

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYTİN DAL KANSERİ ETMENİ *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*'ye KARŞI *in vitro* KOŞULLARDA FARKLI BİTKİLERİN UÇUCU YAĞLARININ ETKİSİ

Cansu ÖKSEL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Mustafa MİRİK

Tekirdağ 2014

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Mustafa MİRİK danışmanlığında, Cansu ÖKSEL tarafından hazırlanan “Zeytin Dal Kanseri Etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye Karşı *in vitro* Koşullarda Farklı Bitkilerin Uçucu Yağlarının Etkisi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof. Dr. Yeşim AYSAN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mustafa MİRİK

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. N. Desen KÖYÇÜ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEYTİN DAL KANSERİ ETMENİ *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye KARŞI *in vitro* KOŞULLARDA FARKLI BİTKİLERİN UÇUCU YAĞLARININ ETKİSİ

Cansu ÖKSEL

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa MİRİK

Bu çalışmada bitki uçucu yağlarının farklı uygulama, doz ve sürelerde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Disk 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. Uçucu yağ dozu arttırıldıkça antibakteriyel etkininde 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 yağlarında patojene etkili olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Uçucu Yağ, Zeytin Dal Kanseri, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, antibakteriyel, Kekik,

2014, 64 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

EFFECT OF ESSENTIAL OIL AGAINST BACTERIAL KNOT DISEASE CAUSED by
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*'ye in *in vitro* CONDITIONS

Cansu ÖKSEL

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa MİRİK

The antibacterial effect of essential oils of thyme (*Thymus vulgaris*), bergamot (*Citrus bergamia*), garlic (*Allium sativum*), fernch lavender (*Lavandula stoechas*) clove (*Caryophyllus aromaticum*), eucalytus (*Eucalyptus globus*) on *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* were investigated. Thyme, bergamot, garlic, fernch lavender, clove, eucalytus 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 changes after 24 h growth in different treatment of essential oils at different times, but relative decrease in becterial 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 essential oil the most effective. Bergamot, lavender and eucalyptus essential oils followed the thyme essential oil, respectively.

Key Words: Essential oil, Olive Knot Disease, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, antibacterial, thyme

2014, 64 pages

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ... ..	14
2.1. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	14
2.2. Bitki Ekstratları ve Uçucu Yağları ile Yapılan Çalışmalar.....	19
3. MATERYAL-METOD.....	25
3.1. Materyal	25
3.2. Metod.....	25
3.2.1. Bakteri Kültürünün Geliştirilmesi	25
3.2.2. Patojenite Testi ve Re-izolatların Eldesi.....	25
3.2.3. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ' nin Tanı Testleri.....	26
3.2.3.1. Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi	26
3.2.3.2. Levan Oluşumu.....	26
3.2.3.3. Oksidaz Testi.....	27
3.2.3.4. Pektolitik Aktivite Testi.....	27
3.2.3.5..Arginin Dihidrolase Testi.....	27
3.2.3.6. Tütün' de Aşırı Duyarlılık Testi.....	28
3.3.4. Farklı Uçucu Yağların In vitro Koşullarda <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin Gelişimine Antimikrobiyal Etkisi.....	28
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	31
4.1. Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi.....	31
4.2. Patojenite Testi ve Re-izolatların Eldesi.....	31
4.3. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ' nin Tanı Testleri.....	32
4.3.1. Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi.....	32
4.3.2. Levan Oluşumu	33
4.3.3. Oksidaz Testi.....	34
4.3.4. Pektolitik Aktivite Testi.....	35
4.3.5..Arginin Dihidrolase Testi.....	35
4.3.6..Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi.....	36
4.4..Farklı Uçucu Yağların in vitro Koşullarda <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin Gelişimine Antimikrobiyal Etkisi.....	38
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	57
6. KAYNAKLAR.....	58
7. TEŞEKKÜRLER.....	63
8. ÖZGEÇMİŞ.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Dünyada zeytin üretimi.....	4
Çizelge 1.2. Türkiye’ de zeytin ağaç sayısı ve üretimi.....	5
Çizelge 1.3. Bölgelere göre yetiştirilen zeytin çeşitleri.....	7
Çizelge 1.4. <i>Pseudomonas savastanoi</i> ’nin pathovar ve konukçuları.....	9
Çizelge 1.5. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pathovarlarının fenotipik ve genetik farklılıkları....	10
Çizelge 4.1. Patojenin tanılanmasında uygulanan testler.....	38
Çizelge.4.2..Farklı uçucu yağların kağıt disk yönteminde oluşturduğu inhibisyonzonları.....	41
Çizelge.4.3..Uçucu yağların farklı doz ve sürelerinin sıvı besi yerindeki patojen popülasyonuna etkisi.....	42
Çizelge 4.4. PSF besi ortamında uçucu yağın etkisi.....	56

Şekil 1.1. Dünyada zeytin üretim alanları.....	2
Şekil 1.2. Akdeniz havzası zeytin üretim alanları.....	3
Şekil 1.3. Türkiye’de zeytin üretimi yapılan yerler.....	4
Şekil 1.4. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ’nin dallarda oluşturduğu ur.....	11
Şekil 4.1. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatının zeytinde oluşturduğu ur belirtileri.....	32
Şekil 4.2. KOH testi sonucunda gram (-) kültürde oluşan sümüksü yapı.....	33
Şekil 4.3. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatı ve <i>Erwinia amylovora</i> ’ nın SNA besi yerinde gelişimi.....	34
Şekil 4.4. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatının oksidaz reaksiyonu.....	34
Şekil 4.5. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatının patates dilimlerinde pektolitik aktivite testi.....	35
Şekil 4.6. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatının arginin dihidrolase testi.....	36
Şekil 4.7. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> izolatının tütün yapraklarında oluşturduğutipik aşırı duyarlılık reaksiyonu.....	37
Şekil 4.8. A ₆₀₀ : 0,3 okuma değerindeki bakteri popülasyonunun -4, -5, -6 seyreltmelerinde petride gelişen bakteri kolonisi.....	39
Şekil 4.9. Kekik uçucu yağının <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ’ nin gelişimine antimikrobiyal etkisi.....	40
Şekil 4.10. Okaliptüs uçucu yağının <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ’ nin popülasyon yoğunluğuna etkisi.....	43
Şekil 4.11. Karabaş uçucu yağının <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ’ nin popülasyon yoğunluğuna etkisi.....	45
Şekil 4.12. Bergamot uçucu yağının <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ’ nin popülasyon yoğunluğuna etkisi.....	47
Şekil 4.13. Sarımsak uçucu yağının <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ’ nin popülasyon yoğunluğuna etkisi.....	49
Şekil 4.14. Karanfil uçucu yağının <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ’ nin popülasyon yoğunluğuna etkisi.....	51
Şekil 4.15. Kekik uçucu yağının <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ’ nin popülasyon yoğunluğuna etkisi.....	53

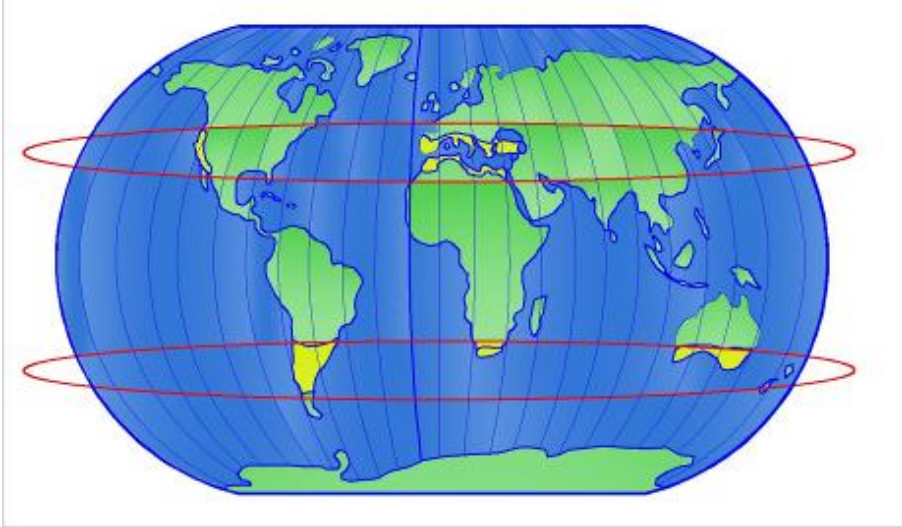
1.GİRİŞ

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. Tarımsal alanda zeytinin M. Ö. 6000 yıllarında ilk kullanımına ilişkin veriler Doğu Akdeniz’de Suriye sınırları içerisinde rastlanılmıştır. Zeytinin buradan üç koldan dünyaya yayıldığını göstermektedir. Son yıllarda Hatay, Kahramanmaraş ve Mardin’de zeytin ağacının en alt türüne rastlanması da bu düşüncüyü doğrulamaktadır. Güneydoğu Anadolu’dan Batı Anadolu’ya ve oradan da Ege adaları yoluyla Yunanistan, İtalya, Fransa ve İspanya’ya kadar uzanmıştır. Sicilya yoluyla Kuzey Afrika’ya yayılan zeytin, Güneydoğu Anadolu’dan Suriye ve Mısır üzerinden ilerleyen ikinci kol ile birleşerek Akdeniz’in tüm güney kıyılarına yayılmıştır. Üçüncü kol ise Irak ve İran üzerinden Afganistan ve Pakistan’a kadar ilerlemiştir. XVI. Yüzyılda İspanyollar tarafından Güney ve Kuzey Amerika’ya götürülmesi ile zeytinin dünyadaki yayılışı tamamlanmıştır. Zeytinin Avrupa’ya yayılmasında ise Romalılar, zeytinyağının yayılmasında ise Giritliler etkin rol oynamıştır. Giritliler yaklaşık 3000 yıl zeytin ticaretinin hâkimi konumunda yer almıştır (Anonim 2014).

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. Ayrıca son yapılan araştırmalarda; içeriğindeki fenolik bileşiklerin doğal antioksidan madde olarak görev yaparak kalp damar hastalıklarını önlemede sinir ve sindirim sisteminde, kemik gelişiminde onarıcı etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda zeytinin içerdiği fenolik bileşiklerin antimutajenik ve antikanserojenik olduklarının yanında antimikrobiyal, antioksidatif ve enzim inhibisyonu etkilerinin olduğu da belirlenmiştir. Bu özellikleri ile zeytin ve zeytinyağı gerek dünyada gerekse ülkemizde insan sağlığındaki önemi açısından giderek daha ön plana çıkmaktadır.

Zeytin ağacının en iyi yetiştirilme koşulları Akdeniz iklimine sahip bölgelerdir (Şekil 1.1). Zeytin bitkisinin çevresel istekleri göz önüne alındığında en iyi gelişim gösterdiği alanlar yıllık sıcaklık ortalamasının 15-20°C arasında olan bölgelerdir. Zeytin ağacının vejetasyonuna göre sıcaklık istekleri de farklılık göstermektedir; ilk sürgünlerin görülmesinden sonraki oluşumuna kadarki dönem (Şubat-Mart) 5-10°C, çiçeklenme döneminde (Mayıs-Haziran) 15-20°C, meyve oluşumu ve büyüme döneminde (Mayıs-Haziran) 20-25°C ve tam olgunluktan hasat sonuna kadar olan dönemde (Kasım-Ocak) ise 5°C’dir. Yüksek uyum yeteneği nedeniyle çok yetersiz şartlarda bile ürün verebilen bir bitki olan zeytin, iyi sulanması halinde

en fazla 40°C'ye, en az -7°C'ye kadar dayanabilir. Sıcaklıkların yanında yıllık ortalama 600-800 mm yağış olması zeytin gelişmesi için yeterli olmaktadır. Zeytin ağacının bu özel iklim istekleri nedeniyle zeytincilik, Şekil 1.2'de de görüldüğü gibi dünyada daha çok Akdeniz'de kıyısı olan ülkelerde (İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Suriye, Fas, Fransa ve Portekiz) yapılmaktadır. FAO'nun 2013 verilerine göre dünyada zeytin ağacı varlığının yaklaşık % 90'nı bu ülkelerde yer almaktadır. Yaklaşık 9.984.918 hektar zeytin üretim alanından 16.584.919 ton zeytin üretimi yapılmaktadır (FAO 2013). Dünyada son yıllarda zeytinyağı ve sofralık zeytin gibi zeytin ürünlerine artan talep nedeniyle zeytinciliğin sadece Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde değil, Şekil 1.1'de de görüldüğü gibi zeytin 30°- 45° kuzey ve güney enlemleri arasındaki Akdeniz iklimi gösteren Arjantin, Şili, Meksika, Peru, Avustralya vb. diğer ülkelerde de ekonomik anlamda tarımı yapılmaktadır (Anonim 2014).



Şekil 1.1. Dünyada zeytin üretim alanları

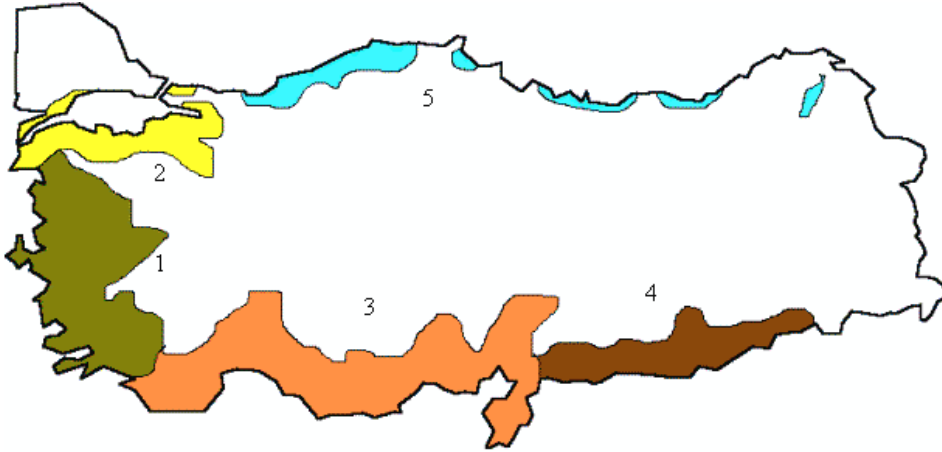


Şekil 1.2. Akdeniz havzası zeytin üretim alanları

Türkiye coğrafik konumunun zeytin üretimi için uygun olması nedeniyle dünyada önemli zeytin üreticileri arasındadır (Şekil 1.3). Çizelge 1.1’de de görüldüğü gibi gerek zeytin üretimi ve gerekse zeytinyağı üretiminde Türkiye dünyada 4. sırada yer almaktadır. Türkiye’de bulunan 81 ilinin yaklaşık 41’inde farklı oranlarda zeytin üretimi yapılmaktadır. Zeytin üretiminin bölgelere göre dağılımına bakıldığında % 53’ünün Ege Bölgesi’nde, % 23’ünün Akdeniz Bölgesi’nde, % 18’inin Marmara Bölgesi’nde, % 6’sının Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde ve % 0,2’sinin de Karadeniz Bölgesi’nde olduğu görülmektedir. Bölgelerde üretilen zeytinin kullanım alanları farklılık göstermektedir. Ege Bölgesi’nde üretimin % 55’i yağlık olarak değerlendirilirken Marmara Bölgesi’nde üretimin % 60’ı sofralık olarak değerlendirilmektedir. Buna karşın zeytin dane üretimi illere göre dağılımı sırasıyla, İzmir (% 13), Manisa (% 12.5) Aydın (% 12), Muğla (% 10), Balıkesir (% 12.5), Çanakkale (% 7) ve Bursa (% 5) şeklindedir (TÜİK 2013).

Çizelge 1.1. Dünyada zeytin üretimi (FAO 2013)

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
İspanya	6.140.251	5.570.727	5.701.000	6.682.009	7.820.060	3.626.600
İtalya	3.249.800	3.473.600	3.286.600	3.170.700	3.182.204	2.992.330
Yunanistan	2.313.055	2.575.000	2.286.139	1.809.800	2.000.000	2.100.000
Türkiye	1.075.854	1.464.248	1.290.654	1.415.000	1.750.000	1.820.000
Tunus	998.000	1.183.000	800.000	873.000	562.000	963.000
Suriye	495.310	827.033	885.942	960.403	1.095.043	1.095.043
Dünya	16.998.160	18.078.194	17.622.359	19.000.981	20.545.421	16.584.857



Şekil 1.3. Türkiye’de Zeytin üretimi yapılan yerler (1: Ege Bölgesi, 2: Marmara Bölgesi, 3: Akdeniz Bölgesi, 4: Güneydoğu Anadolu Bölgesi, 5: Karadeniz Bölgesi, Numaralar bölgelerin ağaç sayısı ve üretim miktarına göre çoktan aza doğru verilmiştir)

Türkiye’de zeytin üretimi yıldan yıla bir artış göstermektedir. Çizelge 1.2’de de görüldüğü gibi 1995 yılında 515.000 ton dane üretimi ve 40.000 ton zeytinyağı üretimi gerçekleştirilirken; 2012 yılına gelindiğinde 1.820.000 ton dane üretimi ve 195.000 ton zeytin yağı üretimi gerçekleştirilmiştir (TÜİK 2013). Bu artışta en önemli faktör son yıllarda Türkiye’de zeytin ve zeytin ürünlerine diğer tarım ürünlerine uygulanan desteklemeler

yanında sertifikalı fidanı ile zeytin bahçesi tesisine verilen destek, girdi destekleri ve zeytinyağında kg başına uygulanan prim desteği yanında ambalajlanmış-paketlenmiş sofralık zeytin ve zeytinyağına verilen ihracat desteğinden kaynaklanmaktadır

Çizelge 1.2. Türkiye’de Zeytin Ağacı Sayısı ve Üretimi (1000 Adet; 1000 Ton)

Yıllar	Toplam Ağaç Sayısı	Meyve Veren	Meyve Vermeyen	Toplam Üretim	Sofralık	Yağlık	Zeytinyağı Üretimi
1995	87 581	81 437	6 144	515	206	309	40.0
1996	89 740	83 200	6 540	1 800	435	1 365	200.0
1997	95 730	85 780	9 950	510	200	310	40.0
1998	93 450	85 850	7 600	1 650	430	1 220	170.0
1999	95 500	87 130	8 370	600	250	350	70.0
2000	97 770	89 200	8 570	1 800	490	1 310	175.0
2001	99 000	90 000	9 000	600	235	365	65.0
2002	101 600	91 700	9 900	1 800	450	1 350	140.0
2003	102 750	92 250	10 500	850	350	500	79.0
2004	107 100	94 950	12 150	1 600	400	1 200	145.0
2005	113 180	96 625	16 555	1 200	400	800	112.0
2006	129 265	97 773	31 492	1 767	556	1 211	165.0
2007	144 329	104 219	40 110	1 076	456	621	72.0
2008	151 630	106 139	45 491	1 464	512	952	130.0
2009	153 723	109 127	44 596	1 291	460	831	147.0
2010	157 156	111 398	45 758	1 415	375	1 040	160.0
2011	155 427	117 941	37 486	1 750	550	1 200	191.0
2012	157 904	120 820	37 084	1 820	480	1 340	195.0

Ülkemizde yetiştirilen zeytin çeşitleri bölgelere göre değişkenlik göstermektedir. Bu çeşitlerin yetiştirildiği bölgeler Çizelge 1.3' te verilmiştir. Ege Bölgesinde Balıkesir körfez bölgesinde Ayvalık, İzmir, Aydın ve Muğla illerinin ise Memecik zeytin çeşidi yaygın olarak yetiştirilmektedir. Diğer çeşitler ise, Ak zeytin, Aşı yeli, Çakır Çilli, Dilmit, Erkence, Eşek zeytini (Ödemiş), Girit zeytini, Hurma kaba, Hurma karaca, İzmir sofralık, Karayaprak, Kiraz, Memeli, Taş arası, Tavşan yüreği, Yağ zeytini, Yerli yağlık çeşitleridir. Marmara Bölgesinde en önemli çeşit Gemlik çeşididir. Bölgenin diğer çeşitleri; Edincik su, Beyaz yağlık, Çelebi (İzmit), Çizmelik (Tekirdağ), Erdek yağlık, Eşek zeytini (Tekirdağ), Samanlı, Şam, Karamürsel su, Siyah salamuralıktır. Akdeniz bölgesinde bölgesel çeşitlerin yanında Ege ve Marmara bölgesinin çeşitleri yaygınlık göstermektedir. Bölgenin en önemli çeşitleri; Büyük Topak Ulak, Çelebi (Silifke), Elmacık, Halhalı (Hatay), Karamani, Sarı Habeşi, Sariulak, Saurani, Sayfi ve Küçük Topakulak'tır. Güneydoğu Anadolu Bölgesinin önemlileri, Kilis Yağlık, Nizip Yağlık, Halhalı (Derik), Eğriburun (Nizip), Kan Çelebi gibi çeşitlerdir. Bölgenin diğer çeşitleri ise, Belluti, Eğriburun (Tatayn), Halhalı, Çelebi, Hamza Çelebi, Hırhalı Çelebi, Hursuki, İri Yuvarlak, Kalem bezi, Mavi, Melkabazı, Tespih Çelebi, Yağ Çelebi, Yağlık Çelebi, Yağlık Sarı Zeytin, Yuvarlak Çelebi, Yuvarlak Halhalı, Yün Çelebi Zoncuk'tur. Son üretim bölgesi olan Karadeniz'de zeytincilik Artvin, Trabzon, Samsun ve Sinop illeri dışında yapılamamaktadır. Bölgenin zeytin çeşitleri ise; Butko, Görvele, Marantelli, Patos, Otur, Sati, Samsun Salamuralık, Samsun Tuzlamalık, Samsun Kırmızı Tuzlamalık, Samsun Yağlık, Sinop No.1, Sinop No.2, Sinop No.4, Sinop No.5, Sinop No.6, Trabzon Yağlıktır.

