

Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı *in vitro* koşullarda farklı bitkilerin uçucu yağlarının etkisi

Cansu ÖKSEL¹ Mustafa MİRİK¹

ABSTRACT

Effect of essential oil against bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in *in vitro* conditions

The antibacterial effect of essential oils of thyme (*Thymus vulgaris*), bergamot (*Citrus bergamia*), garlic (*Allium sativum*), french lavender (*Lavandula stoechas*) clove (*Caryophyllus aromaticum*), eucalyptus (*Eucalyptus globus*) against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* were investigated. When essential oils were applied by dropping on absorbent paper disks and mixing with bacterial suspension thyme, bergamot, garlic, french lavender, clove, eucalyptus essential oils have been found effective more than others. It is detected that as the dose of essential oils increased, the antibacterial effect increased. Bacterial population did not change after 24 h growth in different treatment of essential oils at different times, but relative decrease in bacterial population at 0, 1, 3, and 6 h growing were observed. Especially, thyme essential oil showed the highest antibacterial effect, in all of the applications in different doses. Thyme was the most effective essential oil. Bergamot, lavender and eucalyptus essential oils followed the thyme essential oil, respectively.

Keywords: Essential oil, olive knot disease, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, antibacterial, thyme

ÖZ

Bu çalışmada bitki uçucu yağlarının farklı uygulama, doz ve sürelerde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Diske uygulama ve süspansiyona karıştırma yöntemleri uygulandığında kekik (*Thymus vulgaris*), bergamot (*Citrus bergamia*), sarımsak (*Allium sativum*), karabaş, (*Lavandula stoechas*), karanfil (*Caryophyllus aromaticum*) ve okaliptüs (*Eucalyptus globus*) uçucu yağları diğerlerine göre daha etkili olurken, besi yerine uçucu yağların eklenmesi uygulaması etkisiz bulunmuştur.

¹Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Tekirdağ
Sorumlu Yazar (Corresponding autor) e-mail: coksel@nku.edu.tr
Alınış (Received): 26.09.2014, Kabul Ediliş (Accepted): 11.11.2015

Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı in vitro koşullarda farklı bitkilerin uçucu yağlarının etkisi

Uçucu yağ dozu arttırıldıkça antibakteriyel etkinin de arttığı tespit edilmiştir. Farklı sürelerde uygulanan uçucu yağların tamamında 24 saat sonra yapılan ekimlerde bakteri popülasyonunda değişiklik olmazken, 0, 1, 3 ve 6 saat sonra yapılan ekimlerde bakteri popülasyonunda önemli derecede azalma gözlenmiştir. Bütün uygulamalar sonucunda, besi yerinde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye kekik uçucu yağının antibakteriyel etkisinin en yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Kekik uçucu yağı yanında bergamot, karabaş ve okaliptüs uçucu yağları da patojene etkili olmuştur.

Anahtar kelimeler: Uçucu yağ, zeytin dal kanseri, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, antibakteriyel, kekik

GİRİŞ

Zeytin (*Olea europea* L.) ağacı, zeytingiller (Oleaceae) familyasından, meyvesi yenen, yaklaşık 2000 yıl kadar yaşayabilen, kutsal bir bitki olarak pek çok kültürde önemli bir yere sahiptir. Zeytin meyvesi yağlık ve sofralık olarak işlenebilen tarımsal bir ürün olmasının yanı sıra, zeytinyağına ve salamuraya işlenmesi nedeniyle de tarıma dayalı sanayi ve ihracatta vazgeçilmez ürünler arasında yer almaktadır (Anonim 2014).

Türkiye, coğrafik konumunun zeytin üretimi için uygun olması nedeniyle dünyada önemli zeytin üreticileri arasındadır. Gerek zeytin üretimi ve gerekse zeytinyağı üretiminde Türkiye dünyada 4. sırada yer almaktadır (TÜİK 2013).

Türkiye'de çok geniş alanlarda üretimi yapılan, iç tüketim ve ihracatımız için önemli bir yere sahip olan zeytin ağaçlarında ekonomik kayıplara neden olan birçok hastalık ve zararlı bulunmaktadır. Bakteriyel hastalıklardan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Smith 1908) Janse (1982)'nin neden olduğu zeytin dal kanseri hastalığı verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır.

Ülkemizde bu hastalığın, zeytinlerde varlığı uzun zamandır bilinmesine rağmen ilk çalışmalar Ege bölgesinde Azeri (1993), Ustun ve Aslan (2013); Aydın ve Muğla illerinde Tatlı ve Benlioğlu (2004); Batı Akdeniz Bölgesinde Basım ve Ersoy (2000); Doğu Akdeniz Bölgesinde (Mirik ve ark. 2004); Marmara Bölgesinde ise (Mirik ve ark. 2007) tarafından yapılmıştır.

