Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

http://dergipark.gov.tr/bitkorb

Original article

Antibacterial effects of eucalyptus and some commercial plant essential oils on tomato bacterial canker disease (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)

Okaliptus ve bazı ticari uçucu yağlarının Domates bakteriyel kanser hastalığı (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) üzerine antibakteriyel etkileri

Nida ÜNLÜ [a], Eminur ELÇİ [a*]

[a] *Niğde Ömer Halisdemir University, Faculty of Agricultural Sciences and Technologies, Department of Plant Production and Technologies, 51240, Niğde, TÜRKİYE*

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: 10.16955/bitkorb.471162

Received : 16.10.2018

Accepted : 16.03.2019

Keywords:

eucalyptus, essential oil, bacterial cancer, anti-bacterial effect, disease management

* Corresponding author:

Eminur ELÇİ

eminur@gmail.com

ABSTRACT

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* is a Gram-positive, seed borne, and quarantine bacterium which causes bacterial wilt and cancer disease in tomato. This study was conducted to determine *in vitro* antibacterial activity of commercial plant essential oils of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*), St. John's wort (*Hypericum perforatum*), clove (*Dianthus caryophyllus*), anise seed (*Pimpinella anisum*) and mustard (*Brassica nigra*) on *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. In this study, morphological and molecular diagnostic assays were performed on suspicious samples collected from Mersin province and as a result six of them were identified as *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. The most effective essential oil on *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* was determined by disc-diffusion method under *in vitro* conditions and the inhibition zone diameters were measured. Since eucalyptus essential oil was determined as the most efficient essential oil, the most effective concentration was also determined by applying different amount of essential oils on the antibiogram discs and measuring inhibition zones. The most effective dose was found to be 25 µl which caused 23 mm inhibition zone. This concentration was also applied on tomato plants in different combinations. Based on these results, it can be concluded that eucalyptus essential oils can be used for management of control strategies on *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasından bünyesinde A, C, B1 ve B6 vitaminleri, kalsiyum, potasyum barındırması bakımından dünyada ve ülkemizde oldukça fazla tüketilen, üretilen ve gıda sanayisinde de önemli yer tutan besin maddelerinden birisidir (Akat 2008). Dünyada ve ülkemizde yaş sebze ürünlerinin en önemlilerinden biri olan domatesin, dünyada 177.042.359 ton üretim miktarının 12.600.000 tonu ülkemizde üretilmektedir (FAO 2016). Ülkemiz, üretilen domates miktarı ile dünyada Çin, Hindistan, ABD'den sonra dördüncü sırada yer almaktadır (FAO 2016).

Domates yetiştiriciliği sırasında hastalık ve zararlılar ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Gerek örtü altı gerekse açık koşullarda yetiştirilen domateslerde kalite ve ürün

kaybında biyotik ve abiyotik faktörlerin önemli ölçüde etkisi bulunmaktadır. Etkisi açısından en önemli biyotik etmenler bakteriler, funguslar, virüsler ile nematodlar, kemirgenler, sümüklü böcekler gibi zararlılardır (Aktaş 2015). Domateste bakteriyel kanser ve solgunluk [*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.] hastalığı, bakteriyel hastalıklar içinde önemli ekonomik kayba ve bitkide önemli tahribata neden olan hastalıklar içinde önemli bir sırada yer almakta olup karantinaya tabi bir patojendir (Çetinkaya Yıldız 2007).

C. michiganensis subsp. *michiganensis* ilk olarak ABD'nin, Michigan eyaletinde, 1909 yılında saptanmış ve domates yetiştiriciliğinin yapıldığı hemen hemen her bölgede görülmüştür (Gleason et al. 1993). Ülkemizde ise Tokgönül (1998)'in çalışmasına göre ilk olarak İç Anadolu Bölgesinde (Bremer ve Özkan 1950) saptandıktan sonra yetiştiricilik yapılan birçok bölgede görülmüştür. Solanaceae familyasından olan biber (*Capsicum annum* L.) ve patlıcanda (*Solanum melongena* L.) da hastalık oluşturabilmesine rağmen, en çok kalite ve verim kaybına sebep olduğu kültür bitkisi domatestir (Forster and Echandi 1973, Gleason et al. 1993). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domateste başlıca hastalık belirtileri; yanıklık, bitkide tek taraflı solgunluk, iletim demetlerinde kahverengileşme ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde gövde de çatlama, meyvede ise "Kuşgözü" şeklindeki lekelerdir. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sistemik yayılan bir hastalık etmeni olduğu için genel olarak bulaşık tohumlarla taşınmaktadır. Sonraki yıl üretim yapılan alanlara bulaşık topraklar ve hastalıklı bitki artıkları ile taşınarak önemli derecede ürün kaybına neden olmaktadır (Belgüzar et al. 2016a).

Hastalıkla mücadelede; hastalıktan ari tohum ve fide kullanımı başta olmak üzere kültürel mücadele yöntemi, uç alma, koltuk kırma, yaralanmalar ve dolu zararından dolayı oluşan açıklıklardan bulaşmayı önlemek için bakırlı preparatlar önerilmesi gibi kimyasal mücadele yöntemi, tohumlarda her hangi bir hasara yol açmadan hastalık etmenini yok etmek için dayanıklılığın teşvik edilmesi, bitkisel ekstrakt ve uçucu yağlar, sıcak hava uygulaması gibi alternatif mücadele yöntemleri ve en önemli mücadele yöntemi olarak kullanılan ekolojik mücadele yöntemi gibi yöntemler günümüzde kullanılmaktadır (Soylu et al. 2003, Tireng Karut 2011).