Çizelge 1.3. Bölgelere göre yetiştirilen zeytin çeşitleri

Zeytin Yetiştirilen Bölgeler	Yetiştirilen Çeşitler
Ege	Ayvalık, Memecik, Ak zeytin, Aşu yeli, Çakır Çilli, Dilmit, Erkence, Eşek zeytini (Ödemiş), Girit zeytini, Hurma kaba, Hurma karaca, İzmir sofralık, Karayaprak, Kiraz, Memeli, Taş arası, Tavşan yüreği, Yağ zeytini, Yerli yağlık çeşitleri
Akdeniz	Büyük Topak Ulak, Çelebi (Silifke), Elmacık, Halhalı (Hatay), Karamani, Sarı Habeşi, Sarıulak, Saurani, Sayfi ve Küçük Topakulak
Marmara	Gemlik, Edincik su, Beyaz yağlık, Çelebi (İzmit), Çizmelik (Tekirdağ), Erdek yağlık, Eşek zeytini (Tekirdağ), Samanlı, Şam, Karamürsel su, Siyah salamuralık
Güneydoğu Anadolu	Kilis Yağlık, Nizip Yağlık, Halhalı (Derik), Eğriburun (Nizip), Kan Çelebi, Belluti, Eğriburun (Tatayn), Halhalı, Çelebi, Hamza Çelebi, Hırhalı Çelebi, Hursuki, İri Yuvarlak, Kalem bezi, Mavi, Melkabazı, Tespih Çelebi, Yağ Çelebi, Yağlık Çelebi, Yağlık Sarı Zeytin, Yuvarlak Çelebi, Yuvarlak Halhalı, Yün Çelebi Zoncuk
Karadeniz	Butko, Görvele, Marantelli, Patos, Otur, Sati, Samsun Salamuralık, Samsun Tuzlamalık, Samsun Kırmızı Tuzlamalık, Samsun Yağlık, Sinop No.1, Sinop No.2, Sinop No.4, Sinop No.5, Sinop No.6, Trabzon Yağlık

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. Bu etmenlerden dolayı gerek zeytinyağı ve gerekse sofralık zeytin üretim miktarının azalmasına neden olmaktadır. Zeytin ağaçlarında fungal hastalıklardan *Verticillium solgunluğu* (*Verticillium dahliae* Kleb.) ile Zeytin halkalı leke hastalığı (*Spilocaea oleaginae* (Cast) Hughes (= *Cycloconium oleaginum* Cast) ve bakteriyel hastalıklardan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Smith 1908) Janse (1982)’nin neden olduğu zeytin uru veya zeytin dal kanseri hastalığı verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır.

Hastalığa neden olan etmen *Pseudomonas savastanoi* düz çubuk şeklinde, bir veya iki kamçıya sahip gram negatif bir bakteridir. Boyutu ise, eni 0.5-1 µm, boyu 1.5-4.0 µm arasında değişmektedir (Palleroni, 1989). Bakteri ilk olarak *Olea europea* L. (zeytin) bitkisinden Smith tarafından izole edilmiş ve *Bacterium savastanoi* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra 1932 yılında dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) bitkisinden Brown tarafından izole edilmiş ve *Bacterium savastanoi* var. *fraxini* olarak adlandırılmış ve en son 1943’te Dawson tarafından

Pseudomonas savastanoi subsp. *fraxini* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Janse 1982). *Nerium oleander* L. bitkisinde bu hastalık etmeninin ilk kez tanınması Ferraris tarafından 1926'da *Pseudomonas tonelliana* olarak yapılmış ancak 1928'de Smith tarafından daha kesin bir tanımlama yapılarak *Pseudomonas savastanoi* subsp. *nerii* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki yıllarda Sisto ve ark. (1999)'nın bildirdiğine göre Gardan ve ark. 1992 yılında yaptıkları bir taksonomik çalışmayla bakteri *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak adlandırmıştır.

Hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* dünyada zeytin yetiştirilen hemen hemen her yerde görülmektedir. Janse (2006)'nın bildirdiğine göre etmen Amerika, Arjantin, Avusturya, Avustralya, Brezilya, Cezayir, Fas, Fransa, Güney Afrika, Hollanda, Irak, İngiltere, İran, İsrail, İspanya, İsveç, İsviçre, Kolombiya, Kıbrıs, Yunanistan, Libya, Meksika, Yeni Zelanda, Peru, Polonya, Rusya, Tanzanya, Tunus, Türkiye, Uruguay, Yugoslavya gibi çok geniş ülkelerde hastalık tespit edilmiştir.

Ülkemizde bu hastalığın, zeytinlerde varlığı uzun zamandır bilinmesine rağmen ilk çalışmalar Ege bölgesinde Azeri (1993), 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 uru veya zeytin dal kanseri hastalığının etmeni *Oleaceae* ve *Apocynaceae* familyasına ait farklı bitkilerde yaprak, sürgün ve gövdede urlara oluşumuna neden olur. Etmenin konukçuları olarak Zeytin (*Olea europea* L.) (Smith 1908, Young ve ark. 1978), Zakkum (*Nerium oleander* L.) (Wilson 1965), Yasemin (*Jasminium officinale* L.) (Janse 1981), Dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) (Janse 1981) ve Forzitya çalısı (*Forsythia* sp.) (Iacobellis ve ark. 1998), Mersin çalısı (Mirik ve ark. 2006) ve Cılbırtı çalısı (*Fontanesia phillyreoides*.) (Mirik ve ark. 2011), Çin ardıcı (*Loropetalum chinense*) (Conner ve ark. 2013) saptanmıştır.

Zeytin, zakkum ve dişbudak gibi farklı konukçulardan elde edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatlarının çarpaz olarak yapılan patojenite testleri sonucunda: zeytinden elde edilen izolatlar sadece zeytinde ur oluşturmuş, zakkumdan izolatları zakkum ve zeytinde semptom oluştururken dişbudak ise sadece kendi konukçusunda ur oluşturmuştur (Iacobellis ve ark. 1998).

Çizelge 1.4'te de görüldüğü üzere Young (1996) tarafından yapılan *Pseudomonas savastanoi*'nin isimlendirmesi sonucunda 6 pathovara ayırmıştır ve bu pathovارların konukçuları listelenmiştir.

Çizelge 1.4. *Pseudomonas savastanoi*'nin pathovar ve konukçuları

Pathovar	Konukçu
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>fraxini</i>	Dişbudak (<i>Fraxinus excelsior</i>)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	Soya (<i>Glycine max</i>)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>nerii</i>	Zakkum (<i>Nerium oleander</i>)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>retacarpa</i>	İspanyol süpürgesi (<i>Retema sphaerocarpa</i>)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Zeytin (<i>Olea europaea</i>) Zakum (<i>Nerium oleander</i>) Ligistrum (<i>Ligustrum</i> sp.) Yasemin (<i>Jasminium officinale</i>) Forzitya çalısı (<i>Forsythia</i> sp.) Mersin çalısı (<i>Myrtus communis</i>) Cılbırtı çalısı (<i>Fontanesia phillyreoides</i>) Çin ardıcı (<i>Loropetalum chinense</i>) Kurtbağı (<i>Ligustrum japonicum</i>)

Ramos ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* pathovarlarını izole edildikleri konukçunun yanında genel konukçularada çapraz patojenite çalışmaları ile pathovarların farklılıklarını belirlemişlerdir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*, *nerii* ve *savastanoi* pathovارları dişbudakda ur oluştururken *retacarpa* pathovarı ise ur oluşumu göstermemiştir. Zakkum bitkisinde sadece *nerii* ve İspanyol süpürgesinde (*Retema sphaerocarpa*) ise sadece *retacarpa* pathovarı ur oluşumuna neden olmuştur. Bu çalışmada Çizelge 1.5' de de görüldüğü gibi seçtikleri *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* pathovarlarının fenotipik ve genetik farklılıklarını ortaya koymuşlardır.

Ekonomik açıdan etmenin en önemli konukçusu zeytindir. Ancak hastalık etmeni bir yara patojenidir. Bitki üzerinde herhangi bir yara olmadığı takdirde patojenin bitkiye giriş

yapamamaktadır. Hastalık etmeni infekteli ağaçların üzerinde bulunan urlarda canlılığını sürdürebilmektedir ve asla uzun süre toprakta yaşamını sürdüremez. Buradan sağlıklı bitkilere yağmur, rüzgar, böcek ve insan hareketleriyle yayılmakta ve yaralardan enfeksiyon gerçekleştirmektedir. Bir zeytin üretim alanında tek bir ağacın infekteli olması durumunda bir yıldan kısa bir süre içerisinde bahçenin tamamına yayılabilir. İnfekteli ağaçlarda bulunan bakteri yağmurlu ve ılık geçen aylarda maksimum popülasyona ulaşabilmektedir (Ramos ve ark. 2012). Bitki üzerindeki yaralar; bitkiye uygulanan kültürel işlemler esnasında ve sıklıkla zeytin hasadı sırasında meydana geldiği gibi rüzgar, dolu, şiddetli yağmur gibi iklim faktörlerinden dolayı da oluşabilmektedir. Bu yaralardan enfeksiyon sonucunda bakteri tarafından hastalandırılmış dokularda gözle görülebilir urlar oluşturmaktadır (Alvarez ve ark. 1998). Hastalık özellikle ana dal ve sürgünlerde ur oluşumuna neden olur. Bunun yanında kök, kabuk, yaprak, yaprak sapı ve meyve dalında da ur oluşumuna neden olabilir. Şekil 1.5'te görüldüğü gibi başlangıçta urlar yumuşak ve sarımsı olmasına karşın daha sonra sertleşir ve kahverengi nekrotik alanlar şeklinde görüntü alır (Janse, 2006).

Çizelge 1.5. *Pseudomonas savastanoi* pathovarlarının fenotipik ve genetik farklılıkları (Ramos ve ark. 2012)

<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv.	Konukçular				Hormon genlerinin yeri		
	Dişbudak	Zakkum	Zeytin	İspanyol Süpürgesi	<i>iaaMH</i>	<i>iaaL</i>	<i>ptz</i>
<i>fraxini</i>	Sığil benzeri	-	Sığil benzeri	-	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<i>nerii</i>	Ur	Ur	Ur	-	Plasmid	Plasmid	Plasmid
<i>savastanoi</i>	Ur	-	Ur	-	Kromozom	Kromozom	Kromozom
<i>retacarpa</i>	-	-	-	Ur	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor

Bakteri tarafından salgılanması teşvik edilen indol asetik asidin (IAA) (Smidt ve Kosuge 1978, Surico ve ark. 1985, Iacobellis ve ark. 1994, Iacobellis ve ark. 1995), sitokininler (Surico ve ark. 1985), ve Tip III salgı sistemi vasıtasıyla *hrp/hrc* gen demetlerinin kodlanmasıyla (Sisto ve ark. 2004) bitkide ur oluşumu için gerekli olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Oluşan urlar sonucu bitki besin maddesi ve su alımını engellendiği veya azalmasından dolayı bitki gelişimi zayıflayarak kurumalar meydana gelmektedir (Gardan ve ark. 1992).



Şekil 1.4. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin dallarda oluşturduğu urlar (Fotoğraflar Mirik ve ark. 2008'den alınmıştır)

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*'yi tanılama teknikleri içerisinde bakteriyel izolasyonlar, bunu takiben yapılan patojenite testleri ve biyokimyasal testler yer almaktadır. Tanıyı desteklemek için serolojik testler (Casano ve ark. 1987), moleküler yöntemler (Penyalver ve ark. 2000, Ersoy 2002) kullanılabilir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin izolasyonunda yaygın olarak yarı seçici besi yeri kullanımı diğer bakterilerle karışık olduğu durumlarda kolaylık sağlamaktadır. Yoğun olarak gram negatif bakterilerin bulunduğu durumlarda PVF1 yarı seçici besi yeri (Surico ve Lavermicocca 1989) kullanılmaktadır. Bu besi ortamında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin UV ışığı altında floresan ışık verme özelliği ile ayırt edilebilecekleri bildirilmiştir (Surico ve Lavermicocca 1989). Bunun yanında saprofitik bakterilerin gelişimini % 89-97 oranında engelleyebilen OKA isimli bir yarı seçici besi yeri geliştirilmiştir (Azad ve Cooksey 1995).

Bakteriyel hastalıklara karşı kimyasal kullanımı sınırlı olduğundan hastalıkla mücadelede kültürel yöntemler önemlidir. Bitkiyi patojenden korumak için; don olayının çok olduğu yerlere zeytin dikiminden kaçınılmalı, taban suyu yüksek yerlerde zeytin yetiştiriciliği yapılmamalı veya fazla su için kurutma hendekleri açılmalı, bahçe tesisatında fidanların

bulaşık olup olmadığı kontrol edilmeli, fazla azotlu gübre vermekten kaçınılmalı, hasatta sırk kullanımından vazgeçilmeli, budama işlemi nemli günlerde yapılmamalı ve makaslar % 1' lik sodyumhipklorit (çamaşır suyu) ile dezenfekte edilmeli, bahçede urlar var ise bunlar toplanıp yakılmalıdır. Etmen yara patojeni olduğu için ağaçta mümkün olduğunca az yara açılmalıdır. Budama yerlerine % 5'lik göz taşı ve arkadan bitkisel katran sürülmelidir. Yeni bahçe tesis edileceği zaman sertifikalı fidanlarla yapılmalıdır. Bahçe içerisinde yapılacak kültürel işlemlerde her zaman önce sağlıklı bitkilerden başlanmalı ve nemli koşullarda herhangi bir işlem yapılmamalıdır (Ramos ve ark. 2012). Hastalığa karşı dayanıklı çeşitler kullanılmalıdır. Hastalığın kimyasal mücadelesinde; üretim sezonu içerisinde ilkbaharda ve hasattan sonra olmak üzere en az iki kez bakırlı bir ilaçla uygulama yapılmalıdır. Bakır içerikli kimyasalların kullanılması açılan yaralardan hastalığın yayılmasını azaltır. Yaralanma görüldüğü zaman yeni enfeksiyonlardan korunmak için bakırlı ilaç uygulaması tekrarlanmalıdır.

Bakteriyel hastalıklarla mücadelede kullanılan bakırlı preparatlar sistemik olmayan enfeksiyonlarda başarı gösterirken bitkinin iletim demetlerinde veya iç kısmında bulunan bakterileri engellemede yeterli olamamaktadır. Bu nedenle biyolojik mücadele, çeşitli bitki ekstratları ve bunların uçucu yağları gibi alternatif yöntemlere yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Birçok araştırmacı zeytin alt suyunu hastalık etmenine karşı kullanmışlardır. Krid ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada farklı dozlarda kullandıkları zeytin alt suyunun hastalık etmeninin *in vitro*'da petri kaplarında gelişimini engellediğini belirlemişlerdir. Aynı şekilde bitki uygulamalarında da ur oluşumunu engellediğini saptamışlardır. Ayrıca özellikle organik üretimlerde tercih edilen yöresel bitki ekstratları ve bunların uçucu yağlarının hastalık etmenlerine karşı kullanımının da etkili olduğu bilinmektedir. Rhouma ve ark. (2009) tarafından yaptıkları bir çalışmada *Pistacia* ve *Schinus* türlerinden elde ettikleri yaprak ekstratlarının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin de yer aldığı bitki patojenlerine karşı etkinliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda *Pistacia* türlerinden antibakteriyel özelliğinin olduğu ama *Schinus* türlerinin ise antifungal etkiye sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Bu tezde öncelikle hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanılanması amaçlanmıştır. İkinci amacımızı ise, 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 *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye karşı *in vitro* koşullarda etkinliğinin belirlenmesi oluşturmuştur.

Uçucu yağ ve etkili dozun belirlenmesiyle *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye karşı alternatif ve ekonomik bir yöntemin gelecekte geliştirileceği düşünülmektedir

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Patojenin Özellikleri ve İsimlendirilmesi

Pseudomonas savastanoi morfolojik olarak düz çubuk şeklinde, bir veya iki kamçılı, gram negatif özellikte bir bakteridir. Yaklaşık olarak boyları 0.5-1µm-1.5-4µm arasındadır (Palleroni, 1989). Bakteri ilk olarak *Olea europea* L. (zeytin) bitkisinden Smith tarafından izole edilmiş ve *Bacterium savastanoi* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra 1932 yılında dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) bitkisinden Brown tarafından izole edilmiş ve *Bacterium savastanoi* var. *fraxini* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Janse 1982). *Nerium oleander* L. bitkisinde bu hastalık etmeninin ilk kez tanınması Ferraris tarafından 1926'da *Pseudomonas tonelliana* olarak yapılmış ancak 1928'de Smith tarafından daha kesin bir tanılama yapılarak *Pseudomonas savastanoi* subsp. *nerii* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki yıllarda Sisto ve ark. (1999)'nın bildiklerine göre Gardan ve ark. 1992 yılında yaptıkları bir taksonomik çalışmayla bakteriyi *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak adlandırmışlardır. Ekonomik açıdan önemli olan zeytin bitkisinde dal kanserine neden olan etmenin konukçuları olarak Zeytin (*Olea europea* L.) (Smith 1908; Young ve ark.1978), Zakkum (*Nerium oleander*), Yasemin (*Jasminium officinale* L.) (Janse, 1981), Dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) (Janse, 1981) ve Forzitya (*Forsythia* sp.) (Iacobellis ve ark.1998) saptanmıştır. Doğu Akdeniz Bölgesinde Zakkum, Yasemin, Cılbırtı ve Mersin çalılarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin neden olduğu ur hastalığı saptanmış, Mersin ve Cılbırtı çalısının *P. savastanoi*'nin yeni bir konukçusu olduğu tespit edilmiştir (Mirik ve ark. 2006). Mirik ve ark. (2011) Cılbırtı çalısının (*Fontanesia phillyreoides*) zeytin dal kanseri etmeni olan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye konukçuluk ettiği saptanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda etmenin yeni konucuları olarak Akdiken (*Rhamnus alaternus*) (Temsah ve ark. 2007), Çin ardıcı (*Loropetalum chinense*) (Conner ve ark. 2013) bitkisinin *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin yeni bir konukçusu olduğu saptanmıştır.