Zeytin dal kanseri hastalığının etmeni *Oleaceae* ve *Apocynaceae* familyasına ait farklı bitkilerde yaprak, sürgün ve gövdede ur oluşumuna neden olur. Etmenin konukçuları olarak Zeytin (*Olea europea* L.) (Smith 1908, Young et al. 1978), Zakkum (*Nerium oleander* L.) (Wilson 1965), Yasemin (*Jasminium officinale* L.) (Janse 1981), Dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) (Janse 1981), Forzitya çalısı (*Forsythia* sp.) (Iacobellis et al. 1998), Mersin çalısı (*Myrthus communis*) (Mirik ve ark. 2006), Cılbırtı çalısı (*Fontanesia phillyreoides*) (Mirik ve ark. 2011) ve Çin ardıcı (*Loropetalum chinense*) (Conner et al. 2013) saptanmıştır.

Enfekteli ağaçların üzerinde bulunan urlarda canlılığını sürdüren ve buradan yağmur, rüzgar, böcek ve insan hareketleriyle yayılan etmen (Ramos et al. 2012)

ile mücadele etmek oldukça zordur. Hastalığın önlenmesi için mücadelesinde bitkiyi patojenden koruyacak veya yayılmasını önleyecek kültürel tedbirlerin alınması önerilmektedir. Kimyasal mücadelesinde ise farklı vejetasyon dönemlerinde Bordo Bulamacı kullanımı önerilmektedir (Anonim 2008). Ancak tavsiye edilen kültürel önlemler ile Bordo Bulamacı uygulaması hastalığın mücadelesinde yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle daha etkili çevre dostu alternatiflerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada hastalıkla mücadelede alternatif olabileceği düşünülen, 21 farklı bitki ekstraktından elde edilen uçucu yağların (Adaçayı, Anason, Aloevera, Aspir, Bergamut, Biberiye, Defne, Isırgan tohumu, Karanfil, Kantaron, Karabaş, Kekik, Kimyon, Lavanta, Melissa, Mersin, Nane, Okaliptüs, Rezene, Papatya, Sarımsak) farklı dozlarının hastalık etmeni *P. savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı *in vitro* koşullarda etkinliği belirlenmiştir.

MATERYAL VE METOT

TUBITAK TOVAG-106O196 nolu proje kapsamında izole edilen ve tanısı yapılmış olan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* 11-1 izolatu, besi yerleri, çeşitli kimyasallar, laboratuvar malzemeleri, inkübatör, etüv, otoklav, pH metre, spektrofotometre, ticari olarak alınan bitki uçucu yağları (Çizelge 1) bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

Çizelge 1. Denemede kullanılan ticari bitki uçucu yağları

Ekstrat Adı	Firması	Ekstrat Adı	Firması	Ekstrat Adı	Firması
Adaçayı (<i>Salvia</i> spp)	Mecitefendi	Isırgan tohumu (<i>Urtica dioica</i>)	Nurs Lokman Hekim	Melissa (<i>Melissa officinalis</i>)	Nurs Lokman Hekim
Anason (<i>Pinpinella anisum</i>)	Mecitefendi	Karanfil (<i>Caryophyllus aromaticum</i>)	Mecitefendi	Mersin (<i>Myrtle</i> sp.)	Mecitefendi
Aloevera (<i>Aloe vera</i>)	Destek	Kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>)	Nurs Lokman Hekim	Nane (<i>Mentha piperita</i>)	Mecitefendi
Aspir (<i>Carthamus tinctorius</i>)	Destek	Karabaş (<i>Lavandula stoechas</i>)	Mecitefendi	Okaliptüs (<i>Eucalyptus globus</i>)	Nivalis
Bergamut (<i>Citrus bergamia</i>)	Nurs Lokman Hekim	Kekik (<i>Tymus vulgaris</i>)	Destek	Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>)	Mecitefendi
Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Mecitefendi	Kimyon (<i>Carum carvi</i>)	Nurs Loman Hekim	Papatya (<i>Matricoria chamomilla</i>)	Nurs Lokman Hekim
Defne (<i>Laurus nabilis</i>)	Mecitefendi	Lavanta (<i>Lavandula officinalis</i>)	Nurs Lokman Hekim	Sarımsak (<i>Allium sativum</i>)	Nivalis

Bakteri kültürünün geliştirilmesi

Derin dondurucuda gliserol içerisinde saklanan 34 adet *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Marmara Bölgesi izolatları ve CFPB 1672 kodlu referans izolatın geliştirilmesi için King B (20 g Proteose peptone, 1.5 g K₂HPO₄, 1.5 g MgSO₄.7H₂O, 10 ml Glyserol, 15 g Agar, 1000 ml Saf su, pH= 7.2) besi yeri kullanılmıştır. Taze hazırlanan King B besi yeri içeren petrilere bakteri kültürleri çizgi ekim şeklinde aşılanmıştır. Petrilere 48 saat 25°C'de inkübe edildikten sonra krem renkli floresan koloni gelişimleri gösteren izolatlar seçilerek alınmıştır (Lelliot and Stead 1987).

