



T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**BİTKİ UÇUCU YAĞ VE BİLEŞENLERİNİN FASULYEDE SORUN OLAN  
FUNGAL VE BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI  
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN *in vitro* KOŞULLARDA  
ARAŞTIRILMASI**

**ŞAHİMERDAN TÜRKÖLMEZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Antakya/HATAY  
NİSAN -2009**



T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**BİTKİ UÇUCU YAĞ VE BİLEŞENLERİNİN FASULYEDE SORUN OLAN  
FUNGAL VE BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI  
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN *in vitro* KOŞULLARDA  
ARAŞTIRILMASI**

**ŞAHİMERDAN TÜRKÖLMEZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZ**

**Antakya/HATAY  
NİSAN -2009**

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİ UÇUCU YAĞ VE BİLEŞENLERİNİN FASULYEDE SORUN OLAN  
FUNGAL VE BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI  
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN *in vitro* KOŞULLARDA  
ARAŞTIRILMASI**

**ŞAHİMERDAN TÜRKÖLMEZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Doç. Dr. E. Mine SOYLU Danışmanlığında Hazırlanan Bu Tez 22/04/2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

.....  
Doç.Dr. E. Mine SOYLU

Başkan

.....  
Doç.Dr. Gülsün A. EVRENDİLEK

Üye

.....  
Yrd.Doç.Dr. Sibel DERVİŞ

Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır

**Kod No:**

Prof.Dr. Bünyamin YILDIZ  
Enstitü Müdür V.

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca Desteklenmiştir.  
Proje No: 07 M 0205

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirilerin, çizelgelerin, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Dünyada ve Ülkemizde Yetiştiriciliği Yapılan Fasulye Bitkilerinde Sorun Olan Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenleri İle Yapılan Çalışmalar .....	5
2.2. Bitki Uçucu Yağları ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Etkinlikleri İle İlgili Çalışmalar .....	8
2.3. Bitki Uçucu Yağları ve Ana Bileşenlerinin Antibakteriyel Etkinlikleri İle İlgili Çalışmalar .....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Bitki Örnekleri.....	19
3.1.2. Fungus ve Bakteri Kültürleri.....	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Hastalık Sörveyi.....	20
3.2.2. Fungal Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanısı.....	20
3.2.3. Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanısı.....	21
3.2.3.1. Bakteriyel Etmenlerin İzolasyonu.....	21
3.2.3.2. Bakteriyel İzolatların Morfolojik ve Klasik Biyokimyasal Yöntemlerle Tanılanması.....	21
3.2.3.3. Bakteriyel İzolatlarının Yağ Asitleri Profillerine Göre Tanılanması....	22
3.2.3.4. Tütünde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction, HR) Testi .....	23
3.2.4. Patojenite Testlemeleri.....	24
3.2.4.1. Fungal Etmenlerin Patojenite Testlemeleri.....	24
3.2.4.2. Bakteriyel İzolatlarının Patojenite Testlemeleri.....	24

3.2.5. Bitki Uçucu Yağların Elde Edilmesi .....	25
3.2.6. Bitki Uçucu Yağlar ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	25
3.2.6.1. Bitki Uçucu Yağların Değme Etkilerinin Belirlenmesi.....	25
3.2.6.2. Bitki Uçucu Yağlarının Buhar Etkilerinin Belirlenmesi.....	26
3.2.6.3. Bitki Uçucu Yağ Anabileşenlerinin Değme Etkilerinin Belirlenmesi...	26
3.2.7. Bitki Uçucu Yağların Antibakteriyel Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	27
3.2.7.1. Agar Disk Difüzyon Yöntemi.....	27
3.2.7.2. Mikro Seyreltme Yöntemi.....	27
3.2.8. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler.....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1. Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin İzolasyon ve Teşhisleri.....	30
4.2. Bitki Uçucu Yağlar ve Genel Özellikleri .....	32
4.3. Bitki Uçucu Yağ ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	32
4.3.1. Bitki Uçucu Yağlarının Misel Gelişimi Üzerine Değme Etkileri.....	32
4.3.2. Bitki Uçucu Yağlarının Misel Gelişimi Üzerine Buhar Etkileri.....	35
4.3.3. Bitki Uçucu Yağlarının Ana Bileşenlerin Misel Gelişimi Üzerine Değme Etkileri.....	39
4.4. Bitki Uçucu Yağ ve Ana Bileşenlerinin Antibakteriyel Etkinlikleri.....	41
4.4.1. Bitki Uçucu Yağların Antibakteriyel Etkinlikleri.....	41
4.4.1.1. Agar Disk Difüzyon Yöntemi.....	41
4.4.1.2. Mikro Seyreltme Yöntemi.....	43
4.4.2. Bitki Uçucu Yağlarının Ana Bileşenlerinin Antibakteriyel Etkinlikleri....	47
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	55
TEŞEKKÜR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	61

## ÖZET

**BİTKİ UÇUCU YAĞ VE BİLEŞENLERİNİN FASULYEDE SORUN OLAN FUNGAL VE BAKTERİYEL HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN *in vitro* KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışmada, Hatay ilinde doğal olarak yetişen tıbbi bitkilerden Suriye kekiği (*Origanum syriacum*), rezene (*Foeniculum vulgare*) ve defne (*Laurus nobilis*) bitkilerinden elde edilen uçucu yağ ve bu yağların ana bileşenlerinin (carvacrol, *trans*-anethole ve 1,8-cineole) fasulye bakteriyel hastalık etmenleri *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (**Psp**) ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (**Cff**) ile toprak kökenli fungal hastalık etmelerinden *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* ve *Macrophomina phaseolina*'ya karşı antimikrobiyal etkinlikleri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

Bitkilerden elde edilen uçucu yağların değme ve buhar fazları fungal etmenlerin misel gelişimlerini konsantrasyonlara bağlı olarak değişik oranlarda engellemiştir. *O. syriacum* ve *F. vulgare* uçucu yağları 160 ile 320 µg/ml değme konsantrasyonlarda fungal etmenlerin miselyal gelişimini tamamen engellerken, *L. nobilis* uçucu yağı nispeten yüksek konsantrasyonlarda (1440-2880 µg/ml) antifungal etkinlik göstermiştir. Uçucu yağların buhar etkinliğine bakıldığında 20 ile 200 µg/ml hava konsantrasyonlarda fungusların misel gelişiminin tamamen engellendiği belirlenmiştir. Uçucu yağların buhar etkinliği değme etkinliğine göre daha yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. *O. syriacum* ve *F. vulgare* uçucu yağlarının ana bileşenlerinden carvacrol ve *trans*-anethole fungal etmenleri 130 ile 440 µg/ml konsantrasyonda tamamen engellerken, *L. nobilis* uçucu yağının ana bileşeni olan 1,8-cineole fungal etmenler içinde sadece *M. phaseolina* karşı kullanılan en yüksek konsantrasyonda (3000 µg/ml) antifungal etkinlik gösterebilmiştir.

Uçucu yağlar ve ana bileşenlerinin antibakteriyel etkinlikleri iki farklı metot (agar disk difüzyon ve mikro seyreltme yöntemleri) kullanılarak araştırılmıştır. Bakteriler arasında uçucu yağlara karşı gram-pozitif **Cff** in gram-negatif **Psp**'e göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. *O. syriacum* uçucu yağı **Cff** ve **Psp** bakteriyel etmene karşı en etkili yağ olurken (37.0-10.1 mm çapında engelleme bölgesi oluşturarak), bu yağı sırası ile *F. vulgare* (6.2-12.1 mm) ve *L. nobilis* (6.0-10.0 mm) uçucu yağları takip etmiştir. **Cff** ve **Psp** için belirlenen en düşük patojen gelişimini engelleyen konsantrasyonlar (MIC) *O. syriacum* için sırası ile 0.5 ve 2.5, *F. vulgare* için 175.0 ve 300.0, *L. nobilis* için 60.0 ve 400.0 mg/ml olarak belirlenmiştir.

**Cff** in mikrobiyel gelişimi carvacrol ve 1,8-cineole bileşenlerince uçucu yağlarında buldukları oranlarda (0.5 ve 35 mg/ml) engellenirken, *trans*-anethole bileşeni kullanılan tüm oranlarda (150-450 mg/ml) antibakteriyel etkinlik göstermemiştir. **Psp**'nin mikrobiyel gelişimi carvacrol tarafından uçucu yağlarda buldukları oranlarda (2 mg/ml) engellenirken, 1,8-cineole ve *trans*-anethole bileşenlerin uçucu yağlarında buldukları oranlarının yanı sıra daha yüksek konsantrasyonlarda bile (220-660 ile 255-765 mg/ml) antibakteriyel etkinlik göstermemiştir.

Bitki uçucu yağ ve ana bileşenlerin göstermiş olduğu antimikrobiyal etkinlikler, bu tür doğal bileşiklerin ekonomik öneme sahip bitkilerin fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı kimyasal mücadeleye alternatif yeni mücadele yöntemleri olarak kullanılabilme potansiyellerine sahip olduğunu göstermiştir.

**2009, 61 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Fasulye, antibakteriyel, antifungal, bitki uçucu yağ, *Origanum*, *Foeniculum*, *Laurus*

## ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* ANTIMICROBIAL EFFICACY OF PLANT ESSENTIAL OILS AND THEIR MAIN CONSTITUENTS AGAINST FUNGAL AND BACTERIAL DISEASE AGENTS OF BEAN

In this study, *in vitro* antimicrobial efficacy of essential oils (EO's) obtained from Syrian oregano (*Origanum syriacum*), fennel (*Foeniculum vulgare*) and laurel (*Laurus nobilis*) plants, naturally growing in the different regions of Hatay province, and bay their major constituents (carvacrol, *trans*-anethole and 1,8-cineole) were investigated against bean bacterial [*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (**Psp**) and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (**Cff**)] and soil-borne fungal [*Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*] disease agents.

Volatile and contact phase of EO's at different concentrations inhibited the mycelial growth in a dose-dependent manner. Results obtained showed that contact phases of *O. syriacum* and *F. vulgare* EO's at 160 to 320 µg/ml concentrations completely inhibited mycelial growth of fungal pathogens. Contact phases of *L. nobilis* EO, however, completely inhibited mycelial growth at relatively high concentrations (1440-2880 µg/ml). Volatile phases of *O. syriacum*, *F. vulgare* and *L. nobilis* EO's completely inhibited mycelial growth at relatively lower concentrations (20 ile 200 µg/ml). Volatile phase effects of EO's were consistently found to be more successful on inhibition of mycelial growth in comparison to contact phases. Major components of *O. syriacum*, and *F. vulgare* EO's, carvacrol and *trans*-anethole respectively, completely inhibited mycelial growth at 130 to 440 µg/ml concentrations. Major component of *L. nobilis* EO, 1,8-cineole, was, however, able to show antifungal activity against only *M. phaseolina* at the highest concentration (3000 µg/ml).

Antibacterial activities of the EO's and their major constituents were investigated by using two conventional methods (agar disk diffusion and micro broth dilution methods). Gram-positive **Cff** and gram-negative **Psp** were the most and the least sensitive bacterial agents against tested essential oils. The EO from *O. syriacum* was the most effective against the both bacterial species (**Cff** and **Psp**) tested (giving mean inhibition zones of 10.1-37.0 mm diameter). This essential oil was followed by *F. vulgare* (6.2-12.1 mm) and laurel (6.0-10.0 mm) essential oils.

Minimum inhibitory concentrations (MIC's) of EO and major constituents such as cavracrol, *trans*-anethole and 1,8-cineole, were determined using micro broth dilution tests. MIC values in the range of 0.5 to 2.5 mg/ml by *Origanum*, 175 to 300 mg/ml by *F. vulgare*, 60 to 400 mg/ml by *L. nobilis* EO's were determined against **Cff** and **Psp** respectively.

Carvacrol and 1,8-cineole was completely inhibited bacterial growth of **Cff** at the concentrations found in their respective EO (0.5 and 35 mg/ml respectively). Major component of *F. vulgare*, *trans*-anethole, did not inhibited bacterial growth at the all concentrations used (150-450 mg/ml). While carvacrol completely inhibited bacterial growth of **Psp** at the concentrations found in EO (2 mg/ml), 1,8-cineole and *trans*-antehole failed to show antibacterial activities against **Psp** at the all concentrations used (220-660 to 255-765 mg/ml)

Antimicrobial activities shown by EO's and their major constituents against fungal and bacterial disease agents revealed their potential to be used as a new alternative control measures against fungal and bacterial diseases of economically important plant.

2009, 61 pages

**Key words:** Fasulye, antibacterial, antifungal, plant essential oil, *Origanum*, *Foeniculum*, *Laurus*

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><i>Cff</i></b>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>
<b>HR</b>	Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu (Hypersensitive Reaction)
<b>KB</b>	King's B Agar katı besi yeri
<b>cfu</b>	Koloni oluşturan birim
<b>LB</b>	Luria Broth sıvı besi yeri
<b>MIS</b>	Mikrobiyal Tanılama Sistemi
<b>NA</b>	Nutrient Agar katı besi yeri
<b>OD</b>	Optik densite
<b>PDA</b>	Patates Dekstroz Agar katı besi yeri
<b><i>Psp</i></b>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
<b>TSBA</b>	Trypticase soy broth agar katı besi yeri
<b>UV</b>	Ultra viole dalga boyu
<b>YDC</b>	Yeast Dekstroz Chalk Agar besi yeri



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1 Denemede uçucu yağları kullanılan bitkilerin bilimsel adı, yöresel adı, toplandığı yer ve toplanma tarihleri.....	19
Çizelge 4.1 Çalışmalarda Kullanılan Bitkilerden Elde Edilen Uçucu Yağlarının Genel Özellikleri.....	32
Çizelge 4.2 <i>O. syriacum</i> uçucu yağının değme fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği.....	33
Çizelge 4.3 <i>F. vulgare</i> uçucu yağının değme fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği.....	33
Çizelge 4.4 <i>L. nobilis</i> uçucu yağının değme fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği.....	34
Çizelge 4.5 <i>O. syriacum</i> uçucu yağının buhar fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği.....	36
Çizelge 4.6 <i>F. vulgare</i> uçucu yağının buhar fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği.....	37
Çizelge 4.7 <i>L. nobilis</i> uçucu yağının buhar fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği.....	37
Çizelge 4.8 Bitki Uçucu Yağ Ana Bileşenlerinin Farklı Konsantrasyonlarının Fasulyede Sorun Olan Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Antifungal Etkinliği.....	39
Çizelge 4.9 Bitki Uçucu Yağlarının Fasulyede Sorun Bakteriyel Hastalık Etmenlerine Karşı Antibakteriyel Etkinliği.....	42
Çizelge 4.10 Uçucu Yağların Bakteriyel Gelişimlerini Engelleyen Minimum Engelleme Konsantrasyonları (MIC).....	45
Çizelge 4.11 Bitki Uçucu Yağ Ana Bileşenlerinin Farklı Konsantrasyonlarının Fasulyede Sorun Bakteriyel Hastalık Etmenlerine Karşı Antibakteriyel Etkinliği.....	49

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. Hatay ili ve ilçelerinde ekimi yapılan fasulye bitkilerinde sorun olan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerince bitki kök ve gövdelerinde (oklar) oluşturulan hastalık belirtileri (A, B ve C). D, Bakteriyel fasulye hale yanıklığı etmeni <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 'nın fasulye meyvelerinde oluşturduğu tipik ıslaklık belirtileri.....	31
Şekil 4.2. Hastalıklı fasulye bitkilerinden izolae edilen toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinin (A, <i>S. rolfsii</i> ; B, <i>R. solani</i> ; C, <i>M. phaseolina</i> ) PDA besi yerinde oluşturdukları koloni morfolojileri.....	31
Şekil 4.3. Rezene uçucu yağının buhar fazına ait farklı konsantrasyonlarının (A) <i>S. rolfsii</i> , (B) <i>R. solani</i> ve (C) <i>M. phaseolina</i> etmenlerine karşı gösterdiği antifungal etkinliği.....	36
Şekil 4.4. <i>L. nobilis</i> ve <i>O. syriacum</i> uçucu yağlarının bakteriyel etmenlerden <i>P.syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (A) ve <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (B) karşı agar disk difüzyon testi ile antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi.....	42
Şekil 4.5. <i>O. syriacum</i> uçucu yağının <i>Psp</i> (A) ve <i>Cff</i> (B) etmenlerine karşı farklı konsantrasyonlarda göstermiş olduğu antibakteriyel etkinliğinin Resazurin mikrotitrasyon assay testi (REMA) ile belirlenmesi.....	44
.....	44
Şekil 4.6. Bitki uçucu yağların ana bileşenlerinden carvacrol (A) ve 1,8-cineole'ün (B) <i>Psp</i> etmenine karşı farklı konsantrasyonlarda (1x, 2x ve 3x) göstermiş olduğu antibakteriyel etkinliğinin Resazurin mikrotitrasyon assay testi (REMA) ile belirlenmesi.....	47

## 1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), taze, konserve ve kuru olarak değerlendirilebilen besleyici değeri yüksek bir sebze türüdür. Türkiye’de 2004 yılında toplam 258.000 ha alanda fasulye tarımı yapılmış olup, 545.000 ton taze, 260.000 ton kuru fasulye üretilmiştir (Anonymous, 2005). Hatay ilinde 29710 da alanda fasulye ekim alanı bulunmakta ve toplam 44.899 tonluk baklagil üretiminin 29.631 tonunu fasulye üretimi oluşturmaktadır (Anonymous, 2007). Bölgemizde fasulye yetiştiriciliği daha çok taze tüketime yönelik olarak yapılmaktadır.

Ülkemizde ve tüm dünyada bu önemli bitkinin verim ve kalitesi birçok biyotik (fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri) ve abiyotik etkenler tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir (Nywall, 1989). Fungal toprak kökenli hastalık etmenlerinden *Rhizoctonia solani* Kühn. [Rhizoctonia (Ağ) Kök Çürüklüğü], *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f.sp. *phaseoli* (Burkholder) W.C. Snyder&H.N. Hans. [Fusarium Kök Çürüklüğü], *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *phaseoli* J.B. Kendrick and W.C. Snyder. [Fusarium Solgunluğu (sarılığı)], *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich [Kömür Çürüklüğü], *Pythium ultimum* Trow [Ani Solgunluk (Çökerten)], *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary [Beyaz Çürüklük], *Sclerotium rolfsii* Sacc. [Güney Yanıklığı], ve *Alternaria* spp, fasulyede solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü gibi hastalıklara sebep olan, bitkinin fide döneminde olduğu kadar ileri dönemlerinde de ortaya çıkan ve erken enfeksiyonlarda bitki ölümlerine neden olmaktadır(Willetts ve Wong, 1980; Sippell ve Hall, 1982; Dixon, 1984; Hall, 1991). Bu patojenlerden *S. rolfsii*, *R. solani* ve *M. phaseolina* fungusları oluşturdukları dayanıklı yapılar olan sklerotlarla toprakta uzun yıllar konukçuları olmaksızın canlı kalabilmektedirler (Nelson, 1981; Carling ve Sumner,1992; Punja ve Rahe,1992; Mihail,1992).

Fungal hastalıkların yanı sıra bakteriyel hastalık etmenleri de fasulyede önemli sorunlara neden olmaktadır. Önemli bakteriyel hastalık etmenleri arasında hale yanıklık etmeni, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (**Psp**), adi yaprak yanıklık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (**Xap**), kahverengi leke etmeni, *P. syringae* pv. *syringae* (**Pss**), *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* (**Cff**) en fazla bildirilenlerdir (Saettler, 1991, Serfontein, 1994; Hirano ve ark. 1995; Taylor ve ark., 1996; Allen ve ark., 1998; Ferrira ve ark., 2003). Hastalık etmenlerinin varlığı

ülkemizde yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur. Benlioğlu ve ark. (1994) ile Demir ve Gündoğdu, (1994) Türkiye'nin birçok bölgesinden toplamış olduğu örneklerin *Psp*, *Pss* ve *Xap* izolatları ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir. Fasulyede sorun olan bu bakteriyel etmenler kışı tohum üzerinde ve topraktaki bitki artıkları üzerinde geçirmektedir (Gilbertson ve ark., 1990). Bu tohumlar ve bunlardan yetiştirilen fideler primer inokulum kaynağı olarak hastalığın yayılmasında rol oynamaktadırlar. Bakteriyel hastalıklara karşı mücadelede ilk sırayı bakırlı fungusitler ile antibiyotik içerikli pestisitlerin kullanımı almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bitki patojeni bakterilerde bakırlı bileşiklere karşı dayanıklılık sağlayan plazmitlerin varlığı bildirilmiş olup, kullanılan bakırlı ilaçlara karşı dayanıklılığın ortaya çıktığı belirlenmiştir (Urech ve ark., 1997; Garrett ve Schwart, 1998; Voloudakis ve ark., 2005). Patojenlerin dayanıklı patojen popülasyonları tohumda ve bitki artıklarında kışı geçirip yeni fasulye bitkilerini enfekte etmesiyle bir sezondan diğerine aktarılabilmektedir. Bu durum bakterisit uygulamaları ve sertifikalı tohum kullanımı, çeşit seleksiyonu ve ürün rotasyonu gibi entegre mücadele yaklaşımlarını tehlikeye sokmaktadır (Legard ve Schwartz, 1987). Ayrıca pek çok ülkede tohum yüzey kontaminasyonun azaltılması için yapılan antibiyotik uygulamalarının ülkemizde yasak olması mücadele açısından önemli sorun oluşturmaktadır.