Patojenin Konukçuları

Janse (1982) zeytin, zakkum, dişbudak, yasemin ve kurtbağrı yaptığı patojenite çalışması sonucunda zeytin ve dişbudak izolatları zeytin ve dişbudakda, zakkum izolatları zakkum, zeytin ve dişbudakda, yasemin izolatları zeytin ve forzityada, kurtbağrı izolatları ise zeytin ve dişbudak ur oluşumuna neden olmuştur.

Mirik ve ark. (2011) zeytin, zakkum, yasemin, mersin ve cılbırtı çalışından elde ettikleri *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarını konukuların hepsinde yaptıkları patojenite çalışmalarında farklılıkların olduğunu belirlemişlerdir. Zeytinden elde edilen izolatlar zakkumda, zakkumdan elde edilen izolatlar yaseminde, yaseminden elde edilen izolatlar ise zakkum bitkisinde ur oluşumuna neden olmazken diğer konukçularda ur oluşumuna neden olduğunu belirlemişlerdir. Araştırıcılar *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının izole edildikleri konukçularına verildiğinde daha şiddetli ur oluşumlarına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Ramos ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* pathovarlarını izole edildikleri konukçunun yanında genel konukçularda çapraz patojenite çalışmaları ile pathovarların farklılıklarını belirlemişlerdir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*, *nerii* ve *savastanoi* pathovarları dişbudakta ur oluştururken *retacarpa* pathovarı ise ur oluşumu göstermemiştir. Zakkum bitkisinde sadece *nerii* ve İspanyol süpürgesinde ise sadece *retacarpa* pathovarı ur oluşumuna neden olmuştur. *Pseudomonas savastanoi* pathovarları zeytin bitkisine inokule edildiğinde ise *nerii* ve *savastanoi* pathovarları ur oluşumuna, *fraxini* siğil oluşumuna neden olurken *retacarpa* pathovarı ise ur oluşumuna neden olmamıştır.

Patojenin Patojenite zellikleri

Caponero ve ark. (1995) zeytin ve zakkum izolatları ile yaptıkları çalışmada indol-3-acetic acid ve sitokin biyosentezinden sorumlu olan tryptophan monooxygenase (*iaaM*) ve isopentenyl transferase (*ipt*) genlerinin izolatlarda bulunma yerlerini araştırmışlardır. Çalışmada kullandıkları 10 zakkum izolatının hem zeytinde hem de zakkumda ur oluşumuna neden olduğunu ama bakteriosin retememsinin yanında plasmidi üzerinde *iaaM* (tryptophan monooxygenase) geninin bulunmadığını belirlemişlerdir. Bunun aksine 11 zeytin izolatının sadece zeytinde ur oluşumuna neden olduğunu, 10 izolatın bakteriosin üretebildiği ve 9 izolatın ise kromozomu üzerinde *iaaM* genin bulunduğunu belirlemişlerdir. Bir zeytin izolatında aynı plasmid üzerinde hem *iaaM* hem de *ipt* genlerinin bulunduğunu, iki zeytin izolatında ise plazmit üzerinde *iaaM* geninin bulunduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmada ilk defa plasmid kökenli *iaaM* geninin virülens ve bakteriosin üreten zeytin izolatlarında *ipt* geni ile aynı plasmid te bulunduğunu belirlemişlerdir. Zeytin ve zakkum izolatlarında virlenslikte önemli olan *iaaM* ve *ipt* genlerinin ya kromozom üzerinde ya da plasmid üzerinde bulunabildiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre doğal koşullarda zakkum

ve zeytin bitkilerinin birbirine yakın ya da teması durumunda dahi hastalığın bulaşmasının mümkün olmadığı belirlenmiştir.

Gardan ve ark. (1992)'nin bildirdiğine göre Janse (1981) farklı konukçulardan izole ettikleri izolatları biyokimyasal ve fizyolojik karakterizasyonunu yapmış ve izolatlar arasında farklılıklar olduğunu belirlemiştir. Bu farklılıkların levan oluşumu, pektatin hidrolizasyonunda, indolasetikasit ve sitokin benzeri bileşiklerin üretiminde olduğunu saptamıştır. Bu sonuçlara göre de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarını pv. *savastanoi*, *nerii* ve *fraxini* olarak üç farklı pathovara ayrılmasını önermiştir.

Alvarez ve ark. (1998)'nin bildirdiğine göre, Janse (1991) ve Wells ve ark. (1991), zeytin ve zakkum izolatlarının yağ asit profillerine göre iki farklı homogeneous gruba ayrıldığını, bu iki grubun farklılığının IAA genin bakteri hücresi içerisinde farklı lokasyonlarda (kromozom veya plasmid) bulunmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Ayrıca farklı bakteriosin üretmeleri (Iacobellis ve ark. 1995) ve plasmid üzerinde yer alan sitokin üretim genlerinin bulunmasından (Mac Donald ve ark. 1986, Powell ve Morris 1986) kaynaklandığını belirlenmiştir.

Iacobellis ve ark. (1998) bildirdiğine göre, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin pathovarlarının ayırımında patojenite testlerinde, fitohormon üretiminde ve şeker metabolizmalarında (Wilson ve ark. 1972), yağ asit profillerinde (Varvaro ve Sasser 1987), DNA yapılarına (Mugnai ve ark 1994) ve bakteriosin üretimindeki farklılıklar göz önüne alınarak yapılmaktadır.

Patojenin Tanımlanması

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*'yi tanıma teknikleri içerisinde bakteriyel izolasyonlar, bunu takiben yapılan patojenite testleri ve biyokimyasal testler yer almaktadır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin izolasyonunda yaygın olarak yarı seçici besi ortamı kullanımı diğer bakterilerle karışık olduğu durumlarda kolaylık sağlamaktadır. Yoğun olarak bakterilerin bulunduğu durumlarda PVF1 yarı seçici besi yeri kullanılmaktadır. Bu ortamda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin UV ışığı altında floresan ışık verme özellikleri ile ayırt edilebilecekleri bildirilmiştir (Surico ve Lavermicocca 1989). Ayrıca, Azad ve Cooksey (1995) yüksek oranında saprofitik bakterilerin gelişmesini engellerken, patojen bakterinin gelişmesine kolaylık sağlayan OKA isimli yarı seçici besi yeri geliştirmişler ve daha sonra içerisine %0.04 oranında SDS, bacitracin, ampicilin, novobiocin

ve cycloheximide içeren antibiyotikleri ekleyerek tekrar modifiye etmişler ve OKA-M olarak isimlendirmişlerdir.

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*' nin PCR ile tanılmasında Penyalver ve ark. (2000) *iaaL* genini kullanarak elde ettikleri primer (IAALF5'-GGC ACC AGC GGC AAC ATC AA-3' VE IAALR 5'CGC CCT CGC AAC TGC CAT AC-3') ile başarılı bir şekilde yapılabilmekte ve yapılan PCR sonucunda 454kb'lik baz oluşumu gözlenmektedir.

Ersoy (2002) tarafından dizayn edilen PSS1 (5'-TGG GGT GCT ACT TGT ACC CGA-3') ve PSS2 (5'- CCG TGT ACT ACG TTC AGC GAG-3') ile yapılan PCR sonucunda 684bp baz görüntüsü elde edilmiştir. Aynı şekilde dizayn ettikleri PSS3 (5'-CAG GAC TTC AGA ACC CAC GT-3') ve PSS4 (5'-CGG TCG ATG ATG TAG AGC AT-3') primerleri kullanılarak yaptıkları PCR çalışmaları sonucunda da 1064 bp'lik bant oluşumunu elde etmişlerdir. Bu çalışma ile gerek PSS1-PSS2 ve gerekse PSS3-PSS4 primer çiftleri kullanarak *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' nin PCR ile tanınması başarılı bir şekilde yapılacağı gösterilmiştir.

Mirik ve ark. (2008) ve Mirik ve ark. (2011)'de bildirdiklerine göre bakteriyel etmenin neden olduğu urlu yapıdan hazırlanan süspansiyon içerisinde PSF besi yeri bulunan petrilere üç çizgi ekim yöntemine göre çizmişler ve sonra 48 saat 25°C'de inkübe edildikten sonra bir gün buzdolabına transfer etmişlerdir. Bu sayede petri içerisinde gelişen ve ortamın yüzeyini kaplayan sarı saprofitik bakterinin gelişimini engelleyerek patojeni izole etmişlerdir.

Bella ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada PVF-1 ortamına izolasyon, klasik PCR ve real-time PCR gibi farklı tanılama yöntemlerini kıyaslamışlardır. İnfekteli zakkum ağaçlarında simptomlu ve symptomsuz bitkilerden 20 örnek almışlardır. Simptomlu olan 20 örnekten PVF-1besiyerine izolasyon ve klasik PCR ile 18 adedinde hastalık etmenini belirlerken, real-time PCR'da örneklerin tamamında saptamışlardır. Ur belirtisi göstermeyen infekteli zakkum bitkilerinden yapılan izolasyon ve klasik PCR çalışmalarında 6 adedinde real-time PCR'da ise 12 adet bitki örneğinde patojeni tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada real-time PCR'ın 10^2 - 10^8 bakteri yoğunluğunda etmenin tanılabildiğini saptamışlardır.

Mirik ve Aysan (2011) Marmara Bölgesinde Tekirdağ, Çanakkale, Balıkesir, Bursa ve Yalova illerinde zeytin üretim alanlarından elde ettikleri *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarını klasik tanının yanında BİOLOG, yağ asit analizleri ve spesifik PCR ile yapmışlardır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının tüm hücre yağ asitleri

kompozisyonuna göre karşılaştırdıklarında %97, BOX-PCR'a dayanan küme analizlerine göre genotipik olarak %97.4 oranında birbirlerine benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Ramos ve ark. (2012) hastalık etmeninin epidemiyolojisini, bitki üzerinde herhangi bir yara olmadığı takdirde patojenin bitkiye giriş yapamadığını, enfekteli ağaçların üzerinde bulunan urlarda canlılığını sürdürebildiğini ve asla uzun süre toprakta yaşamını sürdüremediğini belirtmiştir. Enfekteli bitkilerden sağlıklı bitkilere yağmur, rüzgar, böcek ve insan hareketleriyle yayılmakta ve yaralardan enfeksiyon gerçekleştirebildiğini bildirmiştir. Bir zeytin üretim alanında tek bir ağacın enfekteli olması durumunda bir yıldan kısa bir süre içerisinde bahçenin tamamına yayılabileceğini ve enfekteli ağaçlarda bulunan bakterinin yağmurlu ve ılık geçen aylarda maksimum popülasyona ulaşabildiğini saptamışlardır.

Hastalık Epidemiyolojisi

Bitki üzerindeki yaralar; bitkiye uygulanan kültürel işlemler esnasında ve sıklıkla zeytin hasadı sırasında meydana geldiği gibi rüzgar, dolu, şiddetli yağmur gibi iklim faktörlerinden dolayı da oluşabilmektedir. Bu yaralardan enfeksiyon sonucunda bakteri tarafından hastalandırılmış dokularda gözle görülebilir urlar oluşturmaktadır (Alvarez ve ark. 1998).

Hastalık özellikle ana dal ve sürgünlerde ur oluşumuna neden olmaktadır. Bunun yanında kök, kabuk, yaprak, yaprak sapı ve meyve dalında da ur oluşumuna neden olabilmektedir. Urlar başlangıçta yumuşak ve sarımsı olmasına karşın daha sonra sertleşir ve kahverengi nekrotik alanlar şeklinde görüntü almaktadır (Janse, 2006).

Hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* dünyada zeytin yetiştirilen hemen hemen her yerde görülmektedir. Amerika, Arjantin, Avusturya, Avustralya, Brezilya, Cezayir, Fas, Fransa, Güney Afrika, Hollanda, Irak, İngiltere, İran, İsrail, İspanya, İsveç, İsviçre, Kolombiya, Kıbrıs, Yunanistan, Libya, Meksika, Yeni Zelanda, Peru, Polonya, Rusya, Tanzanya, Tunus, Türkiye, Uruguay, Yugoslavya gibi çok geniş ülkelerde hastalık tespit edilmiştir (Janse, 2006).

Ülkemizde bu hastalığın, zeytinlerde varlığı uzun zamandır bilinmesine rağmen ilk çalışmalar Ege bölgesinde Azeri (1993), 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.

Marmara Bölgesinde Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Tekirdağ ve Yalova illerindeki zeytin üretim alanlarında survey yapılarak dal kanseri hastalığının yaygınlığı araştırılmıştır.

Hastalığın üretim alanlarında yaygınlığı % 15-100 arasında değişmekle birlikte ortalama % 57 olarak belirlenmiştir. İllere göre hastalığın yaygınlık oranı; Balıkesir % 56, Çanakkale % 73, Tekirdağ % 30 olarak saptanmıştır. Sofralık Gemlik çeşidinin üretildiği Bursa ve Yalova’ da hastalığa rastlanılmamıştır. Yağlık çeşitlerin üretildiği Mudanya’ da ise hastalık % 2-5 arasında değişen oranlarda saptanmıştır (Mirik ve ark. 2007).

2.2. Bitki Ekstratları ve Uçucu Yağlar İle Yapılan Çalışmalar

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*’ ye karşı bitki ekstratları ve uçucu yağların etkisini ortaya koyan beş adet çalışma bulunmaktadır. Bunlara aşağıda yer verilmiştir. Ayrıca bu yüksek lisans çalışmasında kullanıldığımız 21 farklı bitki ekstratları ve uçucu yağların farklı bitki patojeni bakterilere etkisini ortaya koyan önceki çalışmalarda aşağıda yer verilmiştir.

Sakız ağacı (*Pistacia atlantica*), Antep fıstığı (*Pistacia vera*), Brezilya biber ağacı (*Schinus terebenthifolius*), Peru biber ağacı (*Schinus molle*)’ nin yaprak ekstraktlarının *Agrobacterium tumefaciens* ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ye karşı antibakteriyel etkisi üzerine yapılan çalışmada Sakız ağacı (*Pistacia atlantica*) ve Peru biber ağacı (*Schinus molle*)’nin bakterilerin gelişmesini engellemişlerdir. Yapılan kimyasal analizleri sonucunda yaprak ekstraktlarının tanin, flavanoids ve alkaloidlerden meydana geldiği belirlenmiştir (Rhouma 2009).

Bendaoud ve ark. (2009) okaliptüs (*Eucalytus radiata*)’tan elde ettikleri uçucu yağ bakteriyel (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) ve fungal (*Fusarium solani* ve *Rhizoctonia solani*) patojenlere karşı etkinliklerini denemişlerdir. Antibakteriyel etki olarak 750 ve 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$ dozunda uygulama yapılmasına rağmen *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ye göre daha hassas olmasından dolayı etkisi yüksek olmuştur. Benzer olarak aynı dozların uygulandığı fungal etmenlerden *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*’ye göre daha çok etkilenmiştir.

Krid ve ark. (2011) zeytin alt suyu ve bundan elde edilen fenolik ekstraktların *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ye karşı *in vitro* ve bitki üzerinde etkinliğini araştırmışlardır. *In vitro* koşullarda hastalık etmeninin gelişimini tamamen durdurduğunu saptamışlardır. Bitki denemelerinde kullandıkları 100, 500 ve 1000 mg L^{-1} dozlarının sürgünlerde ur oluşumunu engellediğini belirtmişlerdir. Zeytin alt suyuna yapılan GS/MS analizleri sonucunda yüksek oranda hydroxytyrosol bulunduğu, bunun yanında tyrosol, catechol, caffeic acid ve *p*-coumaric asidin bulunduğu saptanmıştır. Bu kimyasalların

antibakteriyel etkilerinin olduğu düşünöldüğü ve bundan dolayı etkinin yüksek olduğu belirtilmektedir. Bakır uygulamaları ile fenolik bileşikler kıyaslandığında daha az etkili olduğu belirtmişlerdir.

Okan ve ark (2011) Keten (*Linum usitatissimum*), Pavlonya (*Pavlonia tomentosa*), Enginar (*Cynara scollymus*), Rezene, (*Feoniculum vulgare*), Fesleğen (*Ocimum basillicum*), Sınır otu (*Plantago mayor*), Antep fıstığı (*Pistacia vera*), Ceviz (*Juglans regia*), Zeytin (*Olea europaea*), Hint yağı (*Ricinus communis*), Nar (*Punica granatum*), Çayır düğmesi (*Sanguisorba officinalis*), Sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), Meşe palamudu (*Quercus spp.*), İğde (*Elaeagnus pungens*), Sığır kuyruğu (*Verbascum spp.*)'nın *In vitro* da *Pseudomonas savastanoi*'ye ve *Agrobacterium vitis*'e etkisini araştırmışlardır. *Pseudomonas savastanoi*'ye Çayır düğmesi (*Sanguisorba officinalis*)'in ve *Agrobacterium vitis*'e ise Çayır düğmesi (*Sanguisorba officinalis*), Ceviz (*Juglans regia*), Meşe palamudu (*Quercus spp.*), Antep fıstığı (*Pistacia vera*), Hint yağı (*Ricinus communis*) ve Nar (*Punica granatum*) den elde edilen ekstraktların antibakteriyel etkilerinin bulunduğıu belirlemiştir.

Trigui ve ark. (2013) kına (*Lawsonia inermis*) yaprak ekstraktını bitki patojeni olan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ve *Agrobacterium tumefaciens*'e karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda test etmişlerdir. Kloroform ve etil asetat ile yapılan yaprak ekstraktlarında hastalık etmenlerinin gelişmesini engellemiştir. Bitki denemelerinde etil asetat ile yapılan yaprak ekstraktlarında farklı konsantrasyonlarda (0.4, 0.2, 0.1 ve 0.05 mg/yara) zeytin dallarında ura neden olan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ve domates bitkilerinde ise *Agrobacterium tumefaciens*'in neden olduğu ur oluşumlarını engellenmiştir. Ayrıca etil asetat ile yapılan yaprak ekstraktının kimyasal analizinde gallik asit, lalioside, glukoz, apigenin, luteolin gibi farklı fenolik ve fenolik glikozit bileşikleri belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan bitki ekstrakt ve uçucu yağlarının diğer bitki patojeni bakterilere etkisi

Basım ve ark. (2000) Kekik (*Tymbra spicata* var. *spicata*)'den elde edilen uçucu yağın etkisini, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *E. caratovora* pv. *caratovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gibi bazı bitki patojeni bakterilere karşı denemiş ve çalışma sonunda uçucu yağın antibakteriyel etkisinin olduğunu belirlemiştir.

Başer ve ark. (2001) çeşitli bölgelerden toplanan yedikekik (*Satureja wiedemannian*) uçucu yağının karvakrol ve timolün içeriğinin patojen mikroorganizmaların inhibisyonu açısından güçlü bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Mirik ve Aysan (2002), domates ve biberde bakteriyel leke hastalığına neden olan *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'nın tohum kökenli inokulumuna turp (*Raphanus raphanistrum*), nane (*Mentha piperita*), sarımsak (*Allium sativum*), zakkum (*Nerium oleander*), okaliptüs (*Eucalyptus* sp.), yalancı karabiber, menengiç (*Pistacia terebinthus*), kuru soğan (*Allium cepa*), çam (*Pinus sylvestris*), marata (*Clematis marata*) ve biberiye (*Rosmarinus officinalis*) bitki ekstraktlarının, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda iki farklı sterilizasyon yöntemi kullanarak etkisini araştırmışlardır. Sarımsak ve okaliptüs ekstraktları *in vitro* koşullarda patojenin gelişimini engellerken, *in vivo* denemelerde ise hastalık oluşumu okaliptüs ekstraktı % 100, sarımsak ekstraktı % 95 oranında engellemiştir. Ayrıca hastalık şiddetine olan etkileri değerlendirildiğinde okaliptüs ekstraktının etkisi % 100 iken sarımsak ekstraktının etkisinin ise % 24 olarak belirlemişlerdir.