Günümüzde hastalık ve zararlı kontrolünde uygulanan kimyasal mücadele yöntemlerine alternatif olarak ekolojik mücadele yöntemleri önerilmektedir (Kaya et al. 2018). Antibakteriyel özellikte olan bitkisel uçucu yağların hastalıklara karşı kullanılması bu yöntemlerden bir tanesidir (Soylu et al. 2010, Yılmaz et al. 2014). Doğada kolay bir şekilde parçalanan ve bitkilerde kalıcılığı olmayan uçucu yağların antimikrobiyal etkileri araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Al-Reza et al. 2010, Mondal and Khalequzzaman 2009). Bitki hastalık ve zararlıları ile mücadelede bitkilerden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağların kullanılmasıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Altundağ ve Aslım 2005, Belgüzar et al. 2016b, Daferera et al. 2003, Görmez et al. 2014, Iacobellis et al. 2005, Kızıl and Uyar 2006, Kotan et al. 2010, Mengulluoglu ve Soylu 2012, Sertkaya et al. 2010, Soylu et al. 2009, Soylu et al. 2012, Şahin et al. 2003, Şahin et al. 2004, Yanar et al. 2016, Yılmaz et al. 2014). Yapılan birçok çalışmada *Origanum vulgare* L., *O. majorana* L., *O. syriacum* L., *O. dictamnus* L., *O. onites* L., *O. syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) letswaart, *Thymus vulgaris* L., *T. capitatus* Hoff. et Link., *Lavandula angustifolia* Mill., *L. stoechas* subsp. *stoechas*, *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia fruticosa* Mill., *Mentha pulegium* L., *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata*, *Lippia citriodora* Kunth., *Anethum graveolens* L., *Cuminum cyminum* L. gibi uçucu yağların *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerinde laboratuvar koşullarında yapılan denemelerde etkili olduğu saptanmıştır ve hastalık etmeni ile mücadelede kimyasal mücadeleye alternatif bir mücadele yöntemi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan bu çalışmada ticari olarak satılan okaliptus (*Eucalyptus citriodora* Hook.), sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.), karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.), anason (*Pimpinella anisum* L.) ve hardal [*Brassica nigra* L. (Koch)] bitki uçucu yağlarının Domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı üzerine antibakteriyel etkinliği *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması

Mersin ilinin Erdemli (Kocahasanlı, Püstüllü, Kızılen köyleri) ve Silifke (Delikkaya, Ovacık köyleri) ilçelerinde 2017 yılının Kasım ve 2018 yılının Mart aylarında yapılan arazi çalışmaları sonucunda domates yetiştiriciliği yapılan 4 adet tarladan ve 5 adet seradan hastalık simptomlarını gösteren bitki örnekleri toplanmıştır. Toplanan örnekler ıslak kâğıt havluya sarılarak şeffaf polietilen torba içerisine yerleştirilmiştir. Etiketlemesi yapılan bitki örnekleri, soğutucu termos ile laboratuvar ortamına getirilmiştir.

Bakteri kültürünün geliştirilmesi ve tanısı

Laboratuvara getirilen örnekler yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra porselen havanda ezilerek solüsyon haline getirildikten sonra King B (KB) ve Nutrient Agar (NA) besiyerlerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler

48 saat sonra incelenerek her iki besiyeri üzerinde de oluşan açık sarı renkli morfolojiye sahip olan koloniler seçilerek saflaştırılmıştır. Seçilen bakterilerin morfolojik olarak tanılanmasından sonra patojenisite testi yapılmış ve ardından moleküler testlerle tanısı yapıldıktan sonra gliserol içerinde muhafaza edilmiştir. Gliserol içinde saklanan izolatların geliştirilmesi için Nutrient Agar (8.0 g Nutrient Broth (Difco), 2.0 g K_2HPO_4, 0.5 g KH_2PO_4, 2.5 g Glikoz, 1000 ml distile su) besiyeri kullanılmıştır. Taze olarak hazırlanan ve petrilere dökülen besiyerine çizgi ekim yöntemi kullanılarak bakteriler ekilmiştir. 25 ºC'de ki inkübatörde 2-3 gün inkübe edilmiştir. Ayrıca saflaştırılan sarı kolonilerden "Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Microprep Kit–ZymoResearch-D6007" ticari kit yardımı ile DNA izole edildikten sonra bakteriye özgü primer çifti kullanılarak (CMM5: 5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3' ve CMM6: 5'-CGTCAGGAGGTTCGCTAATA-3'; 614 bp) PCR yapılmış ve kesin tanı konulmuştur.