Farklı uçucu yağların in vitro koşullarda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin gelişimine antimikrobiyal etkisi

Patojenin ml' deki hücre sayısının belirlenmesi

TUBİTAK TOVAG-106O196 projesi kapsamında gerçekleştirilen patojenite çalışmasında en büyük ur oluşumuna neden olan 11-1 izolatı, King B besi yerinde geliştirilen 48 saatlik izolatlar spektrofotometrede 600 nm 0.3 absorbans değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyondan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml nutrient broth bulunan tüplerde 10⁻⁶'ya kadar seyreltme serileri yapılmıştır. Her bir seyreltmeden içerisinde King B besi yeri bulunan petrilere 100 µl süspansiyon konulmuş ve bir baget yardımı ile ortam üzerine yayılmıştır. Her bir seyreltme için 3 adet petri kullanılmıştır. 25°C'de 48 saat inkübasyondan sonra petrilere gelişen koloniler sayılarak ml'deki hücre yoğunluğu hesaplanmıştır (Klement et al. 1990).

Ticari olarak temin edilen farklı bitki ekstraktlarından elde edilmiş olan uçucu yağların *P.s.* pv. *savastanoi*'nin gelişimine antimikrobiyal etkisi, (1) kağıt disk yöntemi; (2) sıvı besi yerine uçucu yağları ekleme yöntemi; (3) katı besi yerine uçucu yağları ekleme yöntemi olmak üzere üç farklı yöntemle araştırılmıştır. Uçucu yağların bu patojene etkisi araştırılırken patojenin üç farklı popülasyonu (4x10³ hücre/ml, 4x10⁴ hücre/ml ve 4x10⁵ hücre/ml) ile çalışma yürütülmüş ve bakteri popülasyonu arttıkça uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesindeki değişimler ortaya konmuştur.

Birinci yöntem: Farklı bitki ekstraktlarından elde edilmiş olan uçucu yağların *P.s.* pv. *savastanoi*'nin gelişimine antimikrobiyal etkisi kağıt disk yöntemiyle Mangama and Sreeramulu (1981) ve Mirik ve Aysan (2006)'ya göre araştırılmıştır. Çalışmada, Adaçayı (*Salvia* spp.), Anason (*Pinpinella anisum*), Aloevera (*Aloe vera*), Aspir (*Carthamus tinctorius*), Bergamut (*Citrus bergamia*), Biberiye (*Rosmarinus officinalis*), Defne (*Laurus nobilis*), Isırgan tohumu (*Urtica dioica*), Karanfil (*Caryophyllus aromaticum*), Kantaron (*Hypericum perforatum*), Karabaş (*Lavandula stoechas*), Kekik (*Tymus vulgaris*), Kimyon (*Carum carvi*), Lavanta (*Lavandula officinalis*), Melissa (*Melissa officinalis*), Mersin (*Myrtle* sp.), Nane (*Mentha piperita*), Okaliptüs (*Eucoyptus globus*), Rezene (*Foeniculum vulgare*), Papatya (*Matricoria chamomilla*), Sarımsak (*Allium sativum*) elde edilmiş 21 adet

farklı uçucu yağ kullanılmıştır. Hastalık etmeni *P.s. pv. savastanoi* izolatının 24 saatlik kültüründen 4×10^3 hücre/ml yoğunluktaki süspansiyondan 100 µl alınarak King B besi ortamı bulunan petrilere bağıt ile yayılmıştır. Petrilere 1 cm çapında birbirine eşit uzaklıkta olan üç adet steril kağıt disk yerleştirilmiştir. Kağıt diskler üzerine 20 µl uçucu yağ damlatılarak emdirilmiştir. Petrilerin kapağı parafilm ile sarıldıktan sonra petriler 25°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmış, farklı zamanlarda petri kaplarındaki bakteri gelişimi izlenmiş ve petrilere oluşan inhibisyon zonları cetvel ile ölçülerek değerler “mm” olarak kaydedilmiştir. Negatif kontrol olarak 100 µl steril su, pozitif kontrol olarak 100 µl streptomisin sülfat kağıt disklerle emdirilmiştir. Deneme 3 tekrarlı ve her tekrarda 3 kağıt disk olacak şekilde kurulmuştur. Aynı işlemler patojen bakterinin 4×10^4 ve 4×10^5 hücre/ml yoğunlukları için de yapılmıştır. Çalışma sonunda, farklı uçucu yağların *P.s. pv. savastanoi*’nin üç farklı popülasyonuna olan antimikrobiyal etkisi ortaya konmuştur.