Basım ve Basım (2003) Gül (*Rosa damascena*)' den elde edilen uçucu yağın antibakteriyel etkinliğini araştırdıkları çalışmada *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*'ya karşı yapılan disk difüzyon testi sonucunda bakteriyel etmenin gelişimini engellediğini belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar *Rosa damascena*'dan elde edilen uçucu yağın bakteriyel hastalıklara karşı bakterisit olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

Daferera ve ark. (2003) güveyotu (*Origanum vulgare*), geyik otu/giritotu (*Origanum dictamnus*), mercanköşk (*Origanum majorana*), kekik (*Thymus capitatus*), lavanta (*Lavandula angustifoli*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), adaçayı (*Salvia fruticosa*) ve yarpuz (*Mentha pulegium*) gibi bitkilerin uçucu yağları, domateste patojen olan *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. ve *Clavibacter michigenensis* subsp. *michigenensis*'ye karşı etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda güveyotu, kekik, dictamnus ve mercanköşk uçucu yağları düşük konsantrasyonlarda (85-300µg/ml) dahi testlenen 3 patojenin gelişimlerini tamamen durdurmuştur. Lavanta, biberiye, adaçayı ve yarpuz ise daha az etki göstermiştir.

Şahin ve ark. (2003), Çibriska'dan (*Satureja hortensis*) elde ettikleri ekstratı, klinik ve bitki patojeni olan 55 adet bakteriye karşı denemişlerdir. Deneme sonunda bitki ekstratının klinik bakterilere karşı etkili olduğu, yeni bir ilaç yapımında ve tedavide kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak, bitki patojeni bakterilere karşı deneme sonuçlarının *Clavibacter*,

Pseudomonas ve *Xanthomonas* cinsine ait bakterilerde ekonomik önemde olmadığını bildirmişlerdir.

Curtis ve ark. (2004) sarımsak ekstratının bitki patojen organizmalara karşı etkisini *in vitro*'da test etmiştir. *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* adlı bitki patojenlerine karşı etkili olduğunu saptamıştır.

Talas-Oğraş ve ark. (2005) Salkım ağacı (*Robinia pseudoacacia*) tohumundan elde edilen cationic peptitin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ve *Escherichia coli* gibi bazı bakterilerin gelişimlerini engellediğini bildirmiştir.

Domateste *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatora* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* sera ve arazi koşullarında önemli kayıplara neden olan bakteriyel etmenlerdir. Bu hastalık etmenlerine karşı *Allium sativa* (Sarımsak) ve *Ficus carica* (İncir) ekstratlarının uygulanması sonucunda hastalık oranını % 58 ve %30, hastalık şiddeti ise % 68 ve % 30 oranında azalmıştır. Standart bakır uygulamaları ile karşılaştırıldığında *Allium sativa* (Sarımsak) %65 ve *Ficus carica* (İncir) ise %38 oranında hastalığı engellemiştir. *Allium sativa* ve *Ficus carica* ekstratlarının antibakteriyel etkisinin domateste bakteriyel hastalık etmeni olan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatora* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' e karşı serada başarılı şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir (Balestra ve ark. 2009).

Hong ve ark. (2011) kekikten elde ettikleri thymol fenolik bileşik ve asibenzolar-S-methyl'i tek tek ve karışım olarak *Ralstonia solanacearum*'a karşı etkinliklerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda sadece thymol kullandıklarında hastalığı %30 görülürken thymol ve asibenzolar-S-methyl karışımı uygulandığında hastalık oranı %19 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda uygulamalar sonucunda üründe de önemli seviyede artış görülmüştür. Araştırmacılar dayanıklı domates çeşidi ile birlikte bu kimyasalların kullanımı ile hastalık etmenlerine karşı mücadelenin başarılı olacağını bildirmişlerdir.

Lucas (2012) Karanfil (*Syzygium aromaticum*), tarçın, limon otu (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf), okaliptus (*Eucalytus gunii* Hook), kekik (*Thymus vulgaris* L.) ve çay otu (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) uçucu yağlarının *Xanthomonas vesicatora*'nın gelişimine

ve domates bakteriyel lekesinin şiddeti üzerine etkilerini araştırmışlardır. *In vitro* da bütün uçucu yağlar etkili olurken sera koşullarında da benzer olarak hastalık şiddetini azalttığı görülmüştür.

Mbega ve ark. (2012) Tanzanya’da domateslerdeki bakteriyel leke hastalığına karşı 84 farklı bitkinin [Adaçayı (*Salvia officinalis* L.), adi yonca (*Medicago sativa* ssp. *sativa* L.), aksöğüt (*Salix alba* L.), aciağaç (*Quassia* sp.), ayrik otu (*Agropyron repens* L.), ağaç minesini (*Lantana camara* L.), avakado (*Persea americana* L.), akdiken (*Frangula alnus* Mill.), Agapanthus (*Agapanthus* sp.), avize ağacı (*Yucca* sp.), ayrik otu (*Agropyron repens* (L.) Beauv.), alman papatyası (*Matricaria chamomilla* L.), atkuyruğu (*Equisetum arvense* L.), aloevera (*Aloe vera* L.), andızotu (*Inula helenium* L.), Adam’s needle (*Yucca filamentosa* L.), ardıç (*Juniperus communis* L.), akhardal (*Sinapis alba* L.), asma anacı (*Vitis vinifera* L.), andızotu (*Inula helenium* L.), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), çay (*Camellia sinensis* L.), çarkıfelek (*Passiflora incarnata* L.), çuhaçiçeği (*Primula veris* L.), çayır üçgülü (*Trifolium pratense* L.), çemenotu (*Trigonella foenum-graecum* L.), deniz yosunu (*Fucus vesiculosus* L.), dikenli kayışkıran (*Ononis spinosa* L.), ebegümece (*Malva sylvestris* L.), ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer.), ginko (*Ginkgo biloba* L.), hindiba (*Cichorium intybus* L.), irlanada yosunu (*Chondrus crispus* L.), ısırgan otu (*Urtica* sp.), kırmızıbiber (*Capsicum frutescens* L.), kayın ağacı (*Betula pendula* Roth.), kahve (*Coffe arabica* L.), karanfil (*Caryophyllus aromaticus* L.), kinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.), kekik (*Thymus vulgaris* L.), kinin (*Cinchona pubescens* Vahl.), kereviz (*Apium graveolens* L.), kuzudili (*Plantago major* L.), karaağaç (*Ulmus campestris* L.), karakavak (*Populus nigra* L.), kazotu (*Pontentilla anserine* L.), kakule (*Ellettaria cardamomum* L.), limon otu (*Cymbopogon citratus* L.), meyankökü (*Glycyrrhiza uralensis* L.), meşe (*Quercus robur* L.), okalıptüs (*Eucalyptus globulus* L.), ökse otu (*Viscum album* L.), reyhan (*Ocimum basilicum* L.), mercan bitkisi (*Jatropha* sp.), mojave yucca (*Yucca schidigera* L.), mürver ağacı (*Sambucus nigra* L.), nar (*Punica granatum* L.), Nor-grape 80 (*Vitis vinifera* L.), nemm (*Azadirachta indica* L.), papatya (*Bellis perennis* L.), sabunotu (*Saponaria officinalis* L.), sedefotu (*Ruta graveolens* L.), sisal (*Agave sisalana* Perrine.), Soapbark (*Quillaja saponaria* Molina.), suyarpuzu (*Mentha aquatica* L.), solucanotu (*Tanacetum vulgare* L.), sarıçam (*Pinus sylvestris* L.), soğan (*Allium cepa* L.), taş anasonu (*Pimpinella saxifraga* ssp. *nigra* (Mill)), üçgül (*Trifolium repens* L.), yayla muzu (*Rheum palmatum* L.), yaban mersini (*Vaccinium myrtillus* L.), zerdeçal (*Curcuma longa* L.), zencefil (*Zingiber officinale* Rosc.), zeytin (*Olea europaea* L.)] ekstraktının etkisini araştırmıştır. Tohum uygulaması olarak aloevera (*Aloe vera* L.), adaçayı (*Salvia officinalis*

L.), kayın ağacı (*Betula pendula* Roth.), kahve (*Coffe arabica* L.), meyanökü (*Glycyrrhiza uralensis* L.), ardıç (*Juniperus communis* L.), reyhan (*Ocimum basilicum* L.), meşe (*Quercus robur* L.), yayla muzu (*Rheum palmatum* L.), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), sedefotu (*Ruta graveolens* L.), akhardal (*Sinapis alba* L.), mojave yucca (*Yucca schidigera* L.) bitkilerinden elde edilen ekstraktları en etkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle aloevera (*Aloe vera* L.), kahve (*Coffe arabica* L.) ve mojave yucca (*Yucca schidigera* L.) bakteriyel leke hastalığını tamamen engellemiş ve tohumun çimlenmesine ise herhangi bir olumsuz etkileri olmamıştır.

Kotan ve ark. (2013) *Satureja hortensis* (cibrişka)'den elde ettikleri ekstrakt ve uçucu yağını *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians* karşı domates ve marul tohumlarında dezenfaktan olarak denemişlerdir. Uçucu yağ petri denemelerinde çok etkili bulunurken ekstrak daha az etkili olmuştur. Tohum uygulamalarında çimlenmeye olumsuz bir etki bulunmamasının yanında hastalık oranında düşüş ve bitkilerde kök ve yeşil aksamında bir artış tespit edilmiştir.

3. MATERYAL-METOD

3. 1. MATERYAL

TUBITAK TOVAG-106O196 nolu proje kapsamında izole edilen ve tanıları yapılmış olan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları, CFPB 1672 referans izolat, besi yerleri, çeşitli kimyasallar, laboratuvar malzemeleri, inkübatör, etüv, otoklav, pH metre, spektrofotometre, ticari olarak alınan Adaçayı (*Salvia* spp. Mecitefendi), Anason (*Pinpinella anisum*, Mecitefendi) , Aloevera (*Aloe vera*, Destek), Aspir (*Carthamus tinctorius*, Destek), Bergamut (*Citrus bergamia*, Nurs Lokman Hekim), Biberiye (*Rosmarinus officinalis*, Mecitefendi), Defne (*Laurus nabilis*, Mecitefendi), Isırgan tohumu (*Urtica diolca*, Nurs Lokman Hekim), Karanfil (*Caryophyllus aromaticum*, Mecitefendi), Kantaron (*Hypericum perforatum*, Nurs Lokman Hekim), Karabaş (*Lavandula stoechas*, Mecitefendi), Kekik (*Tymus vulgaris*, Destek), Kimyon (*Carum carvi*, Nurs Loman Hekim), Lavanta (*Lavandula officinalis*, Nurs Lokman Hekim), Melissa (*Melissa officinalis*, Nurs Lokman Hekim), Mersin (*Myrtle* sp. Mecitefendi), Nane (*Mentha piperita*, Mecitefendi), Okaliptüs (*Eucolyptus globus*, Nivalis), Rezene (*Foeniculum vulgare*, Mecitefendi), Papatya (*Matricoria chamomilla*, Nurs Lokman Hekim), Sarımsak (*Allium sativum*, Nivalis) bitkilerinin uçucu yağları bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

3. 2. METOD

3. 2. 1. Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi

Derin dondurucuda gliserol içerisinde saklanan 34 adet *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* bölge izolatları ve CFPB 1672 kodlu referans izolatın geliştirilmesi için King B (20g Proteose peptone, 1.5 g K₂HPO₄3H₂O, 1.5 g MgSO₄7H₂O, 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 alınmış ve tanı testleri için kullanılmıştır (Lelliot ve Stead 1987).

3. 2. 2. Patojenite Testi ve Re-izolatların Eldesi

Patojenite testi, izole edilen bakterinin patojenite özelliğini gösteren bir yöntemdir ve etmenin kesin tansını yapmak için gereklidir. Nutrient agar besi yerinde geliştirilen 24 saatlik bakteri izolatlarının 10⁸ hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyonu Tutku Fidancılık-Tekirdağ firmasından 1 yaşındaki sağlıklı Edremit çeşidi zeytin fidanlarında açılan yaralardan bir injektör yardımıyla inokule edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril su, pozitif kontrol olarak

CFPB 1672 (INRA-Fransa, Dr. Cindy Morris, zeytin izolatu) kodlu *Pseudomonas savastanoi* izolatu kullanılmıştır. İnokulasyon bölgeleri 24 saat ıslak pamuk ve parafilm ile sarılarak 25°C ve %70 nem içeren sera bölmesinde muhafaza edilmiştir. Pozitif kontrolle bulaşık bitkilerde dıştan gözle görölür simptomlar oluşunca yaklaşık 2 ay sonra değerlendirme yapılmıştır (Janse 1981).

İnokulasyon yapılan Edremit zeytin fidanlarında oluşan yumuşak dokuya sahip, açık renkli urlar kesilerek incelemeye alınmıştır. Örnekler küçük parçalara ayrılmış ve %70 etil alkol ile yüzeyden dezenfeksiyon edilmiştir. Örnekler porselen havan içerisine konulmuş ve 2 ml steril saline buffer eklenerek süspansiyonlar hazırlanmıştır. Steril kabin içersine konulan havanlar 15-20 dakika bekletilerek bakterinin saline buffer süspansiyonuna geçmesi sağlanmıştır. Bekleme sonunda içerisinde King B agar bulunan petrilere üç çizgi yöntemine göre çizimler yapılmıştır (Janse 2006). 25°C’de 2 gün inkübasyondan sonra petriyer buz dolabının +4 kısmına alınmış ve 24 saatte orada inkübe edilmiştir. İzolasyon petriyeri 48 saatten fazla inkübatörde bekletilmesi durumunda Mirik ve ark. (2008) belirttiği gibi petri yüzeyinde sarı renkli saprofit bir bakteri gelişerek petriyeri kaplamakta ve patojeni izole etmeyi engellemektedir. PSF agar besi yerinde zayıf floresan tipte, küçük yuvarlak ve kabarık olmayan tipte gelişen koloniler saflaştırılmıştır. Yapılan tütünde HR pozitif olan izolatlarda cam tüplerde eğik olarak hazırlanmış yeast dekstroz kalsiyum karbonat agar (YDCA) besi yerine çizimleri yapılarak buzdolabında saklanmıştır.

3. 2. 3. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin Tanı Testleri

3. 2. 3. 1. Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi

Taze hazırlanan %3’lük potasyum hidroksit solüsyonundan lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* re-izolatları ve referans izolatu 24 saatlik kültüründen steril kürdanla alınarak solüsyona dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. 20-30 saniye sonra kürdan yukarı kaldırıldığında viskoz, yapışkanımış bir sünmenin oluşması gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sands 1990). Kontrol olarak Prof. Dr. Yeşim AYSAN’dan alınan gram pozitif özelliğe sahip Cmm 3a-r kodlu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kültürü kullanılmıştır.

3. 2. 3. 2. Levan Oluşumu

SNA besi yeri olarak adlandırılan, % 5 sukroz içeren nutrient agar (8 g Nutrient broth, 15 g, Agar, 50 g Sakkaroz, 1000 ml Saf su) ortamına çizgi şeklinde ekim yapılmıştır. 3-5 günlük inkübasyon sonra pozitif reaksiyon verenler beyaz mukoid, tümsek şeklinde koloni

oluşumuna göre değerlendirilmiştir (Schaad ve ark. 2001). Pozitif kontrol olarak Ziraat Yüksek Mühendisi Nesrin TUNALI' dan temin edilen *Erwinia amylovora* 57 izolatu kullanılmıştır.

3. 2. 3. 3. Oksidaz Testi

Taze hazırlanan %1'lik N; N; N; N; Tetra methyl-p-phenyldiamine dhydrochloride solüsyonu steril filtre kağıdına damlatılmıştır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* re-izolatları ve referans izolatın 24 saatlik kültüründen steril kürdanla alınarak ıslak kurutma kağıdına çizildiğinde 10 saniye sonra bakteri kitlesi maviye dönüşürse pozitif, 60 saniye sonra maviye dönüşürse geç pozitif, 60 saniye sonra mavi renk oluşumu gözlenmez ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Kovaks 1956).

3. 2. 3. 4. Pektolitik Aktivite Testi

Patates yumruları yüzeysel dezenfeksiyon için önce deterjanlı fırçalanarak yıkanmış ve daha sonra %1 NaOCl'da 3 dakika bekletilmiştir. NaOCl'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemden sonra steril bir bisturi ile patates yumrularının kabukları soyulmuştur. İçerisinde steril nemli filtre kağıdı bulunan petri içerisine patates yumruları steril bir bıçakla 7-8 mm kalınlığında dilimlere ayrılarak konulmuştur. Bir öze dolusu bakteri kültürü patates dilimi üzerine bulaştırılmıştır. 25 °C'de 24-36 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmıştır. İnokule edilen bölgedeki yumuşama pozitif olarak değerlendirilmiştir. (Lelliot ve Stead 1987).

3. 2. 3. 5. Arginin Dihidrolase Testi

Test için içerisinde 1.0 g Peptone, 5.0 g NaCl, 0.3 g K₂HPO₄, 0.01 g Phenol red, 10 g L (+) Arginin HCL, 3 g Agar 1000 ml saf su konularak ortam ısıtılarak eritilmiş ve 35 °C'ye kadar soğuduktan sonra pH:7.2'ye ayarlanmıştır. 3 ml tüplere konulup 121 °C 15 dakika otoklav edilmiştir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* re-izolatları ve referans izolatın 24 saatlik kültürden yarma aşılama yapılmıştır. Üzeri 2 ml steril vaspar (Vaspar: 1 ölçü vazelin, 3 ölçü sıvı parafin. Eritilen vazeline parafin ilave edilir ve 121 °C 15 dakika otoklav edilir) ile örtülmüştür. Kontrol olraka 3 tüp aşılınmamıştır 10-12 günlük bir inkübasyondan sonra kırmızı renkteki kontrole göre vişne rengini veren kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliott ve Stead 1987).

3. 2. 3. 6. Tütün' de Aşırı Duyarlılık Testi (Hipersensitiv Reaksiyon: HR)

Tütün 3-4 yapraklı duruma geldiğinde Klement ve Goodman (1967) yöntemine göre 10^8 hücre/ml'lik bakteri süspansiyonunun çok ince uçlu enjektör yardımıyla yaprağın alt yüzeyindeki damar aralarındaki hücreler arasındaki alana enjekte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İnokule edilen kısımlarının 24-48 saat sonra nekroz görünüm vermesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3. 3. 4. Farklı Uçucu Yağların *In Vitro* Koşullarda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Gelişimine Antimikrobiyal Etkisi

Patojenin ml' deki Hücre Sayısının Belirlenmesi

King B besi yerinde (King ve ark 1954) geliştirilen 48 saatlik izolatlar spektrofotometrede 600 nm 0.3 ölçüm değerine ayarlanarak süspansiyonlar hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyonlardan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml nutrient broth bulunan tüplerde -6'e kadar seyreltme serileri yapılmıştır. Her bir seyreltmeden içerisinde PSF 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 ve ark. 1990).

