken, % 10'luk dozda misel gelişiminin tamamen engellendiğini belirtmişlerdir. Ankara, Samsun, Yozgat, Tekirdağ ve Mardin illerinden temin edilen ham propolisin etanol ekstraktı (PEE)'nin % 0,06, 0,125, 0,5 ve 1'lik dozlarının *Rhizoctonia solani*, *Macrophammina phaseolina* ve *Pythophthora infestans* patojenlerine karşı *in vitro*'da antifungal etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, 5 ilden temin edilen ham PEE'nin tüm dozlarında patojenlerin misel gelişimlerinin önemli derecede engellendiği tespit edilmiştir (Yanar ve diğ. 2016). Yürütülen diğer bir çalışmada, Tokat ve Ankara'dan getirilen propolisin etanolik ekstraktının (PEE) üç farklı konsantrasyonu (% 1, 3 ve 5)'nun ayva kahverengi çürüklük hastalığı (*Monilinia fructigena*)'na antifungal etkileri araştırılmış, Ankara ve Tokat PEE % 3 konsantrasyonu *M. fructigena*'nın miselyum gelişimini % 100 oranında; Ankara ve Tokat PEE % 1 konsantrasyonu patojenlerin gelişimini sırasıyla % 85,6 ve % 84,2 arasında değişen oranlarda engellediği belirlenmiştir (Özyiğit ve diğ. 2017a). Limon'da yeşil küf hastalık etmeni *Penicillium digitatum*'a karşı Propolis etanol ekstraktının *in vitro* koşullarda etkisinin araştırıldığı çalışmada, % 3 propolis etanol ekstraktının patojenin miseliyal gelişimini güçlü bir şekilde engellediği ve 1.4 cm engeleme zonu oluşturduğu bildirilmiştir (Abo-Elyousr ve diğ. 2021). Çakar ve diğ. (2022), Farklı Propolis ekstraktlarının *Fusarium solani*'ye karşı anti-fungal etkisini araştırdıkları bir çalışmada, saf propolis ekstraktlarının artan dozlarda (600 µl için yaklaşık 30 mm) patojenin misel büyümesine karşı daha etkili bulunurken, propolisin etanol ekstraktları orta düzeyde bir antifungal etki gösterdiğini (600 µl için yaklaşık 33 mm) ve DMSO (Dimetil sülfoksit) ekstraktlarının ise daha az etkili olduğunu bulmuşlardır (600 µl için yaklaşık 58 mm). PEE'nin farklı veya aynı hastalık etmenlerine (fungal veya bakteriyel) karşı değişen oranlarda antifungal etki göstermesinin sebebi olarak propolis içeriğinin temin edildiği yerlerdeki bitki florasına bağlı olarak kimyasal içeriğinin önemli düzeyde farklılık göstermesine bağlanmaktadır. Benzer sonuçlar daha önceden yapılmış olan birçok çalışmada da belirtilmiştir (Chee 2002; Shehu ve diğ. 2015).

Saksı denemelerinde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; PEE'nin *V. dahliae*'ya etkisi dikkate dikkate alındığında PEE'nin 1 ppm/ml dozu ile kaplanan Giza 45, Carmen ve Acala SJ2 pamuk çeşidi tohumlarından oluşan bitkilere yaklaşık bir ay sonra patojenin her iki patotipi inoküle edildiğinde yaprak dökmeyen patotipte en düşük hastalık şiddeti indeks değeri dayanıklı Giza 45 ile tolerant Carmen çeşitlerinde saptanırken, yaprak döken patotipte en düşük hastalık şiddeti indeks değeri dayanıklı Giza 45 çeşidinde saptanmıştır. En yüksek hastalık şiddeti indeks değeri ise her iki patotipte duyarlı Acala SJ2 çeşidinde saptanmıştır (Tablo 4.2).