İkinci yöntem: Sıvı besi yerine eklenen uçucu yağların *P.s. pv. savastanoi*’ye antimikrobiyal etkisi Balestra et al. (2009)’a göre araştırılmıştır. Çalışmada birinci yöntemde etkili bulunan 6 farklı bitki ekstraktından elde edilen uçucu yağ (Bergamot, Karabaş, Karanfil, Kekik, Sarımsak, Okaliptüs) kullanılmıştır. Patojenin üç farklı popülasyonu (4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml) ile uçucu yağın dört farklı (25, 50, 75 ve 100 µl) dozu çalışmada denenmiştir. *P.s. pv. savastanoi* izolatının 24 saatlik kültüründen, tüpte 9 ml’lik sıvı besi yerinde hazırlanan, 4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml yoğunluktaki süspansiyonlarına 25, 50, 75 ve 100 µl dozunda uçucu yağlar eklenmiş ve tüplerin ağzı önce pamukla sonra parafilmle kapatılmıştır. Uçucu yağ uygulamasından 0, 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra her bir uygulamadan 100 µl alınarak üç tekrar olacak şekilde petrilere yayma yöntemi kullanılarak bakteri ekimi yapılmış ve petrilere gelişen koloni sayımı yapılarak bakteri popülasyonu hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler sayısal olarak büyük değerler olduğu için \log_{10} tabanına çevrilmiştir. Deneme 3 tekrarlı olarak her tekrarda tek tüp olacak şekilde kurulmuştur. Denemede negatif kontrol olarak su, pozitif kontrol olarak streptomisin kullanılmıştır. Uygulamadan hemen sonraki (0 saat) bakteri popülasyonu ile ilerleyen saatlerdeki bakteri popülasyonu karşılaştırılarak farklı uçucu yağların sıvı kültürdeki patojen bakteriye antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır.

Üçüncü yöntem: Balestra et al. (2009)’a göre katı besi yerine eklenen uçucu yağların *P.s. pv. savastanoi*’ye antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Çalışmada birinci yöntemde etkili bulunan 6 farklı bitki ekstraktından elde edilen uçucu yağ (Bergamot, Karabaş, Karanfil, Kekik, Sarımsak, Okaliptüs) kullanılmıştır. Patojenin üç farklı popülasyonu (4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml) ile uçucu yağın dört farklı (25, 50, 75 ve 100 µl) dozu çalışmada denenmiştir. Taze hazırlanan 9 ml King B besi yeri cam tüpler içerisine konularak otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan tüpler 40°C’deki su banyosuna konularak soğuması sağlanmıştır. İlık besi yerleri steril kabinde içerisine 25, 50, 75

Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı in vitro koşullarda farklı bitkilerin uçucu yağlarının etkisi

ve 100 µl dozlarında uçucu yağlar eklenmiş ve vortekslenerek petrilere dökülmüştür. *P.s. pv. savastanoi* izolatının 24 saatlik kültüründen, 4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml yoğunluktaki süspansiyonlarından 100 µl alınarak içerisinde uçucu yağ ve King B besi yeri bulunan petrilere baget ile yayılmıştır. Daha sonra petrilerin etrafı parafilmle sarılarak inkübatöre yerleştirilmiştir. 24 saat sonra petrilere bakteri gelişimleri ve koloni sayımları yapılarak değerlendirilmiştir.

SONUÇLAR

Farklı uçucu yağların in vitro koşullarda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin gelişimine antimikrobiyal etkisi

Patojenin ml' deki hücre sayısının belirlenmesi

Spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0.3 absorbans değerinde hazırlanan bakteri süspansiyonunun 4×10^9 hücre/ml olduğu hesaplanmıştır. Yapılan ön çalışmalarda 10^9 hücre/ml'de koloni gelişimi sayılamayacak kadar yoğun olduğu için denemelerde 10^8 hücre/ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonu kullanılmıştır. Buradan seyreltme serileri hazırlanarak uçucu yağların bakteriyel etmene etkisinin saptanacağı çalışmalarda, patojenin 4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml popülasyonu kullanılmıştır.