Farklı bitki ekstraktlarından elde edilmiş olan uçucu yağların *Pseudomonas savastanoi* 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 (4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 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 *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin gelişimine antimikrobiyal etkisi kağıt disk yöntemiyle Mangama ve 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 nabilis*), Isırgan tohumu (*Urtica diolca*), 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 *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatının 24 saatlik kültüründen, 660 nm’ de 0.3 değerine ait 4×10^9 hücre/ml yoğunluktaki süspansiyondan 100 µl alınarak PSF besi ortamı bulunan petrilere baget 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 petrilere 25°C’de 48 saat inkubasyona bırakılmış ve oluşan inhibisyon zonları cetvetle ölçülerek değerler mm olarak kaydedilmiştir. Negatif kontrol olarak 100 µl steril su, pozitif kontrol olarak 100 µl streptomisin sülfat kağıt disklere emdirilmiştir. Deneme 3 tekrarlı ve her tekrarda 3 kağıt disk olacak şekilde kurulmuştur. Aynı işlemler patojen bakterinin 4×10^8 ve 4×10^7 hücre/ml yoğunlukları için de yapılmıştır. Çalışma sonunda, farklı uçucu yağların *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin üç farklı popülasyonuna olan antimikrobiyal etkisi ortaya konmuştur.

İkinci yöntem: sıvı besi yerine eklenen uçucu yağların *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ye antimikrobiyal etkisi Balestra ve ark. (2009)’e 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. *Pseudomonas savastanoi* 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 gelişen petrilere koloni sayımı yapılarak bakteri popülasyonu hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler \log_{10} tabanına çevrilmiştir. Deneme 3 tekrarlı olarak her tekrarda tek tüp olacak şekilde kurulmuştur. 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: otoklavdan sonra 48°C’ye soğutulmuş katı besi yerine eklenen uçucu yağların *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ye antimikrobiyal etkisi Balestra ve ark. (2009)’e 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.

Taze hazırlanan 9 ml King B besi yeri cam tüpler içerisinde otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan tüpler 48°C' deki su banyosuna konularak soğuması sağlanmıştır. Ilık besi yerleri steril kabinde içerisinde 25, 50, 75 ve 100 µl dozlarında uçucu yağlar eklenmiş ve vortekslenerek petrilere dökülmüştür. Hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatının 24 saatlik kültüründen, 4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml hücre/ml yoğunluktaki süspansiyonlarından 100 µl alınarak içerisinde uçucu yağ ve PSF besi ortamı bulunan petrilere baget ile yayılmıştır. Daha sonra petrilerin etrafı parafilmle sarılarak inkübatöre yerleştirilmiştir. 24 saat sonra petrilere bakteri gelişimleri değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4. 1. Bakteri Kültürlerinin Geliştirilmesi

Derin dondurucuda gliserol içerisinde saklanan 34 adet *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* bölge izolatları ve referans olarak kullanılan CFPB 1672 kodlu izolatın King B besi yerinde krem renkli floresan koloni gelişimleri gösteren izolatlar seçilerek alınmış ve çalışmada kullanılmıştır (Lelliot ve Stead 1987).

4. 2. Patojenite Testi ve Re-izolatların Eldesi

Nutrient agar besi yerinde geliştirilen 24 saatlik bakteri izolatların ve CFPB 1672 kodlu *Pseudomonas savastanoi* izolatı Edremit çeşidi zeytin bitkilerine inokule edildikten yaklaşık 2 ay sonra değerlendirme yapılmıştır Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi yara dokusunun etrafında açık yeşil veya açık kahve renkte, yumuşak ur belirtileri oluşmuştur. Ur belirtileri gösteren 34 izolatın patojenitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak çeşme suyuyla inokule edilen bitkilerde herhangi bir ur belirtisi gözlenmemiştir (Janse 1981). Bu yumuşak urlu dokulardan yapılan re-izolasyonlarda 68 adet re-izolat elde edilmiştir. İzolasyonlarda, petrilерinin 25°C'de 2 gün inkübasyonu takiben +4°C'deki buzdolabında 24 saat bekletilmesi Mirik ve ark. (2008)'nın da belirttiği gibi izolasyon petrisindeki sarı renkli saprofit bakteri gelişimini baskılayarak yavaş gelişen patojenin gelişimine müsaade etmiştir. Böylelikle patojen bakteri kolaylıkla izole edilmiştir. Elde edilen re-izolatlarla tanı çalışmaları yapılmıştır.

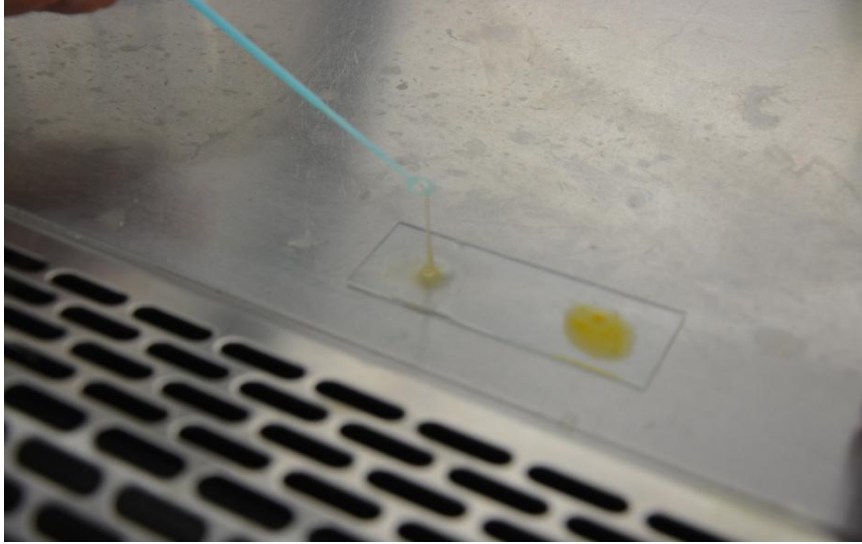


Şekil 4.1. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatının zeytinde oluşturduğu ur belirtileri

4. 3. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Tanı Testleri

4. 3. 1. Potasyum Hidroksit (KOH) ile Gram Reaksiyon Testi

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* re-izolatları ve referans izolatla yapılan KOH testi sonucunda özeye yapışarak sümüksü bir yapı oluşturmasından dolayı gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.2.). Karşılaştırma kültürü olarak kullanılan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'de ise sümüksü bir yapı gözlenmemiş olmasından dolayı gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.2. KOH testi sonucunda gram negatif kültürlerde oluşan sümüksü yapı

4. 3. 2. Levan Oluşumu

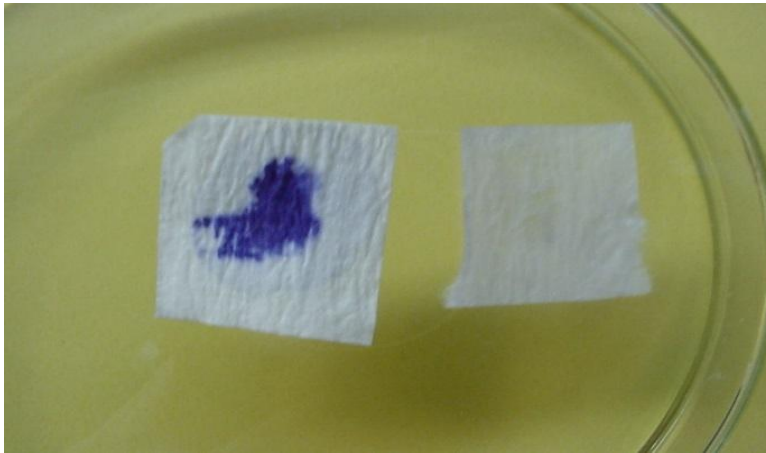
% 5 sukroz içeren nutrient agar ortamına ekimi yapılan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* re-izolatları ve referans izolat inkübasyon süresinin sonucunda petride beyaz mukoid, tümsek şeklinde koloni oluşturmamıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.3). Pozitif kontrol olarak Ziraat Yüksek Mühendisi Nesrin TUNALI' dan temin edilen *Erwinia amylovora* 57 izolatının kolonileri bu besi yerinde inci gibi beyaz ve tümsek şeklinde gelişmiştir.



Şekil 4.3. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatı (sağda) ve *Erwinia amylovora*'nın (solda) SNA besi yerinde gelişim

4. 3. 3. Oksidaz Testi

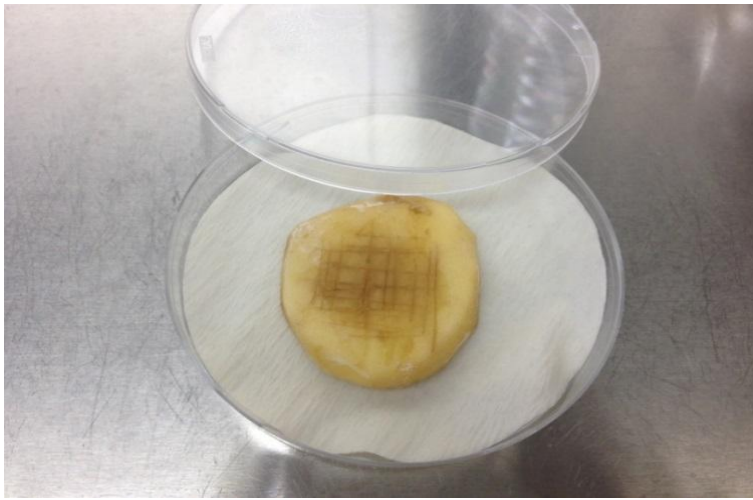
N; N; N; N; Tetra methyl-p-phenyldiamine dihydrochlorideden hazırlanan % 1' lik solüsyon kurutma kağıdı üzerine bir damla damlatılıp bakteri kültüründen kürdan yardımı ile filtre kağıdına, sürüldüğünde 60 sn içinde bir renk değişimi olmadığından dolayı oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4. 1, Şekil 4.4). Pozitif kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas cichori* kültürü bu süre içinde mor renkte bir değişime neden olmuştur.



Şekil 4.4. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatının oksidaz reaksiyonu

4. 3. 4. Pektolitik Aktivite Testi

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* re-izolatları ve referans izolatın hiçbiri pektolitik enzim üretmediğinden patates dilimleri üzerinde yumuşak çürüklük belirtisi oluşturmamıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.5). Pozitif kontrol olarak *Pectobacterium caratovorum* kullanılmıştır.



Şekil 4.5. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatının patates dilimlerinde pektolitik aktivite testi

4. 3. 5. Arginin Dihidrolase Testi

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* re-izolatları ve referans izolatın ekim yapılan tüplerin üzeri 1 ml mineral yağ ile kapatılmış ve 7-15 gün inkübatörde bekletildikten sonra tüplerde herhangi bir renk değişimi gözlenmemesinden dolayı negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatının arginin dihidrolase testi

4. 3. 6. Tütün' de Aşırı Duyarlılık Testi (HR)

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* re-izolatları ve referans izolatın tamamı, tütün yapraklarının damar aralarında 24 saat sonra su emmiş alanlar ve 48 saat sonra nekroz oluşturduğundan aşırı duyarlılık reaksiyonları pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1., Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatının tütün yaprak damar aralarında oluşturduğu tipik aşırı duyarlılık reaksiyonu

Tanı testleri sonucunda 34 re-izolatın tümü, gram negatif özellikte, SNA besi yerinde levan tipte olmayan koloni üretmiş, oksidaz reaksiyonu, patates dilimlerinde pektolitik aktivite ve arginin dehidrolaz aktivitesi negatif olarak saptanırken tütün damar aralarında aşırı duyarlılık reaksiyonunun pozitif olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçlara göre zeytin dallarında ura neden olan bakteri LOPAT 1b grubundan bir bitki patojeni olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Patojenin tanılanmasında uygulanan testler

Uygulanan Testler	Test Sonuçları	
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> Re-izolatları	Referans İzolat (CFPB 1672)
Potasyum Hidroksit Testi (KOH)	Gram (-)	Gram (-)
Levan Oluşumu	-	-
Oksidaz Testi	-	-
Pektolitik Aktivite Testi	-	-
Arginin Dihiyrolase Testi	-	-
Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR)	+	+

4.4. Farklı Uçucu Yağların *In vitro* Koşullarda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Gelişimine Antimikrobiyal Etkisi

Patojenin ml' deki Hücre Sayısının Belirlenmesi

Spektrofotometrede 600 nm absorbansda 0.3 okuma değerinde hazırlanan bakteri süspansiyonununun -4, -5, -6 seyreltmelerinden besi yerine yapılan ekimlerde, Şekil 4. 9.'de de görüldüğü gibi sırasıyla 5000, 1000, 400 adet bakteri kolonisi sayılmıştır. Hesaplamalar -6 seyreltmesine göre yapıldığında $A_{600}:0.3$ okuma değerindeki bakteri popülasyonununun $(400 \times 10 \times 1000000 = 4 \times 10^9$ hücre/ml) 4×10^9 hücre/ml olduğu hesaplanmıştır. 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.

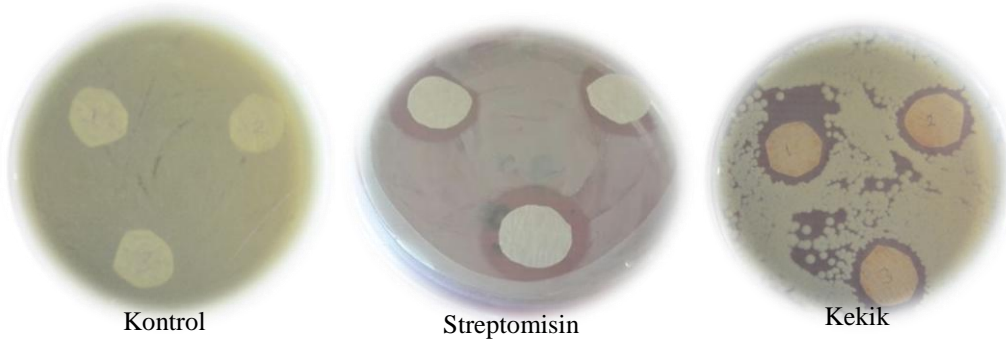


Şekil 4.8. $A_{600}:0.3$ okuma değerindeki bakteri popülasyonunun -4, -5, -6 seyreltmelerinde petride gelişen bakteri kolonileri

Birinci yöntem: Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi, farklı bitki ekstraktlarından elde edilen uçucu yağların, *Pseudomonas savastanoi* 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, okalüptüs, 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 *Pseudomonas savastanoi* 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.

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*'nin en yüksek popülasyonu olarak 4×10^5 hücre/ml kullanıldığında, kekik uçucu yağı 2.40 cm engelleme alanı (Şekil 4.9) oluşturarak en başarılı uçucu yağ olarak saptanmış ve bunu 1.11 cm'lik engelleme alanıyla karabaş kekik uçucu yağı izlemiştir. Patojen popülasyonu 4×10^4 hücre/ml'ye düştüğünde, antimikrobiyal etki gösteren uçucu yağ sayısı dörde çıkmış ve okalüptüs, karabaş, karanfil ile kekik uçucu yağlarında 0.32-3.60 cm arasında değişen engelleme zonları tespit edilmiştir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin 4×10^4 hücre/ml kullanıldığında, kekik uçucu yağında 3.60 cm'lik engelleme zonuyla en başarılı uçucu yağ olmuş bunu sırasıyla 1.60, 0.90 ve 0.32 cm'lik engelleme zonuyla karabaş kekik, karanfil ve okalüptüs uçucu yağı izlemiştir. Patojen popülasyonu 4×10^3 hücre/ml'ye düştüğünde, sonuçlar 4×10^4 hücre/ml popülasyonuyla benzer bulunmuştur. Aynı dört uçucu yağ daha yüksek oranda etki göstererek başarılı olmuştur. Kekik uçucu yağında 3.70, karabaş kekik uçucu yağında 2.60, karanfil uçucu yağında 1.30 ve okalüptüs uçucu yağında 1.00 cm'lik patojeni engelleme zonu ölçülmüştür. Patojen popülasyonu arttıkça uçucu yağların etkisinde azalma tespit edilmiştir. Bu durum pek çok

çalışmada da gösterilmiştir (Balestra ve ark. 2009). Başarılı bulduğumuz kekik ve karabaş kekiğin bakterilere karşı antimikrobiyal etkisini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Basım ve ark. 2000; Lucas 2012). Benzer şekilde kekik ve karabaş kekikten elde edilen uçucu yağın *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye antimikrobiyal etkisi bu çalışmayla ortaya konmuştur.



Şekil 4.9. Kekik uçucu yağının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin gelişimine antimikrobiyal etkisi

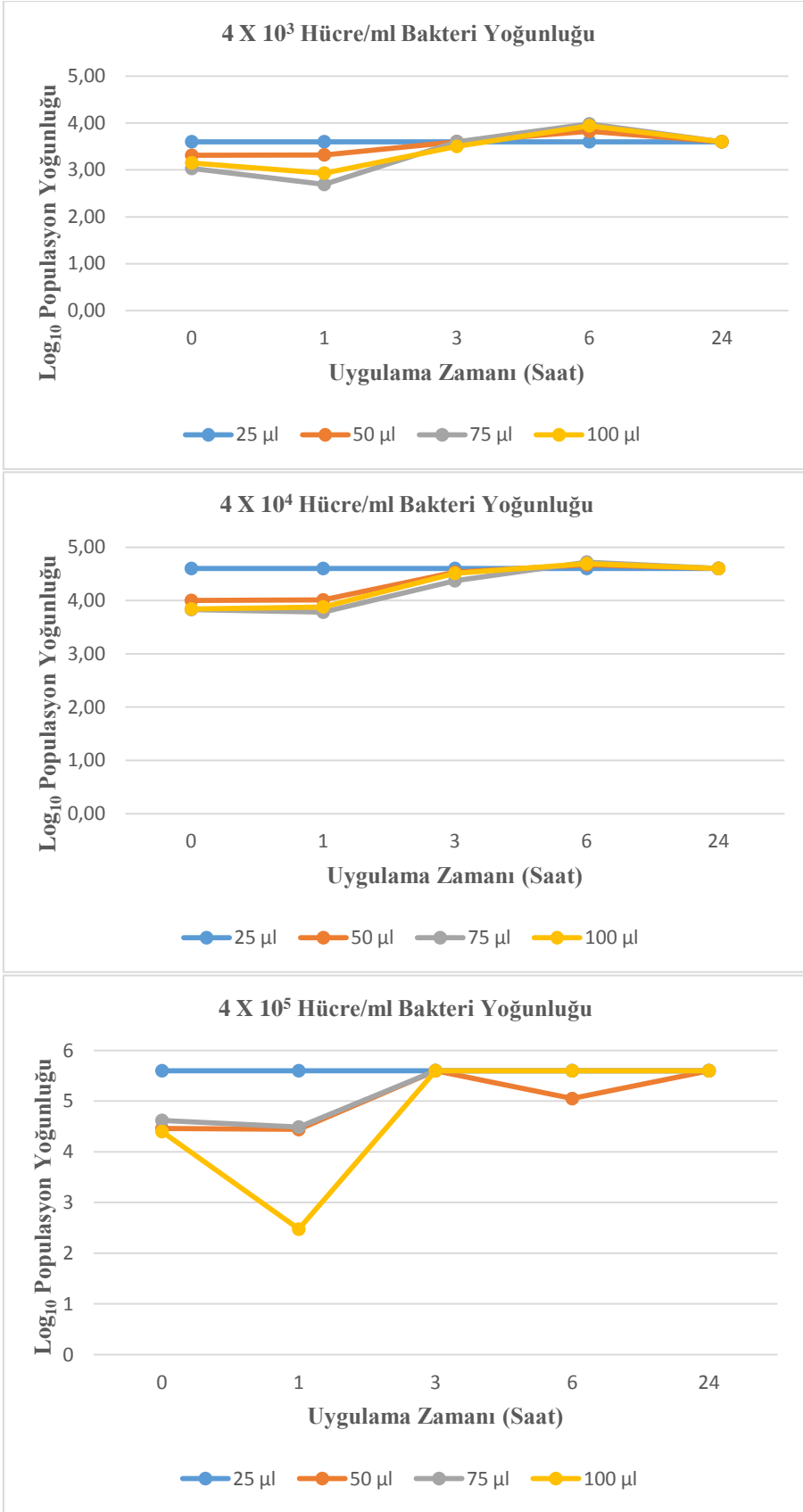
Çizelge 4.2. Farklı uçucu yağların kağıt disk yönteminde oluşturduğu inhibisyon zonları (mm)