Ekonomik olarak ciddi kayıplara neden olan toprak kökenli fungal hastalıkların mücadelesinde genelde toprak fumigantları yaygın olarak kullanılmaktadır. Örtü altında karşılaşılan toprak kökenli patojenlerin mücadelesinde, yıllarca Metil Bromid (MB) uygulamaları yapılmıştır. Günümüzde MB'in çevre ve insan sağlığı açısından doğurduğu olumsuz etkiler nedeniyle ülkemizde ve dünyada kullanımdan kaldırılması bu konuda araştırmacıları ve üreticiyi mevcut kimyasal alternatifleri daha yoğun kullanmaya yöneltmiştir. Bu patojenlerin mücadelesinde ülkemizde ve dünyada yaygın olarak kullanılan alternatif toprak fumigantları Dazomet ve Metam-Sodium'dur (Duniway, 2002; Yücel ve ark., 2007). Bu fumigantlar nemli toprağa uygulandıklarında önemli bir aktif bileşik olan ve değişik toprak kökenli fungus, nematodların mücadelesinde etkili bir şekilde kullanılan Methyl Isothiocyanate'a (MITC) parçalanır (Saeed ve ark., 1994; Fritch ve ark., 1998). Ancak toprak fumigantlarının kullanıldığı alanlarda ortaya çıkan fitotoksite problemlerinin yanısıra son zamanlarda sık kullanımlarından dolayı MITC'nin hızlı parçalandığı ve bunun da patojenlere olan

etkinliklerinde azalışa neden olduğu belirlenmiştir (McGovern ve ark. 1998; di Primo ve ark. 2003; Martin, 2003). Son yıllarda tarım alanlarında yapılan yoğun pestisit uygulamalarının çevreyi ve doğal dengeyi tehdit etmesi, tüketicinin bilinçlenmesi ve organik tarımın önem kazanması gelişmiş ülkelerde pestisit uygulamalarına sınır getirilmesine neden olurken, bu durum hastalıkla mücadelede acil alternatif yöntemlerin araştırma ihtiyacı duyulmasına sebep olmuştur.

Bitki hastalıklarıyla mücadelede alternatif metotlardan biri olarak bitkilerden elde edilen uçucu yağların kullanımı, günümüzde araştırmacıların ilgisini çekmeye başlamış olup, hastalıkların mücadelesinde kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Bitkilerin içerdikleri uçucu yağların birbirleriyle sinerjistik etkileşim içinde olan çok sayıda bileşikten oluştuğu bildirilmektedir (Ceylan, 1987). Bu bileşiklerin en önemlileri hidrokarbon, alkol, aldehit, ester, fenol ve eter yapılı bileşiklerdir. Uçucu yağların çoğunda bazı bileşikler diğerlerinden daha fazla olup ana bileşen durumundadır. Örneğin *Mentha piperita* (nane) uçucu yağında menthol (%50'den fazla), *Thymus revolutus* (kekik) uçucu yağında timol, cavaracrol (%50 civarında), *Eucalyptus spp.* (ökaliptus) uçucu yağında cineol (%70 civarında), *Origanum syriacum var bevani* (Suriye kekiği) uçucu yağında cavaracrol (%80 civarında), *Thymbra spicata* subsp. *spicata* (karabaş kekik) uçucu yağında cavaracrol (%38 civarında), *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas* (karabaş kekik) uçucu yağında 1,8-cineole (%36 civarında), *Rosmarinus officinalis* (biberiye) uçucu yağında borneol (%20 civarında), *Foeniculum vulgare* (rezene) uçucu yağında *trans*-Anethole (%80'den fazla), *Laurus nobilis* (defne) uçucu yağında 1,8-cineole (%36 civarında) ana bileşen olarak bulunmaktadır (Ravid ve Putievsky, 1985; Capone ve ark., 1988; Karaman ve ark., 2001; Soylu ve ark., 2006). Antimikrobiyal özelliğe sahip bitki uçucu yağların bileşenlerinde bulunan fenoller, aldehitler ve alkollerin mikroorganizmalara karşı hidrokarbonlar, eteroksit ve ketonlara göre daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Agarwal ve ark., 1979; Benjilali ve ark., 1984).

Yapılan bu çalışma ile Hatay ili florasında yetişen origanum (*O. syriacum* L. var *bevanni*), rezene (*F. vulgare* Mill.) ve defne (*L. nobilis* L.) bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve bu yağların içerisinde en yüksek oranlarda bulunan ana bileşenlerinden carvacrol, *trans*-anethole ve 1,8-cineole'ün fasulye patojeni fungal hastalık etmenlerinden *R. solani*, *M. phaseolina* ve *S. rolfisii* ile bakteriyel hastalık etmenlerinden *P. syringae*

pv. *phaseolicola* ve *C. flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens*'e karşı antimikrobiyal etkinliği kimyasal m¼cadeleye alternatif bir y¼ntem olarak *in vitro* koşullarında araştırılmıştır. Bu kapsamda bitki u¼ucu yağlarının antibakteriyel etkinliği agar disk dif¼zyon ve mikro seyreltme y¼ntemleri ile antifungal etkinliği ise gerek buhar gerekse değme fazları ayrı ayrı belirlenmiştir. Bitki u¼ucu yağları uygulamaya aktarıldığında damla sulama ile bitkilerin k¼klerine verilerek toprak k¼kenli fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı m¼cadelede kullanılabileceği gibi, seralarda bitkiler ¼zerine p¼sk¼rt¼lerek bitki patojenleri ile m¼cadelesi g¼z ¼n¼nde bulundurularak buhar etki ve değme etki fazları ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır. Soylu ve ark., (2006) tarafından yapılmış olan bir ¼alıřma ile belirlenen u¼ucu yağların i¼erisinde en y¼ksek oranlarda bulunan 3 ana bileşenden carvacrol, *trans*-anethole ve 1,8-cineole'¼n test edilen fitopatojen bakteriyel ve fungal etmenlere karşı antimikrobiyal etkinliği ilk kez bu ¼alıřma ile araştırılmıştır.

Klasik petride sayma y¼ntemi 48 saatlik bekleme gerektirdiği i¼in bu ¼alıřmada Resazurin mikrotitrasyon assay testi kullanılarak ¼alıřmaya kolaylık kazandırılmıştır. Bir ¼eřit oxazine (quinonimine boya) olan resazurin, steril su veya buffer i¼erisinde hazırlandığında oksidasyona uğramış hali mavi-mor renktedir (Palomino ve ark. 2002). Mavi-mor renkteki resazurin bileşiği mikrobiyal gelişimin varlığında yapısındaki oksijenin mikrobiyal etmenlerce yok edilmesi ve/veya t¼k¼tilmesi ile pembe renge d¼n¼řmektedir. Bu t¼ketim ve/veya yok edilmenin canlı mikrobiyal etmenin mitokondriyal enzimlerinden kaynaklandığı d¼ř¼n¼lmektedir (De Fries ve Mistuhashi, 1995; O'Brien ve ark., 2000; Guerin ve ark., 2001).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Dünyada ve Ülkemizde Yetiştiriciliği Yapılan Fasulye Bitkilerinde Sorun Olan Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenleri İle Yapılan Çalışmalar

Kömür çürüklüğü hastalığına neden olan *M. phaseolina*, kurak ve yarı kurak iklim kuşağında bulunan dünyanın birçok ülkesinde yetiştirilen fasulyelerde önemli ekonomik kayıplara neden olan toprak kökenli fungal hastalık etmenidir. Hastalık etmeninin hasat artıklarında oluşturduğu binlerce mikrosklerot primer inokulum kaynağı olarak görev yapar ve fungusun toprakta uzun süre canlı kalmasına neden olur (Dhingra ve Sinclair, 1978; Cottingham, 1981).

Smith ve ark. (1988), fasulye tarımının yapıldığı ülkelerde bakteriyel hastalık etmenlerinin sorun olduğunu, hastalık etmenlerinin yaygınlığı ve şiddeti üzerine uygulanan yetiştiricilik koşulları yanı sıra, bitki çeşitlerinin genetik yapısı ve bölgenin iklim koşullarının önemli düzeyde etkide bulunduğu bildirmişlerdir. Bakteriyel etmenler arasında hale yanıklığı etmeni *P. syringae* pv. *phaseolicola* nın serin, nemli ve yağışlı bölgelerde yetiştirilen fasulyelerde sorun olurken (Taylor ve ark., 1996; Allen ve ark., 1998), adi yaprak yanıklık etmeni *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ve kahverengi leke hastalığı etmeni *P. syringae* pv. *syringae*'nin özellikle uzun süreli sıcak ve nemli havaların hakim olduğu üretim alanlarında sorun olduğu bildirilmiştir (Schwartz, 1980; Saettler, 1991; Serfontein, 1994; Fourie, 2002).

Temizel ve Ertunç (1992), Ülkemizde Van ilinin önemli fasulye ekim alanlarında yapmış oldukları sörveyelerde, önemli sorun olarak karşılaştıkları hastalık etmenlerinin *A. alternata*, *F. solani*, *M. phaseolina*, *Drechslera sorokiniana* [*Cochliobolus sativus*], *R. solani*, *Stemphylium* sp. ve *Botrytis cinerea* olduğunu bildirmişlerdir.

Benlioğlu ve ark. (1994), Türkiye'nin birçok bölgesinden toplamış olduğu örneklerin *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ve *Pss* etmenleri ile bulaşık olduğunu belirlemiş ve bu etmenlere karşı dayanıklı fasulye genotiplerini araştırmışlardır.

Kahveci ve Maden (1994), *P. syringae* pv. *phaseolicola* ve *X. axonopodis* pv. *phaseoli* etmenlerince neden olunan bakteriyel hale yanıklığı ve leke hastalığının ülkemizde farklı bölgelerde ciddi kayıplara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Yücel ve Güncü (1994), Akdeniz Bölgesinde (G.Antep, K.Maraş, Adana, İçel ve Antalya) aralarında fasulye bitkisinin de bulunduğu nohut ve mercimek gibi Leguminaceae familyasına dahil bitkilerde; *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum* [*Gibberella acuminata*], *M. phaseolina*, *R. solani* ve *P. ultimum* gibi kök boğazı çürüklüğü ve solgunluğa neden olan fungal hastalıkların sıkça karşılaşıldığını bildirmişlerdir. Bu hastalıkların yanı sıra, fasulye bitkilerinde pas (*U. phaseoli* [*U. appendiculatus*]) ve antraknoz (*C. lindemuthianum*) hastalıklarına neden olan fungusların da bu bölgede varlığını belirlemişlerdir.

Valarini ve Spadotta (1995), İspanya'da fasulye yetiştiriciliği yapılan bazı bölgelerde yapmış oldukları sörveylerde *F. solani f.sp. phaseoli*, *S. sclerotiorum*, *S. rolfii* ve *X. campestris pv. phaseoli* gibi fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerini belirlemişler ve bunlardan *X. campestris pv. phaseoli* ve *F. solani f.sp. phaseoli*'nin bölgede yetiştirilen fasulyelerde diğer etmenlere oranla daha önemli olduğunu bildirmiştir.

Rusuku ve ark. (1997), Rwanda'da fasulye bitkilerinde sorun olan hastalık etmenlerini belirledikleri çalışmalarında, hastalık belirtisi gösteren bitkilerin %97' sinde toprak kökenli hastalık etmenlerinin varlığını ortaya koymuşlardır. Sörvey yapılan 4 farklı bitki vejetasyon döneminde en sıklıkla karşılaşılan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinin *Pythium* spp., *M. phaseolina*, *R. solani* ve *F. oxysporum f. sp. phaseoli* olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacıların sonuçlarına göre *Pythium* spp. sörvey yapılan tüm bölgelerde en çok rastlanan ve *S. rolfii* sadece bir bölgede belirlenmiş olan fungal etmen olmuştur.

Allen ve ark. (1998), Hale yanıklığı etmeni *P.syringae pv. phaseolicola* ile %0.4 oranında bulaşık bir primer enfeksiyondan %34 kapsül enfeksiyonu ve %12.5 ürün zararı, % 2.6 oranında bir primer enfeksiyon kaynağı bulunduğunda ise %62.5 kapsül enfeksiyonu ve %43 ürün zararı oluştuğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde adi yaprak yanıklık etmeni *X. axonopodis pv. phaseoli*'nin epidemi yaptığı üretim alanlarında % 22-45 oranlarında ürün kaybına neden olduğu (Yoshii, 1980); bakteriyel kahverengi leke hastalığı etmeni *P. syringae pv. syringae*'nin ise çok yaygın olmamakla birlikte bazı ülkelerde aşırı yağış ve dolu zararları müteakiben epidemi yaparak %100 hastalık yaygınlığına ulaştığı ve bunun sonucunda %55'e varan bir ürün kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Serfontein, 1994).



Ağsakallı ve Olgun (2001), yağış, sıcaklık, nem gibi bazı iklim faktörlerinin fasulye yetiştiriciliğinde sorun olan önemli fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenlerinden antraknoz (*C. lindemuthianum*), adi yaprak yanıklığı (*X. campestris* pv. *phaseoli*), hale yanıklığı (*P. syringae* pv. *phaseolicola* [*P. savastanoi* pv. *phaseolicola*]), bakteriyel kahverengi leke (*P. syringae* pv. *syringae*), bean common mosaic virus ve bean yellow mosaic virusünün fasulye gelişimi ve verimi üzerine olan etkilerini araştırdıkları 8 yıllık çalışma sonucunda, iklim faktörlerinin hastalık çıkışı ve ürün kaybı üzerine etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Yiğit (2002), Konya ilinde fasulye bitkilerinden yaptığı izolasyonlarda, fide döneminde *R.solani*'yi çiçek-bakla döneminde ise *Fusarium* türlerini yaygın türler olarak bulmuştur. Bölgede sorun olarak belirlenen *F. solani* f. sp. *phaseoli*, *M. phaseolina* ve *R. solani*'ye karşı topraklardan elde ettikleri antagonist bakterilerin hastalıkla mücadele olanakları üzerine yapmış olduğu çalışmada, antagonist bakteri izolatlarının, bu tip toprak kökenli hastalık etmenleri ile mücadele ilaçlı mücadeleye alternatif olabileceğini bildirmiştir.

Andrés-Ares ve ark. (2006), İspanyada yapmış oldukları sörvey çalışmalarında topladıkları 419 hastalıklı fasulye bitkisinden kök çürüklüğü etmenleri olarak *F. solani* f. sp. *phaseoli*, *R. solani*, *P. ultimum*, *Pythium* spp, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* ve *S. rolfsii*'yi izole etmişlerdir. Bu etmenler arasında en sık izole edilen etmenin *F. solani* olduğu (%64), bunu sırası ile *R. solani* ve *Pythium* spp.'nin izlediğini bildirmişlerdir. Yapılan patojenisite testlemeleri, bu etmenler arasında en saldırgan patojenin *F. solani* olduğunu, *F. culmorum* ve *F. avenaceum*'un ise patojenik olmadığını göstermiştir.

Vural ve ark. (2007), Hatay ilinin önemli fasulye ekim alanlarında yetişen fasulye kök ve yapraklarında sorun fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik yapmış oldukları hastalık sörveylerinde, tüm alanlarda en sık karşılaşılan fide kök çürüklüğü ve solgunluğuna neden olan toprak kökenli hastalık etmenlerinin *F. solani*, *F. oxysporum*, *M. phaseolina*, *R. solani*, *Alternaria* spp, *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii* ve *P. ultimum* olduğu belirlenmiştir. *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus* ve *Alternaria* spp. fasulye bitkisinin çiçeklenme ve meyve döneminde en fazla karşılaşılan yaprak kökenli fungal hastalık etmenleri olarak tespit edilmiştir. Külleme (*Sphaerotheca phaseoli*) ve köşeli yaprak leke hastalığı (*Phaeoisariopsis*

*griseola*) ise aynı dönemde en az sıklıkla karşılaşılan fungal hastalıklar olmuştur. Fasulye bitkisinin iki önemli bakteriyel hastalık etmeni *Xap* (adi yaprak yanıklığı etmeni) ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (hale yanıklığı etmeni) bölgede düşük düzeyde önemli olduğu belirlenmiştir.

## 2.2. Bitki Uçucu Yağları ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Etkinlikleri İle İlgili Çalışmalar

Maiti ve ark. (1984), *Mentha piperita*, *M. citrata* ve *Cymbopogon pendulus* uçucu yağlarının antifungal ve antibakteriyel etkinliklerini araştırmışlardır. *M. piperita* yağının  $10^{-1}$  ve  $10^{-2}$  seyreltmelerinde *Rhynchosporium oryzae*, *M. phaseolina*, *Drechslera oryzae*, *D. sorokiniana*, *Xanthomonas campestris* ve  $10^{-3}$  seyreltmesinde sadece *R. oryzae*'ye karşı önemli oranda etkili olduğunu, *M. citrata* yağının  $10^{-1}$  seyreltmesinde *R. oryzae*, *D. oryzae* ve *X. campestris*'e karşı, *C. pendulus* yağının  $10^{-1}$  seyreltmesinde sadece *D. sorokiniana* ve *M. phaseolina*'ya karşı etkinliğinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Çakır ve Yeğen (1988), Antalya çevresinde yetişen bazı bitkilerin (*T. spicata*, *Satureja thymbra*, *Inula viscosa*, *L. nobilis*, *Salvia fruticosa*, *Mentha spicata*, *M. piperita*, *Nerium oleander* ve *Euphorbia characias*) toprak kökenli fungal etmenler (*F. moniliforme*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* ve *Phytophthora capsici*) üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerini araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda kekik türlerinin fungusların misel gelişimi üzerine en fazla fungitoksik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Daouk ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada *O. syriacum* L.'nin GC kullanılarak uçucu yağının içeriği carvacrol ve thymol olarak tanımlamışlar ve *Origanum* yağının, *Penicillium* spp., *Aspergillus niger* ve *Fusarium oxysporum*'a karşı güçlü engelleyici etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Test edilen funguslarda yağın en düşük engelleyen konsantrasyonu (MIC), yeast extract sucrose broth'ta 0,1 ml/ml olduğunu bulmuşlardır.

Müller-Riebau ve ark. (1995), Türkiye'nin güneyinde yetişen yabancı bitkilerden *T. spicata*, *S. thymbra*, *S. fruticosa*, *L. nobilis*, *I. viscosa*, *Mentha pulegium*, *Pimpinella anisum*, *E. camaldulensis* ve *O. minitiflorum*'un uçucu yağlarının kimyasal içeriklerini

GC-MS yardımıyla tanımlayarak içlerinde 1,8-cineole, pulegone ve anethole,  $\gamma$ -terpinene, p-cymene, tyhmol ve cavracrol olduğunu bildirmişlerdir. Biyolojik denemelerde uçucu yağların içerisindeki fenolik fraksiyonların farklı konsantrasyonlarının bitki hastalıklarına neden olan toprak kökenli funguslardan *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *S. sclerotiorum* ve *Phytophthora capsici*'ye karşı fungitoksik olduğunu belirlemişlerdir..

Yonucu (1997), toprak kökenli patojenlerden *F. oxysporum f.sp. lycopersici*, *Pythium sp.*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* ve *S. rofsii* üzerine *Allium sativa*, *E. globolus*, *Euphorbia ligidae*, *L. nobilis*, *Mentha piperita*, *N. oleander*, *T. spicata* gibi bitkilerin ekstrakt, uçucu yağ ve kompost ekstraktlarının etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda, en etkili bitkinin kekik olduğu ve sadece soğuk sterilizasyon yapılan yabancı ot kompostunun *Sclerotinia sclerotiorum*' un gelişimini engellediği belirtmiştir.

Mari ve Guizzardi (1998), *Monilia laxa* ve *Rhizopus stolonifer* gibi hasat sonrası patojenlerine karşı *Thymus*, *Origanum*, *Anethum*, *Eucalyptus*, *Foeniculum* ve *Citrus* cinslerinden elde edilen uçucu yağlar ve ana bileşenlerinin etkinliği konusunda yaptıkları çalışmada, *Thymus* ve *Origanum* yağında bulunan carvacrol ve anason yağındaki p-anisealdehyde' in belirgin bir fungisidal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Suresh ve ark.(1998). yaptıkları çalışmada 15 bitkinin yaprak ve tohumlarından elde ettikleri ekstraktları *M. phaseolina* (Tassi) Goid' nın miselyal gelişimine etkilerini araştırmışlardır. Bu bitkiler arasında *Trachyspermum ammi* L. (*Sprauge*)'nin tohumlarından elde edilen uçucu yağ, test edilen fungusa toksik etki göstermiştir. Minimum engelleme konsantrasyonu 200ppm olarak belirlenmiş ve yağ bu konsantrasyonda fungistatik olmuştur. Fasulye tohumlarına 100, 200 ve 300 ppm konsantrasyonlarında uygulanan yağın, tohum çimlenmesini engellemediği belirlenmiştir. Bu yağın sıcaklığa dayanıklı olduğu ve Benlate, Ceresan, bakır oksichlorid, Dithan m-45 ve Thovit gibi sistemik fungusitlerden daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Fitotoksik bir faktör olarak izole edilen timol'ün fungusa 300 ppm'lik konsantrasyonda toksik olduğu belirlenmiştir.

Sokovic ve ark. (2002), Yunanistan'da yabancı olarak yetişen *Salvia pomifera subsp. calycina*, *S. fruticosa*, *S. thymbra* ve *Origanum onites* gibi bitkilerin uçucu yağları ve bileşenlerinden olan carvacrol, camphor ve 1,8- cineole'un antifungal etkileri

arasında bitki, hayvan ve insan patojeni olan 13 fungus türüne karşı denemişlerdir. Yağların incelenen bütün funguslara değişik seviyelerde engellemeler gösterdiğini belirlemişlerdir. En az etkinliği olanın adaçayı yağı, en yüksek ve en geniş etkinliği olanların ise carvacrol içeren *O.onites* ve *T.spicata* uçucu yağları olduğunu bulmuşlardır. Denenen bileşenler arasında en yüksek antifungal etkiyi carvacrol ve en düşük etkiyi 1,8-cineol göstermiştir.