Birinci yöntem: Farklı bitki ekstraktlarından elde edilen uçucu yağların, *P.s. pv. savastanoi*'nin üç farklı popülasyonuna (4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml) in vitro koşullardaki etkisinin kağıt disk yöntemine göre araştırıldığı çalışmada, uçucu yağ eklenen filtre kağıdının etrafında, 48 saat sonra ölçülen engelleme alanı (zon) değerlerine göre, okaliptüs, karabaş, karanfil ve kekik uçucu yağlarının etkili olduğu belirlenmiştir. Adaçayı, aloevera, anason, aspir, bergamut, biberiye, defne, ısırgan tohumu, kantaron, kimyon, lavanta, melissa, mersin, nane, papatya, rezene ve sarımsaktan elde edilen uçucu yağların *P.s. pv. savastanoi*'nin üç farklı popülasyonunun (4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml) gelişimine herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığı saptanmıştır. *P.s. pv. savastanoi*'nin en yüksek popülasyonu olarak 4×10^5 hücre/ml kullanıldığında, kekik uçucu yağı 2.40 mm engelleme alanı oluşturarak en başarılı uçucu yağ olarak saptanmış ve bunu 1.11 mm'lik engelleme alanıyla karabaş uçucu yağı izlemiştir. Patojen popülasyonu 4×10^4 hücre/ml'ye düştüğünde, antimikrobiyal etki gösteren uçucu yağ sayısı dörde çıkmış ve okaliptüs, karabaş, karanfil ile kekik uçucu yağlarında 0.32-3.60 mm arasında değişen engelleme zonları tespit edilmiştir. *P.s. pv. savastanoi*'nin 4×10^4 hücre/ml kullanıldığında, kekik uçucu yağında 3.60 mm'lik engelleme zonuyla en başarılı uçucu yağ olmuş bunu sırasıyla 1.60, 0.90 ve 0.32 mm'lik engelleme zonuyla karabaş, karanfil ve okaliptüs uçucu yağı izlemiştir. Patojen popülasyonunun 4×10^3 hücre/ml yoğunluğunda sonuçlar 4×10^4 hücre/ml popülasyonu ile benzer bulunmuştur. Aynı dört uçucu yağ daha yüksek oranda etki göstererek başarılı olmuştur. Kekik uçucu yağında 3.70, karabaş uçucu

yağında 2.60, karanfil uçucu yağında 1.30 ve okaliptüs uçucu yağında 1.00 mm'lik patojeni engelleme zonu ölçülmüştür (Çizelge 2). Negatif kontrol olarak suyun kullanıldığı petrilerde bakteri popülasyonunda herhangi bir azalmaya rastlanmamıştır. Suyun bakteri gelişimini engellemede hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür. Pozitif kontrol olan streptomisin kullanıldığında petride bakteri gelişmediği gözlenmiştir.

Çizelge 2. Farklı uçucu yağların kağıt disk yönteminde oluşturduğu inhibisyon zonları (mm)

Uçucu Yağlar	4×10^3 hücre/ml	4×10^4 hücre/ml	4×10^5 hücre/ml
Okaliptüs	1.00	0.32	0.00
Karabaş	2.60	1.60	1.11
Karanfil	1.30	0.90	0.00
Kekik	3.70	3.60	2.40
Sarımsak	0.00	0.00	0.00
Adaçayı	0.00	0.00	0.00
Anason	0.00	0.00	0.00
Aloevera	0.00	0.00	0.00
Aspir	0.00	0.00	0.00
Bergamot	0.00	0.00	0.00
Biberiye	0.00	0.00	0.00
Defne	0.00	0.00	0.00
Isırgan Tohumu	0.00	0.00	0.00
Kantaron	0.00	0.00	0.00
Kimyon	0.00	0.00	0.00
Lavanta	0.00	0.00	0.00
Melisa	0.00	0.00	0.00
Mersin	0.00	0.00	0.00
Nane	0.00	0.00	0.00
Rezene	0.00	0.00	0.00
Papatya	0.00	0.00	0.00

İkinci yöntem: 4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonları içerisine farklı dozlarda eklenen uçucu yağlar *P.s. pv. savastanoi*'nin gelişmesini engellemiştir. Çizelge 3'de de görüldüğü gibi etkileri farklı olmuştur. Aynı zamanda bakteri yoğunluğuna bağlı olarak da farklı etki göstermiştir. Bakteri yoğunluğu arttıkça etki kekik uçucu yağı hariç diğer uçucu yağlarda etkilidir. Çizelge 3'de karabaş uçucu yağında görüldüğü gibi uygulama dozundan ziyade uygulama zamanının uçucu yağın etkinliği üzerine daha fazla etkisinin olduğu saptanmıştır. Negatif kontrol olarak su kullanıldığında bakteri popülasyonunda herhangi bir azalmaya rastlanmamıştır. Suyun bakteri gelişimini engellemede hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür. Pozitif kontrol olan streptomisin kullanıldığında petride bakteri gelişmediği gözlenmiştir.