Yapılan literatür taramalarında PEE'nin *V. dahliae*'ya karşı *in-vivo* koşullarda etkinliğini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte PEE'nin diğer fitopatojen funguslara ve fitopatojen bakterilere karşı *in-vivo* etkinliğinin saptandığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. La Torre ve diğ. (1990), çilekte EEP uygulamasının *in-vivo* koşullarda *Botrytis cinerea*'nın neden olduğu kurşuni küf hastalığının çıkışı ve gelişimi üzerine fungistatik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ethanol propolis ekstraktının (EEP) farklı konsantrasyonlarının (10, 50 ve 100 mg/ml) turunçgillerde depo hastalık etmeni *Penicillium digitatum*'a karşı etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, *in-vivo*'da % 70'lik etanol içinde hazırlanan EEP'in kullanılan tüm dozları yapay olarak hastalık bulaştırılmış meyvelerde hastalık çıkışını engellemezken, EEP'in 100 mg/ml konsantrasyonda doğal hastalık çıkışını %100 oranında engellediği belirtilmiştir (Soylu ve diğ. 2008). El-Badawy ve diğ. (2012), yaptıkları başka bir çalışmada, portakal meyvelerinin % 3'lük propolis ekstraktına bandırılması *Penicillium spp.*'nin sebep olduğu çürüklüğü tamamen engellediğini ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada Irak orjinli propolis etanol ekstraktının % 3'lük dozunun portakalda *P. digitatum*'un neden olduğu çürüklüğü oda sıcaklığında üç hafta süreyle engellediğini rapor etmişlerdir (Matny 2015). Abo-Elyousr ve diğ. (2017), Mısır'ın farklı bölgesinden elde ettikleri propolisi su içinde ekstrakte ettikten sonra domates bakteriyel solgunluk etmeni *Ralstonia solanacearum*'a karşı *in-vivo* koşullarda antibakteriyel etkinliklerini araştırdıkları çalışmada, sulu ekstraktın 1, 10 ve 100 mg/mL konsantrasyonlarda antibakteriyel etkinlik gösterdiğini, 100 mg/mL konsantrasyonda sulu ekstraktın *in-vivo* etkinliğinin diğer iki konsantrasyona göre daha yüksek etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Yürütülen başka bir çalışmada Tokat ve Ankara'dan temin edilen propolis örneklerinin PEE % 1, 3 ve 5'lik dozları *M. fructigena*'ya karşı uygulanmış ve *in-*

vivo testlemelerde % 3 ve % 5'lik dozda meyve yüzeyinde patojen gelişimi % 100 oranında engellenmiştir (Özyiğit ve diğ. 2017a). Özyiğit ve diğ. (2017b), depo koşullarında turuncgillerde problem olan *P. digitatum*'a karşı Tokat ve Ankara'dan temin edilen propolislerin etanol ekstraktını kullandıkları çalışmada, *in-vivo* koşullarda Tokat PEE patojen gelişimini % 1'lik dozda, % 28; % 3 ve % 5'lik dozlarda ise % 100 engellerken, Ankara PEE tüm dozlarda patojeni % 100 engellemiştir.

Çalışmada kullanılan propolisin fenolojik bileşikler, toplam antioksidan kapasitesi (Tablo 4.4) ve toplam flavanoid madde miktarı (Tablo 4.5) analiz sonuçlarına göre propolis örneklerinin fenolik bileşikler bakımından zengin, toplam antioksidan kapasitesinin yüksek ve toplam flavonoid madde miktarının etkin olduğu belirlenmiştir. Keskin ve Kolaylı (2018), Anadolu propolislerinin ham hali için toplam fenolik madde miktarının 16,13-178,34 mg GAE/g arasında değiştiğini bildirmiştir. Özdal ve diğ. (2019), tarafından yapılan bir çalışmada, Anadolu'nun farklı bölgelerinden toplanmış propolisler için toplam fenolik madde miktarının 2748 mg GAE/100 g ile 19969 mg GAE/100 g arasında değiştiği bildirilmiştir. Çalışmada elde edilen bulguların literatürle uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Elde edilen bulgular, yüksek antioksidan aktiviteye de sahip örneklerin, toplam fenolik madde miktarlarında yüksek olduğu sonucunu bildirmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmektedir (Keskin ve Kolaylı 2018). Propolisin bileşiminde bulunan fenolikler; flavonoid aromatik asitler, anti-fungal özellikleri nedeni ile PEE, seçilen bitki patojeni funguslara karşı engelleyici bir etki göstermiştir (Bancova ve diğ. 2000).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

-Pamuk ekimi yapılan alanlarda *Verticillium dahliae*'nın sebep olduğu solgunluk hastalığına karşı PEE'nin alternatif mücadele kapsamında kullanımına yönelik olan *in-vitro* ve saksı denemeleri ile desteklenen bu çalışma ile hastalığını mücadelesinde ümit var sonuçlar elde edilmiştir.

-Saksı denemesinde tohuma PEE uygulaması ekonomik bir ilaçlı mücadelesi olmayan *Verticillium* solgunluk hastalığı etmeninin yaprak dökme ve yaprak dökken patotiplerini baskı altına aldığını göstermiştir. Hastalık şiddeti indeks değerlerine göre PEE öncelikle dayanıklı Giza 45 çeşidinde daha sonra tolerant Carmen çeşidinde *V. dahliae*'nin her iki patotipine karşı başarılı bulunmuştur. Bu bağlamda *Verticillium* solgunluğu hastalığı ile mücadelede dayanıklı çeşit propolis kombinasyonu entegre mücadele kapsamında destekleyici mücadelenin en iyi alternatiflerden biri olabileceğini göstermiştir. Ancak PEE'nin pamuk çeşitlerinde kolonizasyonu, tarla şartlarında *Verticillium* solgunluğuna ve verim ile kalite özelliklerinin belirlenmesi konularında ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

-Bu çalışma, ülkemizde tohuma propolis uygulaması yapılarak saksı koşullarında PEE'nin *Verticillium* solgunluğuna etkilerinin belirlendiği ilk araştırmadır. Basit laboratuvar imkanlarıyla yürütülen tohum kaplama çalışmaları ticari olarak hem etkili hem de kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Bu bağlamda çalışmadan elde edilen sonuçlar bundan sonra yapılacak olan alternatif mücadele çalışmalarına yön verecektir.