Duru ve ark. (2002), *Pistacia vera*, *P. terebinthus*, *P. lentiscus*, türlerinden elde edilen eterik yağları GC ve GC-MS ile analiz ederek a-pinene, b-pinene, limonene, terpinen-4-ol ve a-terpineol etkili maddelerinin en yüksek oranda bulunduğu belirlemişlerdir. Elde edilen eterik yağları *Pythium ultimum*, *R. solani* ve *Fusarium sambucinum*'a karşı uygulamışlar ve *P.lentiscus*' tan elde edilen eterik yağın diğerlerine göre daha aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Kumar ve ark. (2002), yapmış oldukları çalışmada 11 familyaya bağlı 18 bitkiden elde edilen uçucu yağları çeşitli funguslara karşı denemişlerdir. *Mentha arvensis* uçucu yağının *M. phaseolina* ve *S.rolfsii*' nin içinde bulunduğu 8 fungus türüne fungitoksik etki gösterdiğini ve sentetik fungusitlerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu yağın antiaflatoksigenik ve antioksidant özelliğini de özellikle depolanan ürünlere raf ömrünü uzatmada etkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

Daferera ve ark. (2003), kekik türleri (*Thymus capitatus*, *Origanum vulgare*, *O. dictamnus*, *O. majorana*), lavanta, biberiye, adaçayı ve yarpuz uçucu yağlarının *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda kekik türlerinin uçucu yağlarının düşük dozlarının (85- 300 µg/ml) *B. cinerea*, *Fusarium sp.* ve *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*'in gelişimini tamamen engellediğini bildirmişlerdir. Lavanta, biberiye, adaçayı ve yarpuz uçucu yağlarının düşük engelleme aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir. *T. capitatus*, *O. dictamnus*, *O. majorana* yağlarının carvacrol'ce zengin iken *O. vulgare* yağının içeriğinde thymol olduğunu, eucalyptolun adaçayı ve biberiye yağlarının temel bileşeni iken, lavanta yağının içeriğinde linalool ve linalyl acetate bulunduğunu bildirmişlerdir. Yarpuz yağının cis-menthone ve pulegone'ce zengin olduğunu da belirtmişlerdir.

Edris ve Farrag (2003), nane yağı ve onun önemli iki bileşeni (menthol ve menthone) ile fesleğen yağı ve iki önemli bileşeni (linalool ve eugenol)'nin buharını *S.*

*sclerotiorum*, *R. stolonifer* ve *Mucor sp.*'ye karşı denemişlerdir. Tek başına methone tüm dozlarında hiçbir etki göstermez iken, menthol'un nane uçucu yağının antifungal özelliğinden tek başına sorumlu olduğunu, fesleğende ise eugenol antifungal aktivite göstermez iken, linalool'un tek başına orta derecede antifungal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. İki bileşiğin yağdaki konsantrasyonuna benzer oranlarındaki karışımıyla gözlenen etkiden, bileşenler arasındaki sinerjinin fesleğen yağının antifungal özelliğini arttırdığını tespit etmişlerdir.

Pitarokili ve ark.(2003), *Salvia fruticosa*'nın GC ve GC-MS analizlerine göre ana bileşenlerini belirlemişler ve bu ana bileşenlerden 1.8-cineole'ün *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* ve *F. proliferatum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*,ve *F.solani f. sp. cucurbitae*'ye karşı yüksek antifungal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çakır ve ark. (2004), *Hypericum hyssopifolium* ve *H. heteropyllum*'un toprak üstü aksamlarından hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen eterik yağları GC ve GC-MS ile analiz ederek 66 bileşene sahip olduğunu saptamışlardır. *H. hyssopifolium*'da en yüksek oranda  $\alpha$ -pinene (%57.3) ve *H. heteropyllum*'da ise sesquiterpenler (%72.9) olduğunu bulmuşlardır. Bu iki bitkiye ait eterik yağları antifungal aktivite yönünden *Fusarium* türleri ve *Rhizoctonia solani*'nin beş anastomosis grubuna uygulamışlar ve *F. acuminatum*, AG-5 ve AG-11'e karşı etkili bulmuşlardır.

Zambonelli ve ark. (2004), *Thymus vulgaris*'in eterik yağını fitopatojen funguslardan *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *R. solani* Kühn and *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.)'un misel gelişimi üzerinde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları GC analizleri sonucunda etkili maddenin thymol (%22-38) olduğu bildirmişlerdir.

Cheng ve ark. (2005), *Cryptomeria japonica* bitkisinin farklı yerlerinden elde edilen eterik yağları GC-MS ile analiz etmişlerdir. Odun dokusundan elde edilen eterik yağın 500 µg/mL oranında *R. solani*, *C. gloeosporioides*, *F. solani* ve *Ganoderma australe*'ye karşı geniş antifungal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Rattanakreetakul (2005), *Boesenbergia pandurata* bitkisinin kök kısımlarından elde ettiği uçucu yağında yapılan analizler sonucunda camphene, eucalyptol, ocimene, camphor ve geraniol olmak üzere 5 ana bileşen belirlemişlerdir. Ana bileşenler *C. gloeosporioides* [*Glomerella cingulata*], *C. capsici*, *Pestalotiopsis sp.*, *Dothiorella sp.*, *Lasiodiplodia theobromae* ve *Pythium sp*'ye karşı antifungal aktivite yönünden

incelenmiş ve geraniol miselyal gelişimi engelleyici olarak etkili bulunmuştur. Geraniol disk diffüzyon metodu ile *Xanthomonas campestris* pv. *citri* [*X. axonopodis* pv. *citri*]’ye uygulanmış fakat etkili bulunmamıştır.

Soylu ve ark. (2005), Hatay bölgesinde doğal olarak yetişen tıbbi bitkilerden *Artemisia annua* uçucu yağının kimyasal bileşenlerini GC-MS ile belirlemişler ve bitki uçucu yağların uçucu ve değme fazlarının antifungal etkinliği *in vitro* koşullarda toprak ve yaprak kökenli fungal hastalık etmenlerinden *S. sclerotiorum*, *V. dahliae*, *B. cinerea* ve *P. infestans*’a karşı araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, yağların uçucu fazının değme fazına oranla fungal gelişimini daha etkili şekilde engellediğini belirlemişlerdir. Uçucu yağın uçucu ve değme fazının *Verticillium dahliae* ve *Botrytis cinerea*’nın miselyal gelişimlerinin yanı sıra fungus sporlarının çimlenmesini de engellediğini ortaya koymuşlardır.

Singh ve ark. (2006), rezene (*F. vulgare*) uçucu yağının GC ve GC-MS analizinde toplam miktarın %94.6’sını 35 bileşenin oluşturduğunu ve ana bileşenin %70.1 ile trans-anathole olduğunu bildirmişlerdir. Ters çevrilmiş petri metodunda uçucu yağın *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium graminearum* ve *F. moniliforme*’nin gelişimini 6 mg/L dozda tam olarak engellediğini ve uçucu yağın *A. niger* için 4 mg/L dozda bile etkin olduğunu bulmuşlardır.

Soylu ve ark (2006), Hatay ilinde yetişen tıbbi bitkilerden origanum, kekik, lavanta, biberiye, rezene ve defne bitki uçucu yağlarının kimyasal bileşenlerini ve yağların domatesin önemli yaprak kökenli fungal hastalık etmeni *Phytophthora infestans*’a (mildiyö hastalığı) karşı antifungal etkinliğini belirledikleri çalışmalarında yağların ana bileşenlerinin sırasıyla carvacrol (%37.9), carvacrol (%79.8), borneol (%20.4), camphor (%20.2), anethole (%82.8) ve 1,8-cineole (%35.5) olduğunu belirlemişlerdir. Yağların *in vitro* koşullarda antifungal etkinliğini fungal etmen *P. infestans*’a karşı araştırdıkları çalışmalarında uçucu yağların buhar fazının değme fazına oranla daha yüksek düzeyde etkinlik gösterdiğini, uçucu yağın aynı zamanda fungus sporangiumlarının çimlenmesini engellediğini, yapılan elektron mikroskobu çalışmalarında yağların fungus hifleri üzerinde oldukça önemli morfolojik bozulmalara neden olduğunu belirlemişlerdir.

Soylu ve ark (2007), origanum ve rezene uçucu yağlarının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda antifungal etkinliğini fungal etmen *S. sclerotiorum*’a karşı araştırdıkları

çalışmalarında uçucu yağların buhar fazının değme fazına oranla daha yüksek düzeyde etkinlik gösterdiğini, toprağa uygulanan uçucu yağın aynı zamanda fungus sklerotlarını öldürdüğünü, yağların fungus hifleri üzerinde oldukça önemli morfolojik bozulmalara neden olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, uçucu yağın toprağa uygulanması ile hastalık çıkışının da %53-70 oranında engellediğini belirlemişlerdir.

Zhou (2007), *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, *E. tereticornis*, *Pinus massoniana* ve *Cunninghamia lanceolata* bitkilerinden elde edilen uçucu yağları ve bu yağların ana bileşenlerini bitki patojeni bakteri ve fungal etmenlerden *X. oryzae* pv. *oryzae*, *Glomerella glycines*, *S. rolfsii*, *V. dahliae*, *Sclerotinia* sp., *Thielaviopsis paradoxa*, *Fusarium* sp., *B. cinerea* ve *A. alternata*'ya karşı test ettikleri çalışmalarında, uçucu yağların tek başına kullanıldığında ana bileşenlere oranla daha etkili olduğunu ve ana bileşenlerin tek başlarına antimikrobiyal etkinlikten sorumlu olmadığını belirlemişlerdir.

Kordalı ve ark. (2008), Türkiyenin doğusunda yetişen *Origanum acutidens* isimli bitkilerden elde edilen uçucu yağı ve bu yağın ana bileşenleri olan carvacrol, *p*-cymene ve thymol'u bitki zararlılarının yanı sıra 17 farklı bitki patojeni fungal etmene karşı antifungal etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, uçucu yağ, carvacrol ve thymol'ün ticari preparatın etken maddesi olan fungisit benomyl'den daha yüksek etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ana bileşenlerden *p*-cymene ise düşük düzeyde antifungal etkinlik göstermiştir.

### **2.3. Bitki Uçucu Yağları ve Ana Bileşenlerinin Antibakteriyel Etkinlikleri İle İlgili Çalışmalar**

Basım ve ark. (2000), *T. spicata* L. var. *spicata* bitkisinden elde ettikleri uçucu yağın altı önemli fitopatogen bakteriyel etmene karşı (*Erwinia amylovora*, *E. carotovora* pv. *carotovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*) etkinliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda uçucu yağın buhar ve değme etkinliğinin test edilen bakterilere karşı yüksek olduğunu, uçucu yağın buhar etkisinin değme etkisine göre daha yüksek düzeyde etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Del Campo ve ark. (2000), biberiye bitkisinden elde ettikleri ekstraktın antioksidant ve antibakteriyel etkinliğini gıda (*Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*) ve bitki patojeni bakterilere (*E. carotovora*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus laurentii*) karşı araştırmışlar, sonuçta biberiye uçucu yağının Gram-pozitif bakterilere etkinliğinin Gram- negatif bakterilere oranla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Karamanoli ve ark. (2000), yapmış oldukları çalışmalarında lavanta, biberiye, origanum bitkilerinden elde ettikleri uçucu yağların *in vitro* koşullarda fitopatojen bakterilere karşı antibakteriyel özelliklerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda oregano ve adaçayı yapraklarından elde edilen uçucu yağların lavanta ve biberiye uçucu yağına oranla daha fazla antibakteriyel etkinliğe sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Toppil ve ark. (2000), *Ocimum adscendens* bitkisinin uçucu yağının aralarında fitopatojen hastalık etmeni *X. campestris* etmeninin de bulunduğu birçok insan (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) ve bitki (*Proteus vulgaris*, *X. campestris*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* ve *Colletotrichum musae*) patojeni olan bakteri ve fungal etmenlere karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Minija (2001), *Coriandrum sativum*'un kendisinin ve tohumlarının uçucu yağlarının bileşenleri belirlenerek ve bu uçucu yağların 6 bakteri ve 6 fungusu karşı aktiviteleri değerlendirilmiştir. Yabancı ot uçucu yağının *Candida albicans*'a karşı en yüksek aktiviteyi gösterdiği buna karşın tohumdan elde edilen uçucu yağın ise *Xanthomonas campestris*, *Candida albicans* ve *Colletotrichum musae*'ye karşı önemli aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Minija ve Toppil (2002), *Apiaceae* familyasına dahil rezene (*F. vulgare*) ve maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkilerinden elde ettikleri bitki uçucu yağlarının kimyasal bileşenlerini ve antibakteriyel etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında rezene bitkisi uçucu yağının %96.7 gibi yüksek oranda *trans*-anethole içerdiğini belirlerken, maydanoz uçucu yağında myristicin isimli bileşenin %93.1 düzeyinde bulunduğunu belirlemişlerdir. Her iki bitki uçucu yağını altı farklı insan (*Escherichia coli*, *B. megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*) ve bitki (*X. campestris*, *Aspergillus niger*, *A. parasiticus*, *Rhizopus*



*oryzae*, *F. solani*, *Nectria haematococca*, *Colletotrichum musae*) patojeni bakteriyel ve fungal etmene karşı test ettikleri çalışmalarında, rezene uçucu yağının maydanoz uçucu yağına oranla daha yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Basım ve Basım (2003), Isparta ilinde yetişen gül bitkisinin (*Rosa damascene*) petal yapraklarından elde ettikleri bitki uçucu yağları *X. axonopodis* spp. *vesicatoria*'nın üç farklı ırkına karşı olan antibakteriyel etkinliklerini araştırmışlar ve sonuçta gül yağınının *in vitro* koşullarda göstermiş olduğu antibakteriyel etkinlikten dolayı, bu yağların hastalık etmeninin mücadelesinde potansiyel bir biyokontrol ajanı olabileceğini belirtmişlerdir.

Laouer ve ark. (2003), *Ammoides pusilla* isimli bitkiden elde ettikleri bitki uçucu yağlarının gerek kimyasal gerekse antimikrobiyal etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında uçucu yağın yüksek oranda thymol (%44.5),  $\gamma$ -terpinene (%32.9) ve *p*-cymene (%13.5) içerdiğini tespit etmişlerdir. Bitki uçucu yağının, aralarında fitopatojen bakteriyel etmenlerden *Pss* ve *P.s syringae* pv. *mosprunorum*'unda bulunduğu birçok bakteriyel, fungal ve maya patojenlerine karşı test ettikleri çalışmalarında uçucu yağın kullanılan tüm patojenlere karşı antifungal ve antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Soylu ve ark. (2003), yapmış oldukları çalışmada Doğu Akdeniz yöresinde bulunan Hatay ilinde doğal olarak yetişen tıbbi bitkilerden lavanta (*L. stoechas* ssp. *stoechas*), biberiye (*R. officinalis* L.), origanum (*O. onites* L.), ve kekik (*T. spicata* L. var. *spicata*) yapraklarından elde edilen uçucu yağların fasulye hale yanıklığı etmeni *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*'ya karşı antibakteriyel etkinliğini *in vitro* koşullarında araştırmışlar, kekik uçucu yağının test edilen bakteriye karşı en etkili uygulama olduğunu, bu yağı sırası ile origanum, lavanta ve biberiye uçucu yağlarının izlediğini belirlemiştir.

Thakare ve ark. (2003), altı farklı tıbbi bitkiden (*Mentha*, *Ocimum*, *Lemongrass*, *Citronella*, *Turmeric*, *Palmarosa* spp.) elde ettikleri bitki uçucu yağlarının antibakteriyel ve antifungal etkinliğini fitopatojen bakteriyel (*X.axonopodis* pv. *malvacearum*) ve fungal hastalık etmenlerine karşı araştırmışlardır. Sonuçta kullanılan uçucu yağlar içerisinde kekik ve *Ocimum* bitki uçucu yağının gerek fungal gerekse bakteriyel hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Horvath ve ark. (2004), *Lamiaceae* familyasına dahil dört kekik türüne (*T. vulgaris* L., *T. serpyllum* L., *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb., ve *Thymus x citriodorus* "Archer's Gold") ait uçucu yağları, kimyasal bileşenlerini ve antibakteriyel etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında kekik bitkisinin ana bileşenlerinin türlere bağlı olarak değiştiğini, *T. vulgaris* ve *T. serpyllum*'un ana bileşenlerinin thymol, *Thymus x citriodorus*'un geraniol, *Thymus x chriodorus*'un ise ana bileşeninin carvacrol olduğunu belirlemişlerdir. Dört kekik türünün uçucu yağı fitopatojen bakteriyel etmenlerden *X. campestris* pv. *vesicatoria* ve *P. syringae* pv. *phaseolicola*'ya karşı yüksek düzeyde antibakteriyel etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Iacobellis ve ark. (2005), *Cuminum cyminum* L. ve *Carum carvi* L. bitkilerinin meyvelerinden elde etmiş oldukları bitki uçucu yağlarının kimyasal bileşenlerinin yanısıra Gram-pozitif ve Gram-negatif fitopatojen bakteriyel türlere karşı antibakteriyel etkinliğini agar disk difüzyon yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Çalışma sonucunda bu bitkilerden elde edilen uçucu yağlarının  $\gamma$ -terpinene,  $\beta$ -pinene, carvone, limonene, germacrene D gibi bileşenlerden meydana geldiğini *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, ve *Agrobacterium* gibi önemli fitopatojen bakteriyel etmenlere karşı antibakteriyel özellik taşıdığını, bu yağların kullanılan bakteri türleri arasında en düşük antibakteriyel etkinliği *Pseudomonas* cinsine dahil bakteri türlerine karşı olduğunu bildirmişlerdir.

Nguefack ve ark. (2005), beş bitkiden (*Cymbopogon citratus*, *Monodora myristica*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris* ve *Zingiber officinale*) elde ettikleri uçucu yağların antibakteriyel etkinliğini beş önemli tohum kökenli fitopatojen bakteriyel hastalık etmenlerine karşı (*Acidovorax avenae* subsp. *avenue*, *Burkholderia glumae*, *B. plantarii*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ve *X. oryzae* pv. *orizicola*) araştırmışlardır. Yağlar içerisinde *O. gratissimum* ve *T. vulgaris* uçucu yağların diğer uçucu yağlara oranla daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca *O. gratissimum* ve *T. vulgaris*'in uçucu yağlarının antibakteriyel etkinliği *in vivo* koşullarda da araştırılmıştır. Elde ettikleri sonuçlara bakıldığında bitki uçucu yağının hastalık bitki uçucu yağlarının kimyasal bileşenlerine GC/MS ile bakmışlar ve aynı zamanda uçucu yağların antifungal ve antibakteriyel özelliklerini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda *Thymus*'ta ana bileşenin %41.6 ile thymol olduğunu belirlerken, *O. onites*'in %40.7, *Satureja hortensis* %20.6 ve *T. spicata* %81 ile ana bileşenlerinin carvacrol olduğunu belirlemişlerdir.

Uçucu yağların fitopatojen bakteriyel etmenlerden *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiklerini, *X. campestris* pv. *malvacearum*'a karşı ise zayıf antibakteriyel etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Kızıl ve Uyar (2006), yaptıkları çalışmada, *Thymus kotschyanus*, *Satureja hortensis*, *Origanum onites* ve *T. spicata*'nın uçucu yağ bileşiklerini GC ile belirlemişler ve 4 bitki patojenine karşı bu bitkilerin uçucu yağlarının antibakteriyel etkinliklerini 24, 48 ve 72 saat inkubasyon sürelerinde ve 5, 10 ve 15 mug konsantrasyonlarda değerlendirmişlerdir. Uçucu yağların ana bileşiklerini *T. kotschyanus* için %41 thymol, *O. onites* %40.7, *T. spicata* %81 ve *S. hortensis* için ise %20.6 oranında carvacrol olarak belirlemişlerdir. Her bir bitkinin hekzan ve sulu ekstraktlarının antimikrobial etkinliklerini agar disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. Bütün uçucu yağların *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* dışında, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı antibakteriyel etki gösterdiğini ve Gram (+) bakterilerin Gram (-) bakterilere göre daha hassas olduğunu belirlemişlerdir.

Vasinauskiene (2006), *Origanum vulgare*, *Acorus calamus*, *Carum carvi*, *Mentha piperita*, *Achillea millefolium*, *Achillea filipendulina* ve *Achillea cartilaginea* gibi tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağlar bitki hastalıklarının mücadelesinde alternatif mücadele olanakları oluşturması sebebiyle patojenik bakterilerin gelişimine etkileri yönünden denemeye alınmıştır. Uçucu yağların engelleyici özelliklerinin belirlenmesinde Disk-difüzyon metodu kullanılarak yapılan in vitro denemeleri sonucunda *Origanum vulgare*'dan elde edilen uçucu yağın patojenetik bakteriye karşı güçlü bir engelleyici özellikte olduğu görülmüştür. Bazı *Pseudomonas spp.* türlerine ve *Erwinia carotovora subsp. carotovora*'ya ise zayıf bir antibakteriyel özellik gösterdiği saptanmıştır.

Ozturk (2007), Türkiyenin doğusunda yetişen *Ziziphora clinopodioides* Lam. bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve metanol ekstraktı antibakteriyel etkisinin belirlenebilmesi için 52 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriye uygulanmıştır. Uçucu yağın yapılan GC ve GC-MS analizleri sonucunda 18 anabileşeni belirlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda *Acidovorax facilis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus sphaericus*, *Brevibacillus brevis*, *Corynebacterium ammoniagenes*,

*Enterobacter sakazakii*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Moraxella catarrhalis* ve *Xanthomonas arboricola*'ya karşı uçucu yağ ve metanol ekstraktı antibakteriyel etki göstermiştir.