Üçüncü yöntem: Katı besiyeri (King B)'ne uçucu yağların eklenmesi ile gerçekleştirilen bu yöntemde su kontroller ile uçucu yağ karakterleri arasında

Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı in vitro koşullarda farklı bitkilerin uçucu yağlarının etkisi

koloni sayısı bakımından farklılık gözlenmiştir. Böylece bu yöntemin bakteri gelişimine hiçbir etkisi olmadığı kararına varılmıştır. Çünkü uçucu yağın besi yerine karıştırılarak kullanımında bakteri popülasyonu uçucu yağ kullanılmamış kontrole yakın yoğunlukta bakteri gelişimi gözlenmiştir. Yöntemin etkisiz olmasının nedenleri olarak; sıcaklığın uçucu yağın etkinliğini bozabilmesi veya petriye döküldüğünde sıcaklıkla birlikte uçucu yağın buharlaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 3. Uçucu yağların farklı doz ve sürelerinin sıvı besi yerindeki patojen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* popülasyonuna etkisi (hücre/ml)

Uçucu Yağlar	Saa t	4 x 10 ³ hücre/ml				4 x 10 ⁴ hücre/ml				4 x 10 ⁵ hücre/ml			
		25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl
OKALİPTÜS	0	3.6	3.3	3.0	3.1	4.6	4.0	3.8	3.8	5.6	4.4	4.6	4.4
	1	3.6	3.3	2.6	2.9	4.6	4.0	3.7	3.8	5.6	4.4	4.4	2.4
	3	3.6	3.6	3.6	3.5	4.6	4.5	4.3	4.5	5.6	5.6	5.6	5.6
	6	3.6	3.8	3.9	3.9	4.6	4.6	4.7	4.6	5.6	5.0	5.6	5.6
	24	3.6	3.6	3.6	3.6	4.6	4.6	4.6	4.6	5.6	5.6	5.6	5.6
KARABAŞ	0	3.1	1.7	2.4	1.7	4.0	2.8	3.3	2.7	4.4	3.3	3.7	3.2
	1	3.4	2.6	2.6	2.4	4.1	3.6	3.6	3.4	4.5	4.0	4.8	3.8
	3	3.6	3.1	3.1	3.0	4.6	4.0	4.0	4.0	5.6	4.4	4.4	4.4
	6	3.6	3.6	3.6	3.4	4.6	4.3	4.3	4.2	5.6	4.8	4.8	4.6
	24	3.6	3.6	3.6	3.6	4.6	4.6	4.6	4.6	5.6	5.6	5.6	5.6
BERGAMOT	0	3.4	2.1	2.2	2.0	4.1	2.9	3.1	2.8	4.5	3.4	3.4	3.2
	1	3.2	2.3	2.1	2.7	4.1	3.0	2.7	2.6	4.5	3.6	3.4	3.3
	3	3.5	2.5	2.2	2.0	4.4	3.1	2.8	2.8	5.4	3.5	3.6	3.2
	6	3.6	2.5	2.2	1.9	4.4	3.3	3.0	1.6	5.6	3.9	3.6	3.2
	24	3.6	3.6	3.6	3.6	4.6	4.6	4.6	4.6	5.6	5.6	5.6	5.6
SARIMSAK	0	3.6	3.3	3.2	3.8	4.6	3.9	4.0	3.7	5.6	4.5	4.4	4.2
	1	3.6	3.4	3.2	3.0	4.6	4.0	4.0	3.8	5.6	4.5	4.4	4.3
	3	3.6	3.6	3.6	3.5	4.6	3.4	4.5	4.4	5.6	5.2	5.6	5.3
	6	3.6	3.6	3.6	3.6	4.6	4.6	4.6	4.6	5.6	5.6	5.6	5.4
	24	3.6	3.6	3.6	3.6	4.6	4.6	4.6	4.6	5.6	5.6	5.6	5.0
KARANFİL	0	2.8	1.9	2.8	2.7	3.6	2.9	3.1	3.4	4.1	3.7	3.7	3.9
	1	2.8	0.0	1.9	3.2	3.5	2.9	3.0	4.6	4.1	3.5	3.7	4.5
	3	2.6	2.2	3.1	2.3	3.6	3.1	3.2	3.9	3.9	4.5	3.8	4.7
	6	3.1	3.0	2.4	0.0	4.0	3.6	3.5	2.2	4.4	4.1	4.4	4.7
	24	3.6	3.6	3.6	3.6	4.6	4.6	4.6	4.6	5.6	5.6	5.6	5.6
KEKİK	0	2.2	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0	0.0	4.4	2.8	0.0	0.0
	1	1.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0	1.9	2.5
	3	1.4	0.0	1.0	0.0	2.7	0.0	0.0	1.9	3.1	2.2	2.6	2.2
	6	1.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	1.9	1.6	3.3	2.3	2.2	1.9
	24	1.9	0.0	1.4	0.0	2.7	0.0	0.0	2.0	4.1	2.3	2.8	4.5