Bazı ticari uçucu yağların antibakteriyel etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada ticari olarak temin edilen okaliptus (*Eucalyptus citriodora*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), karanfil (*Dianthus caryophyllus*), anason (*Pimpinella anisum*) ve hardal (*Brassica nigra*) yağları kullanılmıştır. Bu yağlardan okaliptus, sarı kantaron, karanfil yağı "Doğanın Bahçesi" (Üsküdar/İstanbul) firmasından; anason ve hardal yağı ise "Ege Lokman" (Bakır/Kırkağaç/Manisa) firmalarından temin edilmiştir. Bu uçucu yağların laboratuvar koşullarında *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine antibakteriyel etkisi iki aşamalı olarak denenmiştir. İlk olarak kontrol bakteri izolatına uçucu yağların etkili olup olmadığına uçucu yağların antibakteriyel etki çalışmalarında çok kullanılan metotlardan biri olan disk difüzyon tarama yöntemi (Heatley 1944) ile bakılmıştır. Bu metoda göre; 10^7 hücre/ml konsantrasyonda 100 µl bakteri süspansiyonundan alınarak besiyeri yüzeyine baget ile yayılmış, ekim yapılan petrilerin orta kısmına yerleştirilen 5-6 mm'lik antibiyogram disklere (Whatman® Antibiotic Assay Discs) 20 µl uçucu yağ damlatılmıştır ve petriler parafilmle kapatılarak inkübatöre yerleştirilmiştir. İnkübasyondan 48 saat sonra petrilerde antibiyogram disklerin etrafında oluşan engelleme zonu kumpas yardımı ile mm olarak ölçülmüştür. Çalışmalar üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

İkinci aşamada ise disk difüzyon tarama yöntemi ile etkinliği belirlenen uçucu yağın en etkin yağ miktarının belirlenmesi için; 5 µl, 10 µl, 15 µl, 20 µl, 25 µl, 30 µl, 35 µl ve 40 µl uçucu yağ disklere emdirilerek kullanılmıştır. 24 saatlik taze *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* bakteri kültüründen 10^7 hücre/ml konsantrasyonda solüsyon hazırlanarak 100 µl süspansiyon alınıp besiyeri üzerine drigalski ile ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan petrilerin ortasına yerleştirilen antibiyogram disklere belirtilen miktarlarda uçucu yağ emdirilmiştir, negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmış ve 48 saat sonra oluşan engelleme zon çapı ölçülmüştür (Azaz et al. 2004). Çalışmalar üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Belirlenen en etkin uçucu yağ miktarı domates fidelerine uygulanmıştır.

Okaliptus uçucu yağının farklı kombinasyonlarının domates bitkisinde Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis'e etkisi

Petri denemeleri sonucunda antibakteriyel etki gösteren okaliptus uçucu yağı dört adet *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatı, pozitif ve negatif kontrol üzerinde denenmiştir. Çalışmada H 2274 domates çeşidi kullanılmıştır. Domates tohumları 1/3 oranında perlitli torf olan saksılara ekilmiş ve 16/8 fotoperiyotta 25 °C sıcaklık ve %60-70 nispi neme ayarlanan iklim kabinlerinde büyütülmüştür. Domates fidelerinin 3-4 gerçek yapraklı döneme ulaştığında denemeye geçilmiştir. Çalışmada uçucu yağ ve bakteri süspansiyonunun iki farklı kombinasyonu, sadece bakteri, sadece uçucu yağ ve negatif kontrol olarak steril saf su uygulaması yapılmıştır. Birinci uygulamada; fizyolojik su içerisinde 48 saatlik taze kültüründen 10^7 hücre/ml yoğunlukta hazırlanan bakteri süspansiyonu, herhangi bir yara açılmadan püskürtme yöntemi ile bitkiye uygulanmış ve 48 saat polietilen torbada bekletilmiştir. 48 saat sonra domates bitkisine petri çalışmaları ile etkisi belirlenmiş olan uçucu yağın en etkili miktarı (25 µl) %10'luk DMSO'da seyreltilerek el pülvarizatörü ile bitkiye püskürtülerek uygulanmıştır. İkinci kombinasyonda ise bitkiye önce uçucu yağ uygulanmış, üzerine bakteri solüsyonu uygulanmıştır. İnokule edilen bitkiler 25 ºC'de yaklaşık %60-70 nispi nem içeren iklim odası koşullarında tutulmuştur. Bitkiler günlük olarak kontrol edilerek skala değerlerine göre değerlendirme yapılmıştır (0: Bitkide hiç simptom yok, 1: Bitkide tek taraflı solgunluk var, 2: Bitkinin yapraklarında nekrozlar ve kısmi kahverengileşme var, 3: Bitkinin yapraklarında nekroz, gövdede kahverengileşme ve şiddetli solgunluk var). Çalışma üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Veri analizi

İn vitro koşullarda yürütülen petri denemeleri 3 tekrarlı olarak yapılmış olup denemeler arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ($P \leq 0.05$) kullanılarak belirlenmiştir. *İn vivo* koşullarda yürütülen bitki denemelerinde, inokule edilen domates bitkileri iki hafta süre ile günlük olarak kontrol edilerek hastalık simptomları

gözlemlenmiştir ve 0-3 skala değerlerine göre hastalık şiddeti (%) hesaplanmıştır. Veriler SPSS paket programı (versiyon 16.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizine tabi tutularak uygulamalar arasındaki farklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ($P \leq 0.05$) kullanılarak belirlenmiştir.