Tan ManLiang ve ark. (2007), *Russowia sogdiana* (Bunge) B. Fedtsch bitkisinden damıtma yöntemiyle elde edilen uçucu yağın ana bileşenlerinin GC ve GC-MS ile yapılan analiz sonucunda %15 limonene), trans- alpha -bergamotene (%5.6), salvia-4 (14)-en-1-one (%3.8), carvone (%3.6), p-cymene (%3.6), trans-carveol (%3.2) olduğunu belirlemişlerdir. Antimikrobiyal etkinlik yönünden *Russowia sogdiana* (Bunge) bitkisinden elde edilen uçucu yağ 7 bakteri türüne ve miselyal gelişim yönünden ise 3 fungus türüne uygulanmıştır. Gram-pozitif bakteriler (*B. subtilis*, *S. aureus*) ve gram-negatif bakteriler (*E. coli*, *E. carotovora* ssp. *carotovora*, *Pseudomonas lachrymans*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Agrobacterium tumefaciens*)'e karşı minimum engelleme dozlarını 0.2- 0.8mg/ml olarak belirlemişlerdir. Uçucu yağ, meyve patojenlerinden *Glomerella cingulata*, *Botryodiplodia theobromea* ve *Venturia pirina*'ya karşı önemli ölçüde antifungal aktivite göstermiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitki Örnekleri

Çalışmanın ana materyali olan bitki örnekleri *O. syriacum* L. var *bevanni*, *F. vulgare* Mill. ve *L. nobilis* L. Hatay ili ve çevresinde doğal olarak yetişen ortamlardan değişik zamanlarda yapılan çıkışlarda toplanmıştır (Çizelge 3.1). Toplanan bitkilerden Suriye kekiği ve defne bitkilerinin yaprak ve sürgünlerinden oluşan yeşil aksamaları, rezene bitkisinin ise tohumları toplanarak gölgede hava sirkülasyonunda kurutulmuştur.

Çizelge 3.1. Denemede uçucu yağları kullanılan bitkilerin bilimsel adı, yöresel adı, toplandığı yer ve toplanma tarihleri

Bilimsel adı	Yöresel adı	Toplandığı yer	Toplandığı tarih
<i>Origanum syriacum</i> L. var <i>bevanni</i>	Suriye kekiği, Halil İbrahim Zahteri	Kapısuyu/HATAY	Nisan-Haziran 2007
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Rezene, Şumra	Narlıca/HATAY	Temmuz-Ağustos 2007
<i>Laurus nobilis</i> L.	Defne, Har	Harbiye/HATAY	Nisan-Haziran

##### 3.1.2. Fungus ve Bakteri Kültürleri

Bu çalışmada fasulye üretim alanlarında sorun olan fasulye bakteriyel hastalık etmenleri *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*) ve *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) ile toprak kökenli fungal hastalık etmelerinden *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* ve *Macrophomina phaseolina* izolatları kullanılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hastalık Sörveyi

Hatay ili fasulye ekim alanları, 2006 yılı üretim sezonunda fungal ve bakteriyel hastalıklar yönünden kontrol edilmiştir.

Hastalık belirtileri gösteren bitki örnekleri, kese kâğıdına konulup etiketlenmiştir. Sörvey sırasında etiketlenmiş olan hastalıklı bitki örnekleri, hastalık etmeninin belirlenmesi için laboratuara getirilerek izolasyonlar yapılmaya kadar + 4°C'de saklanmıştır.

### 3.2.2. Fungal Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanısı

2006 üretim sezonunda farklı bölgelerden temin edilen hastalıklı fasulye bitkilerinden fungal hastalıkları etmenlerini izole etmek için, bitki örnekleri çeşme suyu altında yıkanıp kök, gövde ve yaprak sapları seçilerek alınmıştır. Enfeksiyon nedeni ile nekrozlaşmış ve sağlam dokuları içeren parçalar, temiz bir bisturi ile kesilmiştir. 1-2 mm büyüklüğündeki bu parçalar, %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 2 dakika yüzeyden steril edilmiştir. NaOCl çözeltisinden alınan bu doku parçaları, steril saf suda 2 kez çalkalanıp durulandıktan sonra, steril kurutma kağıtlarında 3-4 saat kurumaya bırakılmıştır. Her bir bitki örneğinden alınan steril doku parçaları, genel besi ortamı olan Patates Dekstroza Agar (PDA) üzerinde geliştirilmiştir.

Fungal hastalık etmenlerinin teşhisleri PDA ortamında gelişen kolonilerde miseliyal gelişme, sporulasyon ve mikrosklerot oluşumuna göre yapılmıştır. Bu hastalık etmenlerinin teşhisinde *R. solani* için Van der Plaats-Niterink (1981), *S. rolfii* (syn. *Corticium rolfii*) için Punja (1985) ve *M. phaseolina* için Holliday ve Punithalingam (1970) esas alınmıştır. Teşhisleri yapılmış tüm izolatlar patojenisite kaybı olmaksızın kuru filtre kâğıdı üzerinde geliştirilerek zarf içerisinde -20°C'de korunmuştur.

### 3.2.3. Bakteriye Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanısı

#### 3.2.3.1. Bakteriye Etmenlerin İzolasyonu

Sörveyler sırasında hastalık belirtilerine rastlanan fasulye bitkilerinden yaprak ve meyve örnekleri alınarak her örnek ayrı kâğıt torbalara konulup buzluk içinde muhafaza edilmiştir. Şüpheli örnekler fazla bekletilmeden laboratuara getirilmiş ve yüzey sterilizasyonu yapılmış, her bitki örneğinden (yaprak ve meyvelerden) steril su içinde bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen bakteri süspansiyonu seri olarak sulandırıldıktan sonra her bir örnekten alınan 200 µl süspansiyonlar, genel (Nutrient Agar, NA), veya yarı seçici (Yeast Dekstroz Chalk (YDC) Agar; King's B (KB) Agar) besi ortamlarının yüzeylerine yayılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra tüm petri kapları 26°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

#### 3.2.3.2. Bakteriye İzolatların Morfolojik ve Klasik Biyokimyasal Yöntemlerle Tanılanması

Her bitki örneğinden elde edilen süspansiyon ayrı ayrı petrilere ekilmiş ve her petride gelişen farklı koloniler izolat olarak kabul edilmiştir. Tüm bakteriler ilk olarak Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Palleroni, 1984) kriterlerine göre gruplandırılarak karakterize edilmiştir. Saflaştırılan tüm izolatlara gram boyama, oxidaz testi, hareketlilik, spor oluşumu, KOH testi ve katalaz testleri yapılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987; Hildebrand ve ark., 1988; Schaad ve Stall, 1988; Goszczynska ve Serfontein, 1998; Schaad, 2001; Fouire, 2002). İçerisinde KB bulunan petri kapları 365 nm'lik UV ışık altında tutulmuş ve floresan *Pseudomonas* spp.'nin King B ortamında floresan koloni oluşturmasına bakılarak cins düzeyinde teşhisleri yapılırken, diğer bakteriler morfolojik görünümüne bakılarak kodlanmış ve kesin teşhis işlemleri için hazırlanmıştır. Tüm bakteri izolatları kesin teşhis (MIS sistemi ile) ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hem +4 °C'de buzdolabında petri kapları içerisinde, hem de uzun süreli saklamalar için %20'lik glycerol içerisinde -80 °C'de derin dondurucular içerisinde, muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3.3. Bakteriyel İzolatlarının Yağ Asitleri Profillerine Göre Tanılanması

Saf kültür olarak  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen bakteri izolatlarının yağ asit metil ester ekstraksiyonu (FAME), izolasyonu, saflaştırılması ve analizleri Sasser (1990)'in belirttiği şekilde yapılmıştır. Bilgisayar kontrollü gaz kromatografi sistemi olan Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIS, MIDI, Inc., Newark, DE) kullanılarak kültüre alınan izolatların tür ve alt tür seviyesinde tanısı aşağıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Test edilecek mikroorganizmalar steril platin bir öze ile depo kültürden alınarak, Trypticase soy broth agar (TSBA) katı besi yerine 4 fazlı çizgi ekim yapılmış, daha sonra ekim yapılan petriler, 24-48 saat süreyle  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır.

Mikroorganizmaların yağ asitlerini saf olarak izole edebilmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır. Hazırlanan 4 çözelti ile aerobik bakterilerden yağ asit metil esterlerinin saflaştırılması aşağıdaki metot takip edilerek yapılmıştır.

1. TSBA üzerinde geliştirilen bakterilerin inkübasyon periyodunu takiben, 4 fazlı çizim yapılmış petrilerin 3 ve 4 numaralı fazlarından canlı bakteri hücreleri steril bir özeye toplanarak ( $\sim 40\text{mg}$ ) steril teflon kapaklı cam test tüplerine (5 ml) aktarılarak tüpler etiketlenmiş ve kapakları kapatılmıştır.

2. Her bir test tüpüne 1ml hücre parçalayıcı çözelti ilave edilmiş ve 5-10 sn çalkalandıktan sonra test tüpleri 5 dk süreyle  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda bekletilmiştir. Ardından tekrar 5-10sn çalkalanan test tüpleri 25 dk süreyle  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Böylece canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.

3. Test tüplerine 2 ml metilleştirme çözeltilerinden eklendikten sonra 5-10 sn'lik bir çalkalamadan sonra  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10dk süreyle su banyosunda bekletilmiş ve hemen takiben 2dk süreyle buz veya soğuk su içerisinde soğutulmuştur. Bu uygulama ile serbest yağ asitlerine ester bağları ile metil eklenmiş ve yağ asitlerinden yağ asit metil esterleri elde edilmiştir. Bu durumda yağ asitlerine yüksek sıcaklıklarda uçuculuk özelliği kazandırılmıştır.

4. Soğutulmuş tüplere 1.25 ml saflaştırma çözeltilerinden eklenerek 10 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısında bekletilmiştir. Tüplerin alt kısmında asidik (inorganik), üst kısmında da organik sıvı faz olmak üzere 2 ayrı faz oluştuğu gözlenmiştir. Yağ asit metil esterleri asidik fazdan ayrışarak organik faz bölgesinde toplandığından pastör



pipeti kullanarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılmış ve organik faz muhafaza edilmiştir.

5. Son aşamada her tüpe 3 ml bazik yıkama çözeltisinden ilave edilmiştir. Tüpler 5 dk süreyle hematoloji çalkalayıcısında karıştırıldıktan sonra 10 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilmiş olup, kullanılan çözeltinin bazik özelliğinden dolayı serbest yağ asit metil esterleri daha saf olarak elde edilmiştir. Bu aşamada da benzer şekilde tüp içerisinde yine iki ayrı faz oluştuğu tespit edilmiştir. Üstte toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz, pastör pipeti ile alınarak 2 ml gaz kromatografisi vial şişelerine transfer edildikten sonra ağızları sıkıca kapatılmış ve MIS cihazı üzerindeki örnek koyma tepsisine yerleştirilmiştir.

Örnekler MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılarak, sistem kılavuzunda belirtildiği gibi tek tek analiz edilmiş ve tanı sonuçları alınmıştır.

#### **3.2.3.4. Tütünde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction, HR) Testi**

İzole edilen bakteri izolatlarının fitopatojen olup olmadıkları tütünde aşırı duyarlılık testi ile belirlenmiştir. Bu kapsamda bakteri izolatları 10 ml LB Agar ortamı içerisinde gece boyu geliştirilmiştir. Gelişen bakteriler 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Üst taraftaki süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet kısmı toplanarak 10 mM steril MgCl<sub>2</sub> içerisinde tekrar süspanse edilip santrifüj işleminden geçirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet 10mM MgCl<sub>2</sub> içerisinde tekrar süspanse edilmiştir. Oluşan süspansiyonun konsantrasyonu 620 nm'de (Optik Densite) OD=0.13'e spektrofotometre ile ayarlanmıştır (yapılan petri sayım yöntemiyle OD= 0.13 değerinin 10<sup>8</sup> koloni oluşturan birim (cfu)/ml'ye denk geldiği görülmüştür). Daha sonra bakteri süspansiyonu 5 cc'lik steril plastik enjektörlerle tütün (*Nicotiana tabacum* L. Samsun) yapraklarının alt kısmından damar aralarına enjekte edilmiştir. İnokule edilen bitkiler en az 8 saat ışıklı bir ortamda tutularak inokulasyonun yapıldığı kısımda nekroz oluşup oluşmadığı tespit edilmiştir. Ölü doku oluşumu HR pozitif, oluşmaması ise HR negatif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

### 3.2.4. Patojenisite Testlemeleri

Farklı bölgelerden izole edilen fungal ve bakteriyel izolatların patojenisite testlemelerinde bölgede taze tüketime yönelik olarak en fazla ekimi yapılan “Gina” ve “Sarıköz” fasulye çeşitleri kullanılmıştır.

#### 3.2.4.1. Fungal Etmenlerin Patojenisite Testlemeleri

Fungusların patojenisite testlemeleri için gerçekleştirilen denemelerde, içinde torf-bahçe toprağı bulunan 21 cm’lik saksılara fasulye tohumları ekilmiştir. Yaklaşık 15 günlük fidelerde ilk gerçek yaprak oluşum döneminde patojenisite çalışmaları yürütülmüştür.

*R. solani*, *M. phaseolina* ve *S. rolfii* izolatları PDA üzerinde 7 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. İnokulum süspansiyonu, fungusun tamamen gelişerek yüzeyini kapladığı 4 petri kutusunun içeriğinin 400 ml steril suda düşük hızda (200 rpm) 1 dakika karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan süspansiyonun konsantrasyonu  $10^5$  propagül/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan inokulum süspansiyonundan 10 ml alınıp, 2 kotiledon yaprak oluşturmuş sağlıklı fasulye bitkilerinin kök boğazı yaralanarak çevresine pipet yardımıyla inokulasyonlar yapılmıştır (Jones ve Belmar, 1989; Schneider ve Kelly, 2000).

Uygulama yapılmış bitkiler ve saksılar daha sonra 10.000 lüks ışık, 24-25 C sıcaklık, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarındaki iklim odasında 4 hafta bekletilmiştir. Bu süre sonunda her bir bitki, kök boğazı seviyesinden kesilmek suretiyle iletim demetlerindeki renk değişimleri ve nekroz gibi belirtiler esas alınarak hastalık oluşumu değerlendirilmiştir.

#### 3.2.4.2. Bakteriyel Etmenlerin Patojenisite Testlemeleri

Bakteriyel etmenlerden *P. s. pv. phaseolicola*’nın patojenisite testlemesi, ham meyve inokulasyon tekniğı ile yapılmıştır (Harper ve ark., 1987). KB besi yerlerinde geliştirilen iki günlük bakteri kültürlerinden steril kürdan ile alınan bakteri kolonileri

tam olgunlaşmamış taze koparılmış fasulye meyveleri üzerine açılan yaralara bulaştırılmıştır. İnokule edilen meyveler, tabanında ıslak kurutma kâğıtları bulunan şeffaf plastik kaplar içerisinde 22°C sıcaklık ve 12 saat/günlük foto periyot'a sahip inkübatörlere yerleştirilmiştir. İnokülasyondan sonraki 5 gün boyunca 24 saat arayla inkübatörlerdeki meyvelerde simptom gelişimi gözlenmiştir. İnokülasyon noktalarında görülen ıslaklık şeklindeki belirtiler hastalık etmeninin virülent bir izolat olduğunu göstermiştir.

### **3.2.5. Bitki Uçucu Yağlarının Elde Edilmesi**

Çalışmada kullanılan bitkilerin toplanması için Hatay ilinin değişik bölgelerine Nisan-Ağustos aylarında periyodik olarak çıkışlar yapılmış ve *O. syriacum* var. *bevanni* (Suriye kekiği), *L. nobilis* (defne) bitkilerinin yaprakları ile *F. vulgare* (rezene) bitkisinin tohumları toplanmıştır. Toplanan bitkilerin yaprak, sürgünlerinden oluşan yeşil aksamaları ile tohumlar gölgede hava sirkülasyonunda kurutulmuştur. Bitkilerin uçucu yağları Clevenger tipi cihaz yardımıyla (İldam, Ankara, Türkiye) buhar distilasyonu ile elde edilmiştir (Council of European Pharmacopoeia, 1997). Ekstraksiyon sonucu elde edilen uçucu yağlar denemelerde kullanılıncaya kadar +4 °C'de içerisinde anhydrous sodium sulphate bulunan koyu renkli cam şişelerde korunmuştur.

### **3.2.6. Bitki Uçucu Yağlar ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.6.1. Bitki Uçucu Yağlarının Değme Etkilerinin Belirlenmesi**

Uçucu yağlarının değme etkisini araştırmak için, agar seyreltme yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde 1 ml hacimlik eppendorf tüp içerisinde uçucu yağların farklı konsantrasyonları (*O. syriacum* 0-240 µg/ml; *F. vulgare* 0-320 µg/ml; *L. nobilis* 0-2880 µg/ml) Tween 20 (%0.1) ve etanol (5 µl) yardımıyla süspansiyon haline getirilerek 45°C civarındaki PDA ortamına katılmasından önce karıştırılmış ve 9 cm

çapındaki petri kaplarına dökülmüştür. Daha sonra katılaştan PDA ortamına fungus kültürlerinden 10 mm çapındaki mantar delici ile alınan diskler miselli yüzeyi besi ortamına değecek şekilde petri kabının merkezine yerleştirilmiştir. Petri kabının boşlukları parafilm ile kapatılarak 25 °C’de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrilerinde ortama sadece Tween 20 (%0.1) ve etanol (5 µl) eklemesi yapılmıştır. Kontrol petrilerinde fungus gelişiminin tamamlanmasıyla (5 gün), ortam yüzeyindeki fungus kolonilerinin çapları ölçülerek uçucu yağların etkinliği ortaya konulmuştur.

### 3.2.6.2. Bitki Uçucu Yağlarının Buhar Etkilerinin Belirlenmesi

Bitki uçucu yağlarının buhar etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, 9 cm çapındaki steril petri kaplarına (100 ml hava hacimli) PDA ortamı dökülerek petri kabının merkezine 10 mm çapındaki mantar delici ile alınan 7 günlük fungus kültürünün diskleri, diskin misel gelişimi görülen yüzeyi PDA ile temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Uçucu yağlarının değişen konsantrasyonları (*O. syriacum* 0-60 µg/ml; *F. vulgare* 0-80 µg/ml; *L. nobilis* 0-200 µg/ml) petri kabının kapağının merkezine yapıştırılan steril filtre kağıdına emdirilmiş daha sonra petri kabının boşlukları parafilm ile kapanıp ters çevrilerek (kapak altta kalacak şekilde) 25 °C’de 5 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petri kaplarına steril destile su damlatılarak aynı işlemlere tabi tutulmuştur. Değerlendirmeler kontrol petrilerinde fungus gelişimi tamamlandığında (yaklaşık 96 saat) koloni çaplarının ölçülmesiyle yapılmıştır.

### 3.2.6.3. Bitki Uçucu Yağlarının Ana Bileşenlerinin Değme Etkilerinin Belirlenmesi

Daha önce yapılmış olan bir çalışmada GC-MS analizleri *O. syriacum* uçucu yağının en önemli ana bileşenin carvacrol (%79.8); *L. nobilis* uçucu yağının 1,8-cineole (%36.0) ve *F. vulgare* uçucu yağının ise *trans*-anethole (%82.8) olduğu belirlenmiştir (Soylu ve ark., 2004). Test edilen uçucu yağların ana bileşenleri ticari olarak (Sigma, Aldrich, USA) temin edilmiş ve denemelerde kullanılmıştır. Ana bileşenlerin antifungal ve antibakteriyel etkinlikleri ise uçucu yağların fungal ve bakteriyel etmenlerin gelişimini engeleyen minimum engelleme konsantrasyonlarında bulunan miktarları (1x)

ile bu miktarın 2 (2x) ve 3 (3x) katı kullanılmıştır. Örneğin antifungal etkinliğinin belirlendiği çalışmalarda ana bileşenlerin konsantrasyonları carvacrol için 130-570 µg/ml; 1,8-cineole için 500-3000 µg/ml; *trans*-anethole için 220-780 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu dozlar her bir yağın fungal etmeni engelleyen dozlardaki bulunuş oranına göre ayarlanmıştır.

### **3.2.7. Bitki Uçucu Yağlarının Antibakteriyel Etkinliklerinin Belirlenmesi**

#### **3.2.7.1. Agar Disk Difüzyon Yöntemi**

Test edilen uçucu yağın hızlı bir şekilde etkinliğinin belirlendiği Agar disk difüzyon yönteminde (Hammer ve ark., 1999), ortaya çıkan engellenme bölgelerinin çapına göre yağın etkinliği belirlenmiş ve buna bağlı olarak minimum engellemeyi yapacak yağ konsantrasyonları hakkında ön fikir elde edilmiştir. Bu yöntemde, 24 saatlik bakteri süspansiyonundan 0.1 ml bakteri kültürü alınmış, 9 cm çapında 20 ml King B ortamı içeren petri yüzeylerine yayılarak ortam yüzeyinde kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra bu petrilerin tam ortasına 6 mm çapında steril filtre kağıtları (disk) yerleştirilmiş ve bu filtre kağıdına 10 µl bitki uçucu yağı otomatik ayarlı pipet yardımıyla damlatılmıştır. Damlatılan yağın etrafa taşmaması için kağıt diskler 4 kat halinde kullanılmıştır.

Her bir petriye 1 bitki uçucu yağı konmuş ve uygulama (her patojen ve yağ için) 5 farklı petride tekrar edilmiştir. Petrilerin kenarları daha sonra parafilm ile kaplanarak 25 °C’ de 4 gün inkübasyona bırakılmış, günlük ölçümler alınmıştır. Uçucu yağların etkinliği petrilere ortaya çıkan inhibisyon (engelleme) bölgelerinin ölçülmesiyle yapılmıştır. Değerlendirmeler engelleme alanının genişliğinin enine ve boyuna ölçülmesiyle yapılmıştır.