TARTIŞMA VE KANI

Bu çalışmada kullanılan üç farklı yöntemde, farklı patojen bakteri (*P.s. pv. savastanoi*) yoğunluğu ve farklı dozlarda bitki uçucu yağları kullanılarak patojen popülasyonuna olan antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 21 bitkinin uçucu yağı kullanılmış fakat altı tane uçucu yağ (Bergamut, Karabaş, Karanfil, Kekik, Okaliptüs, Sarımsak) etkili bulunmuştur. Bu durum zeytin dal kanseri hastalığının mücadelesinde uçucu yağların alternatif oluşturabileceğini düşündürmüştür.

Kağıt disk yönteminde en etkili sonucu kekik uçucu yağı vermiştir. Kekik uçucu yağı 4×10^3 yoğunlukta 3.70 mm, 4×10^4 yoğunlukta 3.60 mm inhibisyon zonu oluştururken 4×10^5 yoğunluğunda ise 2.40 mm inhibisyon zonu oluşturarak petride en etkili inhibisyon zonunu oluşturmuştur. Patojen bakteri popülasyonu arttıkça çoğu yağın antimikrobiyal etkisinin azaldığı ortaya konmuştur. Bu durum pek çok çalışmada da gösterilmiştir (Balestra et al. 2009). Başarılı bulduğumuz kekik ve karabaş kekiğin bakterilere karşı antimikrobiyal etkisini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Basım et al. 2000). Benzer şekilde kekik ve karabaş kekikten elde edilen uçucu yağların *P.s. pv. savastanoi*'ye antimikrobiyal etkisi bu çalışmayla ortaya konmuştur.

Süspansiyon içerisine uçucu yağ eklenerek yapılan denemede disk yönteminde de olduğu gibi kekik uçucu yağı yine etkili sonuç vermiştir. Kekik uçucu yağı 4×10^3 , 4×10^4 ve 4×10^5 bakteri yoğunluğunda bakteri gelişimini engellediği görülmüştür. Balestra et al. (2009) yaptıkları çalışmada benzer sonuçları elde etmiştir. Ancak bu çalışma kapsamında kekik uçucu yağından *in vitro*'da elde edilen olumlu sonuçların *in vivo*'da da testlenmesi gerekmektedir. Saksı ve arazide doğa koşullarında gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalarında başarılı sonuçlar alınması durumunda bu yağın mücadele programlarına dahil edilmesi hastalığa karşı bir alternatif oluşturabilecektir.

Sarımsak ve adaçayı uçucu yağının *P.s. pv. savastanoi*'ye karşı etkili bir sonuç vermemesinin sebebi olarak; uçucu yağın buharlaşmasından dolayı etkinliğinin kısa sürede kaybolması veya bu uçucu yağların elde edilme metodunda etkili olan allicin gibi fenolik bileşiklerin yapısının bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle başarılı uygulamalar için uçucu yağ elde edilme metodunun değiştirilmesi ile daha başarılı sonuçlara ulaşılabileceği tahmin edilmektedir.

Üçüncü yöntem olarak denediğimiz besi ortamı içerisine koyduğumuz tüm uçucu yağların bakteri gelişimini etkilemediği görülmüştür. Ortamın sıcaklığından dolayı uçucu yağın etkisi kaybolduğundan bu yöntemin gelecekteki denemelerde kullanılması uygun bulunmamıştır. Mirik ve Aysan (2002) yaptıkları çalışmada otoklavda steril ettikleri sarımsak ekstraktının domates ve biber bakteriyel leke hastalığına karşı etkisiz olduğunu, soğuk sterilizasyon yaptıklarında ise sarımsak ekstraktının bitki patojeni bakteriye karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu

çalışmada görüldüğü gibi, sıcaklığın bitki ekstraktları ve uçucu yağların patojenlere etkilerini azalttığı veya ortadan kaldırdığını göstermektedir.