Her bir karakter için bitkide oluşan hastalık şiddeti Townsend and Heuberger (1943) formülüne göre hesaplanmıştır:

Hastalık şiddeti = [Σ(n.v) / 3 N] x 100

n: Her skala değerindeki bitki sayısı

v: Skala değeri

N: Sayılan bitkilerin toplamı

3: En büyük skala değeri

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Arazi çalışmaları

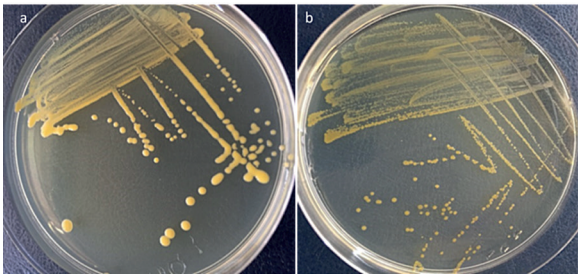
Arazi çalışmalarında yapılan gözlemler sonucunda, domates bitkisinin yan dallarında tek taraflı solgunluk (Şekil 1a), bitki yapraklarının solarak içe kıvrılması (Şekil 1b), iletim demetlerinde kahverengileşme (Şekil 1c), bitkide kısmi solgunluk ve gövdede kahverengileşme (Şekil 1d) en yaygın olarak gözlenen simptomlardır.



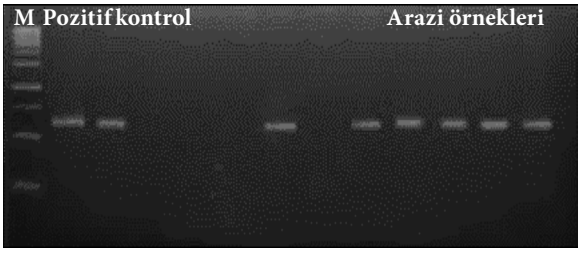
Şekil 1. Domates bitkisinde *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in oluşturduğu; tek taraflı solgunluk (a), yapraklarda solarak içe kıvrılma (b), iletim demetlerinde kahverengileşme (c), bitki gövdesinde kahverengileşme (d)

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis kültürü

Toplanan hastalıklı bitki örneklerinden bakteriye özgü olduğu bilinen sarı koloniler elde edilmiş ve saflaştırılmıştır (Şekil 2). Ayrıca bu bakteriye özgü primer çiftinin kullanılması ile beklenen seviyede 614 bp büyüklüğünde bant elde edilerek saflaştırılan bakterilerin 6 tanesinin *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* olduğu moleküler olarak da tespit edilmiştir (Şekil 3).



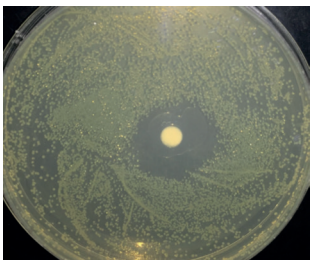
Şekil 2. Simptomatik domates bitkilerinden izole edilip saflaştırılan sarı bakteri kolonileri; King B besiyerinde (a), Nutrient Agar besiyerinde (b)



Şekil 3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e özgü primer çiftinin PCR sonucu jel analizi görüntüsü elde edilen 614 bp büyüklüğündeki bantlar

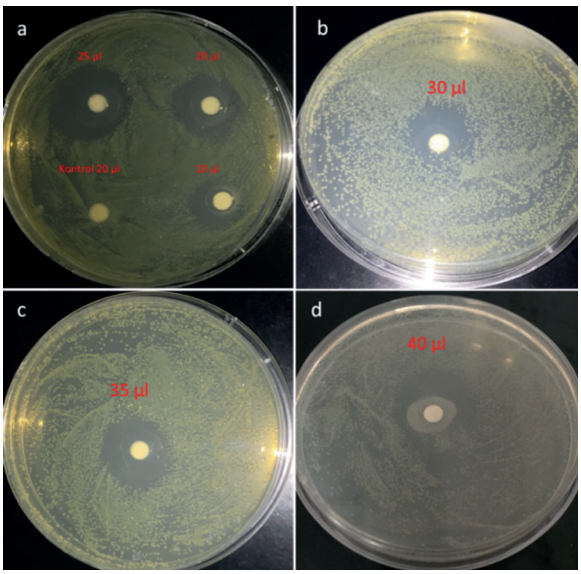
Ticari uçucu yağların antibakteriyel etkisi

Araştırmada, yapılan literatür taramalarına göre daha önce çok az kullanılmış olan okaliptus, sarı kantaron, karanfil, anason ve hardal yağı seçilmiş ve kullanılan yağlardan sarı kantaron, hardal, karanfil ve anason yağları bakteri gelişiminde herhangi bir etki göstermemişler ve bakteri kültürü üzerinde herhangi bir engelleme zonu oluşturmamışlardır. Okaliptus yağı, 20 µl içeren disklerin etrafında yaklaşık 23 mm çapında engelleme zonu oluşturmak suretiyle en etkili yağ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Okaliptus uçucu yağının *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (pozitif bakteri) izolatı üzerine antibakteriyel etkisi

Bu çalışmanın sonucuna göre, ikinci aşama olan, okaliptus uçucu yağının bakteri üzerindeki en etkili dozunu belirleme denemelerine geçilmiş ve kullanılan bakteri izolatları üzerine okaliptus uçucu yağının farklı miktarlarının uygulandığı denemelerde, 5 µl ve 10 µl uçucu yağ miktarlarının bakteri ekimi yapılan petrilerde engelleme zonu oluşturmadığı gözlenmiştir. Uygulanan diğer miktarlarda ise; 15 µl (15-16 mm), 20 µl (17-20 mm), 25 µl (23-25 mm) (Şekil 5a), 30 µl (22-24 mm) (Şekil 5b), 35 µl (23-25 mm) (Şekil 5c) ve 40 µl (23-26 mm) (Şekil 5d) yağ emdirilen diskler engelleme zonu oluşturmuşlardır. Engelleme oranı 25 µl yağ miktarına kadar artış gösterirken daha yüksek miktarlarda çok fazla artış göstermemiştir. Veri analiz sonuçlarına bakıldığında ise sonuçların $p<0.05$ değerinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1).