#### **3.2.7.2. Mikro Seyreltme Yöntemi**

Test edilen bitki uçucu yağları ve ana bileşenlerin minimum engelleme konsantrasyonları mikro seyreltme yöntemi ile 1 ml kapasiteli steril eppendorf tüpleri içerisinde belirlenmiştir. Denemelerde kullanılan farklı uçucu yağ ve ana bileşenlerinin

konsantrasyonları eppendorf tüplerine konulduktan sonra üzerlerine toplam hacmi 1000 µl tamamlayan daha önceden tarif edildiği şekilde hazırlanan (son konsantrasyonu  $10^5$  hücre/ml olacak şekilde) 24 saatlik bakteri süspansiyonu ilave edilmiştir. Sonuçta eppendorf tüplerde uçucu yağlar ve ana bileşenleri değişen konsantrasyonları elde edilmiştir. Farklı uçucu yağ ve ana bileşen konsantrasyonlarının bulunduğu eppendorf tüpleri parafilm ile kaplandıktan sonra inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 25 °C 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Uçucu yağın sıvı besi ortamında homojen bir halde dağılması için LB besi ortamı içine yayıcı-çözücü madde olarak %1 oranında dimethyl sulfoxide (DMSO) ilave edilmiştir. Aynı oranda DMSO kontrol olarak kullanılan ve içerisinde sadece bakteri kültürü bulunan tüplere de ilave edilmiştir.

Bakteriyel etmenin gelişimini tamamen engelleyen en düşük konsantrasyon değeri (MIC, minimum inhibisyon konsantrasyonu) 2 farklı şekilde ortaya konmuştur;

**A. Klasik petride sayma yöntemi:** Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ ve ana bileşenleri ile muamele edilen bakteri süspansiyonlarının 48 saat inkübasyonundan sonra, her tüpten 0.2 ml örnek alınarak besi ortamı yüzeyine yayılmıştır. Petriler 25 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra yüzeyde gelişen bakteri kolonileri sayılarak uçucu yağlarının etkinliği ortaya konulmuştur. Herhangi bir bakteri koloni gelişmesinin görülmediği petriler o yağ veya ana bileşen için MIC değeri olarak belirlenmiştir.

**B. Resazurin mikrotitrasyon assay testi (REMA):** Bu kapsamda resazurin sodyum tuzu (Sigma, R-2127) 0.1 mg/ml (w/v) oranında steril distile su içinde hazırlanmış ve mavi-mor renkli bir stok solusyon elde edilmiştir. Elde edilen solusyon 22 µm por çaplı steril membran filtrelerle filtrasyondan geçirilerek steril cam tüpte +4 °C saklanmıştır. Klasik yöntemle belirlemede olduğu gibi farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ ve ana bileşenleri ile muamele edilen bakteri süspansiyonları 48 saat inkübe edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarla muamele edilmiş her tüpten 180 µl bakteri süspansiyonu alınarak steril eppendorf tüplerine konulmuş ve bu süspansiyonun üzerine resazurin stok solüsyonundan alınan 200 µl ilave edildikten sonra (bu aşamada ilave edilen tüm tüpler mavi-mor renge dönüşmüştür) 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörden çıkartılan tüpler içerisinde başlangıçta mavi-mor renk olan süspansiyonun

pembe renge dönmesi o tüplerde bakteriyel gelişimin olduğunu, mavi-mor renkte kalan süspansiyon ise herhangi bir bakteriyel gelişimin olmadığını göstermiştir (Palomino ve ark. 2002). Söz konusu uçucu yağın veya ana bileşenin MIC değerinin mavi-mor rengin görüldüğü ilk tüplerdeki konsantrasyonun olduğu kabul edilmiştir. Mavi-mor rengin görüldüğü ilk tüplerden alınan örnekler klasik mikro seyreltme testi ile de canlılığın olup olmadığı açısından desteklenmiştir.

### 3.2.8. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Tüm *in vitro* denemelerinde her petri/eppendorf tüp 1 tekerrür ve her konsantrasyon da 3 tekerrür olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre % engelleme =  $(K_k - U_k) / K_k \times 100$  formülü ile hesaplanmıştır.  $K_k$ =kontrol deki koloni sayısı;  $U_k$ =uygulama sonucunda gelişen koloni sayısını ifade eder.

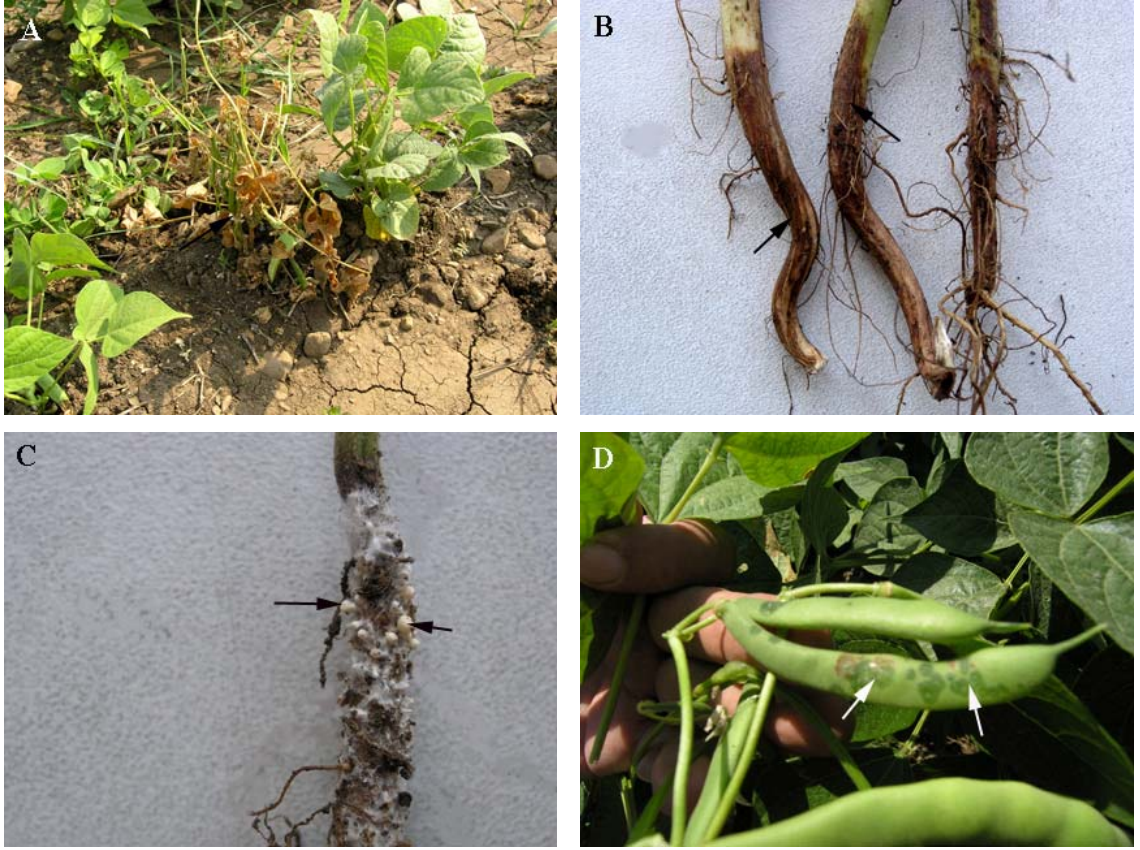
Elde edilen ölçüm değerlerinde % engelleme oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı (SPSS Inc., versiyon 11.5.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve Duncan's çoklu karşılaştırma testi ( $p \leq 0.05$ ) ile konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin İzolasyon ve Teşhisleri

Hatay ilinde fasulye yetiŐtiriciliĐinin bŸyŸk bir alanı taze tŸketime yŸnelik olup, klasik tarla yetiŐtiriciliĐinin yanı sıra, Ÿzellikle Erzin ve DŸrtyol ilçelerinde turunçgil bahçeleri arasında ara tarım olarak da yapılmaktadır. Çalışmalarda kullanılan ve uçu cu yağların antifungal etkinliklerinin test edildiği fungal etmenler *S. rolfsii*, *R. solani* ve *M. phaseolina* hastalıklı fasulye bitkilerinin kŸk, kŸk boğazı ve gŸvdelerinden (Şekil 4.1) izole edildikten sonra PDA besi ortamında gelişen kolonilerinin morfolojik yapılarına gŸre (Şekil 4.2) teşhisleri yapılmış ve patojenisite testlemelerinden sonra çalışmalarda kullanılmıştır. Benzer Ÿekilde bakteriyel etmenler de hastalıklı bitkilerin yaprak, gŸvde ve meyvelerinden izole edildikten sonra yağ asit profillerine gŸre mikrobiyel teşhis sistemi ile tanımlanmıŐlardır. Bakteriyel etmenlerin patojeniste testlemeleri, *Psp* için meyve Ÿzerinde, *Cff* için ise gŸvde inokŸlasyon tekniği kullanılarak yapılmıştır.





Şekil 4.1. Hatay ili ve ilçelerinde ekimi yapılan fasulye bitkilerinde sorun olan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerince bitki kök ve gövdelerinde (oklar) oluşturulan hastalık belirtileri (A, B ve C). D, Bakteriyel fasulye hale yanıklığı etmeni *P. syringae* pv. *phaseolicola*'nın fasulye meyvelerinde oluşturduğu tipik ıslaklık belirtileri (oklar)



Şekil 4.2. Hastalıklı fasulye bitkilerinden izole edilen toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinin (A, *S. rolfsii*; B, *R. solani*; C, *M. phaseolina*) PDA besi yerinde oluşturdukları koloni morfolojileri

## 4.2. Bitki Uçucu Yağlar ve Genel Özellikleri

Çalışmalarda kullanılan bitki uçucu yağları Clevenger tipi alet yardımıyla buhar distilasyon yöntemi ile elde edilmiş ve denemelerde kullanılmıştır. Uçucu yağları kullanılan bitkilerin yağ verimleri ve uçucu yağların genel özellikleri Çizelge 4.1 de verilmiştir. Bitkiler içinde en yüksek verim *F.vulgare* tohumlarından elde edilmiş olup, bunu *O. syriacum* ve *L. nobilis* bitkileri takip etmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmalarda kullanılan bitkiler ve uçucu yağlarının genel özellikleri

Bitki	Kullanılan bitki kısmı	Uçucu yağın rengi	Uçucu yağın % verimi*
<i>O. syriacum</i>	Yaprak	Koyu sarı- turuncu	6,7 b
<i>L. nobilis</i>	Yaprak	Açık sarı	3,1 a
<i>F. vulgare</i>	Tohum	Saydam beyaz	7,9 c

\* Kurutulmuş bitki materyalinden elde edilen toplam miktar (w/v). Yağ verimi her birinde 100 gr kuru bitki materyalinin kullanıldığı 3 farklı ekstraksiyon sonucu elde edilen miktarın ortalamasıdır. Sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler yağ verimleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Duncan's Multiple Range Test,  $P \leq 0.01$ )

## 4.3. Bitki Uçucu Yağ ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi

### 4.3.1. Bitki Uçucu Yağlarının Misel Gelişimi Üzerine Değme Etkileri

Bu çalışma kapsamında *O. syriacum*, *L. nobilis* ve *F. vulgare* bitkilerinden elde edilen uçucu yağların farklı konsantrasyonlarının *S. rolfii*, *R. solani* ve *M. phaseolina* üzerine değme etkilerini belirlemek için kontrol petrilerinde fungus kolonileri tamamen petriyi kapladığında ( 5 gün sonra) değerlendirme yapılmış ve sonuçlar çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *O. syriacum* uçucu yağının değme fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği

Konsantrasyon*	<i>S. rolfisii</i>		<i>R. solani</i>		<i>M. phaseolina</i>	
	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)
0	90.0 g**	-	90.0 h	-	90.0 g	-
1	78.3 f	13.0	87.7 h	3.0	80.8 f	10.2
2	59.7 e	33.6	65.7 g	2.7	65.3 e	27.4
3	42.3 d	53.0	59.3 f	34.1	61.0 e	32.2
4	28.0 c	68.8	51.3 e	43.0	51.0 d	43.3
5	16.7 b	81.4	33.0 c	63.8	48.0 d	46.6
6	0 a	100	21.3 b	76.3	30.0 c	66.6
7	-	-	0 a	100	15.3 b	83.0
8	-	-	-	-	0 a	100

\*Çalışmalarda uçucu yağ konsantrasyonları aşağıdaki oranlarda kullanılmıştır.

*S. rolfisii* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240 µg/ml,

*R. solani* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 20, 40, 60, 80, 120, 140, 160 µg/ml,

*M. phaseolina* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 20, 40, 60, 80, 120, 160, 180, 200 µg/ml olarak uygulanmıştır.

\*\* Sütunlar içerisindeki ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler, konsantrasyonlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir. (Duncan's Multiple Range Test,  $p \leq 0.05$ )

-: Bu konsantrasyonda uygulama yapılmamıştır

Çizelge 4.3. *F. vulgare* uçucu yağının değme fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği

Konsantrasyon*	<i>S. rolfisii</i>		<i>R. solani</i>		<i>M. phaseolina</i>	
	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)
0	90.0 h**	-	90.0 g	-	90.0 i	-
1	72.0 g	20.0	72.0 f	20.0	76.3 h	15.2
2	61.0 f	32.2	65.0 e	27.7	71.7 g	20.3
3	45.0 e	50.0	59.3 e	34.1	57.3 f	36.3
4	33.0 d	63.3	48.3 d	46.3	36.7 e	59.2
5	22.7 c	74.7	40.0 c	55.5	29.7 d	67.0
6	16.0 b	82.2	23.7 b	73.6	21.7 c	75.8
7	0 a	100	0 a	100	16.3 b	81.8
8	-	-	-	-	0 a	100

\*Çalışmalarda uçucu yağ konsantrasyonları aşağıdaki oranlarda kullanılmıştır;

*S. rolfisii* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 µg/ml,

*R. solani* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 µg/ml,

*M. phaseolina* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 µg/ml olarak uygulanmıştır.

\*\* Sütunlar içerisindeki ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler, konsantrasyonlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Duncan's Multiple Range Test,  $p \leq 0.05$ )

-: Bu konsantrasyonda uygulama yapılmamıştır.

Çizelge 4.4. *L. nobilis* uçucu yağının değme fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği

Konsantrasyon*	<i>S. rolfsii</i>		<i>R. solani</i>		<i>M. phaseolina</i>	
	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)
0	90.0 h**	-	90.0 h	-	90.0 g	-
1	81.3 g	9.6	76.3 fg	15.2	77.6 f	13.7
2	65.3 f	27.4	74.3 f	17.4	60.1 e	33.2
3	49.7 e	44.7	71.3 f	20.7	44.1 d	51.0
4	43.0 de	52.2	70 f	22.2	21.8 c	75.7
5	28.0 c	68.8	61 ef	32.2	11.1 b	87.6
6	14.7 b	83.6	51.3 e	43.0	0 a	100
7	0 a	100	35.7 d	60.3	-	-
8	-	-	21.1 c	76.5	-	-
9	-	-	12.8 b	85.7	-	-
10	-	-	0 a	100	-	-

Çalışmalarda uçucu yağ konsantrasyonları aşağıdaki oranlarda kullanılmıştır;

*S. rolfsii* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 480, 640, 800, 960, 1120, 1280, 1440 µg/ml

*R. solani* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 480, 640, 800, 960 1120, 1280, 1440, 1600, 1760, 1920 µg/ml

*M. phaseolina* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 480, 960, 1440, 1920, 2400, 2880 µg/ml olarak uygulanmıştır.

\*\* Sütunlar içerisindeki ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler, konsantrasyonlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Duncan's Multiple Range Test,  $p \leq 0.05$ )

-: Bu konsantrasyonda uygulama yapılmamıştır.

Çizelgelerde de görülebileceği gibi yağların artan konsantrasyonlarında fungusların misel gelişimleri azalmıştır. Kullanılan 3 fungal izolatin misel gelişimi üzerine en yüksek antifungal etkiyi *O. syriacum* ve *F. vulgare* bitkilerinden elde edilen uçucu yağların gösterdiği ve *L. nobilis* bitkisinden elde edilen uçucu yağın diğer iki uçucu yağa göre daha az antifungal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Uçucu yağlardan *O. syriacum* yağının *S. rolfsii*'yi 240 µg/ml, *R. solani*'yi 160 µg/ml ve *M. phaseolina*'yı 200 µg/ml, konsantrasyonlarda tamamen engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2.). *F. vulgare* uçucu yağının *O. syriacum* uçucu yağına yakın bir değerle *S. rolfsii* ve *R. solani*'yi 280 µg/ml konsantrasyonda engellerken, *M. phaseolina*'yı 320 µg/ml konsantrasyonda tamamen engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.3). *L. nobilis* uçucu yağı, *O. syriacum* ve *F. vulgare* uçucu yağına kıyasla oldukça düşük düzeyde etkinlik göstermiş, fungal etmenlerin misel gelişimlerini daha yüksek konsantrasyonlarda durdurabilmiştir. Çizelge 4.4'de de görülebileceği gibi *L. nobilis* uçucu yağının *S.*

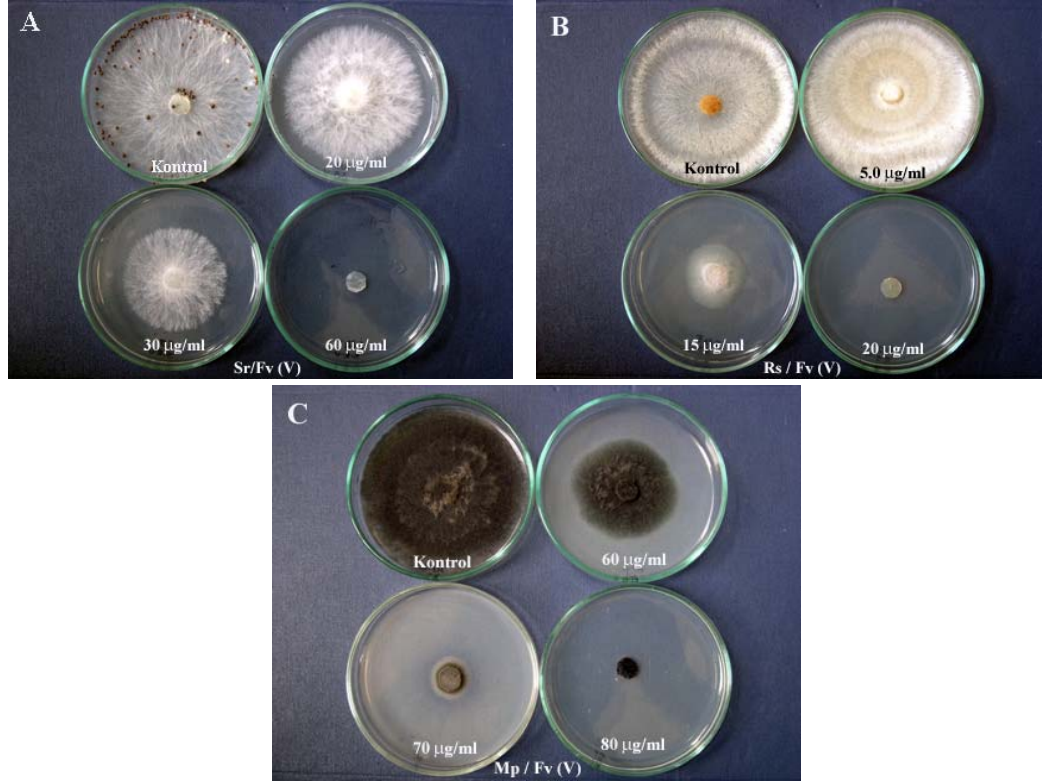
*rolfsii*'yi 1440 µg/ml, *R. solani*'yi 1920 µg/ml engellerken, *M. phaseolina*'yı oldukça yüksek bir konsantrasyonda (2880 µg/ml) tamamen engellediği belirlenmiştir.

Daha önce yapılan pek çok çalışmada da kekik türlerinin yağlarının diğer bitki yağlarından daha düşük konsantrasyonlarda fitopatojen fungal ve bakteriyel etmenlere karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Benjilali ve ark., 1984; Maiti ve ark. 1984; Çakır ve Yeğen ,1988; Charai ve ark., 1996; Sivropoulou ve ark., 1996; Basım ve ark., 2000; Daferera ve ark., 2002; Abou-Jawdah ve ark. 2002; Cheng ve ark. 2005; Soylu ve ark, 2006; YeZhou, 2007).

Müller-Riebau ve ark., (1995) yaptıkları çalışmada, test edilen uçucu yağların bazılarının (*S. fruticosa*, *L. nobilis*, *M. pulegium*, ve *E. camaldulensis*) çalışmada kullanılan toprak kökenli fungusların misel gelişimini engellemediğini veya çok az engellediğini, benzer şekilde sadece kekik türlerinin uçucu yağlarının (*T. spicata*, *S. thymbra* ve *O. miniifolium*) test edilen fungusların miselyal gelişimini geniş ölçüde engellediğini bildirmişlerdir. Yapılmış olan bir başka çalışmada *Mentha arvensis* uçucu yağının *M. phaseolina* ve *S.rolfsii*'nin içinde bulunduğu 8 fungus türüne fungistoksik etki gösterdiğini ve sentetik fungusitlerden daha etkili olduğunu belirlemişlerdir (Kumar ve ark. , 2002).