Sonuç olarak *P.s.* pv. *savastanoi*'ye karşı kekik uçucu yağının *in vitro* da test edilen diğer uçucu yağlara göre en etkili olduğu ortaya çıkmıştır. *In vitro* denemelerde elde edilen başarılı sonuçların pratikte kullanılması için arazi çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Doğa koşullarında da etkili olmasıyla bu yağın entegre mücadele programı içerisine alınması faydalı olacaktır. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda uçucu yağ yerine etkisi daha kalıcı olduğu düşünülen bitki ekstratı daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara, 29-31.
- Anonim 2014. www.ayvalikzeytinyagi.org. (Erişim tarihi:25.05.2014)
- Azeri T. 1993. Research on olive leaf spot, olive knot and verticillium wilt of olive in Turkey. EPPO Bulletin, 23: 437-440
- Balestra G.M., Heydari A., Ceccarelli D., Ovidi E. and Quattrucci A. 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. Crop Protection, 28:807-811.
- Basim H. ve Ersoy A. 2000. Batı Akdeniz Bölgesinde zeytin ağaçlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tarafından oluşturulan bakteriyel dal kanseri hastalığının yayılışı ve hastalık etmeninin tanısı. Türkiye I. Zeytincilik Sempozyumu, 310-315, Bursa.
- Basim, H., Yegen, O. and Zeller, W., 2000. Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. Journal of Plant Diseases and Protection 279(3):279-284.
- Conner K.N., Zhang L., Jacobi J., Putnam M.L. 2013. First Report of Bacterial Gall on *Loropetalum chinense* Caused by *Pseudomonas savastanoi* in the United States. Disease Notes, 97(6):835.
- Iacobellis N.S., Caponero A. and Evidente A. 1998. Characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* strains isolated from ash. Plant Pathology, 47: 73-78.
- Janse J.D. 1981. The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*) caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. II. Etiology and taxonomic considerations. Eur. J. For. Pathol., 11: 425-438.
- Janse J.D. 1982. *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. Rev., the bacterium causing excrescences on oleaceae and *Nerium oleander* L. Int. J. Syst. Bacteriol., 32: 166-169.
- Janse J.D. 2005. Phytobacteriology Principles and Practice. CABI, 359, USA.

- Klement Z., Rudolph K. and Sand D.C. 1990. Methods in Phytobacteriology, Akademia Kiado, Budapest, 568p.
- Lelliott R.A. and Stead D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases plants. Balackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 216 pp.
- Mangamma P. and Speeramula A. 1981. Garlic extract inhibitory to growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Indian Phytopathology, 44:372.
- Mirik M. ve Aysan Y. 2002. Tohum kökenli *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* üzerine çeşitli bitki ekstraktlarının etkisi. Türkiye I. Tohumculuk Kongresi, 333-338.
- Mirik M., Aysan Y., Cinar O. ve Sahin F. 2004. Türkiye’de çeşitli bitkilerden izole edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatlarının fenotipik karakterizasyonu. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi, 139, Samsun.
- Mirik M. ve Aysan Y. 2006. Doğu Akdeniz Bölgesinde zakkum, yasemin, mersin ve cılbırtı çalılarında *Pseudomonas savastanoi*’nin neden olduğu bakteriyel ur hastalığı üzerine araştırmalar. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 311-317, İzmir.
- Mirik M., Aysan Y. ve Büyükyılmaz M. 2007. Türkiye’nin Marmara Bölgesi Zeytin Üretim Alanlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolatlarının Elde Edilmesi ve Yaygınlığı Üzerine Araştırmalar. II. Bitki Koruma Kongresi, Isparta.
- Mirik M. ve Aysan Y. 2009. Marmara Bölgesi Zeytin Alanlarında İzole Edilen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. III. Bitki Koruma Kongresi, Van.
- Mirik M, Aysan Y, Sahin F (2011) Characterization of *Pseudomonas cichorii* isolated from different hosts in Turkey. International Journal of Agricultural Biology 13, 203-209
- Ramos C., Matas I.M., Bardajı L., Aragon I.M. and Murillo J. 2012. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. Molecular Plant Pathology, 13(9): 998-1009.
- Smith E.F. 1908. Recent studies on the olive-tubercle organism. Bull. Bur. Plant Ind. U. S. Dep. Agric. 131: 25-43.
- Tatlı B. ve Benlioglu K. 2004. Aydın ve Muğla illeri zeytin alanlarında zeytin ağacı uru hastalığı (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) üzerine çalışmalar. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi, 147, Samsun.
- TÜİK 2013. www.tuik.gov.tr. (Erişim tarihi:25.05.2014)
- Ustun N. and Aslan N. 2013. Present status of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Aegean Region of Turkey. Integrated protection of fruit crops, IOBC-WPRS, Bulletin Vol.91 pp 273-277.
- Wilson E.E. 1965. Pathological histogenesis in oleander tumors induced by *Pseudomonas savastanoi*. Phytopathology, 55: 1244-1249.
- Young J.M., Dye D.W., Bradbury J.F., Panagopoulos C.G. and Robb C.F. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N. Z. J. Agric. Res., 21: 153-177.