-Çalışmada kullanılan propolisin yapılan analiz sonuçları fenolik bileşikler bakımından zengin, toplam antioksidan kapasitesinin yüksek ve toplam flavonoid madde miktarının etkin olduğunu göstermiştir. Ancak propolis ekstraktının etki mekanizmalarına yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu amaçla etkili bulunan PEE'nin etki mekanizmaları ve bitki gelişimini teşvik edici etkilerinin belirlenmesine yönelik daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

-Gübre sınıfı, gübre dozu, sulama yöntemleri, sulama sıklığı ve ekim normu gibi kültürel uygulamalar ile *Verticillium* solgunluğu etmeni arasında direkt bir ilişki bulunmaktadır. Entegre mücadele kapsamında çalışma sonucunda ümit var bulduğumuz PEE'nin yukarıda bahsedilen konular ile kombine edilerek daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

-*Verticillium dahliae* etmeni ülkemizde pamuğun dışında özellikle zeytin yetiştiriciliğinde tahripkâr boyutlarda yaygınlık göstermektedir. Bu nedenle mücadelesi zor olan bu hastalığa karşı propolis uygulamasından tarla koşullarında

ümit var sonuçların alınması hastalıkla mücadele ve verim kayıpları açısından hem ülke ekonomisine hem de üreticilerimize önemli katkılar sağlayacaktır. Günümüzde *Verticillium* solgunluğu hastalığına karşı etkin ve ekonomik bir kimyasal mücadele imkânı bulunmadığından çalışmada ümit var bulunan PEE sonraki dönemlerde hastalıkla entegre mücadelede katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

Abo-Elyousr, K.A.M., Seleim, M.E.A, El-Sharkawy, R.M., and Bagy, H.M.M.K., “Effectiveness of Egyptian propolis on control of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*”, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124, 467-472, (2017).

Abo-Elyousr, K.A.M., Al-Qurashi, A.D., and Almasoudi, N.M., “Evaluation of the synergy between *Schwanniomyces vanrijiae* and propolis in the control of *Penicillium digitatum* on lemons”, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 66, (2021).

Anonim FAO & ICAC Measuring Sustainability in Cotton Farming Systems Towards a Guidance Framework, ICAC Report: III-V. Expert Panel on Social, Environmental and Economic Performance of Cotton Production with the FAO Plant Production and Protection Division. Rome, 1-107, (2015).

Aydogdu, M.H., Karli, B., Parlakci Dogan, H., Sevinc, G., Eren, M. E. and Kucuk, N., “Economic analysis of agricultural water usage efficiency in the GAP-Harran plain: Cotton production sampling”, *International Journal of Advances in Agriculture Sciences*, 3, 12, 12-19, (2018).

Bancova, V., and Marcucci, M.C., ”Standardization of propolis: Present status and perspectives”, *Bee World*, 81, 182-188, (2000).

Bancova, V.S., De Castro, S.L., and Marcucci, M.C., “Propolis: recent advances in chemistry and plant origin”, *Apidologie*, 31, 1, 3–15, (2000).

Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., and Kadota, S., “Antiproliferative activity of the Netherlands Propolis and its active principles in cancer cell lines”, *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 67-73, (2002).

Benzie, J.F., F., and Strain, J.J.,”Ferric reducing/antioxidant power assay: directmeasure of total antioxidant activity of biological fluids and modifiedversion for simultaneous measurement of total antioxidant power andascorbic acid concentration", *Methods in Enzymology*, 299, 15-27, (1999).

Bogdanov, S., “Honey as nutrient and functional food”, *Proteins*, 1100, 1400-2700, (2012).

Bölek, Y., Bell, A.A., El-Zik, K.M., Thaxton, P.M. and Magill, C.W. “Reaction of cotton cultivars and a F2 population to stem inoculation with isolates *Verticillium dahliae*”. *Journal of Phytopathology*, 153, 269-273, (2005).

Bölek, Y., Tekerek, H., Hayat, K., and Bardak, A., "Screening of cotton genotypes for protein content, Oil and fatty acid composition". *Journal of Agricultural Science*, 8, 5, 107-121, (2016).

Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R., Mitchell, K.A., and Da Cunha, A.P., "Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 742-745, (2003).

Celemlı OG., Hatjına F., Charistos L.," More insight into the chemical composition of greek propolis; differences and simularities with turkish propolis", *Zeitschrift Für Naturforschung C* 68, 11-12,(2013).