#### 4.3.2. Bitki Uçucu Yağlarının Misel Gelişimi Üzerine Buhar Etkileri

Bitki uçucu yağlarının fungal misel gelişimi üzerine buhar etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışma kapsamında *O. syriacum*, *F. vulgare* ve *L. nobilis*'den elde edilen uçucu yağların farklı konsantrasyonları bölüm 3.2.6.2'de belirtildiği şekilde uygulanmıştır. Uçucu yağların buhar etkisini belirlemek için yapılan denemelerde elde edilen sonuçlar Şekil 4.3 ile Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Rezene uçucu yağının buhar fazına ait farklı konsantrasyonlarının (A) *S. rolfsii*, (B) *R. solani* ve (C) *M. phaseolina* etmenlerine karşı gösterdiği antifungal etkinliği

Çizelge 4.5. *O. syriacum* uçucu yağının buhar fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği

Konsantrasyon*	<i>S. rolfsii</i>		<i>R. solani</i>		<i>M. phaseolina</i>	
	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)
0	90.0 g**	-	90.0 d	-	90.0 f	-
1	77.3 f	14.1	90.0 d	-	73.3 e	18.5
2	63.7 e	29.2	44.7 c	50.3	37.3 d	58.5
3	51.7 d	42.5	23.7 b	73.6	27.0 cd	70.0
4	38.3 c	57.4	0 a	100	26.0 c	71.1
5	21.0 b	76.6	-	-	16.7 bc	81.4
6	0 a	100	-	-	13.0 b	85.5
7	-	-	-	-	0 a	100

\*Çalışmalarda uçucu yağ konsantrasyonları aşağıdaki oranlarda kullanılmıştır;

*S. rolfsii* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml hava

*R. solani* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 5, 10, 15, 20 µg/ml hava

*M. phaseolina* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 µg/ml hava olarak uygulanmıştır.

\*\* Sütunlar içerisindeki ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler, konsantrasyonlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Duncan's Multiple Range Test,  $p \leq 0.05$ )

-: Bu konsantrasyonda uygulama yapılmamıştır

Çizelge 4.6. *F. vulgare* uçucu yağının buhar fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği

Konsantrasyon*	<i>S. rolfisii</i>		<i>R. solani</i>		<i>M. phaseolina</i>	
	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)
0	90.0 d**	-	90.0 d	-	90.0 e	-
1	89.7 d	0.3	90.0 d	-	85.3 e	5.2
2	78.3 d	13.0	42.0 c	53.3	59.3 d	34.1
3	48.7 c	45.8	24.3 b	73.0	39.3 c	56.3
4	42.0 c	53.3	0 a	100	25.0 b	72.2
5	19.7 b	78.1	-	-	0 a	100
6	0 a	100	-	-	-	-

\*Çalışmalarda uçucu yağ konsantrasyonları aşağıdaki oranlarda kullanılmıştır;

*S. rolfisii* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml hava

*R. solani* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 5, 10, 15, 20 µg/ml hava

*M. phaseolina* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 40, 50, 60, 70, 80 µg/ml hava olarak uygulanmıştır.

\*\* Sütunlar içerisindeki ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler, konsantrasyonlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Duncan's Multiple Range Test,  $p \leq 0.05$ )

-: bu konsantrasyonda uygulama yapılmamıştır.

Çizelge 4.7. *L. nobilis* uçucu yağının buhar fazının PDA ortamında fungal etmenlerin misel gelişimi üzerine etkinliği

Konsantrasyon*	<i>S. rolfisii</i>		<i>R. solani</i>		<i>M. phaseolina</i>	
	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)	Misel gelişimi (mm)	Etkinlik (%)
0	90.0 h**	-	90.0 h	-	90.0 j	-
1	79.0 g	12.2	83.3 g	7.4	85.1 j	5.5
2	75.0 fg	16.6	57.0 f	36.6	55.7 i	38.1
3	71.3 f	20.7	46.0 e	48.8	48.0 h	46.6
4	64.7 e	28.1	33.3 d	63	38.7 g	57
5	41.3 d	54.1	25.0 c	72.2	34.3 fg	61.8
6	28.0 c	68.8	23.0 c	74.4	32.0 ef	64.4
7	20.3 b	77.4	13.0 b	85.5	26.3 de	70.7
8	0 a	100	0 a	100	21.7 cd	75.8
9	-	-	-	-	20.3 cd	77.4
10	-	-	-	-	16.0 bc	82.2
11	-	-	-	-	13.3 b	85.2
12	-	-	-	-	0 a	100

\*Çalışmalarda uçucu yağ konsantrasyonları aşağıdaki oranlarda kullanılmıştır;

*S. rolfisii* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 200 µg/ml hava

*R. solani* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 200 µg/ml hava

*M. phaseolina* için uygulanan dozlar sırası ile: 0, 32, 36, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80 µg/ml hava olarak uygulanmıştır.

\*\* Sütunlar içerisindeki ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler, konsantrasyonlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir (Duncan's Multiple Range Test,  $p \leq 0.05$ )

-: Bu konsantrasyonda uygulama yapılmamıştır.

Çizelgelerdende (4.5- 4.7) görülebileceği gibi uçucu yağların konsantrasyonlarının artmasıyla fungusların misel gelişimleri azalmıştır. Değme fazında elde edilen sonuçlarda olduğu gibi buhar fazları bakımından en yüksek antifungal etkiyi gösteren uçucu yağlar *O. syriacum* ve *F. vulgare* bitkilerinden elde edilen yağlar olurken, *L. nobilis* bitkisinden elde edilen uçucu yağın daha az etkili olduğu belirlenmiştir. Uçucu yağların buhar fazındaki patojen gelişimini durduran konsantrasyonlarının, değme fazında kullanılan konsantrasyonlara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. *O. syriacum* uçucu yağının *S. rolfsii*'yi 60 µg/ml, *R. solani*'yi 20 µg/ml ve *M. phaseolina*'yı 35 µg/ml konsantrasyonlarda tamamen engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.5). *F. vulgare* uçucu yağının *O. syriacum* uçucu yağına benzer değerlerle *S. rolfsii* ve *R. solani*'yi (sırası ile 60 ve 20 µg/ml konsantrasyonda) engellerken, *M. phaseolina*'yı 80 µg/ml konsantrasyonda tamamen engellediği belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve Çizelge 4.6). *L. nobilis* uçucu yağının buhar etkinliği değme etkinliğinde olduğu şekilde *O. syriacum* ve *F. vulgare* uçucu yağına kıyasla oldukça düşük olmuş ve fungal etmenlerin misel gelişimlerini daha yüksek konsantrasyonlarda durdurabilmiştir (Çizelge 4.7). Çizelgede de görülebileceği gibi *L. nobilis* uçucu yağı *S. rolfsii* ve *R. solani*'yi 200 µg/ml engellerken, *M. phaseolina*'yı nispeten çok yüksek bir konsantrasyonda (80.0 µg/ml) tamamen engellediği belirlenmiştir.

Çakır ve Yeğen (1988), tarafından yapılan çalışmada *F. moniliforme*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* ve *Phytophthora capsici* 'nin misel gelişimini tamamen engelleyen uçucu yağların *T. spicata*, *S. thymbra*, *L. nobilis* ve *M. spicata* yağları olduğunu ancak en yüksek etkiyi benzer şekilde kekik türlerinin gösterdiğini belirlemişlerdir. Çakır (1992), kekik türlerinden *T. spicata* ve *S. thymbra* uçucu yağlarının buhar etkisini araştırmak için yapmış olduğu denemelerde uçucu yağın her petriye verilen 0,1 ml'sinde *S. sclerotiorum* ve test edilen diğer fungusların misel gelişimini tamamen durdurarak fungisidal etki yaparken diğer uçucu yağların funguslar üzerinde kekik türleri kadar etkili olmadıklarını belirtmiştir. Bitki uçucu yağlarının fungusların gelişimi üzerine buhar etkileri ile ilgili bir başka çalışmada okaliptus yağının *Pythium sp.*, *S. rolfsii* ve *S. sclerotiorum*'un, defne yağının *R. solani* ve *S. sclerotiorum*'un, sarımsak yağının ise sadece *S. sclerotiorum*'un misel gelişimini %100 oranında engellemeyi başardığı, ancak karabaş kekik uçucu yağının tüm patojenlere yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Yonucu, 1997). Soylu ve ark. 2006), origanum ve rezene uçucu yağlarının *S.*



*sclerotiorum*'a karşı yüksek düzeyde etkinlik gösterdiğini ve benzer şekilde uçucu yağların buhar fazının değme fazına oranla daha etkili olduğunu belirlemişlerdir.

#### 4.3.3. Bitki Uçucu Yağlarının Ana Bileşenlerin Misel Gelişimi Üzerine Değme Etkileri

Bitki uçucu yağlarının etkinliği ortaya konulduktan sonra yağların içerisinde en yüksek oranda bulunan kimyasal bileşenlerin antifungal etkinlikleri araştırılmıştır. Çalışmalarda uçucu yağların önemli ana bileşenleri ticari olarak temin edilmiş olup, test edilen patojenlere karşı farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ bileşenlerini içeren besi yerlerinde fungal gelişimler ölçülerek, misel gelişimi durduran en düşük konsantrasyonlar belirlenmiştir. Çalışmalarda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Bitki Uçucu Yağ Ana Bileşenlerinin Antifungal Etkinliği

Ana bileşenler ve dozlar*	Fungal etmenler ve engellenme oranları (%)		
	<i>S. rolfisii</i>	<i>R. solani</i>	<i>M. phaseolina</i>
Carvacrol 1x	100	43	62.2
Carvacrol 2x	100	100	100
Carvacrol 3x	100	100	100
<i>trans</i> -anethole 1x	90	20.7	20.3
<i>trans</i> -anethole 2x	100	85	46
<i>trans</i> -anethole 3x	100	100	78.8
1,8-cineole 1x	0	18.8	0
1,8-cineole 2x	14.1	67.8	13.7
1,8-cineole 3x	44.1	81	100

Konsantrasyonlar ana bileşenin test edildiği fungusa karşı minimum engellemeyi sağlayan konsantrasyondaki oranlara göre ayarlanmış ve sırası ile aşağıdaki oranlarda kullanılmıştır;

\* carvacrol konsantrasyonları sırası ile;

*S. rolfisii* için: 190, 380, 570 µg/ml; *R. solani* için: 130, 260, 390 µg/ml; *M. phaseolina* için: 160, 320, 480 µg/ml olarak kullanılmıştır.

\* *trans*-anethole konsantrasyonları sırası ile;

*S. rolfisii* için: 220, 440, 660 µg/ml; *R. solani* için: 220, 440, 660 µg/ml; *M. phaseolina* için: 260, 520, 780 µg/ml olarak kullanılmıştır.

\* 1,8 cineole konsantrasyonları sırası ile;

*S. rolfisii* için: 500, 1000, 1500 µg/ml; *R. solani* için: 670, 1350, 2010 µg/ml; *M. phaseolina* için: 1000, 2000, 3000 µg/ml olarak kullanılmıştır.

-: Bu konsantrasyonda uygulama yapılmamıştır.

Denemelerde en etkili uçucu yağ olarak belirlediğimiz *O. syriacum* uçucu yağının ana bileşeni carvacrol'ün tek başına kullanıldığında fungal etmenlerden *S. rolf sii*'yi 190µg/ml' lik konsantrasyonda tamamen engellerken, *R. solani*'yi 260 µg/ml ve *M. phaseolina*'yı 320µg/ml konsantrasyonlarında engellemiştir. *F. vulgare* uçucu yağının ana bileşeni olan trans-anethole, carvacrole oranla daha yüksek konsantrasyonlarda etkinlik göstermiştir. *Trans-anethole* tek başına kullanıldığında *S. rolf sii*'yi 440 µg/ml, *R. solani*'yi 660 µg/ml'lik konsantrasyonlarda tamamen engellerken, *M. phaseolina*'yı 780 µg/ml'lik konsantrasyonunda %78.8 oranında engellemiştir. Ana bileşenler içinde en düşük etkinlik uçucu yağlarda da olduğu gibi *L. nobilis* uçucu yağının ana bileşeni olan 1,8-cineole tarafından gösterilmiştir. 1,8-cineole tek başına kullanıldığında *S. rolf sii*'yi 1500µg/ml konsantrasyonunda %44.1, *R. solani*'yi 2010 µg/ml konsantrasyonunda %81 ve, *M. phaseolina*'yı 3000 µg/ml gibi oldukça yüksek konsantrasyonda tamamen engellemiştir.

Sonuçlara bakıldığında test edilen ana bileşenlerden carvacrol'ün *S. rolf sii*'ye karşı antifungal etki gösterdiği konsantrasyonun (190 µg/ml) patojeni engelleyen *Origanum* uçucu yağ konsantrasyonunda (240 µg/ml) bulunuş oranında engellemesi, *S. rolf sii*'ye karşı gösterilen antifungal etkinlikten carvacrol'ün sorumlu olduğunu ortaya koymuştur. Aynı bileşiğin *R. solani* ve *M. phaseolina* karşı ise daha yüksek konsantrasyonlarda etkinlik göstermesi bu etmenlere karşı carvacrol'ün antifungal etkinlikten tek başına sorumlu bileşen olmadığını göstermiştir.

Diğer ana bileşenler olan *trans-anethole* ve 1,8-cineole'ün antifungal etkinlik gösterdikleri konsantrasyonlarının, uçucu yağların fungal etmenleri engelleyen konsantrasyonlarındaki bulunuş oranlarından yüksek olması, bu bileşenlerin etmenlere karşı antifungal etkinlikten tek başına sorumlu olmadıklarını göstermiştir. Bu durum ana bileşenlerin, uçucu yağların içerisinde bulunan diğer bileşenlerle sinerjik etkide bulunuyor olabileceklerini ortaya koymuştur.

Daouk ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada, *O. syriacum* L.'nin GC kullanılarak uçucu yağının içeriğini carvacrol ve thymol olarak tanımlamışlar, *Origanum* yağının, *Penicillium* spp., *Aspergillus niger* ve *Fusarium oxysporum*'a karşı güçlü engelleyici etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada, *Salvia pomifera* subsp. *calycina*, *S. fruticosa*, *S. thymbra* ve *O. onites* gibi Yunanistan'da yabani olarak yetişen bitkilerin uçucu yağları ve bileşenlerinden olan carvacrol, camphor ve 1,8- cineole'un

antifungal etkileri arasında bitki, hayvan ve insan patojeni olan 13 fungus türüne karşı denemişlerdir. En yüksek ve en geniş etkinliği olanların carvacrol içeren *O. onites* ve *T. spicata* uçucu yağları olduğunu bulmuşlardır. Denenen bileşenler arasında en yüksek antifungal etkiyi benzer şekilde carvacrol ve en düşük etkiyi 1,8-cineole göstermiştir (Sokovic ve ark. 2002).

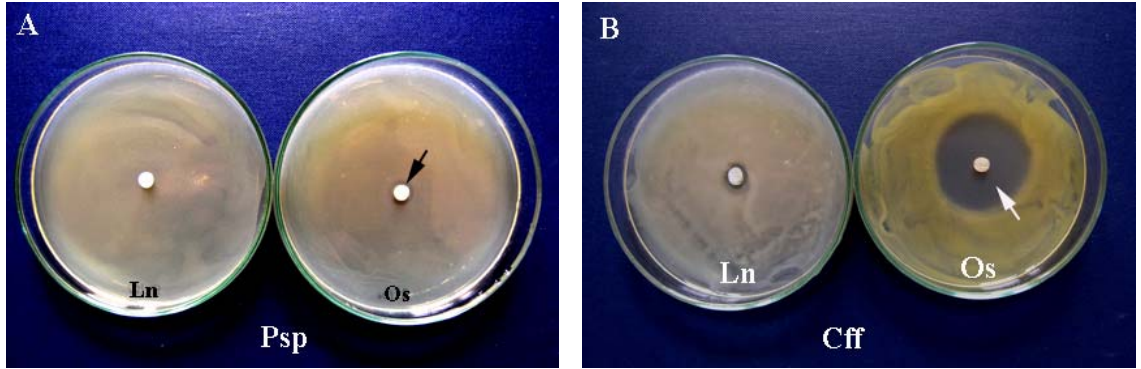
#### **4.4. Bitki Uçucu Yağ ve Ana Bileşenlerinin Antibakteriyel Etkileri**

Bitki uçucu yağlarının antibakteriyel etkinliği 2 farklı yöntemle araştırılmıştır. Öncelikle Agar disk difüzyon yöntemi ile uçucu yağların antibakteriyel özelliğinin bulunup bulunmadığı ve varsa şiddetlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Diğer yöntem olan mikro seyreltme yöntemi ile bitki uçucu yağları ve ana bileşenlerinin test edildiği bakteriyel etmeni engelleyen en düşük konsantrasyonunun (minimum inhibisyon konsantrasyonu) bulunması hedeflenmiştir.

##### **4.4.1. Bitki Uçucu Yağlarının Antibakteriyel Etkileri**

###### **4.4.1.1. Agar Disk Difüzyon Yöntemi**

Agar disk difüzyon yönteminde 10 µl bitki uçucu yağının emdirildiği steril filtre kağıtlarından hazırlanan diskler önceden bakteri süspansiyonu ile bulaştırılmış petri kaplarının ortasına yerleştirilip petri kapağı kapatılmış ve parafilm ile çevrilmiştir. Uygulama yapılan petriler 48, 72 ve 96 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Kâğıt disklerin etrafında oluşan engelleme bölgelerinin (Şekil 4.4) çapı ölçülerek uçucu yağların antibakteriyel etkinliği belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Kontrol olarak steril su ve 2 farklı antibiyotik (tetracycline ve rifampicin 100 µg/ml konsantrasyonda) kullanılmıştır.



Şekil 4.4. *L. nobilis* ve *O. syriacum* uçucu yağlarının bakteriyel etmenlerden *P. syringae* pv. *phaseolicola* (A) ve *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (B) karşı agar disk difüzyon testi ile antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi. Kâğıt disk etrafında oluşan bakteri engellenme bölgesi ok ile gösterilmiştir

Çizelge 4.9. Bitki Uçucu Yağlarının Bakteriyel Hastalık Etmenlerine Karşı Antibakteriyel Etkinliği\*

Uygulamalar	Bakteriyel etmenler ve gözlenen engellenme alanları (mm)	
	<i>Psp</i>	<i>Cff</i>
<i>O. syriacum</i>	10.1 b	37.0 d
<i>L. nobilis</i>	6.0 a	10.0 a
<i>F. vulgare</i>	6.2 a	12.1 a
Tetracyclin (100µg/ml)	22.3 c	34.6 c
Rifampisin (100µg/ml)	11.9 b	20.1 b

\* Antibakteriyel etkinlik agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. 10 µl uçucu yağ emdirilmiş steril filtre kağıdı (6 mm) önceden bakteri süspansiyonu yayılmış petrilerin ortasına yerleştirilmiş ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Filtre kağıdı etrafında ortaya çıkan engelleme bölgesinin çapı (kağıt disk dahil) ölçülmüştür. Elde edilen değerler 5 farklı petri kutusunda ölçülen engellenme bölgelerinin ortalamasıdır.

\*\* Aynı satır veya sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük veya büyük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test,  $P \leq 0.01$ ).

Elde edilen sonuçlara göre, kullanılan yağlar içerisinde *O. syriacum* uçucu yağı, test edilen her iki patojene karşı en yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olan yağ olmuştur. Bunu sırasıyla *F. vulgare* ve *L. nobilis* uçucu yağları takip etmiştir. Bakteriler arasında uçucu yağlara karşı gram-pozitif *Cff*'in gram-negatif *Psp*'e göre daha duyarlı (engellenme bölgesi en büyük) olduğu belirlenmiştir. Söz konusu engellenme bölgeleri daha sonra sıvı besi ortamına ilave edilmiş ve 48 saat sonra sıvı besi ortamlarda

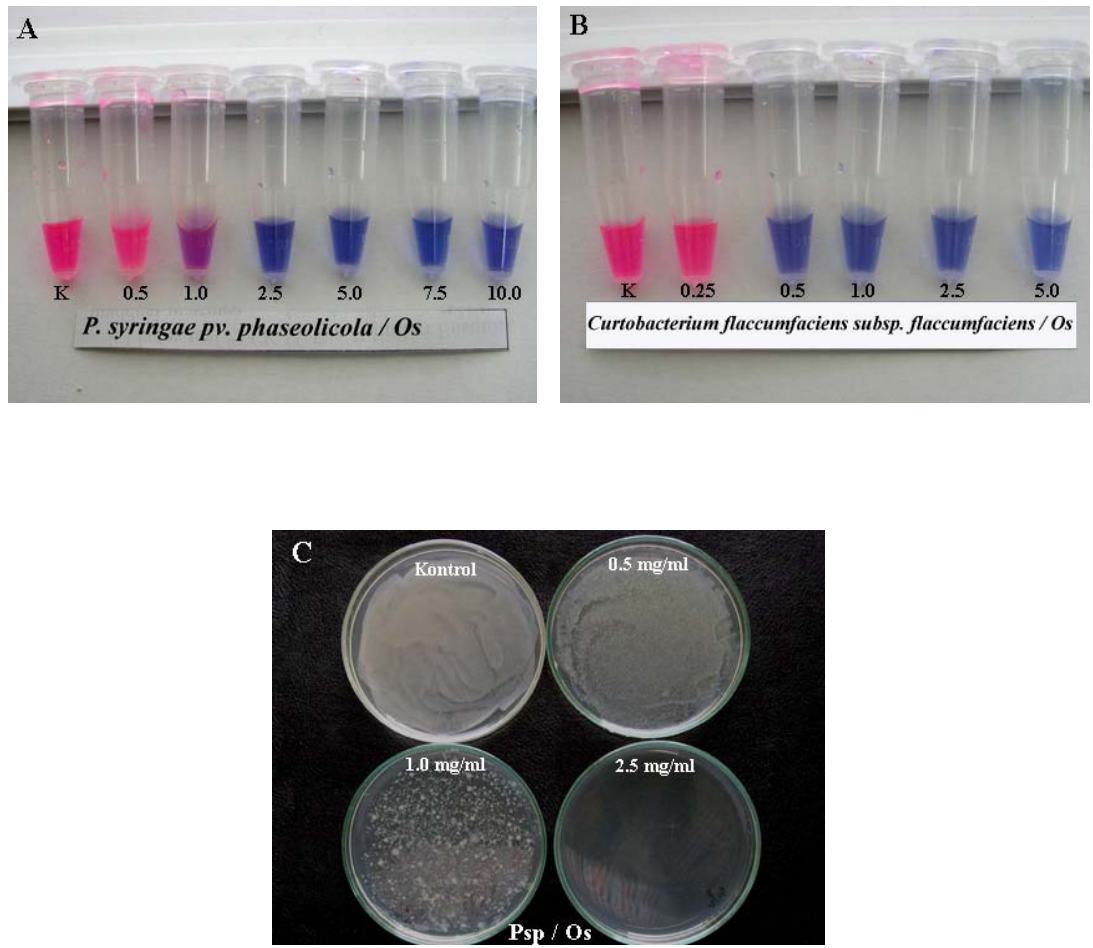
herhangi bir bakteriyel gelişme gözlenmemiştir. Bu durum uçucu yağların antibakteriyel özelliğinin bakteriyostatik (geçici etkinlik) etkinlikten ziyade bakteriyosidal (kalıcı etkinlik) etkinliğinden kaynaklandığını göstermiştir. Vasinauskiene, (2006) tarafından yapılmış olan bir çalışmada *O. vulgare*, *Acorus calamus*, *Carum carvi*, *M. piperita*, *Achillea millefolium* *A. filipendulina*, *A.cartilaginea* gibi tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, bitki hastalıklarının mücadelesinde alternatif mücadele olanakları oluşturması sebebiyle, patojenik bakterilerin gelişimine etkileri yönünden denemeye alınmıştır. Uçucu yağların engelleyici özelliklerinin belirlenmesinde disk-difüzyon metodu kullanılarak yapılan in vitro denemeleri sonucunda *O. vulgare*'den elde edilen uçucu yağın patojenik bakterilere karşı güçlü bir engelleyici özellikte olduğu görülmüştür. Bazı *Pseudomonas spp.* türlerine ve *Erwinia carotovora subsp. carotovora*'ya ise zayıf bir antibakteriyel özellik gösterdiği saptanmıştır.