Uçucu Yağlar	4x10 ³ hücre/ml	4x10 ⁴ hücre/ml	4x10 ⁵ hücre/ml	Uçucu Yağlar	4x10 ³ hücre/ml	4x10 ⁴ hücre/ml	4x10 ⁵ hücre/ml
Okaliptüs	1.00	0.32	0.00	Defne	0.00	0.00	0.00
Karabaş	2.60	1.60	1.11	Isırgan Tohumu	0.00	0.00	0.00
Karanfil	1.30	0.90	0.00	Kantaron	0.00	0.00	0.00
Kekik	3.70	3.60	2.40	Kimyon	0.00	0.00	0.00
Sarımsak	0.00	0.00	0.00	Lavanta	0.00	0.00	0.00
Adaçayı	0.00	0.00	0.00	Melisa	0.00	0.00	0.00
Anason	0.00	0.00	0.00	Mersin	0.00	0.00	0.00
Aloevera	0.00	0.00	0.00	Nane	0.00	0.00	0.00
Aspir	0.00	0.00	0.00	Rezene	0.00	0.00	0.00
Bergamot	0.00	0.00	0.00	Papatya	0.00	0.00	0.00
Biberiye	0.00	0.00	0.00				

İkinci yöntem: 4x10³ hücre/ml, 4x10⁴ hücre/ml ve 4x10⁵ hücre/ml yoğunluğundaki hazırlanan bakteri süspansiyonları içerisine eklenen farklı dozlarda eklenen uçucu yağlar *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin gelişmesini engellemiştir. Çizelge 4.3'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. Balestra ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada benzer sonuçları elde etmiştir. Her bakterinin 4x10³ hücre/ml, 4x10⁴ hücre/ml ve 4x10⁵ hücre/ml yoğunlukları içerisine 25, 50, 75 ve 100 µl uçucun yağ eklenmiş ve 0, 1, 3, 6 ve 24 saat sonra petrilere yayma yöntemine göre ekimleri yapılmıştır. Çizelge 4. 3.'de görüldüğü gibi uygulama dozundan ziyade uygulama zamanı uçucu yağın etkinliği üzerine etkisinin daha fazla olduğu saptanmıştır

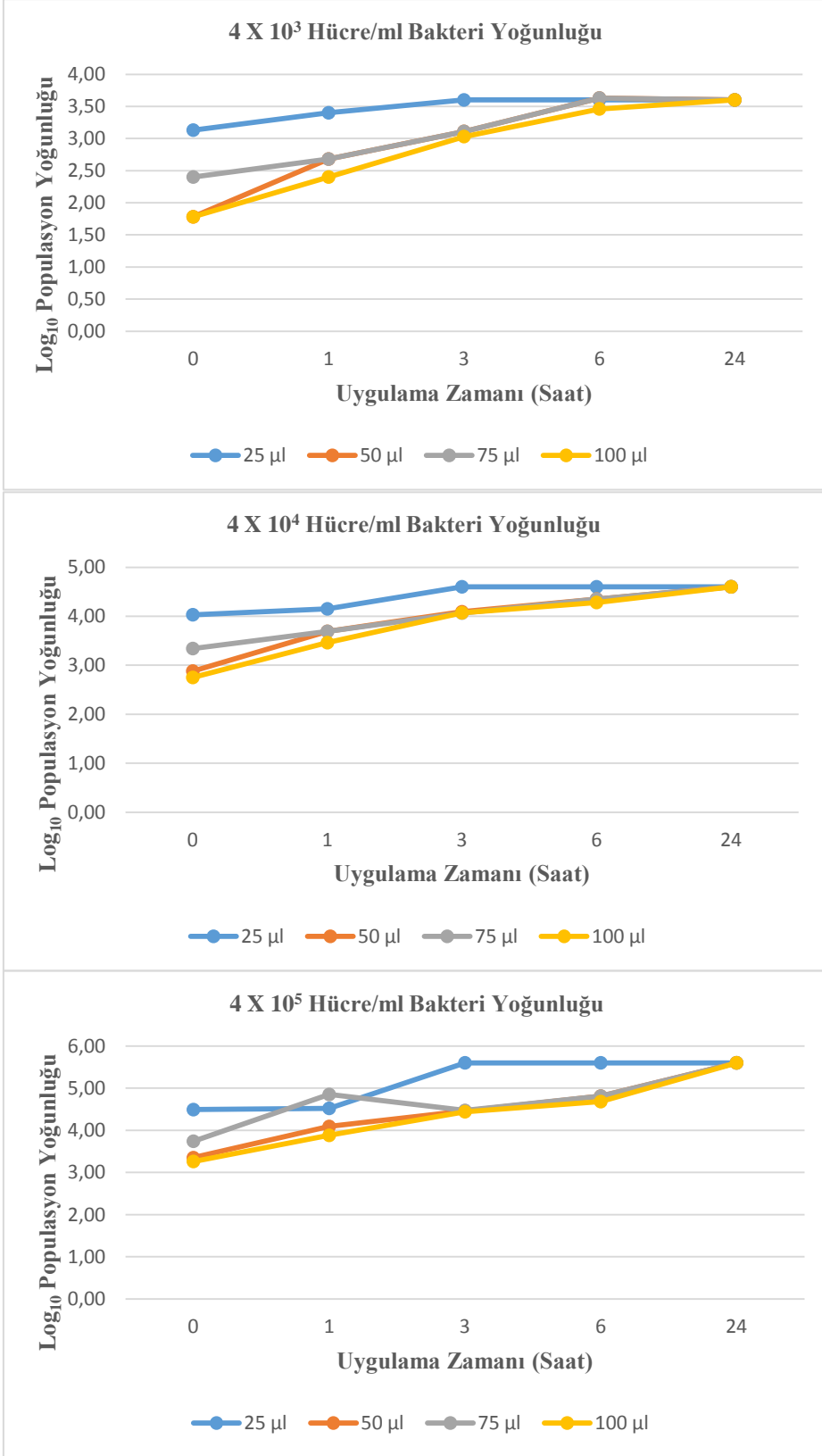
Çizelge 4.3. Uçucu yağların farklı doz ve sürelerinin sıvı besi yerindeki patojen popülasyonuna etkisi

Uçucu Yağlar	Saat	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	3.60	3.31	3.03	3.15	4.60	4.00	3.83	3.84	5.60	4.46	4.62	4.40
	1	3.60	3.32	2.69	2.93	4.60	4.01	3.78	3.88	5.60	4.44	4.49	2.47
	3	3.60	3.60	3.60	3.50	4.60	4.53	4.37	4.51	5.60	5.60	5.60	5.60
	6	3.60	3.82	3.98	3.94	4.60	4.67	4.72	4.69	5.60	5.05	5.60	5.60
	24	3.60	3.60	3.60	3.60	4.60	4.60	4.60	4.60	5.60	5.60	5.60	5.60
KARABAŞ	0	3.13	1.78	2.40	1.78	4.03	2.88	3.34	2.75	4.49	3.35	3.74	3.26
	1	3.40	2.68	2.68	2.40	4.15	3.69	3.69	3.46	4.52	4.09	4.85	3.88
	3	3.60	3.11	3.11	3.03	4.60	4.09	4.07	4.07	5.60	4.46	4.47	4.44
	6	3.60	3.63	3.63	3.46	4.60	4.35	4.35	4.28	5.60	4.81	4.81	4.68
	24	3.60	3.60	3.60	3.60	4.60	4.60	4.60	4.60	5.60	5.60	5.60	5.60
BERGAMOT	0	3.44	2.11	2.23	2.08	4.14	2.90	3.18	2.81	4.57	3.48	3.49	3.27
	1	3.20	2.36	2.15	2.79	4.10	3.02	2.78	2.68	4.56	3.61	3.41	3.34
	3	3.50	2.53	2.23	2.00	4.42	3.11	2.81	2.81	5.45	3.58	3.67	3.20
	6	3.60	2.56	2.26	1.90	4.43	3.34	3.03	1.60	5.60	3.90	3.67	3.20
	24	3.60	3.60	3.60	3.60	4.60	4.60	4.60	4.60	5.60	5.60	5.60	5.60
SARIMSAK	0	3.60	3.32	3.29	3.83	4.60	3.99	4.03	3.79	5.60	4.54	4.47	4.28
	1	3.60	3.41	3.24	3.00	4.60	4.04	4.01	3.87	5.60	4.50	4.45	4.38
	3	3.60	3.60	3.60	3.52	4.60	3.46	4.58	4.41	5.60	5.25	5.60	5.31
	6	3.60	3.60	3.60	3.60	4.60	4.60	4.60	4.60	5.60	5.60	5.60	5.49
	24	3.60	3.60	3.60	3.60	4.60	4.60	4.60	4.60	5.60	5.60	5.60	5.60
KARANFİL	0	2.84	1.90	2.84	2.73	3.64	2.90	3.12	3.43	4.18	3.71	3.70	3.94
	1	2.80	0.00	1.90	3.25	3.51	2.96	3.05	4.61	4.14	3.52	3.79	4.58
	3	2.65	2.28	3.15	2.38	3.62	3.11	3.21	3.91	3.98	4.53	3.89	4.76
	6	3.18	3.00	2.40	0.00	4.07	3.67	3.55	2.20	4.42	4.19	4.49	4.70
	24	3.60	3.60	3.60	3.60	4.60	4.60	4.60	4.60	5.60	5.60	5.60	5.60
KEKİK	0	2.20	0.00	0.00	0.00	3.48	0.00	0.00	0.00	4.48	2.86	0.00	0.00
	1	1.00	0.00	0.00	0.00	2.51	0.00	0.00	0.00	2.90	0.00	1.90	2.51
	3	1.48	0.00	1.00	0.00	2.72	0.00	0.00	1.90	3.11	2.20	2.60	2.20
	6	1.00	0.00	0.00	0.00	2.56	0.00	1.90	1.60	3.30	2.38	2.20	1.90
	24	1.95	0.00	1.48	0.00	2.72	0.00	0.00	2.08	4.18	2.38	2.81	4.51



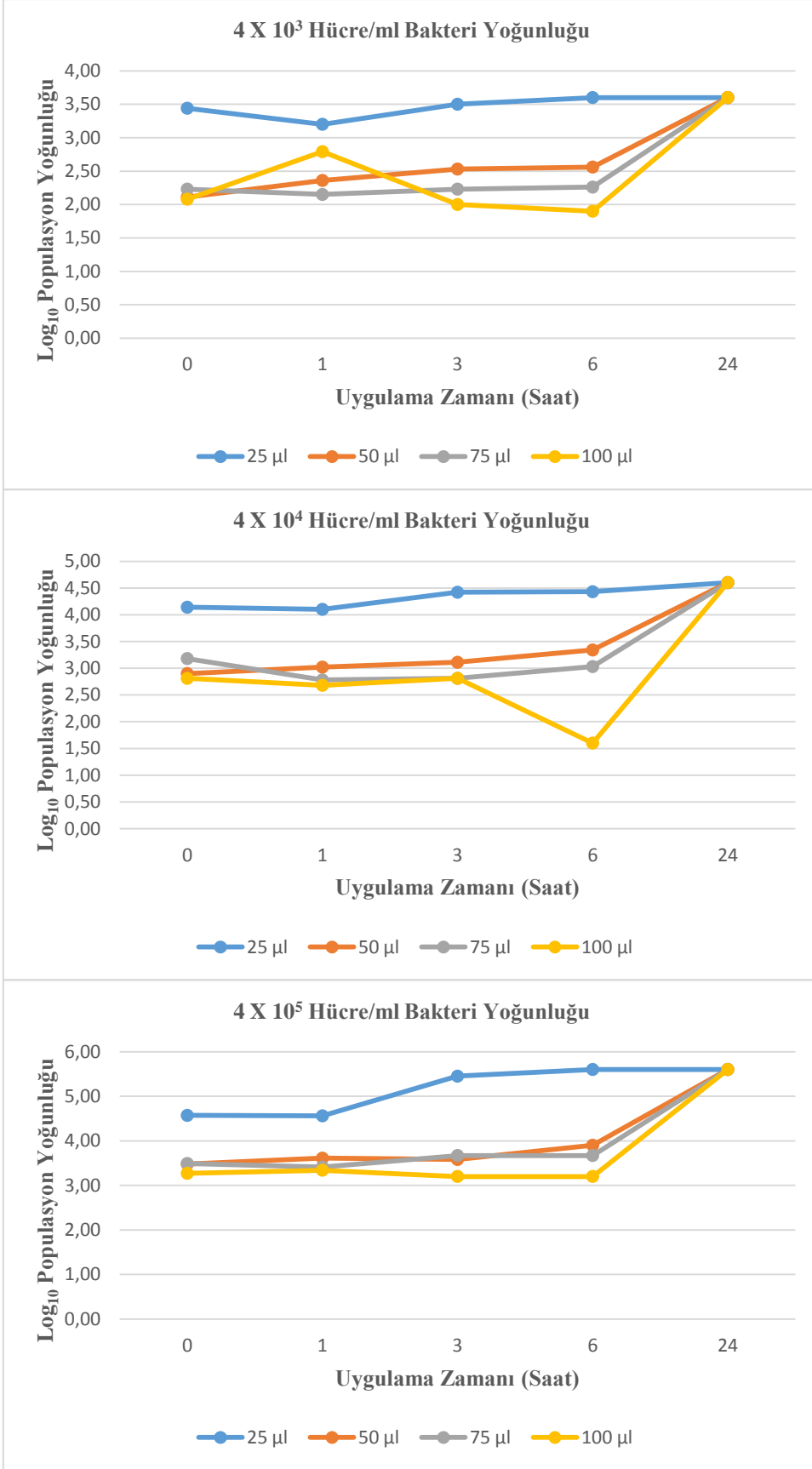
Şekil 4.10. Okaliptüs uçucu yağının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin populasyon yoğunluğuna etkisi

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.10'de görüldüğü gibi okaliptüs uçucu yağın 4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml yoğunluklarına uygulama dozlarının etkisine bakıldığında 25 µl dozu farklı zamanlarda ekim yapılırsa da etkisiz olduğu belirlenmiştir. 50, 75 ve 100 µl uygulamalarının hemen ve bir saat sonra yapılan yayma ekimi yapıldığında populasyon yoğunluğunu başlangıç populasyonuna göre azalttığı görülmüştür. 4×10^3 hücre/ml yoğunluğunda 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 3.31 ve bir saat sonraki yaymada ise 3.32, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 3.03 ve bir saat sonraki yaymada ise 2.69, 100 µl doz uygulamasında ise hemen yaymada populasyon 3.15 ve bir saat sonraki yaymada ise 2.93 olarak hesaplanmıştır. Uygulama zamanları olan 3, 6 ve 24 saat sonraki petri yayımlarında ise uygulanan tüm dozlarda herhangi bir etki görülmemiş, hatta populasyonda bir artış dahi olmuştur. 4×10^4 hücre/ml yoğunluğu 4×10^3 hücre/ml yoğunluğuna benzer olarak 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 4.00, ve bir saat sonraki yaymada ise 4.01, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 3.83 ve bir saat sonraki yaymada ise 3.78, 100 µl doz uygulamasında ise hemen yaymada populasyon 3.84 ve bir saat sonraki yaymada ise 3.88 olarak hesaplanmıştır. 4×10^5 hücre/ml yoğunluğunda ise 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 4.46 ve bir saat sonraki yaymada ise 4.44, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 4.62 ve bir saat sonraki yaymada ise 4.49, 100 µl doz uygulamasında ise hemen yaymada populasyon 4.40 ve bir saat sonraki yaymada ise 2.47 olarak hesaplanmıştır. Uygulama zamanları olan 3, 6 ve 24 saat sonraki petri yayımlarında ise bütün dozlarda herhangi bir etki görülmemiştir. Çizelge 4.3 ve Şekil 4.11'de görüldüğü gibi okaliptüs uçucu yağının süspansiyona eklendikten sonra hemen ve bir saate kadar etkinliğini sürdürürken 3 saat ve daha uzun sürede etkinliği ortadan kalkmaktadır. Bunun nedeni olarak, uçucu yağların süspansiyon içerisinden hızla buharlaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



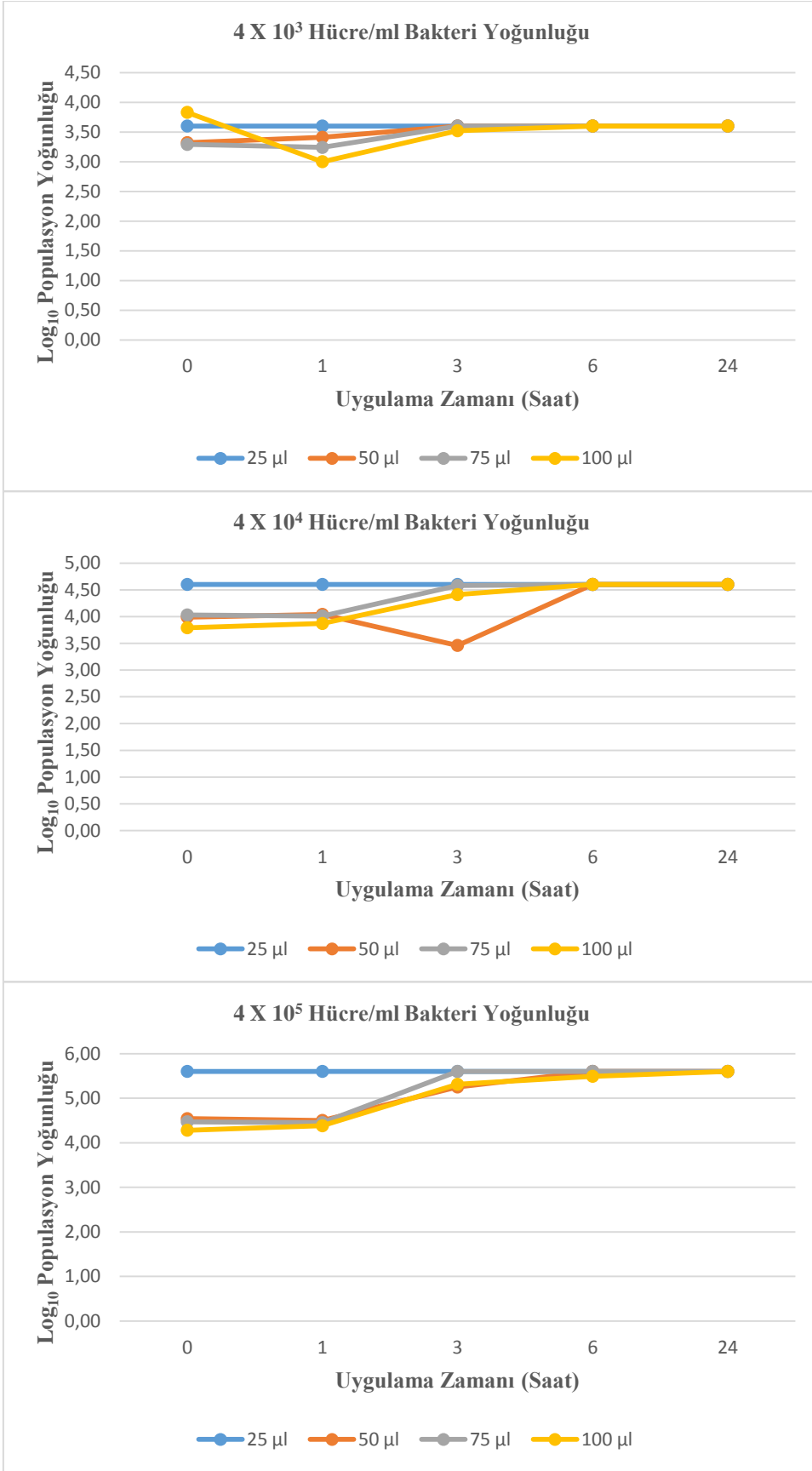
Şekil 4.11. Karabaş uçucu yağının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin popülasyon yoğunluğuna etkisi