Chee, H.Y., "In vitro evaluation of the antifungal activity of propolis extract on *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*", *Mycobiology*, 30, 93-95, (2002).

Cizmarik, J., and Trupl, J., "Effect of propolis on bacteria", *Pharimazie*, 31, 9, 656-657, (1976).

Corato, U., Piscioneri, I. Palazzo, S., and Orlandini, S., "The wilting of cotton by *Verticillium dahliae* in Basilicata", *Journal Petria*, 10, 2, 77-84, (2000).

Crane, E., "Bee and beekeeping Science", *Practice and World Resources, International Bee Research Association*, London, U. K.,18, (1990).

Curifuta, M., Vidal, J., Sanchez-Venegas, J., Contreras, A., Salazar, L.A., and Alvear, M.," The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance", *Ciencia E Investigacion Agraria*, 39, 347-359, (2012).

Çakar, G., Sivrikaya, I.S., Karakaya, E., and Güller, A., "Inhibition effect of different propolis extracts against *Fusarium solani* in vitro". *European Journal of Science and Technology*, 35, 82-88, (2022).

Çakıroğlu, T.N., "Çeşitli çözücülerde Türk propolisinin çözünlüğünün incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon, (2010).

Çelik, I., Soysal, M., İnan, O., ve Çetinkaya, M., "Antalya bölgesinde pamuk solgunluk hastalığı (*Verticillium dahliae*) surveyi", *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 27, 1, 18- 32, (2010).

Deans, S.G., and Soboda, K.P., "The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil", *Flavour and Fragrance Journal*, 5, 187-190, (1990).

DeVay, J.E., "Physiological and biochemical mechanisms in host resistance and susceptibility to wilt pathogens", (eds:Tjamos. and C. H. Beckman), *Vascular Wilt Diseases of Plants Springer-Verlag*, Berlin: Springer-Verlag, 590, (1989).

Doğan, N., ve Hayoğlu, İ., "Propolis ve kullanım alanları", *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16, 3, 39-48, (2012).

Dolar, S., "Akdeniz bölgesi pamuklarında görülen solgunluk hastalığı (*V. dahliae* Kleb.)'na karşı bazı pamuk çeşitlerinin duyarlılıklarının saptanması üzerinde çalışmalar", *Bitki Koruma Bülteni*, 24, 148-158, (1984).

Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.H., "Compendium of soil fungi", *Academic Press*, 1, 859, (1980).

Donadieu, Y., "La propolis", *Editions Maloine*, Paris, (1979).

El-Badawy, H.E., Baiea, M.H., and Eman, A.A. "Efficacy of propolis and wax coatings in improving fruit quality of Washington navel orange under cold storage", *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 8, 420-428, (2012).

El-Zik, K.M., "Integrated control of *Verticillium* wilt of cotton". *Plant Disease*, 1025-1032, (1985).

Erdem, G.B., "Propolisin dış çürüklüğü oluşumuna etkisinin sıçan dişlerinde araştırılması", *Teknik Arıcılık*, 77, 27-28, (2002).

Erdoğan, O., "Bazı pamuk çeşit adaylarının *Verticillium* solgunluk hastalığı etmeni (*Verticillium dahliae* Kleb.)'ne karşı duyarlılıklarının belirlenmesi", *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6, 2 , 9-16, (2009).

Erdoğan, O., Bolek, Y., Dünder, H., Bardak., A., "Screening of cotton genotypes for resistance To *Verticillium dahliae* Kleb. under greenhouse and field conditions", *Romanian Agricultural Research*, 32, 53-61, (2005).

Erdoğan, O., Kurt, Ş., ve Göre, M.E., "Pamukta *Verticillium* solgunluk hastalığı etmeni *Verticillium dahliae* Kleb. İle farklı inokulasyon metotları üzerinde çalışmalar", *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1, 2, 188-193, (2014).

Erdoğan, O., ve Dünder, H., "Bazı pamuk çeşitlerinin *Verticillium* solgunluk hastalığı etmenine (*Verticillium dahliae* Kleb.)'ne karşı duyarlılıklarının belirlenmesi", *Türkiye II.Bitki Koruma Kongresi*, 27-29 Ağustos 2007, s. 93, Isparta, (2007).

Esentepe, M., "Adana ve Antalya illerinde pamuklarda görülen solgunluk hastalığının etmeni, yayılışı, kesafeti ve zarar derecesi ile ekolojisi üzerinde

araştırmalar”, *İzmir Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Araştırma Eserleri Serisi*, 3245, (1979).

Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., and Rossman, A.Y. “*Fungi on plants and plant products in the united states*” APS Press, St. Paul, MN, 1252, (1989).

Fukumoto, L.R., and Mazza G., “Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds”, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48, 3597-3604, (2000).

Garber, R.H., and Houston, B.R.,” Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in the cotton plant”, *Phytopathology*, 56, 1121-1126, (1966).