Şekil 5. Okaliptus yağının farklı dozlarının emdirildiği diskler etrafında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* gelişimi üzerinde oluşturduğu engelleme zonları

Çizelge 1. Okaliptus uçucu yağının farklı dozlarının *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine antibakteriyel etkileri

Dozlar	Engelleme (zon) çapı (mm)*
Kontrol	0[a]
15 µl	13.77[b]
20 µl	17.44[c]
25 µl	22[d]
30 µl	21.22[d]
35 µl	21[d]
40 µl	21.77[d]

* Sütun içerisinde yer alan ortalama engelleme çaplarının (mm) yanlarındaki farklı harfler, dozlar arasındaki farkın istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğunu gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $p\leq0.05$)

Uçucu yağların *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı antibakteriyel etkisine bakıldığı benzer çalışmalarda ise: Basım et al. (2000), *Thybra spicata* L. var *spicata* (Karabaş kekiği)'ni *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'in de dahil olduğu birkaç bakteriyel etmen üzerinde denemişlerdir. Uçucu yağın farklı dozlarını (20-1280 µg/ml) denedikleri çalışmada *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine antibakteriyel etki ettiğini saptamışlardır. Daferera et al. (2003), kekik, giritotu, biberiye, lavanta, ada çayı, yarpuz ve mercanköşk bitkilerinden elde ettikleri uçucu yağları *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* üzerine etkisini uçucu yağı besiyerine katma yöntemi ile denemişlerdir ve *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *B. cinerea*, *F. solani* var. *coeruleum*'un gelişmesi üzerine kekik, mercanköşk ve giritotu bitkisel yağlarının 85–300 mg/ml yoğunlukta engelleyici etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Soylu et al. (2012), disk difüzyon yöntemi ile origanum, rezene, lavanta uçucu yağlarını kullanmış ve uygulanan 5 µl/ml dozunun *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* gelişimini 9.3-35.6 mm zon ile değişen oranlarda engellediğini, en etkili yağın 35.6 mm zon ile origanum uçucu yağı tarafından oluşturulduğunu bildirmiştir. Kızıl and Uyar (2006), kekik bitkisinin farklı türlerinden elde ettikleri uçucu yağların, disk difüzyon metodu ile *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'in de içinde olduğu farklı bitki patojenleri üzerine antibakteriyel etkinliğinin olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada, 5, 10 ve 15 µl dozlarında uygulanan uçucu yağların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde zon çapları ölçülmüş ve *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı etkili olduğunu saptamışlardır. Altundağ (2007), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı kullandığı *Sideritis erythrantha* subsp. *erythrantha* ve *Origanum minutiflorum* uçucu yağlarının farklı dozlarını kullanmış ve 1/5 konsantrasyonda birinci yağda 4 mm, ikinci yağda 33 mm zon çapı elde etmiştir. Kotan et al. (2010), *Satureja, Achillea* ve *Thymus* bitki türlerinden elde ettikleri uçucu yağ ve farklı çözgenlerde hazırladıkları bitki ekstraktlarını *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ve 24 tane bitki patojeni bakteriye karşı antibakteriyel etkilerini disk difüzyon metodu ile araştırmışlardır. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine *Thymus fallax* türünden elde edilen ekstrakt %80, uçucu yağın ise %62.5 oranında etkili olduğu ve *Satureja spicigera*, *Thymus fallax* oils, carvacrol ve thymol'un bakteriyel etmenler üzerinde kullanılabileceğini aynı zamanda tohum dezenfektanı olarak da etkili olduklarını bildirmişlerdir. Nashwa and Abo-Elyousr (2012), okaliptus bitkisinin de yer aldığı 5 bitki ekstraktını *Alternaria solani*'ye karşı püskürtme yöntemi ile uygulamıştır. Sera denemeleri sonucunda sarımsak ekstraktının %5'lik, pıtrak

ekstraktının %1 ve %5'lik konsantrasyonunun hastalığı engellemede en yüksek etkiyi gösterdiğini bildirmiştir. Kotan et al. (2013), çalışmada çibriska (*Satureja hortensis* L.) bitkisinden elde edilen uçucu yağı, ekstraktları ve çibriskanın iki önemli bileşeninin (carvacrol ve thymol) bitki patojeni bakterilerine karşı tohum dezenfektanı olarak kullanılma potansiyelini belirlemişlerdir. Disk difüzyon, MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) ve seri dilüsyon metotlarını kullanarak antibakteriyel testlemeleri yapmışlardır. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas axanopodis* pv. *vesicatoria* bakterileri ile bulaşık tohumların kullanıldığı çalışmada uçucu yağ, carvacrol ve thymol güçlü bir antibakteriyel etki gösterirken ekstrakların (n-hexane, chloroform, acetone ve methanol) zayıf etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Görmez et al. (2014), *Origanum rotundifolium* Boiss. (mercanköşk) bitki uçucu yağını elde ederek GC-MS yöntemi ile uçucu yağların bileşenlerini belirlemiştir. 20 bitki patojeni üzerinde farklı dozlarda disk difüzyon yöntemi ile uygulanan uçucu yağın ortalama 7-48 mm engelleme zon çapı oluşturduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Belgüzar et al. (2016b), kekik bitkisinden elde ettikleri uçucu yağ (5, 10, 15 ve 20 µl/ml) ve su ekstraktının (%0.5, %1, %2, %4 ve %8) farklı dozlarını 3 farklı yöntemde (agar kuyucuk difüzyon, besiyerine katılması, petri kapağına yapıştırma) uygulamışlardır. Kekik uçucu yağının 20 µl/ml'lik dozunun *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'i engellediğini bildirmişlerdir. Yılmaz (2014), çalışmasında 20 adet ticari uçucu yağ kullanarak kekiğin türleri olan *Origanum vulgare* L. (37 mm), *Origanum onites* L. (35 mm) ve tarçın (*Cinnamomum zeylanicum* L., 22 mm) uçucu yağlarının *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine etkili olduğunu bildirmiştir.