Çizelge 4.3. ve Şekil 4.11.'de görüldüğü gibi karabaş uçucu yağın 4×10^3 hücre/ml yoğunluğuna uygulama dozlarının etkisine bakıldığında 25 µl dozu hemen ekim yapıldığında 3.13 ve bir saat sonraki yapılan yaymalarda ise 3.40 olarak hesaplanmıştır. 50 µl dozu hemen ekim yapıldığında 1.78, bir saat sonraki yapılan yaymalarda 2.68 olarak ve üç saat sonraki yapılan yaymalarda ise 3.11 olarak saptanırken 6 ve 24 saat sonra yapılan yaymalarda popülasyonda bir azalma gözlenmemiştir. 75 µl dozu hemen ekim yapıldığında 2.40, bir saat sonraki yapılan yaymalarda 2.68 olarak ve üç saat sonraki yapılan yaymalarda ise 3.11 olarak saptanırken 6 ve 24 saat sonra yapılan yaymalarda ise popülasyonda bir azalma belirlenmemiştir. 100 µl dozu hemen ekim yapıldığında 1.78, bir saat sonraki yapılan yaymalarda 2.40, üç saat sonraki yapılan yaymalarda 3.03 ve altı saat sonraki yapılan yaymalarda 3.46 olarak saptanırken, 24 saat sonra yapılan yaymalarda ise popülasyonda bir azalma gözlenmemiştir. 4×10^4 hücre/ml yoğunluğuna uygulama dozlarının etkisine bakıldığında 25 µl dozu hemen ekim yapıldığında 4.03 ve bir saat sonraki yaymada 4.15 hesaplanırken üç, altı ve 24 saat sonra yapılan yayma ekimlerinde bir etki görülmemiştir. 50 µl ve 75 µl doz uygulamasında bir saat ve altı saat sonra yapılan yayma ekimlerinde 3.69 ve 4.35 olarak aynı sonuçlar elde edilmiştir. Hemen yaymada populasyon 2.88, üç saat sonraki yaymada 3.69 ve altı saat sonraki yaymada ise 4.09 olarak hesaplanmıştır. Bunun yanında 50 µl dozun hemen yayma yapıldığında 2.88 iken 75 µl dozunda ise 3.34 olarak bulunmuştur. 100 µl doz uygulamasında ise hemen yaymada populasyon 2.75, bir saat sonraki yaymada 3.46, üç saat sonraki yaymada 4.07 ve altı saat sonraki yaymada ise 4.28 olarak saptanmıştır. 4×10^5 hücre/ml yoğunluğuna uygulama dozlarının etkisine bakıldığında 25 µl dozu hemen ekim yapıldığında 4.49 ve bir saat sonraki yapılan yaymalarda ise 4.52 olarak hesaplanmıştır. 50 µl hemen yaymada populasyon 3.35, bir saat sonraki yaymada 4.09, üç saat sonraki yaymada 4.46 ve altı saat sonraki yaymada ise 4.81, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 3.74, bir saat sonraki yaymada 4.85, üç saat sonraki yaymada 4.41 ve altı saat sonraki yaymada ise 4.81 olarak hesaplanmıştır. 100 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 3.26, bir saat sonraki yaymada 3.88, üç saat sonraki yaymada 4.44 ve altı saat sonraki yaymada ise 4.68 olarak saptanmıştır. Çizelge 4.3. ve Şekil 4.12'de görüldüğü gibi karabaş uçucu yağın süspansiyona eklendikten sonra 6 saate kadar karabaş uçucu yağın populasyon üzerine etki ettiği gözlenmiştir. Uygulama dozları yönünden karabaş uçucu yağın populasyon üzerine etkisine bakıldığında uygulama dozu arttığında etkisinde de artış olduğu gözlenmiştir.



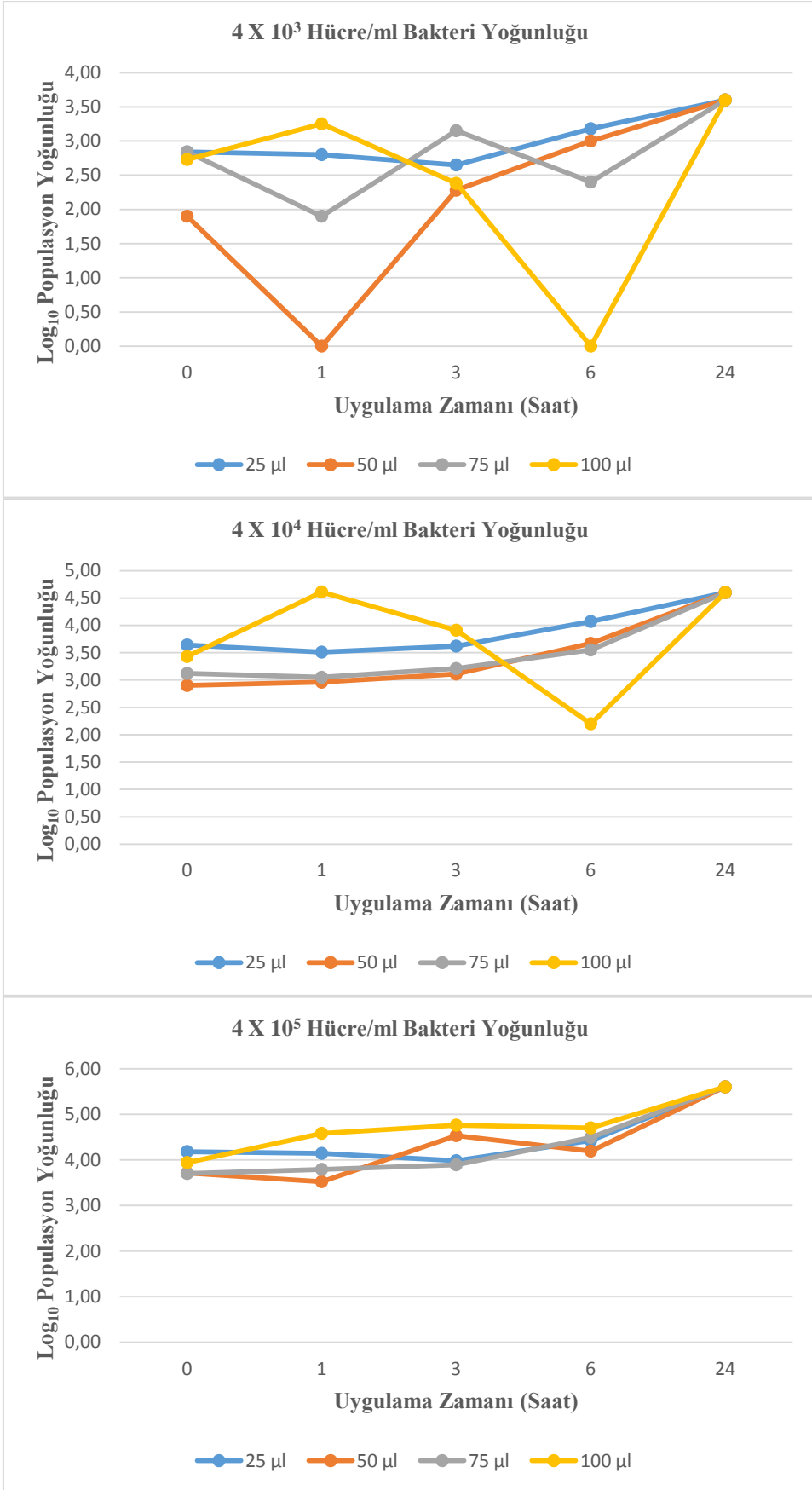
Şekil 4.12. Bergamot uçucu yağının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin popülasyon yoğunluğuna etkisi

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12’de görüldüğü gibi bergamot uçucu yağın 4×10^3 , 4×10^4 ve 4×10^5 hücre/ml yoğunluklarına uygulama dozlarının etkisine bakıldığında karabaş uçucu yağ uygulamasına benzerlik göstermektedir. 4×10^3 hücre/ml yoğunluğuna etkinliğine bakıldığında, 25 µl dozu hemen ekim yapıldığında 3.44 ve bir saat sonraki yapılan yaymalarda ise 3.20 olarak hesaplanmıştır. 50 µl hemen yaymada populasyon 2.11, bir saat sonraki yaymada 2.36, üç saat sonraki yaymada 2.53 ve altı saat sonraki yaymada ise 2.56 olarak, 75 µl hemen yaymada populasyon 2.23, bir saat sonraki yaymada 2.15, üç saat sonraki yaymada 2.23 ve altı saat sonraki yaymada ise 2.26 olarak saptanmıştır. 100 µl doz uygulamasında ise hemen yaymada populasyon 2.08, bir saat sonraki yaymada 2.79, üç saat sonraki yaymada 2.00 ve altı saat sonraki yaymada ise 1.90 olarak saptanmıştır. 4×10^4 hücre/ml yoğunluğuna etkinliğine bakıldığında, 25 µl dozu hemen ekim yapıldığında 4.14, bir saat sonraki yapılan yaymalarda 4.10, üç saat sonraki yaymada 4.42 ve altı saat sonraki yaymada ise 4.43 olarak hesaplanmıştır. 50 µl dozu hemen yaymada populasyon 2.90, bir saat sonraki yaymada 3.02, üç saat sonraki yaymada 3.11 ve altı saat sonraki yaymada ise 3.34, 75 µl hemen yaymada populasyon 3.18, bir saat sonraki yaymada 2.78, üç saat sonraki yaymada 2.81 ve altı saat sonraki yaymada ise 3.03 olarak saptanmıştır. 100 µl doz uygulamasında ise hemen yaymada populasyon 2.81, bir saat sonraki yaymada 2.68, üç saat sonraki yaymada 2.81 ve altı saat sonraki yaymada ise 1.60 olarak saptanmıştır. 4×10^4 hücre/ml yoğunluğuna etkinliğine bakıldığında, 25 µl dozu hemen ekim yapıldığında 4.57, bir saat sonraki yapılan yaymalarda 4.56 ve üç saat sonraki yaymada 5.45 olarak belirlenirken altı ve 24 saat sonraki yayma popülasyona etki etmemiştir. 50 µl hemen yaymada populasyon 3.48, bir saat sonraki yaymada 3.61, üç saat sonraki yaymada 3.58 ve altı saat sonraki yaymada ise 3.90 olarak, 75 µl hemen yaymada populasyon 3.49, bir saat sonraki yaymada 3.41, üç saat ve altı saat sonraki yaymada ise 3.67 olarak saptanmıştır. 100 µl doz uygulamasına bakıldığında hemen yaymada populasyon 3.27, bir saat sonraki yaymada 3.34, üç saat ve altı saat sonraki yaymada ise 3.20 olarak saptanmıştır. Çizelge 4.3. ve Şekil 4.13’de görüldüğü gibi bergamot uçucu yağının süspansiyona eklendikten sonra 6 saate kadar populasyon üzerine etki ettiği gözlenirken 24 saat sonra ekimde etki etmediği belirlenmiştir. Zaman arttıkça süspansiyon içerisinde bulunan uçucu yağın miktarının azaldığı düşünülmektedir.



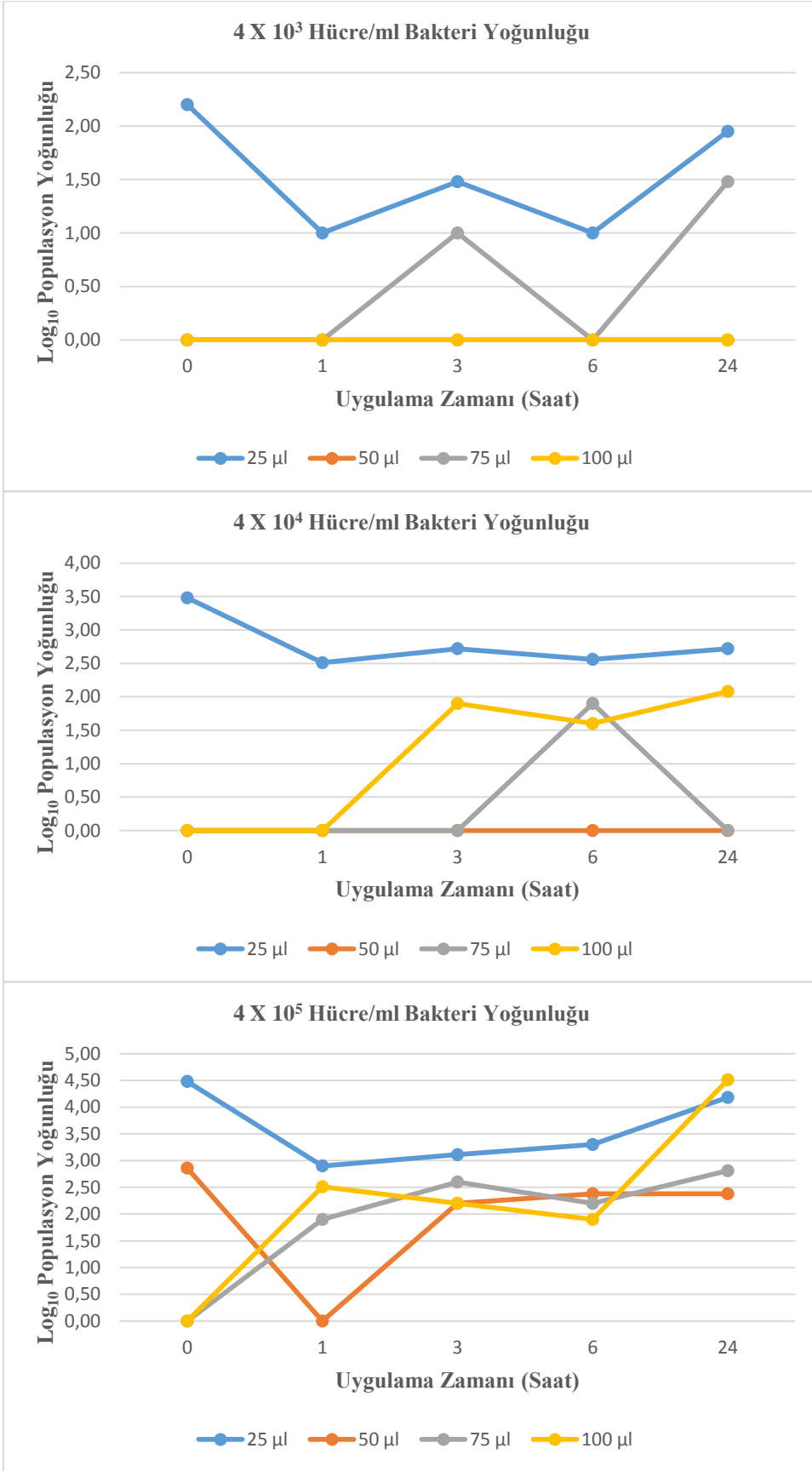
Şekil 4.13. Sarımsak uçucu yağının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin populasyon yoğunluğuna etkisi

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.13' te görüldüğü gibi sarımsak uçucu yağın 4×10^3 hücre/ml, 4×10^4 hücre/ml ve 4×10^5 hücre/ml yoğunluklarına uygulama dozlarının etkisine bakıldığında 25 µl dozu farklı zamanlarda ekim yapılırsa da etkisiz olduğu belirlenmiştir. 4×10^3 hücre/ml yoğunluğunda 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.32 ve bir saat sonraki yaymada 3.41, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 3.29 ve bir saat sonraki yaymada ise 3.24, 100 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.83, bir saat sonra yaymada 3.00, üç saat sonra yaymada 3.52 olarak hesaplanırken altı ve 24 saat sonraki yapılan yaymalarda bir etki belirlenmemiştir. 4×10^4 hücre/ml yoğunluğunda 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.99, bir saat sonra yaymada 4.04, üç saat sonra yaymada 3.46, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada 4.03, bir saat sonra yaymada 4.01 ve üç saat sonra yaymada 4.58, 100 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.79, bir saat sonra yaymada 3.87, üç saat sonra yaymada ise 4.41 olarak hesaplanmıştır. Uygulama zamanı olan 6 ve 24 saat sonraki petri yayımlarında ise bütün dozlarda herhangi bir etki görülmemiştir. 4×10^5 hücre/ml yoğunluğunda 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada 4.54, bir saat sonra yaymada 4.50, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada 4.47, bir saat sonra yaymada 4.45, 100 µl doz uygulamasında ise hemen yaymada 4.28, bir saat sonra yaymada 4.38, üç saat sonra yaymada 5.31 bakteri populasyonu hesaplanmıştır. 50 ve 75 µl doz uygulamalarında 6 ve 24 saat sonra petri yayımlarında ise herhangi bir etki göstermemiştir. Çizelge 4.3. ve Şekil 4.13'de görüldüğü gibi sarımsak uçucu yağı diğer uçucu yağlara göre etkisiz görülmektedir. Benzer şekilde Mirik ve Aysan (2002) filtreden geçirilerek steril edilen sıcaklıkla muamele edilmemiş sarımsak ekstraktını etkili bulurken, otoklavda steril ettikleri sarımsak ekstraktının bitki patojeni bakteriye karşı etkisiz bulmuşlardır. Benzer olarak sarımsak uçucu yağının elde edilme sürecinde sıcaklık uygulamasının olmasından dolayı etkisinin yok olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.14. Karanfil uçucu yağının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin populasyon yoğunluğuna etkisi

Çizelge 4.3. ve Şekil 4.14 ' te görüldüğü gibi karanfil uçucu yağın 4×10^3 hücre/ml yoğunluğuna uygulama dozlarının etkisine bakıldığında 25 µl doz uygulamasında hemen yaymada populasyon 2.84, bir saat sonra yaymada 2.80, üç saat sonra yaymada 2.65, altı saat sonra yaymada 3.18, 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada 1.90, bir saat sonra yaymada hiç gelişme olmamış, üç saat sonra yaymada 2.28, altı saat sonra yaymada 3.00, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada 2.84, bir saat sonra yaymada 1.90, üç saat sonra yaymada 3.15, altı saat sonra yaymada 2.40, 100 µl doz uygulamasında hemen yaymada 2.73, bir saat sonra yaymada 3.25, üç saat sonra yaymada 2.38 olarak hesaplanırken altı saat sonra yaymada ise hiç gelişme olmamıştır. 4×10^4 hücre/ml yoğunluğuna uygulama dozlarının etkisine bakıldığında 25µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.64, bir saat sonra yaymada 3.51, üç saat sonra yaymada 3.62, altı saat sonra yaymada 4.07, 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada 2.90, bir saat sonra yaymada 2.96, üç saat sonra yaymada 3.11, üç saat sonra yaymada 3.67, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.12, bir saat sonra yaymada 3.05, üç saat sonra yaymada 3.21, altı saat sonra yaymada 3.55, 100 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.43, bir saat sonra yaymada 4.61, üç saat sonra yaymada 3.91, altı saat sonra yaymada 2.20 olarak hesaplanmıştır. Her dozda 24 saat sonra yaymada herhangi bir etki görülmemiştir. 4×10^5 hücre/ml yoğunluğunda ise 4×10^4 hücre/ml yoğunluğuna benzer olarak 25 µl doz uygulamasında hemen sonra yaymada 4.18, bir saat sonra yaymada 4.14, üç saat sonra yaymada 3.98, altı saat sonra yaymada 4.42, 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.71, üç saat sonra yaymada 3.52, altı saat sonra yaymada 4.53, 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.70, bir saat sonra yaymada 3.79, üç saat sonra yaymada 3.89, altı saat sonra yaymada 4.49, 100 µl doz uygulamasında hemen yaymada 3.94, bir saat sonra yaymada 4.58, üç saat sonra yaymada 4.76 bakteri populasyonu hesaplanmıştır. Karanfil uçucu yağının 4×10^3 , 4×10^4 ve 4×10^5 hücre/ml yoğunluğuna uygulama dozlarının 24 saat sonraki petri yayımlarında etkili olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.15. Kekik uçucu yağının *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin populasyon yoğunluğuna etkisi