Ghisalberti, E. L., “Propolis: A review”, *Bee World*, 60, 59-84, (1979).

Göre, M.E., Esen, H., Orak, A., Gozcu, D., Altın, N., and Erdogan, O., “Pathotype groups within *Verticillium dahliae* isolates from cotton in Turkey”, *Anadolu Journal of AARI*, 17,1, 16-42, (2007).

Guitchounts, A., “China will import less cotton In 2014/15”, *Cotton: Review of the World Situation International Cotton Advisory Committee*. 67,6, 3-4. July-August, (2014).

Güldür, M. E., ve Çopur, O., “Pamuk solgunluk hastalığı etmeni (*V. dahliae* Kleb.)'ne karşı bazı pamuk çeşitlerinin bulaşıklık oranlarının belirlenmesi”, *GAP II. Tarım Kongresi*, 24-26 Ekim 2001, 219-224, Şanlıurfa, (2001).

Harris, D.C., “An introduction to *Verticillium* wilts, (eds: J. A., Hiemstra and D. C., Harris) *A Compendium of Verticillium Wilts in Tree Species*”, The Netherlands: Ponsen &Looijen, Wageningen, 80, (1998).

Hegazi, A.G., “Propolis an overview”, *Congreso Internacional de Propóleos*, Buenos Aires 1-2nd, September 2000, (1998).

Hui-Fang, B.S., “Development of molecular markers and mapping of quantitative trait loci for resistance to *Verticillium* wilt disease using two inbred line populations in tetraploid cotton” Doctor of Philosophy, *New Mexico State University Las Cruces*, New Mexico, (2013).

Isaac, I., “Speciation in *Verticillium*”, *Annual Review of Phytopathology*, 201-222, (1967).

İyriboz, N., “Cotton Diseases”, *Turkish Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, Publ. No. 237, Marifet Press, Izmir, Turkey, (1941).

Jian, G.L., Ma, C., Zheng, C.L., and Zou, Y.F., “Advances in cotton breeding for resistance to *Fusarium* and *Verticillium* wilt in the last fifty years in China”, *Agricultural Sciences in China*, 3, 280-288, (2003).

Karaca, I., Karcılıoğlu, A., ve Ceylan, S., “Wilt disease of cotton in the Ege region of Turkey”, *The Journal of Turkish Phytopathology*, 1, 4–11, (1971).

Karaca, İ., *Sistemik bitki hastalıkları*, 4, Bornova: Ege Üniversitesi Matbaası, 272, (1974).

Karakaş, S., ”Türk propolisinin ticari bitkisel yağlarda çözünürlüğünün incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Trabzon, 71, (2012).

Karman, M., “*Bitki koruma araştırmalarında genel bilgiler, denemelerin kuruluşu ve değerlendirme esasları*”, T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları Mesleki Kitaplar Serisi, 279, (1971).

Katırcıoğlu, H., and Mercan, N., “Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region”, *African Journal of Biotechnology*, 5, 1151-1153, (2006).

Keskin, M., ve Kolaylı S., “Standardization of propolis, is it possible?” *Uludağ Bee Journal*, 18, 2, 101-110, (2018).

Koral, A.Ö., ve Türkteş, M., “Patlıcanda *Fusarium* solgunluğuna dayanıklılık ve mücadele çalışmaları”, *Çukurova Journal of Agricultural and Food Science*, 33, 1, 111-124, (2018).

Korkmaz, H.Y.,” Pamuk solgunluk hastalığı etmeni *Verticillium dahliae* Kleb. izolatlarının morfolojik ve patolojik özellikleri ve bazı pamuk çeşitlerinin hastalığa tepkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kahramanmaraş, (2005).

Krell, R., “Value-added products from beekeeping”, *FAO Agricultural Services Bulletin*, 124: 87–113, (1996).

Kumazawa, S., “Studies of the constituents of Uruguay propolis”, *Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4777- 4782, (1994).

Kumova, U., “Önemli bir arı ürünü: Propolis”, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 02(2),10-24. Retrieved from (2002).

Kurt, Ş., ve Şahinler, N., “Propolis ekstraktının bitki patojeni funguslara antifungal aktivitesi”, *Uludağ Arıcılık Dergisi*. 3, 3, 35-37. (2003).

Kurt, S., Dervis S., ve Sahinler S., “Sensitivity of *Verticillium dahliae* to prochloraz and prochloraz–manganese complex and control of *Verticillium* wilt of cotton in the field”, *Crop Protection*, 22, 51–55, (2003).

Kutluca, S., Genç, F., ve Korkmaz, A., “Propolis”, *Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayın Şubesi*, Samsun, 52, (2008).

Küçük, N., “Pamuğun dünyası, küresel aktörler ve politikalar”, *ASSAM Uluslararası Hakemli Dergi*, 2, 4, 60-85, (2015).