Okaliptus uçucu yağının farklı kombinasyonlarının domates bitkisine etkisi

Okaliptus bitkisinin uçucu yağı doz etki belirleme yöntemi ile etkin doz olarak bulunan 25 µl dozu ve *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatının taze kültürden 10^7 hücre/ml yoğunlukta hazırlanan bakteri süspansiyonları ve uçucu yağ bitkiye iki farklı kombinasyon ile uygulanmıştır. Uçucu yağın bir çözücü içinde çözündürülmeden direk bitkiye verildiğinde bitkinin tamamen öldüğü gözlenmiş ve bunun üzerine uçucu yağı 1/5 oranında çözündürmek için DMSO kullanılmıştır. Büyütme kabininde yetiştirilen ve 3-4 gerçek yapraklı dönemde olan domates fideleri kullanılmıştır. Uygulamadan sonraki 8-15 gün bitkiler gözlemlenmiştir. İki farklı kombinasyonun birincisinde domates fidelerine önce bakteri süspansiyonu uygulanıp 48 saat sonra uçucu yağ uygulanmış olan denemede 8-15 günlük sürede yapılan gözlemler sonucu uçucu yağın bitkide bakteri gelişimini engellemediği tespit edilmiş ve 15 gün daha beklenerek aynı gözlem alınmıştır (Şekil 6). Uygulama yapılan bitkilerde hastalık simptomları net olarak gözlenmiş olup % olarak hesaplanan hastalık şiddeti ise %77.7 olarak hesaplanmıştır. Bu uygulamanın yeterli olmadığı düşünülerek diğer uygulamaya geçilmiştir.



Şekil 6. Bakteri (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) inokulasyonu uygulanıp 48 saat sonra okaliptus uçucu yağı uygulanan domates bitkileri (a), sağlıklı kontrol domates bitkisi (b)

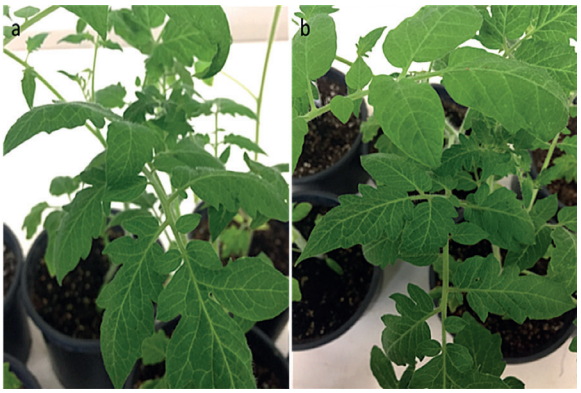
İkinci uygulamada ise önce uçucu yağ püskürtülüp, 48 saat polietilen torbada tutulduktan sonra aynı bakteri süspansiyonu uygulanmış ve 8-15 günlük sürede yapılan gözlemlere göre hastalığa özgü herhangi bir belirti gözlenmemiştir (Şekil 7). Uygulama yapılan bitkilerde % olarak hesaplanan hastalık şiddeti %2.2 olarak hesaplanmıştır. Sadece bakteri uygulanan bitkilerde oluşan hastalık şiddeti %82.2, sadece uçucu yağ uygulanan bitkilerde herhangi belirgin bir simptom gözlenmemiş olup hastalık şiddeti %2.2 olarak hesaplanırken negatif kontrol olan bitkilerde hastalık simptomu gözlenmemiş olup hastalık şiddeti %0 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, saksı denemeleri sonucunda elde edilen veriler ile yapılan varyans analizinde uygulamalar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar tespit edilmiştir (Çizelge 2). Çoklu karşılaştırma testinde iki grup oluşmuştur. Elde edilen bu verilere bakıldığında, bitkide oluşan hastalık şiddeti sırasıyla sadece bakteri uygulaması, bakteri uygulandıktan sonra yağ uygulaması, sadece yağ uygulaması, önce yağ uygulanıp sonra bakteri uygulaması ve negatif kontrol olarak sıralanmıştır. Sonuç olarak okaliptus uçucu yağının hastalık etmeni ile mücadelede kullanılabileceği düşünülmektedir.