#### 4.4.1.2. Mikro Seyreltme Yöntemi

Mikro seyreltme yöntemi ile bitki uçucu yağının test edildiği bakteriyel etmeni engelleyen en düşük konsantrasyonunun (minimum inhibisyon konsantrasyonu) belirlenmesi amaçlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ içeren bakteri süspansiyonları 26 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve buradan alınan 100 µl bakteri süspansiyonu yayıldıkları petri kabında 26 °C'de 48 saat tekrar inkübasyona bırakılarak uçucu yağların bakterilerin populasyon gelişimi üzerine olan antibakteriyel potansiyelleri gerek REMA gerekse petriye klasik ekim yöntemleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.1). Çalışmalarda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10 de sunulmuştur.

Mikro seyreltme yönteminden elde edilen sonuçlar agar disk difüzyon testinde elde edilen sonuçları desteklemiştir. Agar disk difüzyon testinde en küçük engelleme bölgesi oluşturan uçucu yağın mikro seyreltme yönteminde MIC konsantrasyon değerlerinin en yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir. Mikro seyreltme testindeki konsantrasyonlara bakıldığında gram-pozitif *Cff*, gram-negatif *Psp* göre daha düşük dozlarda engellenebilmiştir. *Psp*'e karşı en yüksek antibakteriyel etkiyi *O. syriacum* bitkilerinden elde edilen yağ göstermiş, bu yağın etkinliğini sırasıyla *F.vulgare* ve *L. nobilis* bitkisinden elde edilen uçucu yağları izlemiştir. Uçucu yağların *Psp*'e karşı gösterdiği antibakteriyel etkinlikleri, *Cff*'de farklılık gösterdiği belirlenmiştir. *O.*

*O. syriacum* uçucu yağı *Psp*'de olduğu gibi *Cff*'ye karşıda benzer şekilde en yüksek etkiyi gösterirken, *L. nobilis* uçucu yağı *F.vulgare* uçucu yağına kıyasla daha etkili olmuştur. *O. syriacum* uçucu yağı test edildiği *Cff* ve *Psp* etmenlerine karşı *L. nobilis* ve *F. vulgare* uçucu yağlarına kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda (sırası ile 0.5 ve 2.5 mg/ml) antibakteriyel etkinlik göstermiştir *F.vulgare* ve *L. nobilis* uçucu yağları ise test edildiği her iki bakteriyel etmeni daha yüksek konsantrasyonlarda (sırası ile 60 ve 400 mg/ml) antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *O. syriacum* uçucu yağının *Psp* (A) ve *Cff* (B) etmenlerine karşı farklı konsantrasyonlarda göstermiş olduğu antibakteriyel etkinliğinin Resazurin mikrotitrasyon assay testi (REMA) ile belirlenmesi. Pembe renk bakteriyel gelişmenin (canlı) varlığını gösterirken, mavi-mor renk bakteriyel gelişmenin olmadığını (ölü) göstermektedir. C, Klasik petri yayma yöntemi ile REMA testinde kullanılan tüplerden elde edilen sonuçların (bakterilerin canlılık durumlarının) teyit edilmesini göstermektedir.

Çizelge 4.10. Uçucu Yağların Bakteriyel Gelişimlerini Engelleyen Minimum Engelleme Konsantrasyonları (MIC)

Uçucu Yağlar	Bakteriyel Etmenler	
	<i>Psp</i>	<i>Cff</i>
<i>O. syriacum</i>	2.5 mg/ml	0.5 mg/ml
<i>F.vulgare</i>	300 mg/ml	175 mg/ml
<i>L. nobilis</i>	400 mg/ml	60 mg/ml

Benzer şekilde *Lamiaceae* familyasına dahil olan kekik ve origanum yağlarının diğer yağlara oranla daha yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu yapılan pek çok çalışmada da bildirilmiştir (Knobloch ve ark., 1989; Karamanoli ve ark., 2000; Ezzat, 2001; Nagaraj ve ark., 2001; Bouzouita ve ark., 2003; Daferera ve ark., 2003; Thakare ve ark., 2003; Baydar ve ark., 2004; Horvath ve ark., 2004; Nguiefack ve ark., 2005; Soylu ve ark., 2003). Basım ve ark. (2000), *T. spicata* uçucu yağının buhar etkisinin bazı bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini araştırdıkları çalışmada, *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Erwinia caratovora*, *E. amylovora*, *Pss* ve *Xanthomonas axonopodis* için minimum bakterisidal konsantrasyonlarının sırasıyla 98, 91, 569, 59, 684 ve 41 µg /ml olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde farklı bölgelerden toplanan *O. syriacum*, *L. stoechas* var. *stoechas* ve *F. vulgare* bitkilerine ait bitki uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu ve bazı gıda, insan ve bitki patojeni bakteriyel hastalık etmenlerine karşı antimikrobiyal etkinliği birkaç araştırmada çalışılmıştır (Dadalıoğlu ve Evrendilek, 2003; Tepe ve ark., 2004). Soylu ve ark. (2003), *L. stoechas* var. *stoechas* bitki uçucu yağının fasulye hale yanıklık etmeni *P.s.pv. phaseolicola*'ya karşı antibakteriyel etkinlikte bulunduğunu fakat etkinliğin *Lamiaceae* familyasına dahil olan biberiye (*R. officinalis*), kekik (*T. spicata*) ve origanum (*O. onites*) gibi bitkilerden elde edilen uçucu yağlarla kıyaslandığında düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Patojenler arasında en duyarlı bakteriyel etmeni gram-pozitif etmen *Cff* olurken, en dayanıklı etmen gram-negatif *Psp* olmuştur. Benzer şekilde gıda patojeni olan Gram pozitif bakteriyel etmenlerde de duyarlılığın fazla olduğu bildirilmiştir (Chao ve ark., 2000; Del Campo ve ark., 2000; Ezzeddine ve ark., 2001; Bouzouita ve ark., 2005;

Grierson ve Afolayan 2005; Jacobellis ve ark., 2005; Lopez ve ark., 2005; Santoyo ve ark., 2005). Cox ve ark (2000), çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*) yaprağından elde ettikleri uçucu yağların antibakteriyel etkinliğini Gram-negatif (*Escherichia coli*) ve Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*) bakterilerle *Candida albicans*'a karşı test ettikleri çalışmalarda, bitki uçucu yağının antibakteriyel ve antifungal etkinliğinin mikroorganizmaların hücre membran yapısının geçirgenliğini bozarak kimyasal ozmotik dengesini değiştirdiğini, böylece hücre ölümlerine neden olduğunu bildirmişlerdir.

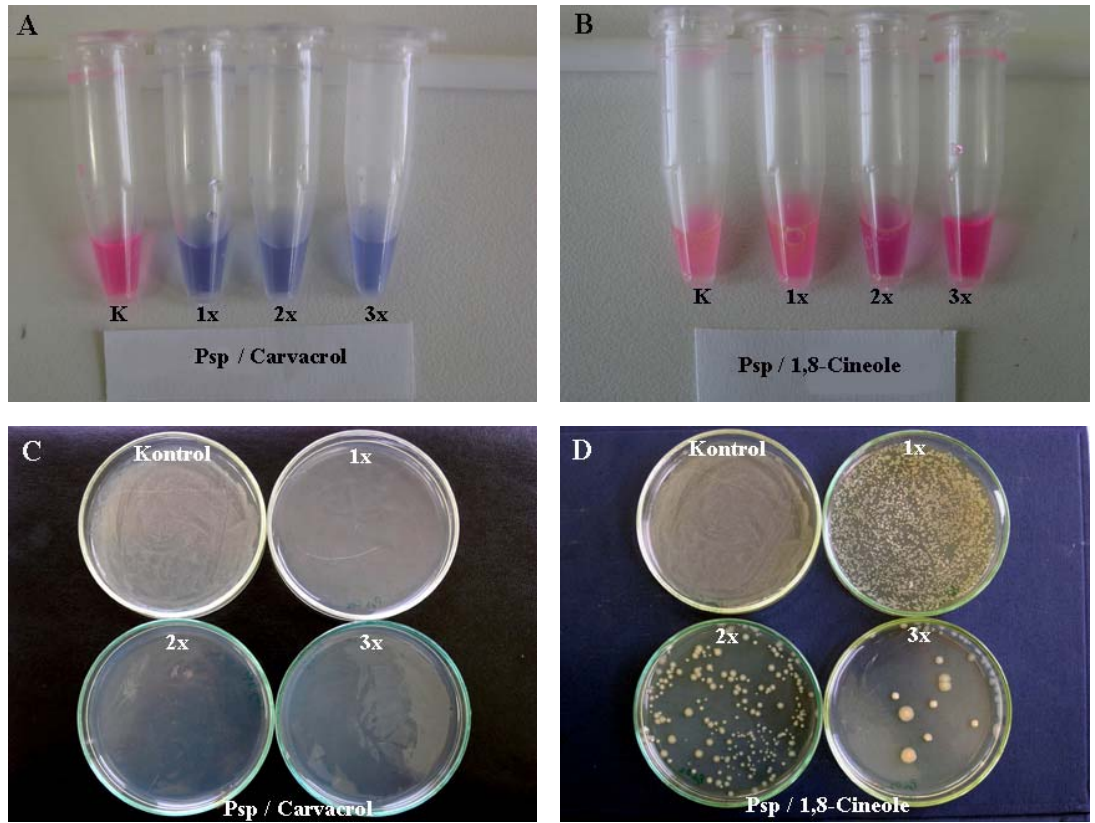
Vaara (1992)'ye göre gram-negatif bakterilerin uçucu yağlara karşı düşük düzeyde duyarlılık göstermesinin nedeninin bu tip bakterilerin hücre duvarlarının dış kısmında yer alan kompleks yapıya sahip bir membranın varlığından kaynaklandığı, bu membranın uçucu yağlar gibi hidrofobik yapıdaki bileşiklerin gerek bu membranın porlarından gerekse sahip oldukları lipopolisakkaridlerden hücre sitoplazması içerisine difüze olmasını engellemesi sonucu etkinliklerinin düşük olmasına neden olduğunu bildirmiştir.

Nguefack ve ark. (2005), beş bitkiden elde ettikleri uçucu yağlardan *Ocimum gratissimum* ve *T. vulgaris*' in tohum kökenli fitopatojen bakteriyel hastalık etmenlerinden *Acidovorax avenae subsp. avenue*, *Burkloderia glumae*, *B. plantarii*, *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* ve *X. oryzae pv. orizicola*'ya karşı daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ozturk, (2007) tarafından yapılmış olan bir çalışmada, Türkiye'nin doğusunda yetişen *Ziziphora clinopodioides Lam.* bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve metanol ekstraktı antibakteriyel etkisinin belirlenebilmesi için yapılan denemeler sonucunda, *Acidovorax facilis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus sphaericus*, *Brevibacillus brevis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Enterobacter sakazakii*, *Erwinia carotovora carotovora*, *Moraxella catarrhalis* and *Xanthomonas arboricola*'nın engellendiğini bildirmiştir. Diğer bir çalışmada ise Laouer ve ark. (2003), *Ammoides pusilla* bitkisinden elde ettikleri uçucu yağın aralarında fitopatojen bakteriyel etmenlerden *Pss* ve *P.s syringae pv. mosprunorum*' un da bulunduğu birçok bakteriyel, fungal ve maya patojenlerine karşı test ettikleri çalışmalarında uçucu yağın kullanılan tüm patojenlere karşı antifungal ve antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.



#### 4.4.2. Bitki Uçucu Yağlarının Ana Bileşenlerinin Antibakteriyel Etkinlikleri

Çalışmalarda uçucu yağların önemli ana bileşenleri ticari olarak temin edilmiş olup, test edilen patojenlere karşı (i) minimum engelleme yaptıkları konsantrasyonlardaki bulunma oranı (1x), bu oranın (ii) iki (2x) ve (iii) üç (3x) katı dozlarda olmak üzere 3 farklı dozlarda kullanılmıştır. Farklı dozlarda uçucu yağ bileşenlerini içeren bakteri süspansiyonlardaki bakteri populasyonları daha önce belirtildiği gibi mikro seyreltme yöntemiyle belirlenmiştir. Benzer şekilde REMA testi ile de, uygulama yapılmış eppendorf tüplerinden alınan örneklerdeki populasyon durumu tüplerdeki renk değişimleri (Şekil 4.2) izlenerek petride elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11 de sunulmuştur.



Şekil 4.6. Bitki uçucu yağların ana bileşenlerinden carvacrol (A) ve 1,8-cineole'ün (B) *Psp* etmenine karşı farklı konsantrasyonlarda (1x, 2x ve 3x) göstermiş olduğu antibakteriyel etkinliğinin Resazurin mikrotitrasyon assay testi (REMA) ile belirlenmesi. Pembe renk bakteriyel gelişmenin (canlı) varlığını gösterirken, mavi-mor renk bakteriyel gelişmenin olmadığını (ölü) göstermektedir. C ve D, Klasik petri yayma yöntemi ile REMA testinde kullanılan tüplerden elde edilen sonuçların (bakterilerin canlılık durumlarının) teyit edilmesini göstermektedir

Sonuçlara göre *F. vulgare* uçucu yağının ana bileşeni olan *trans*-anethole'ün her iki bakteri izolatını mikro seyreltme yöntemi ile belirlenen minimum engellediği konsantrasyonun (1x) yanı sıra diğer 2 dozda da (2x ve 3x) engellemeyi başaramamıştır. Bu durumda rezene uçucu yağdaki ana bileşen *trans*-anethole bileşenin bakteriyel etmenlere karşı gösterilen antibakteriyel etkinlikten tek başına sorumlu bileşen olmadığını göstermektedir. Muhtemelen rezene uçucu yağın göstermiş olduğu antibakteriyel etkinlikte *trans*-anethole'ün uçucu yağda daha düşük konsantrasyonlarda bulunan diğer bileşenlerle sinerjik etkileşime giderek bakteri gelişimini engellediği düşünülmektedir.

*L. nobilis* uçucu yağının ana bileşeni 1,8-cineole *Psp* izolatının populasyon gelişimini kontroldeki gelişime oranla önemli düzeyde engellenmiş olsa da (%72.1 oranında), kullanılan 3 dozda da tamamen engellenme tespit edilmemiştir. Aynı bileşen *Psp*'deki etkinliğinin aksine *Cff* izolatının populasyon gelişimini, mikro seyreltme yöntemi ile belirlenen minimum engellediği konsantrasyonda (1x) engellediği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında 1,8-cineole'ün tek başına *Psp* izolatını engelleyen ana bileşen olmadığını *trans*-anethole' de olduğu gibi diğer bileşenlerle sinerjik etkileşimde bulunduğunu göstermektedir. Diğer yandan, 1,8-cineole'ün tek başına *Cff* izolatının engellemiş olması ise bu izolata karşı antibakteriyel etkinlikten sorumlu bileşik olduğunu görülmektedir.

Denemelerde en etkili uçucu yağ olarak belirlediğimiz *O. syriacum* uçucu yağının en önemli bileşeni carvacrol'ün antibakteriyel etkinliğinin belirlendiği çalışmalarda da en etkili ana bileşen olduğu tespit edilmiştir. Carvacrol tek başına kullanıldığında her iki etmenin populasyon gelişimini, mikro seyreltme yöntemi ile belirlenen minimum engellediği konsantrasyonda bulunduğu oranda (1x) tamamen engellemiştir.

Çizelge 4.11. Bitki Uçucu Yağ Ana Bileşenlerinin Farklı Konsantrasyonlarının Fasulyede Sorun Bakteriyel Hastalık Etmenlerine Karşı Antibakteriyel Etkinliği

<b>Bakteriyel etmenler ve %engellenme</b>		
<b>Ana bileşenler ve dozlar*</b>	<b><i>Psp</i></b>	<b><i>Cff</i></b>
Carvacrol 1x	100	100
Carvacrol 2x	100	100
Carvacrol 3x	100	100
<i>trans</i> -anethole 1x	1.3	4.5
<i>trans</i> -anethole 2x	4.2	7.2
<i>trans</i> -anethole 3x	6.3	11.2
1,8 cineole 1x	5.4	100
1,8 cineole 2x	27.6	100
1,8 cineole 3x	72.1	100

\* Dozlar ana bileşenin test edildiği bakteriye karşı minimum engellemeyi sağlayan dozdaki oran(1x), iki (2x) ve 3 katı (3x) olmak üzere kullanılmıştır.

\*\* Antibakteriyel etkinlik mikro seyreltme yöntemi ile belirlenmiştir. Farklı dozlarda uçucu yağ bileşenleri içeren bakteri süspansiyonları 48 saat inkübasyona bırakılmış ve buradan alınan 100 µl süspansiyon yayıldıkları petri kabında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen değerler 5 farklı petri kutusunda gelişen bakteri kolonilerinin logaritmik değerlerinin ortalaması olup, % engelleme=  $(K_k - U_k) / K_k \times 100$  formülü ile hesaplanmıştır.  $K_k$ =kontrol deki koloni sayısı;  $U_k$ =uygulama sonucunda gelişen koloni sayısını ifade eder. Deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test,  $P \leq 0.01$ ).

Özetle çalışmalarda kullanılan 3 farklı uçucu yağında bulunan ana bileşenler içerisinde en yüksek bulunma oranına sahip 3 farklı ana bileşikler arasında en yüksek antibakteriyel etkinlik, origanum uçucu yağının ana bileşeni olan carvacrol tarafından gösterilmiştir. Her ne kadar test edildiği bakteri türüne göre değişiklik gösterse de carvacrol'u 1,8-cineole izlemiştir. Rezene uçucu yağının ana bileşeni *trans*-anethole'ün ise etkinliğinin çok düşük olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan bitki uçucu yağların kimyasal bileşenleri ile antibakteriyel potansiyellerinin belirlendiği araştırma sonuçlarına bakıldığında söz konusu bitki uçucu yağların antibakteriyel potansiyellerinin içerilerinde yüksek düzeyde bulunan carvacrol gibi fenolikler ve terpen'lerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Söz konusu ana bileşiklerden olan carvacrol (Sivropoulou ve ark., 1996; Aligiannis ve ark., 2001;

Lambert ve ark., 2001; Salgueiro ve ark., 2002; Edris ve Farrag, 2003; Azaz ve ark., 2005; Chami ve ark., 2005; Faleiro ve ark., 2005)'ün farklı bakteriyel ve fungal hastalık etmenlerine karşı antimikrobiyal etkinlikleri önceden yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Nostro ve ark. (2004) origanum yağının yanı sıra ana bileşenlerinden carvacrol ve thymol'ün antibiyotiğe dayanıklı birçok insan patojeni bakteriyel etmene karşı oldukça yüksek düzeyde antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bitki uçucu yağ ve ana bileşenlerinin bakteri hücrelerinin morfolojik yapılarında önemli düzeylerde bozulmalara neden oldukları yapılan elektron mikroskobu çalışmaları ile de teyit edilmiştir (Bennis ve ark., 2003).

Uçucu yağların içerisinde ana bileşen olarak yer alan (carvacrol, camphor, 1,8-cineole ve *trans*-anethole gibi) kimyasalların bazı patojenlere karşı doğrudan antimikrobiyal etkenlikten sorumlu etken olmadığı, bunların yağ içerisinde daha düşük oranlarda bulunan diğer kimyasal bileşenlerle ( $\gamma$ -terpinene, linalool vb.) sinerjik etkiye girerek test edildikleri mikroorganizmalara karşı etkinlik gösterdikleri yapılan önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Hinou ve ark., 1989; Zakarya ve ark., 1993; Sivropoulou ve ark., 1996; Chalchat ve ark., 1997; Cimanga ve ark., 2002; Grierson ve Afolayan, 2005; Cha, 2005; Santoyo ve ark., 2005). Cimanga ve ark. (2002) ile Zakarya ve ark. (1993) iki farklı *Eucalyptus* türünde ana bileşen olarak yer alan 1,8-cineole ve  $\alpha$ -pinene her iki bitki yağında da aynı oranda bulunmasına rağmen, bu yağların test edildiği aynı bakteri türüne karşı önemli düzeyde antibakteriyel etkinlikte bulduklarını bildirmişlerdir.