Küçük, U.N., ve Issı, S., “Pamuk üretiminin stratejik önemi üzerine genel bir değerlendirme”, *TURAN: Stratejik Arastirmalar Merkezi*, 11, 44, 391-398, (2019).

Land, C.J., Lawrence, K.S., Burmester, C.H., and Meyer, B., “Cultivar irrigation and soil contribution to the enhancement of *Verticillium* wilt disease in cotton”, *Crop Protection*, 96, 1-6, (2017).

Laskar, R.A., Sk, I., Roy, N., and Begum, N.A., “An-tioxidant activity of Indian propolis and its chemi-cal constituents”, *Food Chemistry*, 122, 1, 233-237, (2010).

La Torre, A., Imbroglini, G., and Guccione, M., “Action of Propolis based preparations against *Botrytis cinerea* Pers. of strawberry *first observation*”, *Agriculture*, 6, 169-177, (1990).

Lawrence, K., Hagan, A., Olsen, M., Faske, T., Hutmacher, R., Mueller, J., Wright, D., Kemerait, R., Overstreet, C., Price, P., Lawrence, G., Allen, T., Atwell, S., Thomas, S., Goldberg, N., Edmisten, K., Bowman, R., Young, H., Woodward, J., and Mehl, H., “Cotton disease loss estimate committee report”, 2015. *Proceedings of the 2016 Beltwide Cotton Conference*, 20-23 June, Memphis, United States, 1, 113-115, (2016).

Lejeune, B., Pourrat, A., and Dehmouche, H.,” Propolis utilisation en dermocosmetologie. parfums”, *Cosmetiques, Aromes*, 8, 2, 73-77, (1988).

Lindenfelser, L.A., “Antimicrobial activity of propolis”, *American Bee Journal and Food* , 107, 3,90-92, 130-131, (1967).

Lisa, M., Leifertova, I., and Baloun, J., “Fungistatic effect of propolis”, *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* , 13, 29-44, (1989).

Marcucci, M.C., “Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity”, *Apidologie*, 26, 83-99, (1995).

Matny, O.N., “Efficacy evaluation of Iraqi propolis against gray mold of stored orange caused by *penicillium digitatum*”, *Plant Pathology Journal*, 14, 3, 153-157, (2015).

Melouk, H.A., “*Verticillium* methods for research on soil borne” *Phytopathogenic Fungi*, 265, (1992).

Mert, M., Kurt, S., Gencer, O., Akiscan, Y., Boyaci, K., and Tok, F.M., “Inheritance of resistance to *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae*) in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)”, *Plant Breeding*, 124, 102–104, (2005).

Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., and Vattuone, M.A., “Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina” *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 109-114, (2000).

Münstedt, K., and Zygmunt M., “Propolis-current and future medical uses”, *American Bee Journal*, 141, 7, 507-510, (2001).

Nemli, T.,” Pamuk hastalıkları ve savaşım yöntemleri”, *Pamukta Eğitim Semineri*, 14-17 Ekim, İzmir, 103-111, (2003).

Oruç HH., Sorucu A, Ünal HH., “Effects of season and altitude on biological active certain phenolic compounds levels and partial standardization of propolis”, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 64, 13-20,(2017).

Oruç, H.H, Çaycı, M.,Sorucu, A.,Uzabacı, E., and Ramadhan, N., “Characterization of commercially available propolis products in Turkey based on individual phenolic compounds”, *Journal of Apicultural Research*, 60, 3, 1-8,(2021).

Ozdal, T., Sari-Kaplan, G., Mutlu-Altundag, E., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E., “Evaluation of Turkish propolis for its chemical composition, antioxidant capacity, anti-proliferative effect on several human breast cancer cell lines and proliferative effect on fibroblasts and mouse mesenchymal stem cell line”, *Journal of Apicultural Research*, 57(5), 627-638,(2018).

Ozdal, T., Ceylan, FD., Eroglu, N., Kaplan, M., and Olgun, EO., and Capanoglu, E.,” Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis”, *Food Research International*, 122, 528–536, (2019).

Özan, F., “Propolis’in kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi”, Doktora Tezi, *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Sivas, (2006).

Özyiğit, Ç., Yanar, Y., Yanar, D., ve Onaran, A., “Ayvada kahverengi çürüklük (*Monilinia fructigene* Honey in Whetzel) hastalığının propolis ethanol ekstraktı ile

kontrolü”, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35, 108-113, (2017a).

Özyiğit, Ç., Yanar, Y., Yanar, D., ve Arslan, S., “*In-vitro* and *in-vivo* antifungal activity of propolis extract against *Penicillium digitatum*”, Ecology Symposium, 11-13 May 2017, Kayseri, (2017 b)

Pietta, P.G., Gardana, C. ve Pietta, A.M., “Analytical methods for quality control of propolis”, *Fitoterapia*, 73, 7-20, (2002).

Rowe, R., C., and Powelson, M., L.,” Potato early dying: management challenges in a changing production environment”, *Plant Disease*, 86, 1184-1193, (2002).