Yapılan önceki çalışmalara bakıldığında ise, Altundağ (2007), *Origanum minutiflorum* bitkisinin uçucu yağını *Xanthomonas vesicatoria* üzerinde denemiş ve önce uçucu yağ 48 saat sonra bakteri süspansiyonu uyguladığı çalışmada daha az hastalık simptomu oluştuğunu rapor

Çizelge 2. Bitkiye uygulanan okaliptus uçucu yağının farklı kombinasyonlarının *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine antibakteriyel etkileri

Karakter	Hastalık şiddeti*	Hastalık şiddeti (%)
Negatif kontrol	0.00[a]	%0.0
Sadece uçucu yağ uygulaması	0.86[a]	%2.2
Uçucu yağ uygulandıktan 48 saat sonra bakteri uygulaması	0.86[a]	%2.2
Bakteri uygulandıktan 48 saat sonra uçucu yağ uygulaması	5.03[b]	%77.7
Sadece bakteri uygulaması	5.06[b]	%82.2

* Sütun içerisinde yer alan hastalık şiddetinin yanlarındaki farklı harfler, uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğunu gösterir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, p≤0.05)



Şekil 7. Okaliptus yağı uygulanıp üzerine bakteri (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) inokulasyonu yapılan domates bitkisi (a), sağlıklı kontrol bitkisi (b)

etmiştir. Nashwa and Abo-Elyousr (2012), okaliptus bitkisinin de yer aldığı 5 bitki ekstraktını *Alternaria solani*'ye karşı püskürtme yöntemi ile uygulamıştır. Sera denemeleri sonucunda sarımsak ekstraktının %5'lik, pıtrak ekstraktının %1 ve %5'lik konsantrasyonunun hastalığı engellemede en yüksek etkiyi gösterdiğini ve diğer bitki ekstraktının ise daha az bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, okaliptus uçucu yağının *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine antibakteriyel bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. Uçucu yağın alternatif tıpta, kozmetik gibi birçok farklı alanda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmasından dolayı bitki patojeni bakterilerle mücadelede de kullanımında insan ve çevre sağlığı üzerine olumsuz bir etkisi olmayacağı ve hasat edilen ürünlerde kalıcılık riskinin olmayacağı düşünülmektedir. Bu sonuçların, ülkemizde bitki patojeni bakterilerine karşı kimyasal kullanımını en aza indirmeyi hedefleyen mücadele yöntemlerinde ve organik tarım yetiştiriciliğinde *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ile mücadelede kullanılabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Nida ÜNLÜ' nün Yüksek Lisans tezinden üretilmiş olup aynı zamanda Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi-Bilimsel Araştırma Projesi Birimi, GTB-2018/11 BAGEP no' lu projesi tarafından desteklenmiştir. Pozitif kontrol temini için Prof. Dr. Yeşim AYSAN (Çukurova Üni.)' a çok teşekkür ederiz.

ÖZET

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* karantinaya tabi, tohum kökenli, domates bitkisinde bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığına sebep olan önemli Gram pozitif bir bakteriyel hastalık etmenidir. Bu çalışmanın amacı, okaliptus (*Eucalyptus citriodora*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), karanfil (*Dianthus caryophyllus*), anason (*Pimpinella anisum*) ve hardal (*Brassica nigra*) bitki uçucu yağlarının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine antibakteriyel etkinliğini belirlemektir. Bu amaçla, Mersin ilinden toplanan hastalıklı domates örneklerinden izole edilen bakteri izolatları morfolojik ve moleküler tanı yöntemleri ile incelenmiş, 6 tanesinin *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ile enfekteli olduğu teşhis edilmiştir. Uçucu yağların *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine etkileri *in vitro* koşullarda disk difüzyon metodu ile araştırılmıştır. Test edilen uçucu yağlar arasında okaliptus uçucu yağının *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'in gelişimine en etkili yağ olduğu belirlendikten sonra, doz artışına bağlı antibakteriyel etkinliği belirlemek için antibiyogram disklerine farklı miktarlarda uçucu yağlar eklenerek engelleme zonları ölçülmüştür. Araştırma sonucunda, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı okaliptus yağının en etkili

dozunun 23 mm engelleme zonu oluşturan 25 µl yağ dozu olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen uçucu yağ miktarı farklı kombinasyonlarla domates bitkisine uygulanmıştır. Bu sonuçlara göre, okaliptus uçucu yağının *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* gelişimini engellediği tespit edilmiş ve mücadelesinde kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: okaliptus, uçucu yağ, bakteriyel kanser, antibakteriyel etki, mücadele

KAYNAKLAR

Akat S., 2008. Domates bakteriyel leke veya kanser (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) hastalığına karşı biyolojik mücadele yöntemleri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 81 s., Bornova, İzmir.

Aktaş S., 2015. Domates öz nekrozuna neden olan etmenlere karşı PGPR ve biyoajan bakterileri kullanılarak kontrollü koşullarda biyolojik mücadele imkanlarının araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 61 s., Erzurum.

Al-Reza S.M., Rahman A., Ahmed Y., Kang S.C., 2010. Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. Pesticide Biochemistry and Physiology, 96 (2), 86-92.

Altundağ Ş., Aslım B., 2005. Kekiğin bazı bitki patojeni bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3 (7), 12-14.

Altundağ Ş., 2007. Labiatae familyasına ait bazı endemik türlerin önemli bitki patojeni bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisinin araştırılması, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 84 s., Ankara.

Azaz A.D., Irtem H.A., Kurkcuoğlu M., Baser K.H.C., 2004. Composition and the *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of some *Thymus* species. Zeitschrift für Naturforschung C, 59 (1-2), 75-80.