Araştırmacılar antibakteriyel etkinlikte gözlenen bu farklılığın her iki yağın kimyasal bileşenlerinde tespit edilen fakat düşük oranlarda yer alan farklı kimyasal bileşiklerden kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir. Hocine ve ark. (2003) *Ammoides pusilla* isimli bitkiden elde edilen uçucu yağın ana bileşenlerinden biri olan  $\gamma$ -terpinene'nin test edilen insan patojeni, bakteriyel ve fungal hastalık etmenlerine (*Serratia marcescens*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsilla pneumontae*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *mosprunorum*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*) karşı tek başına veya sinerjik olarak antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Söz konusu bileşenlerin fitopatojen hastalık etmeni olan *Botrytis cinerea*'ya karşıda tek başına veya sinerjik olarak antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Wilson ve ark. 1997). Adam ve

ark. (1998) *Origanum vulgare* ve *Lavandula angustifolia* bitki uçucu yağlarının ana bileşenleri olan carvacrol, linalool, 1,8-cineole, camphor ve  $\alpha$ -terpinene bileşenlerinin antifungal etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında carvacrol dışında diğer bileşenlerin tek başlarına kullanıldığında oldukça düşük oranda antifungal özellik gösterdiğini bildirmişlerdir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma ile Hatay ilinde doğal olarak yetişen tıbbi bitkilerden Suriye kekiği (*O. syriacum*), rezene (*F. vulgare*) ve defne (*Laurus nobilis*) bitkilerinden elde edilen uçucu yağ ve bu yağların ana bileşenlerinin (carvacrol, *trans*-anethole ve 1,8-cineole) fasulye bakteriyel hastalık etmenleri *Psp* ve *Cff* ile toprak kökenli fungal hastalık etmelerinden *Sclerotinia rolfisii*, *R. solani* ve *M. phaseolina*'ya karşı kimyasal mücadeleye alternatif bir yöntem olarak yararlanabilme olanakları *in vitro* koşullarında araştırılmış ve sonuçta bitkilerden elde edilen uçucu yağların ve bu yağlarda en yüksek düzeyde bulunan ana bileşenlerinin test edildikleri bakteri ve fungal etmenlerinin gelişimi üzerine etkinlikleri ortaya konulmuştur. Origanum uçucu yağı ve ana bileşeni olan carvacrol'un defne ve rezene uçucu yağına göre daha düşük konsantrasyonlarda etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Bitki uçucu yağlarının antifungal etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, bitkilerden elde edilen uçucu yağların buhar ve değme etkilerinin fungus misellerinin gelişimi üzerine etkinlikleri incelenmiş olup elde edilen sonuçlara göre uçucu yağların buhar fazının değme fazine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Agar disk difüzyon testi uçucu yağlara karşı en duyarlı bakteriyel etmenin Gram pozitif bakteri olan *Cff* nin olduğu belirlenmiştir. Yağlar içinde origanum uçucu yağının defne ve rezene uçucu yağına oranla daha yüksek düzeyde antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Uçucu yağların ana bileşenlerin test edildiği bakteri izolatlarına karşı gösterdiği antibakteriyel etkinliklerine bakıldığında carvacrol'un origanum uçucu yağının etmenlere karşı göstermiş olduğu antibakteriyel etkinlikten sorumlu bileşik olduğu; defne uçucu yağının ana bileşeni olan 1,8-cineole'un *Cff*'e karşı antibakteriyel etkinlikten sorumlu bileşen olurken, *Psp*'ya karşı tek başına sorumlu etkin bileşen olmadığı; rezene uçucu yağının ana bileşeni olan *trans*-anethole'un ise her iki bakteri izolatına karşı uçucu yağın göstermiş olduğu antibakteriyel etkinlikten sorumlu ana bileşen olmadığı belirlenmiştir.

Bu durum 1,8-cineole ve *trans*-anethole'un etkinliğini gösteremediği izolatlarına karşı antibakteriyel etkinlikten 1. derecede sorumlu bileşen olmadığını göstermektedir. Bazı bitki uçucu yağlarının ana bileşenlerinin yağda buldukları orana göre belirlenen konsantrasyonlarda antibakteriyel etkinlik göstermemesinin nedeni yağın içerisinde

düşük oranda bulunan diğer bileşenlerin eksikliğinden kaynaklanabilir. Benzer şekilde sonuçlar daha önceden farklı bitki uçucu yağları ile yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir

Özetle, denemelerde kullanmış olan uçucu yağların test edilen tohum kökenli bitki bakteriyel etmenlerin yanı sıra toprak kökenli fungal hastalık etmenleri üzerinde etkili olduğu açıkça görülmektedir. Bu yağlardan özellikle *O. syriacum* uçucu yağının ve bu yağın ana bileşeni olan carvacrol'un patojenlerin gelişimi üzerine etkileri oldukça ümit vericidir. Bitki uçucu yağların uygulamaya aktarılması için bazı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Özellikle tohum kökenli bakteriyel hastalık etmenlerine karşı uygulanan sıcak suya daldırma yönteminde sıcak suyun tohum çimlenm kapasitesi üzerine olan olumsuz etkinliği, suyun sıcaklığını düşürüp içerisine uçucu yağların eklenmesi ile giderilebileceği düşünülmektedir. Diğer uygulama şekli uçucu yağların suda çözünürlüğünü sağlayıp, damla sulama ile bitkilerin köklerine verilmesi ile toprak kökenli fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı mücadelede kullanılabilir. Benzer şekilde özellikle solarizasyon çalışmalarında toprağa verilmesi ile gerek fitopatojen bakteriyel ve fungal etmenlere, gerekse nematod ve yabancı ot tohumları üzerine olan etkinliği araştırılabilir.

Araştırmamızda kullanılan bitkilere benzer bitkilerin de patojenler üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin olabileceği ihtimali üzerinde durulup, antimikrobiyal etkinliği olabilmesi muhtemel diğer bitkilerin araştırılması konusunda daha kapsamlı araştırmalar yapılabilir. Bu bitkilerden elde edilecek uçucu yağ ve ekstraktların doğal dengeye zarar vermemesi nedeniyle yapılacak preparat çalışmaları sonucunda geliştirilen formülasyonların zirai ilaçların yerine kullanılabilmesi kuvvetli ihtimaldir. *In vitro* etkinliğini araştırdığımız bitki uçucu yağlarının yukarıda belirtilen *in vivo* denemeleri yapılarak uçucu yağların tarla ve sera koşullarındaki etkinliklerinin araştırılması bu konuda yapılan çalışmaların geliştirilmesi üzerine ve geliştirilen preparatların hastalıklarla mücadelede kullanılması sonucunda zirai üretime katkıda bulunacağı açıkça görülmektedir. Ülkemizde ve özellikle Hatay ili ve çevresinde bu tür tıbbi bitkilerin doğal olarak yetiştiği dikkate alınacak olursa, çalışmalarımıza benzer konulara yönelik araştırmaların artması muhtemeldir. Artan bilimsel çalışmalara paralel olarak yöre halkı tarafından doğadan bilinçsizce toplanan bu bitkilerin korunmaya alınması, bunun yanında bu tür antimikrobiyal etkinliği yüksek olan bitkilerin özellikle

alternatif kültür bitkisi olarak yetiştiriciliğinin teşvik edilmesi, gelecekte bu konu da yapılacak yeni çalışmalara temel teşkil etmesi açısından önemlidir.



**KAYNAKLAR**

- Abou-jawdah, Y., Sobh, H., and Salameh, A. 2002. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. **J. Agric. Food Chem.**, 50: 3208-3213.
- Agarwal, I., Mathela, C.S., and Sinha, S. 1979. Studies on the antifungal activity of terpenoids against *Aspergilli*. **Indian Phytopathology**, 32:104-105.
- Ağsakallı, A., ve Olgun, M. 2001. Kuru fasulyede iklim, hastalık ve verim ilişkisi. **Anadolu**, 11: 80-90.
- Alice, D., and Rao, A.R. 1987. Antifungal effects of plant extracts on *Drechslera oryzae* in rice. **International Rice Research Newsletter** 12:28
- Anonim, 2007. **İlimizin önemli tarımsal ürünleri ve üretim miktarları**. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Hatay İl Müdürlüğü.
- Amadioha, A.C. 2000. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. **Crop Protection** 19:287-292
- Basım, H., Yegen, O., and Zeller, W. 2000. Antimicrobial effects of essential oil of *Thymbra spicata* L.var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 279: 279-284.
- Benjlalı, B., Tantaoui-Eleraki, A., Ayadı, A., and Ihlal, M., 1984. Method to study antimicrobial effects of essential oil application to the antifungal activity of six Moroccan essences. **Journal of Food Protection**, 47: 748-752.
- Benlioğlu, K., Ozakman, M. and Onceler, Z. 1994. Bacterial blight of beans in Turkey and resistance to halo blight and common blight. **9<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union**, September 18-24, Kusadası-Aydın, pp. 547-550, Turkey.
- Bianchi, A., Zambonelli, A., Zechini D'aulerio, A., Bellesia, F., 1997. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Plant Dis.** 81: 1241-1246.
- Bletsos, F.A. 2005. Use of grafting and calcium cyanamide as alternatives to methyl bromide soil fumigation and their effects on growth, yield, quality and fusarium wilt control in melon. **Journal of Phytopathology**, 153:155-161.
- Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L. M. and Hmamouchi, M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. **Journal of Ethnopharmacology**, 89: 165-169.
- Bowers, J. H., and Locke, J. C., 2004. Effect of formulated plant extract and oils on population density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of *Phytophthora* blight in the greenhouse. **Plant Disease**, 88: 11-16.
- Capone, W., Mascia, C., Melis, M., and Spanedda, L., 1988. Determination of terpenic compounds in the essential oil from *Satureja thymbra* L. growing in Sardinia. **Journal of Chromatography**, 457, 427-430.
- Ceylan, A., Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ İçerenler), Ege üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları No: 481 Bornova-İZMİR ,(1987) , No: 48.

- Cottingham, C. 1981. Numbers and distribution of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soils of South Carolina. **Plant Disease Reporter**, 65: 355-356.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., and 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.
- Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B. 1973. Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia bataticola*) from different regions. **Phytopathologische Zeitschrift**, 76: 200–204.
- Di Primo, P., Gamliel, A., Austerweil, M., Steiner, B., Beniches, M., Peretz-Alon, I., and Katan, J. 2003. Accelerated degradation and consequences for pathogen control. **Crop Protection**, 22: 635-646.
- Dixon, G.R. 1984. **Vegetable Crop diseases**. Macmillan, London.
- Duniway, J.M. 2002. Status of chemical alternatives to methyl bromide for preplant fumigation of soil. **Phytopathology**, 92: 1337- 1343.
- Dönmez, M.F. 2004. **Erzurum ve Erzincan illerinde fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) görülen bakteriyel hastalık etmenlerinin tanınması ve *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ve *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ye karşı çeşitli fasulye genotip/varyeteleri**. Doktora tezi, Atatürk Üniv., Fen Bilimleri Enst., 305 s. Erzurum
- Frick, A., Zebarth, B.J., and Szeto, S.Y. 1998. Behavior of the soil fumigant methyl isothiocyanate in repacked soil columns. **J. Environ.Qual.** 27:1158-1169.
- Fourie, D. 2002. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. **Journal of Phytopathology**, 150: 220–226.
- Garrett, K.A., and Schwartz, H.F. 1998. Epiphytic *Pseudomonas syringae* on dry beans treated with copper-based bactericides. **Plant Disease**, 82: 30-35.
- Gilbertson, R.L., Rand, R.E. and Hagedorn, D.J. 1990. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in bean debris. **Plant Disease**, 74: 322–327.
- Goszczyńska, T., and Serfontein, J.J. 1998. Milk–Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Journal of Microbiological Methods**, 32: 65–72.
- Guerin, T.F., Mondido, M., McClenn, B. and Peasley, B. 2001. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, 32: 340-345
- Hall, R. (ed.), 1991. **Compendium of bean diseases**. APS Press, St. Paul, USA. 102 pp.
- Harper, S., Zewide, N., Brown, I.R. and Mansfield, J.W. 1987. Histological, physiological and genetic studies of the responses of leaves and pods of *Phaseolus vulgaris* to the races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 31: 153–172
- Hildebrand, D.C., Schroth, M.N. and Sands, D.C. 1988. *Pseudomonas*. (N.W. Schaad, Editör). In: **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 2nd edn, The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 81–93, USA.

- Hirano, S.S., Rouse, D.I., Clayton, M., and Upper, C.D. 1995. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and bacterial brown spot of snap bean: a study of epiphytic phytopathogenic bacteria and associated disease. **Plant Disease**, 79: 1085–1093.
- Holliday, P., and Punithalingam, E. 1976. *Macrophomina phaseolina*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. **IMI Descriptions of Fungi and Bacteria**. 28, Sheet 275.
- Jones, R.K. and Belmar, S.B. 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean and other crops grown in rotation with rice in Texas. **Plant Diseases**, 72: 1004-1010.
- Kahveci, E., and Maden, S. 1994. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by Bacteriophages. **Journal of Turkish Phytopathology**, 23: 79-85.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., and Ilcim, A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* celak from Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, 76: 183-186.
- Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., and Mete, E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. **Bioresource Technology**, 99: 8788–8795.
- Legard, D. E., and Schwartz, H. F. 1987. Sources and management of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* epiphytes on dry beans in Colorado. **Phytopathology** 77:1503-1509.
- Lelliot, R.A., and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece, Editor). In: **Methods in plant pathology**. Vol 2, Blackwell Scientific Publications. pp. 176-177, Oxford.
- Martin, F.N. 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. **Annu. Rev. Phytopathol.** 41:325-350.
- McGovern, R.J., Vavrina, C.S., Noling, J.W., Datnoff, L.A., and Yonce, H. 1998. Evaluation of application methods of Metham sodium for management of fusarium crown rot and root rot in tomato in southwest Florida . **Plant Dis.** 82: 919- 923.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. 2000. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.** 267: 5421–5426.
- Ozcan, M. and Boyraz, N., 2000. Antifungal proerties of some herb decoctions. **European Food Resource and Technol**, 212: 86-88.
- Palomino, J.-C., A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, and F. Portaels. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46:2720–2722.
- Ravid, U. and Putievsky, E. 1985. Composition of essential oils of *Thymbra spicata* and *Satureja thymbra* chemoyhypes. **Planta medica**, 4: 337-338.
- Rusuku, G., Buruchara, R. A., Gatabazi, M., and Pastor-Corrales, M.A. 1997. Occurrence and distribution in Rwanda of soilborne fungi pathogenic to the common bean. **Plant Disease**, 81:445-449.

- Palleroni, N.J., 1984. Genus I *Pseudomonas* Migula 1894. (N.R. Krieg, and J.G. Holt, Editör). In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins, pp 141–199, Baltimore.
- Punja, Z.K., 1985. The biology, ecology and control of *rolfisii*. **Annual Review of Phytopathology**, 23: 97-127.
- Saeed, I.am., Rouse, D.I., Harkin, J.M., and Smith, K.P. 1997. Effects of soil water content and soil temperature on efficacy of metham-sodium against *Verticillium dahliae*. **Plant Dis.** 81: 773-776.
- Saettler, A.W., 1989. Common bacterial blight. (HF Schwartz, and MA Pastor-Corrales, Editör). In: **Bean Production Problems in the Tropics**. 2nd edn, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, pp.261–283, Colombia.
- Saettler, A.W., 1991. Diseases caused by bacteria. (R. Hall, Editör). In: **Compendium of Bean Diseases**. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 29–32, USA.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analyses. (Z. Klement, K. Rudolph, D.C. Sands, Editör). In: **Methods in Phytobacteriology**. Academiai Kiado, Budapest, pp. 199– 204, Hungary.
- Schaad, N.W. 2001. Initial identification of common genera. (N.W. Schaad, J.B. Jones, W. Chun, Editör). In: **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**, 3rd edn, The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, St Paul, pp. 1–15, USA.
- Schaad, N.W., and Stall, R.E, 1988. *Xanthomonas*. (N.W. Schaad, Editör). In: **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 2nd edn, The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 81–93, USA.
- Schneider, K.A. and Kelly, J.D. 2000. A greenhouse screening protocol for *Fusarium* root rot in bean. **Hortscience**, 35: 1095-1098.
- Schwartz, H.F., 1980. Bacterial diseases. (H.F. Schwartz, and G.E. Galvez, Editör). In: **Bean Production Problems: Disease, Insect, Soil and Climatic Constraints of Phaseolus vulgaris**. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali,. pp. 55–187, Colombia.
- Serfontein, J.J., 1994. Occurrence of bacterial brown spot of dry beans in the Transvaal province of South Africa. **Plant Pathology**, 43: 597–599.
- Sippell, D.W., Hall, R. 1982. Effects of pathogen species, inoculum concentration, temperature, and soil moisture on bean root rot and plant growth. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 4: 1–7.
- Smith, I.M., Dunez, J. Lellioth, R.A. Phillips, P.H. and Archer, S.A. (Editör). 1988. European handbook of plant disease. Blackwell Scientific Publications, 623 pp, Oxford.
- Soylu, E.M., Yigitbaş, H., Tok, M.F., Soyly, S., Kurt, Baysal, O., Kaya., and A.D. 2005a. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soilborne fungal pathogens. **Z Pflanzenk Pflanzen.** 112:229-239.
- Soylu, E.M., Tok, M.F., Soyly, S., Kaya., A. D., and Evrendilek G.A. 2005b. Antifungal activities of the essential oil on post- harvest disease agent *Penicillium digitatum*. **Pakistan J. Biol Sci.** 8: 25-29.
- Soylu, E.M., Soyly, and S., Kurt, Ş. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**, 161: 119-128.

- Urech, P.A., Staub, T., and Voss G. 1997. Resistance as a concomitant of modern crop protection. **Pesticides Sci.**, 51: 227.
- Vaara, M. 1992. Agents that increases the permeability of the outer membrane. **Microbiol. Rev.**, 56: 395-411.
- Valarini, P.J., and Spadotto, C.A. 1995. Identification of survival niches of phytopathogens in irrigated agriculture of Guaira, Sao Paulo State. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, 30: 1239-1243.
- Van Der Plaats-Niterink, J., 1981. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology** 21: 1-140.
- Voloudakis, A.E., Reignier, T.M., and Cooksey DA. 2005. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, 71: 782-789.
- Temizel, M., and M. Ertunc, F. 1992. Investigations on the detection of bean diseases of Van province. **Journal of Turkish Phytopathology** 21: 25-31.
- Türküsay, H., and Onoğur, E., 1998. Bazı Bitki Ekstraktların *in vitro* Antifungal Etkileri Üzerine Araştırmalar. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 22: 267-271.
- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A. and Wisniewski., M.E., 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant. Dis.** 81: 204-210.
- Willetts, H.J., and Wong, J.A.L. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Botanical Review**, 46:101-165.
- Yiğit, F. 2002. Isolation of bacteria antagonistic to some fungal pathogens causing root rot of bean from the rhizoplane and investigation on their potential for biological control. **Journal of Turkish Phytopathology** 31: 71-77.
- Yücel, S. ve Güncü, M. 1994. Akdeniz bölgesi yemeklik baklagillerinde görülen fungal hastalıklar. **Bitki Koruma Bulteni** 31: 19-30.
- Yucel, S., Elekçioğlu, İ.H., Can, C., Söğüt, M.A., and Özarslandan, A. 2007. Alternative treatments to Methylbromide in Eastern Mediterranean region of Turkey. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 31:47-53.
- Yonucu, N. 1997. Bitki Ekstrakt ve Kompostlarının Çukurova Bölgesinde Sorun Olan Bazı Fungal Hastalıklara Karşı Antifungal Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniv., Fen Bilimleri Enst., Adana.
- Yoshii, K. 1980. Common and fuscous blights. (H.F. Schwartz, and G.E. Galvez, Editör). In: **Bean Production Problems: Disease, Insect, Soil and Climatic Constraints of *Phaseolus vulgaris***. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia pp.157-172.
- Zambonelli, A., Zechini D'aulerio, A., Bianchi, A., and Albasin, A., 1996. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **J. Phytopathol.** 144: 380-383.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamasında değerli fikir ve katkılarıyla çalışmalarımı yönlendiren sayın hocam Doç. Dr. E. Mine SOYLU'ya sonsuz teşekkür ederim. M.K.Ü Fitopatoloji laboratuvarlarındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Şener KURT Yrd. Doç. Dr. Sibel DERVİŞ 'e çalışmanın bakteriyel etmenlerle yapılan kısmındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Soner SOYLU, bakteriyel etmenlerin tanılanmasında yapmış oldukları değerli katkılarından dolayı Prof.Dr. Fikrettin ŞAHİN (Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İSTANBUL) ve Yrd.Doç.Dr. M. Figen DÖNMEZ'e (Atatürk Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü, ERZURUM) teşekkür ederim. Patojen kültürlerin korunmasında ve laboratuvar çalışmalarımda yardımlarından dolayı Araş.Gör. M. Fatih TOK, bakteriyoloji çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Şenay BALCI'ya ayrıca teşekkür ederim. Tez çalışmalarına sağladığı maddi desteğinden dolayı M.K.Ü Araştırma Fonuna da teşekkür ederim.

Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürümüz Dr. İnanç ÖZGEN'e Fitopatoloji şube şefi Ender ÖĞÜT'e Osman ÇİFTÇİ'ye ve görev yapan tüm mesai arkadaşlarıma, tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman bana desteklerini ve fedakarlıklarını esirgemeyen eşime ve çocuklarıma sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Eskişehir’de doğdum. İlk, orta eğitimimi Eskişehir’de, lise eğitimimi ise Ankara Laborant Meslek Lisesi’nde tamamladıktan sonra 1995 yılında Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü’nde laborant olarak göreve başladım.2002 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesini bitirdim. 2006 yılında M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimime başladım. Halen Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü’nde meyve hastalıkları laboratuvarında çalışmaktayım.