Sağır, A., Tatlı, F. ve Gürkan, B., “Güneydoğu anadolu bölgesinde pamuk ekim alanlarında görülen hastalıklar üzerine çalışmalar”, *GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu*, Şanlıurfa, 257-269, (1992).

Sağır, A., ve Tatlı, F., “Pamuk solgunluk hastalığı etmeni (*Verticillium dahliae* Kleb.)’ne karşı pamuk çeşitlerinin duyarlılıklarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar”, 7. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 26-29 Eylül 1995, Ankara, (1995).

Sarıkaya, A.O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tuncel, M., and Kolaylı, S., “Antioxidant activity and phenolic acid content of chestnut honey and propolis”, *Journal of Food Biochemistry*, 33, 471- 481, (2009).

Schnathorst, W.C., and Mathe, D.E., “Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton”, *Phytopathology*, 56, 1155-1161, (1966).

Schnathorst, W.C., “Life cycle and epidemiology of *Verticillium*, fungal wilt diseases of plants”, New York: Academic Press, 81-111, (1981).

Sezgin, E., “Pamuk solgunluk hastalığı ile savaşımında kültürel işlemlerin önemi”, *Yıllık* 3, 3, 23-31, İzmir, (1985).

Sezgin, E., Karcılıoğlu, A., ve Esentepe, M., ”Üre gübrelemesi ile pamuklarda *verticillium* solgunluğunu önleme imkanları üzerinde araştırmalar”, *Doğa Bilimleri Dergisi*, 29, 359-366, (1985).

Shehu, A., Rohin, M. K., Aziz, A., and Ismail, S., ”Antifungal, characteristic properties and composition of bee glue (propolis)”, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7, 1992-1996, (2015).

Silici, S., and Kutluca, S., “Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region”, *In Journal of Ethnopharmacology*, 99,1, 69–73, (2005).

Silici, S.," Propolisin bazı antimikrobiyal ve farmakolojik aktiviteleri üzerine bir araştırma", *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı*, Adana, (2003).

Slinkard, K., and Singleton, V.L., "Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods", *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 1, 49-55, (1977).

Soylu, E.M., Özdemir, A.E., Ertürk, E., Şahinler, N. and Soylu, S., "Antifungal activity of propolis against postharvest disease agent *Penicillium digitatum*", *Asian Journal of Chemistry*, 20, 4823-4830, (2008).

Temiz, A., Mumcu, A.Ş., Tüylü, A.Ö., Sorkun, K., and Salih, B.," Antifungal activity of propolis samples collected from different geographical regions of Turkey against two food-related molds, *Aspergillus versicolor* and *Penicillium aurantiogriseum*", *Gıda*, 38, 3, 135-142, (2013).

Tokel, D., "Dünya pamuk tarımı ve ekonomiye katkısı", *Manas Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 10, 2,1022-1037, (2021).

Tripathi, P., Dubey, N.K., Banerji, R., and Chansouria, J.P.N., "Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits", *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 20, 317-321, (2004).

Tsrör, L., Hazanovsky, S., Mordechi-Lebish, S., and Simon, S., "Aggressiveness of *Verticillium dahliae* isolates from different vegetative compatibility groups to potato and tomato", *Plant Pathology*, 50, 477-482, (2001).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2021. "Tarımsal Yapı ve Üretim", <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi: 30 Nisan 2022)

Van Alfen, N.K. "Reassessment of plant wilt toxins. Annual rev", *Phytopathology*, 27, 533-550, (1989).

Watkins, G.M., "Compendium of cotton diseases", *The American Phytopathology Society*, 41-44, (1981).

Yanar, Y., Belgüzar, S., Yanar, D., Öksüz, A., ve Özyiğit, Ç.," Farklı bölgelere ait propolis ekstraktlarının antifungal etkileri", *Uluslararası Katılımlı VI. Bitki Koruma Kongresi*, 5-8 Eylül, 2016, Konya, (2016).

Yanar, Y., Yanar, D., and Arslan, S. "Antifungal activity of turkish propolis against *Phytophthora* species", *Plant Pathology Journal*, 4, 58-60, (2005).

Yanar, Y., Yanar, D., Onaran, A., ve Yazıcı, S.,” Propolis ekstraktının antifungal etkisinin belirlenmesi”, *Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi*, 27-29 Mayıs, 2007, Isparta, (2007).

Yücel, B., Topal, E., Akçiçek, E., ve Köseoğlu, M., “Propolisin insan sağlığına etkisi”, *Anadolu Journal of Agean Agriculture Reserarch Institute*, 24, 2, 41-49, (2014).

Zhang, W., Zhang, H., Liu, K., Jian, G., Qi, F., and Sin, N.“ Large scale identification of *Gossypium hirsutum* genes associated with *Verticillium dahliae* by comparative transcriptomatic and reverse genetics analysis” *PLoS ONE* 12, 8, e0181609, (2017).