Basım H., Yegen O., Zeller W., 2000. Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. Journal of Plant Diseases and Protection, 279 (3), 279-284.

Belgüzar S., Yanar Y., Aysan Y., 2016a. Intensity of bacterial wilt disease of tomato in Tokat and identification of disease agent (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 33 (2), 34-40.

Belgüzar S., Yılar M., Yanar Y., Kadıoğlu İ., Doğar G., 2016b. *Thymus vulgaris* L. (kekik) ekstrakt ve uçucu yağının *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerine antibakteriyal etkisi. Turkish Journal Weed Sicience, 19 (2), 20-22.

Bremer H., Özkan M., 1950. Tomato wilt diseases. Mahsul Hekimi, 3 (5).

Çetinkaya Yıldız R., 2007. Domates bakteriyel solgunluk hastalık etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'nin tanılanması ve bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 173 s., Adana.

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 (1), 39-44.

FAO, 2016. Agriculture, vegetable production, http://faostat.fao.org, (Erişim tarihi: 30.07.2018).

Forster R.L., Echandi E., 1973. Relation of age of plants, temperature and inoculum concentration to bacterial cancer development in resistant and susceptible *Lycopersicum* spp. Phytopathology, 63, 773-777.

Gleason M.L., Gitaitis R.D., Ricker M.D., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. Plant Disease, 77 (11), 1069-1076.

Görmez A., Bozari S., Yanmis D., Gulluce M., Agar G., Sahin F., 2014. The use of essential oils of *Origanum rotundifolium* as antimicrobial agent against plant pathogenic bacteria. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19 (3), 656-663.

Heatley N.G., 1944. A method for the assay of penicillin. Biochemical Journal, 38 (1), 61.

Iacobellis N.S., Lo Cantore P., Capasso F., Senatore F., 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (1), 57-61.

Kaya K., Sertkaya E., Üremiş İ., Soylu S., 2018. Determination of chemical composition and fumigant insecticidal activities of essential oils of some medicinal plants against the adults of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 21 (5), 708-714. DOI:10.18016/ksudobil.386176

Kızıl S., Uyar F., 2006. Antimicrobial activities of some thyme (*Thymus, Staureja, Origanum* and *Thymbra*) species against important plant pathogens. Asian Journal of Chemistry, 18 (2), 1455-1461.

Kotan R., Cakir A., Dadasoglu F., Aydin T., Cakmakci R.,

Ozer H., Kordali S., Mete E., Dikbas N., 2010. Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish A*chillea, Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90 (1), 145-160.

Kotan R., Dadasoğlu F., Karagoz K., Cakir A., Ozer H., Kordali S., Cakmakci R., Dikbas 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.

Mengulluoglu M., Soylu S., 2012. Antibacterial activities of essential oils from several medicinal plants against the seed-borne bacterial disease agent *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Research on Crops 13, 641-646.

Mondal M., Khalequzzaman M., 2009. Ovicidal activity of essential oils against red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Bio-Science, 17, 57-62.

Nashwa S.M., Abo-Elyousr K.A., 2012. Evaluation of various plant extracts against the early blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions. Plant Protection Science, 48 (2), 74-79.

Sertkaya E., Kaya K., Soylu S., 2010. Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae). Industrial Crops and Products, 31, 107–112.

Soylu S., Baysal Ö., Soylu E.M., 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-s-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. Plant Science, 165, 1069-1075.

Soylu S., Evrendilek G.A., Soylu E.M., 2009. Chemical compositions and antibacterial activities of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) and dill (*Anethum graveolens* L.) essential oils against the growth of food-borne and seed-borne plant pathogenic bacteria. Italian Journal of Food Science, 21, 347-355.

Soylu E.M., Kurt Ş., Soylu S., 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 143, 183-189

Soylu S., Eriş M., Soylu E.M., 2012. Bitki uçucu yağlar ve ana bileşenlerinin tohum kökenli domates bakteriyel hastalık etmenlerine karşı antibakteriyel etkinliklerinin belirlenmesi. 9. Sebze Tarımı Sempozyumu, 12-14 Eylül 2012, Konya, 368-371 s.

Şahin F., Karaman I., Güllüce M., Öğütçü H., Şengül M., Adıgüzel A., Öztürk S., Kotan R., 2003. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. Journal of Ethnopharmacology, 87 (1), 61-65.

Şahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G., Özer H., 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control, 15 (7), 549-557.

Tireng Karut Ş., 2011. Organik tarımda domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'ne karşı kullanılabilecek tohum uygulamaları. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 62 s., Adana.

Tokgönül S., 1998. Ticari domates tohumlarında bakteriyel solgunluk etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'nin saptanması ve mücadele olanakları üzerine araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 93 s., Adana.

Townsend G.R., Heuberger J.W., 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. Plant Disease Reporter, 27, 340-343.

Yanar Y., Belgüzar S., Telci İ., 2016. *Origanum* spp., *Mentha* spp. ve *Lippia* sp. türlerine ait uçucu yağların *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Botrytis cinerea*'ya karşı antimikrobiyal etkisi. Turkish Journal of Weed Science, 19 (1), 18-25.

Yılmaz M., 2014. Bazı uçucu yağların Domates bakteriyel kanser ve solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) etmeninin kontrolündeki etkinliğinin belirlenmesi ve bu yağların film kaplamada kullanımı. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 137 s., Antalya.