Çizelge 4.3. ve Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi kekik uçucu yağın 4×10^3 ve 4×10^4 hücre/ml yoğunluklarında 25 µl doz uygulaması dışında diğer bütün uygulamalarda herhangi bir bakteriyel gelişim gözlenmemiştir. Gelişme görülen petrilere ise popülasyon 1.00-2.08 gibi çok düşük miktarda kalmıştır. 4×10^5 hücre/ml bakteri yoğunluğunda kekik uçucu yağın uygulanmasında bakteri gelişimi gözlenmiştir. Ama burada da başlangıç popülasyonuna göre önemli miktarda düşüş saptanmıştır. 25 µl doz uygulamasında hemen sonra yaymada 4.48, bir saat sonra yaymada 2.90, üç saat sonra yaymada 3.11, altı saat sonra yaymada 3.30 ve 24 saat sonra yaymada ise 4.18, 50 µl doz uygulamasında hemen yaymada 2.86, üç saat sonra yaymada 2.20, altı ve 24 saat sonra yaymada 2.38 bakteri yoğunluğu gözlenmiştir. 75 µl doz uygulamasında hemen yaymada gelişme görülmemiş, bir saat sonra yaymada 1.90, üç saat sonra yaymada 2.60, altı saat sonra yaymada 2.20, 24 saat sonra ise 2.81 olarak hesaplanmıştır. 100 µl doz uygulamasında hemen yaymada gelişme görülmezken, bir saat sonra yaymada 2.51, üç saat sonra yaymada 2.20, altı saat sonra yaymada 1.90 ve 24 saat sonra ise 4.51 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3' de görüldüğü gibi süspansiyon içerisine uçucu yağın karıştırılması ile yapılan çalışmada en etkili sonucu disk yönteminde de olduğu gibi kekik uçucu yağdan elde edilmiştir. Kekik uçucu yağı uygulanan doz ve saatlerde bakteri kolonisi gelişimini, uygulanan diğer uçucu yağlara göre daha fazla etkilemiştir. Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmaların sonuçları ile çalışmamızdan elde edilen sonuçlar paralellik göstermektedir. Basım ve ark. (2000) farklı bitki patojenlerine karşı denedikleri kekik uçucu yağı benzer şekilde bitki patojen bakterilerin gelişimini engellemiştir. Ayrıca Mirik ve Aysan (2002) domates patojenlerinden bakteriyel leke hastalığına karşı sarımsak ve okaliptüs bitki ekstraktlarını ve Basım ve Basım (2003) ise aynı hastalık etmenine karşı gülden elde ettikleri uçucu yağın antibakteriyel özellikte olduğunu ve gelişmesini engellediğini belirtmişlerdir. Curtis ve ark. (2004) sarımsak ekstraktının bitki patojen organizmalardan *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*'e karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir. Rhouma (2009) Sakız ağacı ve Peru biber ağacı'nın yaprak ekstraktları *Agrobacterium tumefaciens* ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı antibakteriyel etkisi olduğunu ve bakterilerin gelişimi üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde Bendaoud ve ark. (2009) *Eucalyptus radiata*'dan elde ettikleri uçucu yağın bakteriyel etmenlerden *Agrobacterium tumefaciens* ve *Pseudomonas*

savastanoi pv. *savastanoi*'ye etkili olduğunu saptamışlardır. Lucas (2012), karanfil, tarçın, limon otu, okaliptüs, kekik ve çay otu uçucu yağlarının *Xanthomonas vesicatora*'nın gelişimine ve hastalık şiddetini azalttığı belirlemişlerdir. Ayrıca, Trigui ve ark. (2013) kına (*Lawsonia inermis*) yaprak ekstraktını bitki patojeni olan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ve *Agrobacterium tumefaciens*'in neden olduğu ur oluşumlarını engellediğini tespit etmişlerdir. Bizim ve yapılan bütün çalışmalar gerek bitki ekstraktları ve gerekse bitki uçucu yağlarının bakteriyel patojenlere karşı uygulanabilirliğini ortaya koymaktadır. Bitki ekstraktları ve uçucu yağlarının bakteriyel hastalıklara karşı mücadelede alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Üçüncü yöntem: Çizelge 4.4.'de PSF besi ortamına belirtilen dozlarda konulan uçucu yağın bakteri gelişimine hiçbir etkisi olmadığı görülmüştür. Sıcaklığın uçucu yağın etkinliğini bozabilmesi veya petriye döküldüğünde yine sıcaklıkla birlikte uçucu yağın buharlaşması bu yöntemin etkisiz olmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Aynı şekilde 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.

Çizelge 4.4. PSF besi ortamında uçucu yağın etkisi

Uçucu Yağlar	Tekerrür	10 ⁸ Bakteri Yoğunluğu											
		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	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Ort.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
KARABAŞ	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Ort.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
BERGAMOT	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Ort.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
SARIMSAK	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Ort.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
KARANFİL	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Ort.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
KEKİK	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	Ort.	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

(Y: Bakteri popülasyonu sayılmayacak kadar çok yoğun)

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada kullanılan üç farklı yöntemde, farklı patojen bakteri (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) yoğunluğu ve farklı dozlarda bitki uçucu yağları kullanılarak patojen popülasyonuna olan antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 21 bitki uçucu yağı kullanılmış fakat altı tane uçucu yağ (Bergamut Karabaş, Karanfil, Kekik, Okaliptus, Sarımsak) etkili sonuç vermesi nedeniyle gelecekte zeytin dal kanseri hastalığının entegre mücadele programına uçucu yağların da alınabileceği gösterilmiştir.

Kağıt disk yönteminde en etkili sonucu kekik uçucu yağı vermiştir. Kekik 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 bir inhibisyon zonu oluşturarak petride en etkili inhibisyon zonunu oluşturmuştur. Patojen bakteri popülasyonu arttıkça çoğu yağın antimikrobiyal etkisinin azaldığı ortaya konmuştur.

Süspansiyon içerisine uçucu yağ eklenerek yapılan denemede disk yönteminde de olduğu gibi kekik yağı yine etkili sonuç vermiştir. 4×10^3 , 4×10^4 ve 4×10^5 bakteri yoğunluğunda bakteri gelişimini engellediği görülmüştür.

Sarımsak ve adaçayı uçucu yağının *Pseudomonas savastanoi* 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 gerektiği sonucuna varılmıştır.

Üçüncü yöntem olarak denediğimiz besi ortamı içerisine koyduğumuz tüm uçucu yağların bakteri gelişimini etkilemediği görülmüştür. Ortamın sıcaklığından dolayı uçucu yağın etkisinin kaybolduğu ve bu yöntemin gelecekteki denemelerde kullanılması uygun bulunmamıştır.

Sonuç olarak *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*' ye karşı kekik uçucu yağının entegre mücadele programı içerisine alınması faydalı olacaktır. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda uçucu yağ yerine bitki ekstratının denenmesi böylelikle etkinliğin daha uzun süre kalıcı olabileceği ve *in vitro* denemelerde elde edilen başarılı sonuçların pratikte kullanılması için arazi çalışmalarının gelecekte yapılması gerekmektedir..

6. KAYNAKLAR

- Anonim (2013). www.faostat.fao.org. Dünya zeytin üretimi. 25\05\2014.
- Anonim (2014). www.ayvalikzeytinyagi.org. Zeytin yetiştiriciliğinin yapıldığı ülkeler. 25\05\2014.
- Astal Z E (2004). The inhibitory action of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria. *Eur Fodd Res Technol*, 218: 460-464.
- Alvarez F, Garcia de los Rios J E, Jimenez A, Rojas A, Reche P & Troya M T (1998). Phenotypic variability in different strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* isolated from different hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 603-609.
- Azad H R & Cooksey D A (1995). A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic population of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. *Phytopathology*, 85: 740-745.
- 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, Quattrucci A (2009). Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*, 28:807-811.
- Basim H & 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.
- Basım H, Yegen O, Zeller W (2000). Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107:279-284.
- Basım E, Basım H (2003). Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil. *Fitoterapia*, 74:394-396.
- Başer K H C (2001). Her Derde Deva Bir Bitki Kekik. *Bilim ve Teknik Dergisi*, 402: 74-77
- Becker H, Scher J M, Speakman J&B, Zapp J (2005). Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. *Fitoterapia*, 76: 580-584.
- Bella P, Licciardello G, Tessitori M, Catara V (2008). A real-time PCR quantitative detection assay for *Pseudomonas savastanoi* pv. *neri* in *Nerium oleander*. *Phytopathol. Mediterr.*, 47:204-213.
- Bendaoud H, Bouajila J, Rhouma A, Savagnac A, Romdhane M (2009). GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. *Society of Chemical Industry*, 2.
- Benkeblia N (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm-Wiss. u.-Technol*, 37:263-268.
- Bertolini E, Penyalver R, Garcia A, Olmos A (2003). High Sensitive Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Asymptomatic Olive Plants by Nested-PCR in a Single Closed Tube. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 261-266.

- Casano F J, Hung S Y, Wells J M (1987). Differentiation of some pathovars of *Pseudomonas syringae* with monoclonal antibodies. Eur. Mediterr. Plant Prot. Organ. Bull., 17:173-176.
- Cinelli T, Marchi G, Cimmino A, Marongiu R, Evidente A, Fiori M (2014). Heterogeneity of *Pseudomonas savastanoi* Populations Infecting *Myrtus communis* in Sardinia (Italy). Plant Pathology, 63: 277-289.
- 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.
- Curtis H, Noll U, Störmann J, Slusarenko A J (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiological and Molecular Plant Pathology, 65: 79-89.
- Daferera D J, Ziogas B N, Polissiou M G (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection, 22: 39-44
- De Vincenzi M, Silano M, De Vincenzi A, Maialetti F, Scazzocchio B (2002). Constituents of aromatic plants: eucalyptol. Fitoterapia, 73:269-275.
- El Arbi M, Pigeon P, Rkhis Chaari A, Top S, Rhouma A, Rebai A, Jaouen G, Aifa S (2011). Antimicrobial effect of ferrocenyl diaryl butenes against olive plantlet diseases. Journal of Plant Pathology, 93 (3):651-657.
- Ercolani G L (1993). Comparison of Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* From Olive Leaves and Knots. Letters in Applied Microbiology, 16: 199-202.
- Ersoy A. (2002). Batı Akdeniz Bölgesinde zeytin ağaçlarında görülen *P. Savastanoi* pv. *savastanoi*' nin neden olduğu bakteriyel dal kanseri hastalığının yayılışı, etmenin moleküler tanısı, izotların elde edilmesi ve moleküler karakterizasyonu (Yüksek Lisans Tezi), Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gardan L, Bollet C, Abu Ghorrah M, Grimont F, Grimont P A D (1992). DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 42: 606–612.
- Gardan L, David C, Morel M, Glickmann E, Abu-Gorrah M, Petit A & Dessaux Y (1992). Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. Applied and Environmental Microbiology, 58: 1780-1783.
- Hong J C, Momol M T, Olson M S, Colee J, Jones J B (2011). Management of bacterial wilt in tomatoes with thymol and acibenzolar-S-methyl. Crop Protection, 30:1340-1345.
- Iacobellis N S, Sisto A, Surico G, Evidente A, Di Maio E (1994). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* mutants defective in phytohormone production. J. Phytopathol., 140:238–248.
- Iacobellis N S, Contesini A M & Surico G (1995). Bacteriosin production by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. Phytopathology Meditterreanean, 34: 15-22
- Iacobellis N S, Caponero A & 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, Goodman R N (1967). The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 5: 17-44.
- King E O, Ward M K, Raney D E (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Clin. Med. 44: 301-307.
- Krid S, Bouaziz M, Triki M A, Gargouri A, Rhouma A (2011). Inhibition of Olive Knot Disease by polyphenols extracted from olive mill waste water. Journal of Pathology., 93(3):561-568.
- Koton R, Dadasoğlu F, Karagöz K, Çakır A, Özer H, Kordalı S, Çakmakçı R, Dikbaş N (2013). Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. Scientia Horticulturae, 153: 34-41.
- Kovacs N (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, London, 170-173.
- Lelliott R A, Stead D E (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Lucas G C, Alves E, Pereira R B, Perina F J, De Souza R M (2012). Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 47 (3):351-359.
- Mbega E R, Mortensen C N, Mabagal R B, Wulff E G (2012). The Effect of Plant Extracts as Seed Treatments to Control Bacterial Leaf Spot of Tomato in Tanzania. J Gen Plant Pathol., 78: 277-286.
- MacDonald E, Powell G K, Regier D A, Glass N L, Roberto F, Kosuge T, Morris R O (1986). Secretion of Zeatin, Ribosylzeatin, and Ribosyl-1"-Methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi*. Plant Physiology, 82(3):742-747.
- Mangamma P, Speeramula A (1981). Garlic extract inhibitory to growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Indian Phytopathology, 44:372.
- Mirik M, 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 & Sahin F (2004). Türkiye’de çeşitli bitkilerden izole edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatlarının fenotipik karakterizasyonu. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi, 139, Samsun.
- Mirik M, Aysan Y (2006). Doğu Akdeniz Bölgesinde zakkum, yasemin, mersin ve Cılıbırtı çalılarında *Pseudomonas savastanoi*’nin neden olduğu bakteriyel ur hastalığı üzerine araştırmalar. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 311-317, İzmir.

- Mirik M, Aysan Y, 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, Aysan Y (2009). Marmara Bölgesi Zeytin Alanlarında İzole Edilen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. III. Bitki Koruma Kongresi, Van.
- Mugnai L, Giovannetti L, Ventura S, Surico G (1994). The Grouping of Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* by DNA Restriction Fingerprinting. J. Pathology, 142:209-218.
- Okan Ö, Baş B, Zeynalov Y (2011). Bazı bitki özütlerinin *in vitro*' da çeşitli fitopatojen bakterirler üzerinde antibakteriyel potansiyelleri üzerinde araştırmalar. IV. Bitki Koruma Kongresi, Kahramanmaraş.
- Palleroni N J (1989). *Pseudomonas*, Pactical Handbook of Microbiology, ed: William M O'leary, (Ph.D) Pp:55-70.
- Penyalver R, Garcı'a A, Ferrer A, Bertolini E, Lo'pez M M (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Appl. Environ. Microbiol., 66: 2673– 2677.
- Ramos C, Matas I M, Bardajı L, Aragon I M, Murillo J (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. Molecular Plant Pathology, 13(9): 998-1009.
- Rhouma A, Ben Daoud H, Ghanmi S, Ben Salah H, Romdhane M, Demak M (2009). Antimicrobial activities of leaf extracts of pistacia and schinus species against some plant pathogenic fungi and bacteria. Journal of Plant Pathology, 91:339-345.
- Roussos P A, Pontikis C A, Tsantili E (2002). Root promoting compounds detected in olive knot extract in high quantities as a response to infection by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Plant Science, 163:533-541.
- Sands D C, Schroth M N, Hildebrand D C (1970). Taxonomy of phytopathogenic *Pseudomonas*. J. Bacteriol, 101:9-23.
- Schaad N W, Jones J B, Lacy G H (2001). Gram negative bacteria, *Pseudomonas*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition) Edts: Schaad N W, Jones J B, Chun W. APS Press. St. Paul, Minnesota. 84-117.
- Scotty S, Kirkpatrick B, Kosuge T (1994). Characterization of High-Frequency Deletions in the *iaa*-Containing Plasmid, *Piaa*, of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Plazmid, 31: 21-30.
- Sisto A, Morea M, Zaccaro F, Palumbo G, Iacobellis N S (1999). Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* mutants defective in hypersensitive response elicitation and pathogenicity. *Journal Phytopathology*, 145-147.
- Smidt M & Kosuge T (1978). The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 13: 203-214 Smith, E. D. 1908. Recent studies on the olive tubercule organism. *Bull. Bur. Plant Ind. U.S. Dep. Agric.*, 131: 25-43.

- Surico G, Iacobellis N S, Sisto A, (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiol. Plant Pathol.*, 26: 309– 320.
- Surico G & Lavermicocca P (1989). A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytopathology*, 79: 185-190.
- Şahin F, Karaman I, Güllüce M, Oğütçü H, Sengül M., Adigüzel A, Oztürk S, Kotan R. (2003). Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *J. Ethnopharmacol.*, 87: 61–65.
- Tatlı B & 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
- Talas-Oğraş T, İpekçi Z, Bajroviç K, Gözükırmızı N (2005). Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*. *Fitoterapia*, 76: 67-72.
- Temsah M, Hanna L, Saad A T (2007). Anatomical Observations of *Pseudomonas savastanoi* on *Rhamnus alaternus*. *For. Path.*, 37: 64-72.
- Trigui M, Hsouna A B, Hammami I, Culioli G, Ksantini M, Tounsi S, Jaoua S (2013). Efficacy of Lawsonia inermis leaves extract and its phenolic compounds against olive knot and crown gall diseases. *Crop Protection*, 45:83-88.
- TÜİK 2013. www.tuik.gov.tr. Türkiye Zeytin Üretimi. 25/05/2014.
- Varvaro L, Sasser M (1987). Fatty acid profiles of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Presented at the 3rd Int. Working Group on *Pseudomonas syringae* pathovars, Portugal.
- Wells J M, Casano F J, Surico G (1991). Fatty Acid Composition of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *J. Phytopathology*, 133:152-162.
- Wilson E. E (1965). Pathological histogenesis in oleander tumors induced by *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopathology*, 55: 1244-1249.
- Wilson E E, Heskett M G, Johnson M L, Kosuge T (1972). Metabolic behavior of *Pseudomonas savastanoi* isolates from olive and oleander on certain carbohydrates and amino substrates. *Phytopathology*, 62: 350-355.
- 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.

7. TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana ‘Zeytin Dal Kanseri Etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ ye Karşı *In Vitro* Koşullarda Farklı Bitkilerin Uçucu Yağlarının Etkisi’ konulu Yüksek Lisans Tezini veren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa MİRİK’ e teşekkür ediyorum.

Yüksek Lisan Tez Jüri üyelerinde Sayın Prof. Dr. Yeşim AYSAN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. N. Desen KÖYÇÜ’ ye yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda buldukları için sonsuz teşekkürler.

Labaratuvar çalışmalarım sırasında emeği geçen değerli arkadaşlarım Yüksek Lisans öğrencisi Seçil Hande AVCI’ya, Aylin KIRK’a, Ayşen USUL’a, Caner ASLAN’a, Esin ARSLAN’a, Gamze POSTACI’ya, Kübra ADIYAMAN’a ve Zekiye ERDOĞAN’a çok teşekkür ederim.

Manevi desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiğim ve benim için sonsuz motivasyon kaynağı olan sevgili aileme sonsuz teşekkürler...

8.ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Amasya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Amasya’da tamamladı. 2007 yılında başladığı Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği Programı’ndan 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans’a başladı. 2013 yılında Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda açılan “Araştırma Görevliliği” sınavını kazanarak “Araştırma Görevlisi” olarak atandı. Halen Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak devam etmektedir.