EKLER

8. EKLER

Ek A. PEE'nın Yaprak Dökmeyen Patotipi (PHCVd3 izolatu)'ne Anti-fungal Etkisi ve Varyans Analizi

Tablo A. 1: PEE'nın yaprak dökmeyen patotipi (PHCVd3 izolatu)'ne anti-fungal etkisi ve varyans analiz tablosu

PEE Konsantrasyonu (ppm/mL)	PHCVd3 izolatu misel gelişimi (yaprak dökmeyen patotip)			
	I. Tek. (mm)	II. Tek. (mm)	III. Tek. (mm)	Ortalama
0,003	16,50	16,00	16,00	16,20
0,06	15,00	15,00	15,25	15,10
0,125	12,00	11,75	10,75	11,50
0,25	9,00	9,00	9,00	9,00
0,5	7,75	7,50	7,50	7,60
1	5,00	5,00	4,75	4,90
Kontrol	20,00	19,50	20,00	19,80

Kaynak	SD	Hata Kareler Toplamı	Hata Ortalaması	F Değeri	Prob > F
Doz (ppm/ml)	6	501,47619	62,7232	979,6279	<0001
Hata	12	1,02381	0,0853		
Genel	18	502,80952			
CV	2,43				

Ek B. PEE'nın Yaprak Döken Patotipi (PHCVd47 izolatu)'ne Anti-fungal Etkisi ve Varyans Analizi

Tablo B. 1: PEE'nın yaprak döken patotipi (PHCVd47 izolatu)'ne anti-fungal etkisi ve varyans analiz tablosu

PEE Konsantrasyonu (ppm/mL)	PHCVd47 izolatu misel gelişimi (yaprak döken patotip)			
	I. Tek. (mm)	II. Tek. (mm)	III. Tek. (mm)	Ortalama
0,003	17,50	17,00	17,25	17,30
0,06	15,00	15,50	15,00	15,20
0,125	12,00	12,00	11,00	11,70
0,25	9,50	9,00	9,00	9,20
0,5	8,00	7,75	7,50	7,80
1	5,50	5,00	4,75	5,10
Kontrol	19,80	20,20	19,70	19,90

Kaynak	SD	Hata Kareler Toplamı	Hata Ortalaması	F Değeri	Prob > F
Doz (ppm/ml)	6	519,67905	519,67905	1061,859	<0001
Hata	12	0,97881	0,0816		
Genel	18	521,37238			
CV	2,32				

**Ek C. Saksı Denemesinde PEE'nın Yaprak Dökmeyen Patotipinde
(PHCVd3 izolatu) Yüzde Hastalık Şiddeti İndeks Değerleri ve Varyans
Analizi**

Tablo C. 1: Saksı denemesinde PEE'nın yaprak dökmeyen patotipinde (PHCVd3 izolatu) yüzde hastalık şiddeti indeks değerleri ve varyans analiz tablosu

Çeşit	PHCVd3 izolatu Hastalık Şiddeti					Ortalama
	I. Tek.	II. Tek.	III. Tek.	IV. Tek.	V. Tek.	
Giza 45 (Dayanıklı)	1,00	1,20	1,00	2,50	1,00	1,34
Carmen (Tolerant)	1,20	1,40	1,50	2,00	3,00	1,82
Acala SJ2 (Duyarlı)	5,00	3,50	3,50	3,50	3,50	3,80

Kaynak	SD	Hata Kareler Toplamı	Hata Ortalaması	F değeri	Prob > F
Çeşit	2	18,034667	3,00578	14,8853	0,002
Hata	8	4,569333	0,57117		
Genel	10	22,604			
CV	3,25				

**Ek D. Saksı Denemesinde PEE'nın Yaprak Döken Patotipinde
(PHCVd47 izolati) Yüzde Hastalık Şiddeti İndeks Değerleri ve
Varyans Analizi**

Tablo D. 1: Saksı denemesinde PEE'nın yaprak döken patotipinde (PHCVd47 izolati) yüzde hastalık şiddeti indeks değerleri ve varyans analiz tablosu

Çeşit	PHCVd47 izolati Hastalık Şiddeti					Ortalama
	I. Tek.	II. Tek.	III. Tek.	IV. Tek.	V. Tek.	
Giza 45 (Dayanıklı)	1,00	1,00	2,80	1,00	2,40	1,64
Carmen (Tolerant)	2,00	2,00	1,60	3,00	3,00	2,32
Acala SJ2 (Duyarlı)	5,00	5,00	4,50	2,00	3,00	3,90

Kaynak	SD	Hata Kareler Toplamı	Hata Kareler Ortalaması	F değeri	Prob > F
Çeşit	2	15,068	2,51133	5,1827	0,036
Hata	8	10,376	1,297		
Genel	10	25,444			
CV	4,34				